mgr inż. Joanna Kanabus

Wpływ modelowych procesów przetwórczych stosowanych w technologii żywności na stabilność i profil kannabinoidów oraz terpenów z Cannabis sativa L. var. sativa

Effect of model processing used in food technology on the stability and profile of cannabinoids and terpenes from *Cannabis sativa* L. *var. sativa*

Praca doktorska Doctoral thesis

Promotor:

dr hab. inż. Marek Łukasz Roszko, prof. IBPRS-PIB Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Recenzenci:

dr hab. inż. Rafał Wołosiak, prof. SGGW Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie Instytut Nauk o Żywności/Katedra Technologii i Oceny Żywności Zakład Oceny Jakości Żywności

dr hab. inż. Alicja Sułek Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy Zakład Uprawy Roślin Zbożowych

> dr hab. inż. Andrzej Baryga, prof. PŁ Politechnika Łódzka Katedra Cukrownictwa i Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności

Warszawa, styczeń 2025

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi – Panu dr hab. inż. Markowi Łukaszowi Roszko, prof. IBPRS-PIB za możliwość rozwoju moich zainteresowań naukowych, poparcie nowych pomysłów i wspieranie przy ich realizacji, mobilizację i merytoryczną pomoc przy przygotowaniu niniejszej pracy.

Współpracownikom z IBPRS-PIB, w szczególności Koleżankom i Kolegom z Zakładu Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności za pomoc i życzliwą atmosferę.

Mojej Rodzinie i Najbliższym za motywację, wyrozumiałość i nieprzerwane wsparcie.

Tytuł / stopień naukowy Promotora: dr hab. inż. / prof. IBPRS-PIB Imię i nazwisko Promotora: Marek Łukasz Roszko Dziedzina naukowa: nauki rolnicze Dyscyplina naukowa: technologia żywności i żywienia

Oświadczenie Promotora o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani

mgr inż. Joanny Kanabus (tytuł/stopień / imię i nazwisko Autora rozprawy doktorskiej)

pt.: "Wpływ modelowych procesów przetwórczych stosowanych w technologii żywności na stabilność i profil kannabinoidów oraz terpenów z *Cannabis sativa* L. *var. sativa*."

Jako Promotor przyjmuję niniejszą rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora w:

- dziedzinie nauk: nauki rolnicze

- dyscyplinie naukowej: technologia żywności i żywienia

(data i podpis Promotora)

Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

Świadom(a) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data..... Podpis autora rozprawy doktorskiej

Streszczenie

Wpływ modelowych procesów przetwórczych stosowanych w technologii żywności na stabilność i profil kannabinoidów oraz terpenów z *Cannabis sativa* L. *var. sativa*

Rośliny Cannabis sativa L. var. sativa wyróżniają się unikatowym profilem związków bioaktywnych (kannabinoidów i terpenów) i mogą stanowić składnik diety człowieka. Kannabinoidy charakteryzują sie potwierdzonym działaniem prozdrowotnym, a współobecne terpeny wspieraja działanie tych związków. Istnieje ryzyko zdrowotne związane z obecnością psychoaktywnego związku Δ^9 -THC, który może być obecny w żywności zawierającej konopie. Nieodpowiednio przygotowane produkty lub niekontrolowane warunki przechowywania żywności wytworzonej z użyciem konopi mogą przyczynić się do obecności tego związku w produkcie przeznaczonym do spożycia. W ramach niniejszej pracy opracowano metodę oznaczania kannabinoidów w świeżych i suszonych elementach rośliny (kwiatostany różnej wielkości, liście), a także w nasionach konopi. Na potrzeby pracy zastosowano techniki chromatografii cieczowej oraz gazowej sprzeżonej ze spektrometria mas. W celu określenia potencjalnych zmian wynikających z różnych warunków suszenia rośliny przeprowadzono doświadczenie z wykorzystaniem 3 metod suszenia (temperatura otoczenia, liofilizacja oraz suszenie konwekcyjne w trzech wariantach temperatury 50, 60 i 70°C). Suszeniu poddano kwiatostany oraz liście konopi. W ramach badań oceniono stopień zmian zawartości sumy oraz poszczególnych kannabinoidów i terpenów w trakcie i po zakończeniu suszenia. Przeprowadzono ocenę stabilności analizowanych związków w modelowych warunkach produkcji żywności fermentowanej oraz wyrobu produktów cukierniczych. Zbadano wpływ procesu fermentacji na stabilność kannabinoidów w fermentowanych napojach mlecznych zawierających 0,5-2% dodatku konopnego (liofilizowany susz konopny, olej konopny oraz etanolowy ekstrakt konopny). Sprawdzono również wpływ warunków wypieku na stabilność kannabinoidów oraz terpenów w ciastkach kruchych zawierających w składzie 1-3% wsadu konopnego w postaci liofilizowanego suszu konopnego. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że warunki suszenia mają wpływ na końcową zawartość i profil analizowanych związków oraz, że zastosowanie wyższej temperatury suszenia przyczynia się do zwiększenia degradacji kannabinoidów. Wykazano wpływ procesu fermentacji na stabilność kannabinoidów w zależności od zastosowanego rodzaju wsadu konopnego. Warunki prowadzenia wypieku produktów piekarniczych wpływają na końcowa zawartość tych związków. Kluczowymi czynnikami determinującymi stabilność kannabinoidów i terpenów w gotowym produkcie są warunki procesu przygotowania wsadu konopnego oraz forma w jakiej wprowadzany jest do produktu.

Słowa kluczowe: kannabinoidy, terpeny, suszenie, fermentacja, pieczenie

Abstract

Effect of model processing used in food technology on the stability and profile of cannabinoids and terpenes from *Cannabis sativa* L. *var. sativa*

Cannabis sativa L. var. sativa plants are characterised by their unique bioactive compounds (cannabinoids and terpenes) and can be a component of the human diet. Cannabinoids are characterised by proven health-promoting effects and the co-present terpenes support the action of these compounds. There are health risks associated with the presence of the psychoactive compound Δ 9-THC, which may be present in cannabis-containing foods. Inadequately prepared products or uncontrolled storage conditions of foods made with hemp can contribute to the presence of this compound in the product for consumption. In this study, a method was developed to determine cannabinoids in fresh and dried plant parts (inflorescences of different sizes, leaves) and hemp seeds. Liquid chromatography and gas chromatography techniques coupled with mass spectrometry were used for the work. To determine the potential changes resulting from different drying conditions of the plant, an experiment was conducted using three drying methods (ambient temperature, freeze-drying, and convection drying at three temperature variants of 50, 60, and 70°C). Cannabis inflorescences and leaves were dried. The study evaluated the degree of change in the content of total and individual cannabinoids and terpenes during and after drying. An assessment of the stability of the analysed compounds under model conditions of fermented food production and confectionery manufacture was carried out. The effect of the fermentation process on the stability of cannabinoids in fermented milk drinks containing 0.5-2% hemp additives (freeze-dried hemp, hemp oil, and hemp ethanol extract) was investigated. The effect of baking conditions on the stability of cannabinoids and terpenes in shortcakes containing 1-3% hemp input in freeze-dried hemp was also examined. The results showed that drying conditions affect the final content and profile of the analysed compounds and that the use of higher drying temperatures contributes to increased cannabinoid degradation. The effect of the fermentation process on cannabinoid stability was shown to depend on the type of hemp input used. The baking conditions of bakery products influence the final content of these compounds. The key factors determining the stability of cannabinoids and terpenes in the finished product are the conditions of the preparation process of the hemp feedstock and the form in which it is introduced into the product.

Keywords: cannabinoids, terpenes, drying, fermentation, baking

SPIS TREŚCI

WSTĘP WVKAZ PUBLIKAC II WCHODZACYCH W SKŁAD DVSFRTAC II	17
HVRRVDOWEJ REDACEJ PODSTAWA DO URIEGANIA SIE O NADANIE	
STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA ORAZ WKŁAD DOKTORANTKI W	
REALIZACJE PRAC WCHODZACYCH W SKŁAD ROZPRAWY	19
1. PRZEGLAD PIŚMIENNICTWA	21
1.1. <i>Cannabis sativa</i> L. <i>var. sativa</i> – charakterystyka rośliny	21
1.2. Kannabinoidy i terpeny – główne metabolity wtórne rośliny	23
1.3. Potencjalne możliwości i ograniczenia wykorzystania rośliny <i>Cannabis sativa</i> L.	ar.
sativa w produkcji żywności	25
1.4. Techniki analityczne wykorzystywane do identyfikacji kannabinoidów i terpenów	28
1.5. Stabilność kannabinoidów i terpenów w matrycach żywnościowych	29
2. CEL, ZAKRES PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	32
3. MATERIAŁ BADAWCZY I METODY BADAŃ	34
3.1. Materiał badawczy	34
3.1.1. Wzorce i odczynniki chemiczne	35
3.2. Metody badań	35
3.2.1. Analiza chromatograficzna i spektometria mas	35
3.2.1.1. Kannabinoidy	35
3.2.1.2. Terpeny i wybrane związki lotne	35
3.2.2. Część technologiczna	37
3.2.2.1. Suszenie wybranych części rośliny Cannabis sativa L. var. sativa	
"Białobrzeskie"	37
3.2.2.2. Modelowe ciastka kruche z dodatkiem wsadu konopnego	37
3.2.2.3. Modelowe fermentowane napoje mleczne z dodatkiem wsadu konopne	go38
3.2.3. Analiza mikrobiologiczna fermentowanych napojów mlecznych z dodatkie	n
wsadu konopnego	38
3.2.4. Pomiar pH fermentowanych napojów mlecznych z dodatkiem wsadu	
konopnego	39
3.2.5. Pomiar składowych barwy ciastek kruchych z dodatkiem wsadu konopnego	39
3.2.6. Ocena sensoryczna modelowych produktów spożywczych	39
3.2.6.1. Fermentowane napoje mleczne	40
3.2.6.2. Ciastka kruche	40
3.2.7. Analiza statystyczna	40

4. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW 41
4.1. Opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania kannabinoidów w
świeżych i suszonych elementach rośliny oraz nasionach Cannabis sativa L
4.1.2. Ocena występowania kannabinoidów w wybranych produktach konopnych 43
4.2. Opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania terpenów oraz ocena wpływu
suszenia elementów rośliny Cannabis sativa L. var. sativa wybranymi metodami na sumę
oraz profil terpenów
4.3. Ocena wpływu suszenia elementów rośliny Cannabis sativa L. var. sativa wybranymi
metodami na sumę oraz profil kannabinoidów 112
4.4. Ocena wpływu procesu pieczenia pieczywa cukierniczego z dodatkiem suszu
pozyskanego z Cannabis sativa L. var. sativa na stabilność termiczną kannabinoidów,
terpenów oraz wybranych związków lotnych137
4.4.1. Pomiar składowych barwy ciastek kruchych z dodatkiem wsadu konopnego 141
4.4.2. Ocena sensoryczna ciastek kruchych zawierających wsad konopny 142
4.5. Ocena wpływu procesu fermentacji mlekowej zachodzącej podczas produkcji
fermentowanego napoju mlecznego zawierającego wsad konopny na stabilność
kannabinoidów, terpenów oraz wybranych związków lotnych 147
4.5.1. Ocena liczby żywotnych komórek bakterii kwasu mlekowego w gotowym
produkcie oraz w czasie przechowywania chłodniczego153
4.5.2. Ocena zmiany wartości pH podczas produkcji i przechowywania fermentowanego
napoju mlecznego zawierającego wsad konopny 155
4.5.3. Ocena sensoryczna fermentowanych napojów mlecznych zawierających wsad
konopny
5. STWIERDZENIA I WNIOSKI
6. SPIS LITERATURY 191
ANEKS

Wykaz stosowanych skrótów

CBD - kannabidiol CBDA – kwas kannabidiolowy CBG - kannabigerol CBGA – kwas kannabigerolowy CBL - kannabicyklol CBLA - kwas kannabicyklolowy CBC - kannabichromen CBCA – kwas kannabichromenowy CBN - kannabinol CBNA – kwas kannbinolowy CBDV - kannabidiwarin CBDVA – kwas kannabidiwarynowy Δ^9 -THC - Δ^9 -tetrahydrokannbinol Δ^9 -THCA-A – kwas Δ^9 -tetrahydrokannabinolowy Δ^9 -THCV - Δ^9 -tetrahydrokannbiwarin Δ^9 -THCVA - kwas Δ^9 -tetrahydrokannabiwarynowy Δ^{8} -THC – Δ^{8} -tetrahydrokannbinol EFSA – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (z ang. European Food Safety Authority)

EIHA – Europejskie Stowarzyszenie Konopi Przemysłowych

GOT - geranylotransferaza oliwetolanowa

LOQ – granica oznaczalności (z ang. limit of quantification)

MC – poziom wilgotności (ang. moisture content)

QDA - ilościowa analiza opisowa (ang. Quantitative Descriptive Analysis)

UHPLC-HESI-MS – ultra-wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze

spektometrem mas Orbitrap z podgrzewanym źródłem jonów

WSTĘP

Rynek produktów zawierających w swoim składzie konopie lub pozyskane z nich ekstrakty, mąkę lub olej, dynamicznie się rozwija. Produkty tego rodzaju wymagają ścisłej kontroli, aby zapewnić ich bezpieczeństwo zdrowotne. Rośliny konopi posiadają licznie udokumentowane właściwości prozdrowotne, przypisywane charakterystycznym substancjom biologicznie aktywnym. Konopie zawierają kannabinoidy a pośród nich psychoaktywny Δ^9 -THC. Ostatni związek nie jest pożądanym składnikiem żywności. Wydane w 2023 roku Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności reguluje poziom Δ^9 -THC jedynie w nasionach, produktach zawierających nasiona konopne oraz w olejach konopnych. Natomiast podczas produkcji żywności tzw. konopnej warunki suszenia, dalszego przetwarzania oraz przechowywania są istotnymi czynnikami wpływającymi na stabilność kannabinoidów i terpenów. Produkty zawierające konopie są dodatkowo uznawane za "nową żywność", która wymaga szczególnej kontroli i analizy substancji bioaktywnych w niej obecnych [Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283].

Postawione w pracy hipotezy badawcze nawiązują do elementów poznawczych dotyczących określenia stabilności wybranych kannabinoidów oraz możliwości ograniczenia degradacji tych związków podczas przetwarzania żywności zawierającej elementy rośliny konopi. Opracowanie odpowiednich metod i warunków przetwarzania (np. suszenia) materiału roślinnego oraz odpowiednich warunków przechowywania dla produktów na bazie konopi jest istotne z uwagi na programowane funkcje i skład produktów. Pomimo, że istnieje szereg doniesień dotyczących stabilności poszczególnych kannabinoidów w czystej postaci, brakuje danych dotyczących stabilności tych związków w matrycy żywnościowej podczas przetwarzania jak i w gotowym produkcie.

W ramach pracy dokonano systematycznego przeglądu dostępnych danych literaturowych dotyczących możliwości wykorzystania roślin konopi w produkcji żywności. Zebrano dane dotyczące stabilności wybranych związków bioaktywnych (kannabinoidów oraz terpenów). Stabilność substancji bioaktywnych była główną przesłanką do podjęcia badań w ramach niniejszej pracy z uwagi na ocenę możliwości wytwarzania żywności funkcjonalnej z konopi. Określenie zmian profilu badanych związków w warunkach modelowych procesów przetwórczych stosowanych w technologii żywności jest niezwykle istotne do projektowania nowych produktów. Realizacja założeń pracy możliwa była dzięki wykorzystaniu nowoczesnych instrumentalnych metod badawczych, w tym spektrometrii mas.

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD DYSERTACJI HYBRYDOWEJ BĘDĄCEJ PODSTAWĄ DO UBIEGANIA SIĘ O NADANIE STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA ORAZ WKŁAD DOKTORANTKI W REALIZACJĘ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

[P1] Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M. Modrzewska, M., Pierzgalski, A. (2021) Cannabinoids – characteristics and potential for use in food production. Molecules 26,(21), 6723. IF₂₀₂₀=4.412, MNiSW/MEiN₂₀₂₀= 140 pkt

[P2] Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M. (2023) The development, validation, and application of a UHPLC-HESI-MS method for the determination of 17 cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *var. sativa* plant material. Molecules 28,(24), 8008. IF₂₀₂₃=4.6, MNiSW/MEiN₂₀₂₃= 140 pkt

[P3] Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M. (2024) Effect of selected drying methods on cannabinoids profile of *Cannabis sativa* L. *var. sativa* inflorescences and leaves. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 74, 4, 1-11. IF₂₀₂₃=2.3, MNiSW/MEiN₂₀₂₄= 100 pkt

[P4] Kanabus, J., Bryła, M., Kycia, K., Markowska, J., Roszko, M. (2024) Exploring the presence of cannabinoids in hemp-infused fermented milk drinks: An analysis of pre- and post-fermentation levels. Molecules, 29,(21), 5056. IF₂₀₂₄=4.2, MNiSW/MEiN₂₀₂₄= 140 pkt

Sumaryczny współczynnik odziaływania (Impact Factor) publikacji wchodzących w skład cyklu wynosi: 15,512

Sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism MNiSW / MEiN za publikacje wchodzące w skład cyklu wynosi: **520 pkt**

IF oraz liczbę punktów MNiSW / MEiN obliczono na podstawie danych z roku, w którym ukazała się publikacja lub ostatniego roku, dla którego dane te zostały opublikowane.

Badania stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy zrealizowano w ramach projektu statutowego IBPRS-PIB nr 159-01-ZA, którego doktorantka była głównym wykonawcą.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji 1 **[P1]**: przeprowadzenie badań literaturowych; przygotowanie tekstu manuskryptu; przygotowanie tabel i rycin; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy.

Wkład doktorantki w postanie publikacji 2 **[P2]**: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania kannabinoidów techniką LC-MS; wykonanie analiz chromatograficznych badanych próbek; analiza i dyskusja wyników; wizualizacja danych; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie abstraktu graficznego; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji 3 **[P3]**: opracowanie koncepcji badań; przeprowadzenie badań; wykonanie analiz chromatograficznych badanych próbek; analiza

i dyskusja wyników; wizualizacja danych; przygotowanie manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji 4 **[P4]**: opracowanie koncepcji badań; przygotowanie modelowych produktów spożywczych z dodatkiem wsadu konopnego; przeprowadzenie badań; wykonanie analiz chromatograficznych badanych próbek; analiza i dyskusja wyników; wizualizacja danych; przygotowanie manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy.

1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

1.1. Cannabis sativa L. var. sativa – charakterystyka rośliny

Roślina *Cannabis sativa* L. jest jedną z najstarszych roślin uprawianych na świecie. Należy do rzędu *Urticales* i rodziny *Cannabaceae* [Hazekamp i Fischedick 2012]. Rośliny są powszechnie wykorzystywane jako surowiec do produkcji paszy dla zwierząt oraz jako źródło włókna tekstylnego. Z czasem zaczęto je wykorzystywać do produkcji żywności oraz leków. Pierwsze lecznicze zastosowanie konopi w Europie datuje się na XIII wiek. Natomiast działanie przeciwdrgawkowe czy przeciwbólowe potwierdzono dopiero w XIX wieku [Soorni i wsp. 2017]. Za potencjalnie lecznicze właściwości roślin odpowiadają obecne w *Cannabis sativa* L. kannabinoidy a za charakterystyczny smak i zapach odpowiadają terpeny.

Morfologicznie konopie charakteryzują się niewielką liczbą szeroko rozstawionych gałęzi i długimi, dłoniasto rozłożonymi liśćmi. Konopie są przeważnie dwupienne, ale rośliny jednopienne ze względu na lepszą użyteczność rolniczą zastąpiły rośliny dwupienne w Europie. Rośliny żeńskie są odporne na mróz i uprawę w szklarniach. Cannabis sativa L. osiąga wysokość 1-5 m, w zależności od warunków wzrostu [Hazekamp i Fischedick 2012, Pellati i wsp. 2018a, André i wsp. 2020]. Najprostszy podział roślin w obrębie rodzaju to podział na trzy oddzielne gatunki: Cannabis sativa (konopie włókniste), Cannabis indica (konopie indyjskie) i Cannabis ruderalis (uważane za formę dziką) [Hazekamp i Fischedick 2012, Pellati i wsp. 2018a]. Alternatywna klasyfikacja rozróżnia chemotypy Cannabis na podstawie zawartości kannabinoidów. Chemotyp I jest uznawany za leczniczy i zawiera duże ilości psychoaktywnego Δ^9 -THC. Chemotyp II ma właściwości pośrednie między konopiami leczniczymi i włóknistymi. Chemotypy III i IV są włókniste i zawierają duże ilości niepsychoaktywnych kannabinoidów, przy stosunkowo niewielkich ilościach związków psychoaktywnych. Ostatnia grupa (chemotyp V) jest włóknista i nie zawiera kannabinoidów [Pellati i wsp. 2018a]. Ze względu na występowanie w roślinie również psychoaktywnego Δ^9 -THC dostępność i uprawa tych roślin jest ściśle w Europie regulowana i kontrolowana.

Roślina *Cannabis sativa* L. wytwarza małe owoce klasyfikowane botanicznie jako niełupki, ale powszechnie nazywane "nasionami". Niełupki charakteryzują się wysoką zawartością błonnika (27-36 g/100g), tłuszczu (25-35 g/100g), białka (21-28 g/100g) oraz węglowodanów (20-30 g/100g). W nasionach konopi znajdują się również estry kwasów tłuszczowych, amidy, aminy, fitosterole, terpeny. Pod względem żywieniowym są źródłem fosforu, potasu, magnezu, siarki, wapnia, żelaza i cynku, a także witamin A, C oraz E [Citti i wsp. 2018a, Pellati i wsp. 2018, Salami i wsp. 2020, Farinon i wsp. 2020, Alonso-Esteban i wsp. 2020]. Stosunek kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3 w oleju z nasion

konopi wynosi zwykle 2:1 lub 3:1, co jest z punktu widzenia diety uważane za optymalne dla zdrowia człowieka [Bartkiene i wsp. 2016]. Kwas linolowy stanowi ponad połowę całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych (LA, C18:2, n-6). Pozostałe kwasy tłuszczowe obecne w składzie to kwas linolenowy (ALA, C18:3, n-3), kwas oleinowy (OA, C18:1, n-9), kwas palmitynowy (PA, C16:0) i kwas γ-linolenowy (GLA, C18:3, n-6) [Alonso-Esteban i wsp. 2020]. Należy pamiętać, że utrzymanie odpowiedniego stosunku kwasów omega-6 do omega-3 zależy od zastosowanej metody ekstrakcji oleju (zaleca się tłoczenie na zimno), pochodzenia, odmiany i rodzaju nasion [Spano i wsp. 2020]. Białka wchodzące w skład nasion konopi obejmują albuminę, białko globularne i estydynę, których spożycie ma korzystny wpływ na regulację metabolizmu człowieka. Estydyna stanowi 82% całkowitego białka w nasionach konopi [Farinon i wsp. 2020]. Białko to ma wysoką wartość biologiczną, ponieważ jego struktura jest podobna do globulin obecnych w surowicy krwi. Profil aminokwasowy białka z nasion konopi jest porównywalny z profilem jaj kurzych, ale także z profilem białek soi, która charakteryzuje się wysokim stężeniem argininy, glicyny i histydyny [Leonard i wsp. 2019].

Kwiatostany konopi włóknistych mogą stanowić źródło innych związków polifenolowych, których właściwości prozdrowotne są potwierdzone [Tomko i wsp. 2020]. Wśród nich wyróżniamy flawanoidy, które stanowią największą klasę polifenoli i zostały podzielone na sześć głównych podklas: flawonony, flawonole, flawanony, flawanole, izoflawony i antocyjanidyny [Salami i wsp. 2020, Tomko i wsp. 2020]. Związki te stanowią około 10% wszystkich związków bioaktywnych obecnych w konopiach. Grupa flawonoidów izolowanych z kwiatów, liści i pyłków obejmuje m.in. apigeninę, luteolinę, orientynę, kemferol i kwercetynę, ale także kannflawiny A i B, które są metylowanymi izoprenoidowymi flawonami charakterystycznymi dla konopi [Salami i wsp. 2020, Flores-Sanchez i Verpoorte 2008]. W badaniach przeprowadzonych przez André i wsp. [2020], zawartość flawonoidów w kwiatostanach konopi siewnych określono w zależności od fazy kwitnienia. Zaobserwowano, że zawartość związków fenolowych zmniejszała się w miarę rozwoju kwiatów, przy czym odnotowano w kwiatach najwyższą zawartość zebranych we wczesnej fazie kwitnienia. Tilbenoidy to kolejna grupa związków fenolowych, które wykazują ochronną i odstraszającą owady rolę w konopiach. Związki te występują w liściach, łodygach i żywicy konopi. Inne metabolity wtórne Cannabis sativa L. var. sativa to alkaloidy, które wykazują szeroki zakres bioaktywności. Działają jako produkty końcowe metabolizmu jako repelenty zwierząt. Z liści, łodyg i nasion wyizolowano wiele alkaloidów, m.in. cholinę, nurynę, muskarynę i hordeninę [Flores-Sanchez i Verpoorte 2008, Horanin i Bryndal 2017, Salami i wsp. 2020, Wen i wsp. 2020].

1.2. Kannabinoidy i terpeny – główne metabolity wtórne rośliny

Kannabinoidy (fitokannabinoidy) są jednymi z najważniejszych bioaktywnych związków obecnych w konopiach [Pellati i wsp. 2018a]. Klasyfikowane są jako meroterpenoidy z rdzeniami rezorcynowymi zawierającymi łańcuch boczny izoprenylowy, alkilowy lub aralkilowy w pozycji para. Łańcuch boczny alkilowy zwykle składa się z nieparzystej liczby atomów węgla. Kannabinoidy zawierające parzystą liczbę atomów węgla w łańcuchu bocznym roślinach. Cannabis występują bardzo rzadko w sativa L. zwykle wytwarza alkilokannabinoidy, które charakteryzują się ugrupowaniem monoterpenowo-izoprenylowym (C10) i łańcuchem bocznym pentylowym (C5) [Hartsel i wsp. 2016, Gülck i Møller 2020]. Struktura pierścienia pochodzi z pirofosforanu geranylu [ElSohly i wsp. 2017]. Typowa struktura kannabinoidu jest pokazana na **Rycinie 1.**



Rycina 1. Typowa struktura kannabinoidu (np. CBD) zróżnicowana pod względem R (forma kwasowa lub neutralna) oraz długości łańcucha bocznego (opracowanie własne, Kanabus i wsp. 2021].

Fitokannabinoidy są syntetyzowane w trichomach gruczołowych rośliny, występujących głównie w żeńskich kwiatostanach. Nasiona konopi zazwyczaj zawierają bardzo małe ilości kannabinoidów lub wcale ich nie zawierają. Po pęknięciu trichomów gruczołowych, np. pod wpływem wyższych temperatur, na powierzchni rośliny tworzy się lepka powłoka (żywica), która pokrywa wszystkie elementy kwiatostanu, w tym nasiona. Kannabinoidy obecne w żywicy można uznać za zanieczyszczenie nasion. Dotychczas zidentyfikowano ponad 100 związków należących do grupy kannabinoidów obecnych w *Cannabis sativa* L. [Citti i wsp. 2018a, Gülck i Møller 2020]. Uważa się, że kannabinoidy początkowo syntetyzowane są w formie kwasowej, a dopiero w wyniku dekarboksylacji i/lub działania odpowiednich

enzymów ulegają przekształceniu do form obojętnych [Ujváry i Hanuš 2016, Gülck i Møller 2020]. Biosynteza CBGA będącego prekursorem pozostałych kannabinoidów zachodzi w obecności jego prekursorów: kwasu oliwetolowego i pirofosforanu geranylu z udziałem prenylazy difosforanu geranylu - GOT. Enzym ten katalizuje pierwszy etap syntezy kannabinoidów w wyniku którego powstaje CBGA [ElSohly i wsp. 2017, Ujváry i Hanuš 2017, Citti i wsp. 2018a, Leonard i wsp. 2019, Karas i wsp. 2020]. Następnie, po etapie izoprenylacji, aktywuje się cyklaza oksydacyjna, która generuje dalsze reakcje za pośrednictwem Przemiany CBGA katalizowane przez syntazę kwasu specyficznych szlaków. tetrahydrokannabinolowego prowadzą do powstania Δ^9 -THCA-A. Jednak w wyniku aktywności syntazy kwasu kannabidiolowego, transformacja CBGA prowadzi do powstania CBDA, podczas gdy konwersja CBGA katalizowana przez syntazę kwasu kannabichromenowego umożliwia powstanie CBCA. Następnie, w wyniku dekarboksylacji tych związków, może powstać wiele produktów, w tym: Δ^9 -THC, CBD i CBC [Ujváry i Hanuš 2017, Citti i wsp. 2018a, Leonard i wsp. 2019, Farinon i wsp. 2020, Tahir i wsp. 2021].

Terpeny to kolejne metabolity wtórne występujące w Cannabis sativa L. Z korzeni i części nadziemnych konopi wyizolowano zarówno mono-, jak i seskwiterpeny. Dotychczas zidentyfikowano w konopiach co najmniej 200 różnych terpenów z 20 000 znanych w naturze. W większości odmian konopi najczęściej występuje monoterpen mircen, a także seskwiterpeny, takie jak β -kariofilen i α -humulen. Pozostałe terpeny występujące w *Cannabis sativa* L. var. sativa to m.in. α-pinen, limonen, linalol, bisabolol [Casano i wsp. 2011, Tomko i wsp. 2020]. André i wsp. wykazali, że w miarę rozwoju kwiatów zawartość seskwiterpenów w nich maleje, a zawartość monoterpenów wzrasta. Pod koniec okresu kwitnienia monoterpeny stanowią ponad 50% terpenów w kwiatach. W zależności od położenia geograficznego profile terpenowe mogą się różnić w obrębie tej samej odmiany [Pellati i wsp. 2018, André i wsp. 2020, Tomko i wsp. 2020]. Według niektórych autorów terpeny konopi mają działanie przeciwdepresyjne, przeciwzapalne i przeciwlękowe. Głównie pełnią rolę ochronną u roślin [Salami i wsp. 2020]. Wykazano, że terpeny mogą wspomagać efekt działania kannabinoidów w organizmie człowieka. Związki te wytwarzają unikatowy aromat i smak oraz ich obecność zwiększa potencjalne korzyści prozdrowotne spożywanych kannabinoidów. Terpeny są szczególnie wrażliwe na wpływ przetwarzania w szczególności w warunkach podwyższonej temperatury np. podczas suszenia po zbiorach [Chen et al. 2021].

1.3. Potencjalne możliwości i ograniczenia wykorzystania rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* w produkcji żywności

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie konsumentów produktami zawierającymi w składzie elementy rośliny Cannabis sativa L. var. sativa np. nasiona lub suszone kwiatostany, a także olejami tłoczonymi z nasion konopi [Morales i wsp. 2017, Ciolino i wsp. 2018, Christinat i wsp. 2020]. W Europie mogą być stosowane w produkcji żywności odmiany *Cannabis sativa* L., w której całkowita zawartość Δ^9 -THC oraz Δ^9 -THCA-A nie przekracza 0,3% suchej masy [Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915]. Wykorzystanie konopi w przetwórstwie spożywczym jest trudne ze względu na różne zawartości kannabinoidów w elementach rośliny. Obecnie do celów spożywczych można wykorzystywać wyłącznie nasiona konopi, a susz konopny czy ekstrakty z niego pozyskane są klasyfikowane jako "nowa żywność" zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. Rozporządzenie to definiuje ten termin jako żywność, która nie była tradycyjnie spożywana w UE przed 15 maja 1997 r. Stężenie kannabinoidów w produktach zawierających elementy rośliny Cannabis sativa L. zależy od jakości i rodzaju surowca. Badanie przeprowadzone przez Hazekampa i Fischedicka [2012] wykazało, że nominalne stężenia kannabinoidów w roślinach tego samego typu, ale w różnych lokalizacjach geograficznych, różniły się o ponad 25%. W celu zmniejszenia tych różnic należy wdrożyć ścisłą kontrolę nad odmianami i ich metodami uprawy [Fischedick i wsp. 2010, Aizpurua-Olaizola i wsp. 2014, EIHA 2017].

EFSA w odniesieniu do regulowanych kannabinoidów ustaliła ostrą dawkę referencyjną dla ludzi (ARfD) dla Δ^9 -THC na poziomie 1 µg Δ^9 -THC/kg masy ciała [EFSA 2015]. Zgodnie z zaleceniami Komisji Europejskiej konieczne jest monitorowanie żywności z konopi lub zawierającej składniki konopi pod kątem zawartości Δ^8 -THC, CBN, CBD i Δ^9 -THCV [Rozporządzenie Komisji (UE) 2016/2115]. Produkty zawierające CBD nie są regulowane przez UE, ponieważ CBD nie jest klasyfikowane jako substancja kontrolowana. Obecnie nie ma obowiązku znakowania żywności zawartością kannabinoidów. Tym samym konsumenci nie mają informacji o jakości danego produktu [Pavlovic i wsp. 2018]. Zgodnie z badaniami Bonn-Miller i wsp. [2017], aż 58 z 84 produktów pochodzących od różnych dostawców z USA zawierających CBD charakteryzowało się błędnym oznakowaniem, a w 35 produktach stężenie tego związku nie było zgodne z deklaracją producenta. W Niemczech przeanalizowano 67 produktów zawierających CBD. W 17 z nich zawartość Δ^9 -THC przekroczyła ARfD, po uwzględnieniu ilości pobranej z produktem w przeliczeniu na kilogram masy ciała [Lachenmeier i wsp. 2020]. W badaniach Chistinat i wsp. [2020] wykazano, że produkty należące do tej samej kategorii mogą mieć bardzo różne profile i poziomy kannabinoidów,

chociaż do każdego produktu dodano składniki z rośliny Cannabis, co stanowiło 10% całego składu produktu. Zawartość CBD w mleku krowim (pozyskanym od krów karmionych paszą zawierającą w składzie rośliny konopi) wynosiła 0,0095 mg/kg, a związek ten nigdy nie został określony w tej matrycy. Herbaty, kawy i czekolady zawierające liście lub kwiaty konopi charakteryzowały się wyższą zawartością kannabinoidów niż produkty zawierające nasiona konopi. Powyższa obserwacja potwierdza dostępne doniesienia, ponieważ liście i kwiatostany zawierają znacznie więcej kannabinoidów niż nasiona konopi [Chistinat i wsp. 2020]. Spośród 30 próbek żywności analizowanych przez Lee i wsp. [2020] zawierających kannabinoidy, CBD wykryto w 15 próbkach w ilościach od 31 do 70 mg/kg. Zawartość Δ^9 -THC w 12 produktach spożywczych wynosiła 0,08-98 mg/kg. Zarówno próbki czekolady, jak i oleju konopnego charakteryzowały się najwyższą zawartością CBD i Δ^9 -THC spośród analizowanych produktów. Producenci powinni w większym stopniu niż dotychczas zadbać o to, aby produkty zawierające kannabinoidy były prawidłowo oznakowane. Konieczne są również do przeprowadzenia badania dostarczające dowodów na stabilność lub zmiany zachodzące w tych produktach podczas przechowywania, aby zapewnić konsumentowi możliwość spożycia produktu z deklarowana ilością kannabinoidów przez cały okres jego przydatności do spożycia.

Odpowiedni dobór formy dodatku konopnego do produktu spożywczego gwarantuje odpowiednią rozpuszczalność i biodostępność tych związków. Właściwa forma zapewnia także właściwą formulację gotowego produktu. Ekstrakty konopne charakteryzują się żywiczną, oleistą konsystencją oraz rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych, tłuszczach oraz alkoholach. Dlatego formulację płynne, w których faza olejowa jest rozproszona w fazie wodnej, zapewniają dobrą stabilność kannabinoidów i zmniejszają podatność tych związków na utlenianie i degradację [Sun-Waterhouse i wsp. 2012, Ruiz Ruiz i wsp. 2017, Chen i Rogers 2019]. Do produkcji nalewek, kapsułek miękkich i napojów zawierających kannabinoidy stosuje się ich emulsje olejowo-wodne. Ten typ emulsji wymaga zastosowania surfaktantów (emulgatorów), takich jak polisacharydy, białka i fosfolipidy. Wybór emulgatora zależy od rodzaju emulsji, składu cząsteczkowego oleju i siły jonowej wodnego ekstraktu. Stałe produkty konopne są trudne do wytworzenia ze względu na oleisty i żywiczny charakter ekstraktów konopnych. Aby rozwiązać ten problem, stosuje się substancje pomocnicze w celu utworzenia matrycy lipidowej umożliwiającej kontrolowane uwalniania kannabinoidów i zapobieganie ich degradacji. Fosfolipidy sa najczęściej stosowanymi emulgatorami w układach zawierających kannabinoidy (głównie Δ^9 -THC i CBD) [Charoen i wsp. 2011, Ozturk i wsp. 2014, Teo i wsp. 2016, Chen i Rogers 2019]. Producenci żywności również zmagają się z wyzwaniem zapewnienia jednorodności stężenia kannabinoidów w każdej porcji produktu oraz stabilności podczas przechowywania. Wiedza na temat możliwych zmian podczas przechowywania gotowych produktów jest istotna w celu zapewnienia odpowiedniej jakości i bezpieczeństwa wyprodukowanej żywności. Olej z nasion konopi zawiera kwaśne kannabinoidy, zwłaszcza kwas kanabidiolowy, które występują w oleju w najwyższych stężeniach. Stosunek CBDA do CBD obecnego w oleju konopnym jest dobrym wskaźnikiem prawidłowych warunków przechowywania oleju i procesów produkcyjnych, a także świeżości danego produktu. Długi czas przechowywania i nieprawidłowe warunki przechowywania mogą prowadzić do degradacji CBDA do CBD [Citti i wsp. 2018b, Formato i wsp. 2020].

W kilku pracach opisano przykłady procesów produkcji żywności zawierającej elementy rośliny konopi. Steinbach opisuje proces produkcji pralin i czekolad zawierających nasiona konopi [Steinbach 1999]. W kolejnej pracy wykorzystano olej z nasion konopi i nasiona konopi do produkcji pieczywa i wyrobów cukierniczych [Shim 2019]. Guang i Wenwei [2006] opracowali metodę wykorzystania mąki konopnej w produkcji żywności funkcjonalnej. Spożycie mąki powodowało zwiększenie poziomu lipoprotein o dużej gęstości i zrównoważyło poziom innych glicerydów u ludzi. Berghofer i wsp. [2012] uzyskali mleko z nasion konopi, które nie zmieniło koloru ani nie stało się gorzkie po pasteryzacji. Według Bisterfelda von Merr [2014] dodawanie ekstraktu konopnego do napojów alkoholowych może korzystnie wpływać na trawienie. Wpływ spożycia produktów zawierających olej konopny i nasiona na zdrowie człowieka nie został jeszcze w pełni ustalony. Do chwili obecnej wskazuje się, że konopie mogą m.in. powodować obniżenie całkowitego cholesterolu i ciśnienia krwi u osób spożywających te produkty [Spano i wsp. 2020].

Możliwość wykorzystania konopi w produkcji żywności jest uwarunkowana wieloaspektowo. Konieczne jest kompleksowe zrozumienie w jaki sposób kannabinoidy wpływają na organizm człowieka. Biologiczne efekty wywierane przez kannabinoidy są związane z receptorami sprzężonymi z białkiem G (CB₁ R oraz CB₂ R). Kannabinoidy oddziałują na receptory układu endokannabinoidowego, które występują głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, a także przewodzie pokarmowym, wątrobie i sercu (CB₁ R) oraz na powierzchni komórek odpornościowych (CB₂ R). Wykazano, że Δ^9 -THC i CBD oddziałują z układem endokannabinoidowym w organizmie człowieka. Ich działanie odgrywa rolę regulacyjną w kluczowych procesach organizmu tj. pamięć, homeostaza, apetyt oraz reprodukcja, a także wykazują działanie przeciwbólowe [Chanda i wsp. 2019, Wu 2019]. Liczba pozytywnych doniesień na temat kannabinoidów i ich wpływu na organizm człowieka opisywanych w literaturze, wymaga często potwierdzenia badaniami realizowanymi w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Konieczne wydaję się, precyzyjne scharakteryzowanie

właściwości każdego kannabinoidu. Poznane dotychczas właściwości wskazują, że związki te mogą w przyszłości zostać wykorzystane do produkcji szerokiej grupy leków.

1.4. Techniki analityczne wykorzystywane do identyfikacji kannabinoidów i terpenów

Badania obecności kannabinoidów w produktach żywnościowych są ważne z uwagi na bezpieczeństwo żywności. Zapewnienie bezpieczeństwa produktów zawierających konopie prowadzi do minimalizacji ryzyka wynikającego z obecności substancji psychoaktywnych, które mogą mieć potencjalnie negatywny wpływ na organizm człowieka. Z uwagi na chemię produktów żywnościowych i liczebność różnych kannabinoidów metody chromatograficzne są w tego rodzaju badaniach wykorzystywane w pierwszej kolejności. Jedną z metod wykorzystywanych do identyfikacji i oznaczenia kannabinoidów jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS). Metoda jest często stosowana ze względu na swoją uniwersalność, szybkość oraz wysoką czułość. Metoda chromatografii gazowej posiada pewne ograniczenia. Pod wpływem wysokich temperatur w chromatograficznym piecu kolumnowym kwasowe kannabinoidy ulegają dekarboksylacji. W celu ograniczenia tego zjawiska, wymagane jest przeprowadzenie procesu derywatyzacji, aby możliwe było wykonanie analizy zarówno kwasowych jak i neutralnych kannabinoidów. Proces derywatyzacji polega na przekształceniu wybranych związków w bardziej stabilną i lotna cząsteczkę [Dussy i wsp. 2005, Flores-Sanchez i Verpoorte 2008, Chen i Rogers 2019, Micalizzi i wsp. 2021]. Kolejna metoda to chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS). Umożliwia identyfikację i oznaczanie zarówno obojętnych, jak i kwasowych kannabinoidów bez ryzyka dekarboksylacji i konieczności prowadzenia procesu derywatyzacji przed analiza, co stanowi zaletę w porównaniu z GC-MS [Chen i Rogers 2019, Berman i wsp. 2018]. Powyższa technika umożliwia ilościowe oznaczanie głównych związków obecnych w matrycy w stosunkowo wysokich stężeniach. [McRae i Melanson 2020]. Głównym ograniczeniem chromatografii cieczowej jest zdecydowanie niższa rozdzielczość w porównaniu do chromatografii gazowej. W badaniach kannabinoidów stosowane są również inne układy detekcyjne w tym spektrofotometria ultrafioletowa (UV). Ten rodzaj detektora jest najczęściej stosowany do analizy wysokich stężeń kannabinoidów obecnych w materiałach roślinnych w połączeniu z chromatografią cieczową [De Backer i wsp. 2009, Gul i wsp. 2015]. Zastosowanie GC połączonego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) jest ograniczone, ponieważ nie można tą metodą określić kwaśnych kannabinoidów (tj. CBDA i Δ^9 -THCA-A) bez wcześniejszego upochadniania. Detekcja tego rodzaju ma również ograniczenia w odniesieniu do czułości [Dubrow i wsp. 2021]. Spektrometria mas wykorzystana jako układ detekcyjny, a szczególnie tandemowa spektrometria mas (MS/MS), jest znacznie bardziej czuła niż detekcja

UV lub FID i jest znacznie częściej wykorzystywana w badaniach [Citti i wsp. 2018b, Christinat i wsp. 2020, Dubrow i wsp. 2021].

W literaturze istnieją również doniesienia dotyczące innych metod analizy kannabinoidów. Marchetti i wsp. [2019] zastosowali metodę spektroskopii ¹³C-qNMR do określenia niepsychoaktywnych kannabinoidów w włóknistym typie Cannabis sativa L. Metoda ta zapewniła wiarygodne wyniki w porównaniu z bardziej złożoną techniką HPLC. Spektroskopia ¹³C-qNMR zapewniła wystarczająco precyzyjne wyniki, z wartościami granicy oznaczalności (LOQ) niższymi niż 750 µg/ml. Technika ta jest odpowiednia i korzystna do analizy niepsychoaktywnych kannabinoidów w ekstraktach z konopi. Ponadto jest dobra alternatywa dla metod chromatograficznych i może być stosowana zarówno w materiale roślinnym, jak i jego pochodnych. Lachenmeier i wsp. [2020] zastosowali LC-MS/MS do określenia zawartości Δ^9 -THC w 67 próbkach żywności. Christinat i wsp. [2020] zastosowali LC-MS/MS do analizy obecności 15 kannabinoidów w próbkach oleju konopnego i nasion, a także w próbkach herbaty, kawy, czekolady oraz jednej próbce mleka pobranej od krów karmionych paszą z dodatkiem konopi. W pracy Lee i wsp. [2020] zastosowano LC-MS/MS do ilościowego określenia zawartości CBD i Δ^9 -THC w produktach zawierających kannabinoidy sklasyfikowanych na trzy grupy: grupa 1 (wysoka zawartość tłuszczu) — czekolada, batony energetyczne i oleje; grupa 2 (wysoka zawartość cukru) — cukierki i galaretki; i grupa 3 (inne produkty) — sproszkowane białko konopne, przekąski i płatki zbożowe. Analiza kannabinoidów obecnych w żywności wiąże się z wyzwaniami związanymi z matrycami, w których te związki występują, a także z właściwym wyborem sposobu przygotowania próbek do wybranej techniki. Ponieważ zawartość kannabinoidów może różnić się nawet o 25% w obrębie tej samej odmiany konopi, wykorzystanie tych roślin w produkcji żywności nieuchronnie generuje różnice w profilu kannabinoidów w produktach gotowych [Hazekamp i Fischedick 2012]. Istnieje wyraźna potrzeba opracowania skutecznych i wydajnych metod do analizy kannabinoidów. HPLC-DAD i HPLC-UV stanowią dobre alternatywy dla GC, ale swoistość i czułość tych technik są znacznie niższe niż w przypadku GC.

1.5. Stabilność kannabinoidów i terpenów w matrycach żywnościowych

W ramach badań stabilności kannabinoidów większość badaczy skupia się na dwóch głównych związkach, Δ^9 -THC i CBD. Brakuje doniesień naukowych dotyczących produktów powstających w wyniku termicznej degradacji kannabinoidów; wymagają one scharakteryzowania i oceny toksykologicznej. Istnieją doniesienia dotyczące możliwości konwersji CBD do psychoaktywnego Δ^9 -THC i odwrotnie [Golombek i wsp. 2020]. Aby zapewnić bezpieczeństwo produktów zawierających kannabinoidy, warunki uprawy

roślin, z których pozyskuje się ekstrakty, powinny być standaryzowane, a stabilność ekstraktów wytworzonych z tych roślin podczas przechowywania powinna być sprawdzana [Lachenmeier i wsp. 2020] Pierwsze doniesienia dotyczące wpływu temperatury i światła na stabilność kannabinoidów przedstawili Fairbarin i wsp. w 1976 r. Badania te obejmowały przechowywanie suszonych liści konopi i kwiatostanów konopi w temperaturze 5°C bez dostępu światła oraz w temperaturze 20°C z oświetleniem i bez przez okres 98 tygodni. Analizy próbki sproszkowanej żywicy obejmowały również konopnej przechowywanej w opakowaniach w temperaturze 20 °C z oświetleniem. Podczas przechowywania w temperaturze 5°C w ciemności zawartość Δ^9 -THC w próbkach zmielonych liści i kwiatostanów zmniejszyła się o 10%. Przechowywanie próbek liści i kwiatostanów w temperaturze 20°C w ciemności spowodowało spadek zawartości Δ^9 -THC o 25%, podczas gdy w przypadku próbek przechowywanych przy dostępie światła zawartość spadła o 63% [Fairbarin i wsp. 1976]. Trofin i wsp. wykazali również, że zarówno temperatura, jak i światło wpływają na stabilność kannabinoidów (Δ^9 -THC, CBN i CBD) ekstrahowanych z próbek żywicy za pomocą ekstrakcji prowadzonej z użyciem mieszaniny metanol:chloroform (9:1, v/v). W pierwszym roku przechowywania w temperaturze 22°C z dostępem światła (wariant 1) degradacja Δ^9 -THC była 1,02 razy wyższa niż w próbkach przechowywanych w ciemności w warunkach chłodniczych (4°C) (wariant 2). Tworzenie CBN w tych samych próbkach przechowywanych zgodnie z wariantem 1 było 1,10 razy szybsze niż w próbkach przechowywanych zgodnie z wariantem 2. Zaobserwowano odwrotną zależność dla zawartości CBD [Trofin i wsp. 2012]. W pracy Citti i wsp. [2018b] przeanalizowano wpływ temperatury i czasu przechowywania na stabilność i stopień dekarboksylacji CBDA w oleju konopnym. Próbki przechowywano w temperaturze 5, 20 i 25°C. Okres półtrwania CBDA w próbkach oleju konopnego przechowywanych w temperaturze 5°C wynosił około 20 miesięcy. Gdy olej przechowywano w temperaturze 20 i 25°C, okresy półtrwania wynosiły odpowiednio 49 i 20 dni. Meija i wsp. [2021] przeanalizowali stabilność siedmiu par kannabinoidów (CBC, Δ^9 -THC, CBN, CBG, CBD, Δ^9 -THCV i CBDV, a także ich kwaśnych form) w wysuszonym materiale konopnym przechowywanym w ciemności w temperaturach od -20 do 40°C). Średni miesięczny stopień degradacji Δ^9 -THCA + Δ^9 -THC wynosił 2% w temperaturze 20°C. Zaobserwowano, że przechowywanie ziela konopi w temperaturze 4 °C nie zapewniało długoterminowej (ponad 12 miesięcy) stabilności kannabinoidów. W pracy autorstwa Zamengo i wsp. [2019] określono średnią degradację Δ^9 -THC w ciągu 100 dni, która wynosiła 12% w temperaturze 22°C (3-4% miesięcznie). Dostępna wiedza dotycząca stabilności kannabinoidów podczas ogrzewania jest niewystarczająca, aby potwierdzić, że produkty zawierające kannabinoidy są bezpiecznym dodatkiem lub składnikiem żywności. Jedno z badań przeprowadzonych przez Turek i Florian [2013] potwierdziło, że każdy wzrost temperatury ogrzewania oleju konopnego powoduje dwukrotny wzrost szybkości degradacji kannabinoidów. Podczas badań Dussy i wsp. [2005] zaobserwowano, że podgrzewanie Δ^9 -THCA przez 15 min w 160°C, powoduje całkowitą przemianę do Δ^9 -THC, a także obserwowano obecność CBN podczas podgrzewania w 180°C. Opublikowane dotychczas wyniki badań dotyczące stabilności kannabinoidów w ekstraktach z konopi i roślinach zawierających te związki podczas przetwarzania materiału roślinnego, nie są wystarczające do dokładnego określenia wpływu różnych warunków na stabilność kannabinoidów. Ostatnie raporty dotyczące stabilności kannabinoidów w matrycach żywnościowych pokazują, że środowisko, w którym przechowywane są produkty zawierające kannabinoidy, temperatura ogrzewania i tzw. matryca wpływają na stabilność kannabinoidów w produkcie końcowym.

2. CEL, ZAKRES PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

Dane przedstawione w przeglądzie piśmiennictwa **[P1]** wskazują, że istnieje ryzyko występowania psychoaktywnego Δ^9 -THC zarówno w zielu konopi jak i gotowym produkcie zawierającym wsad konopny stosowany w technologii żywności. Powoduje to potencjalne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Opisane w literaturze wyniki badań i dostępne dane są niewystarczające do oszacowania ryzyka zdrowotnego dla potencjalnych konsumentów takich produktów. Niemniej, biorąc pod uwagę, że stężenie poszczególnych kannabinoidów, w tym wykazujących działanie prozdrowotne i psychoaktywne na organizm człowieka, a także zawartość terpenów może ulegać zmianom na każdym etapie produkcji, istnieje konieczność określenia wpływu procesów przetwórczych na te substancje. Konieczne jest również opracowanie jednolitych metod analizy tych związków w różnych matrycach, zapewniających reprezentatywne wyniki badań. Niezbędne jest także opracowanie skutecznych metod produkcji, dystrybucji i przechowywania produktów zawierających wsad konopny, które zapewnią stabilność tych związków w gotowym produkcie. W związku z powyższym w ramach pracy podjęto badania nad wpływem procesów produkcji żywności na stabilność kannabinoidów i terpenów.

Celem pracy było:

- I. Opracowanie metody oznaczania kannabinoidów w świeżych i suszonych elementach rośliny i nasionach *Cannabis sativa* L. oraz modelowych produktach spożywczych.
- II. Opracowanie metody oznaczania terpenów w świeżych i suszonych elementach rośliny *Cannabis sativa* L. oraz modelowych produktach spożywczych.
- III. Porównanie wpływu metod suszenia wybranych elementów rośliny *Cannabis sativa*L. na zawartość kannabinoidów oraz terpenów.
- IV. Ocena wpływu modelowych procesów przetwórczych (wypiek oraz fermentacja mlekowa) na stabilność i profil kannabinoidów oraz terpenów w modelowym produkcie spożywczym.

Uwzględniając powyższe założenia postawiono następujące hipotezy badawcze:

H1. Dobór układu ekstrakcyjnego ma wpływ na wydajność ekstrakcji kannabinoidów i terpenów z materiału roślinnego.

H2. Warunki suszenia elementów rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* wpływają na zawartość kannabinoidów oraz terpenów w suszu.

H3. Proces pieczenia pieczywa cukierniczego z dodatkiem wsadu konopnego na bazie liofilizowanego suszu konopnego z *Cannabis sativa* L. *var. sativa* wpływa na stabilność, skład i profil kannabinoidów oraz terpenów.

H4. Proces fermentacji mlekowej produktu zawierającego wsad konopny na bazie rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* wpływa na stabilność, skład i profil kannabinoidów oraz terpenów.

Zakres pracy obejmował:

- Przegląd dostępnych danych literaturowych dotyczących charakterystyki i możliwości wykorzystania rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* w produkcji żywności, a także regulacji prawnych związanych z tym aspektem. [P1]
- Opracowanie metody analitycznej oznaczania kannabinoidów w zielu *Cannabis sativa* L. var. sativa. [P2]
- 3. Opracowanie metody analitycznej oznaczania kannabinoidów w nasionach rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa*. [Materiały nieopublikowane]
- Opracowanie metody analitycznej oznaczania terpenów w zielu *Cannabis sativa* L. var. sativa oraz ocena wpływu metod suszenia wybranych elementów rośliny konopi na stabilność, skład i profil terpenów. [Materiały nieopublikowane]
- 5. Porównanie wpływu metod suszenia wybranych elementów rośliny konopi na stabilność, skład i profil kannabinoidów w roślinie *Cannabis sativa* L. *var. sativa*. **[P3]**
- 6. Określenie wpływu procesu pieczenia oraz czasu przechowywania pieczywa cukierniczego z dodatkiem wsadu konopnego na bazie liofilizowanego suszu konopnego z *Cannabis sativa* L. *var. sativa* na stabilność, skład i profil kannabinoidów, terpenów oraz wybranych związków lotnych. [Materiały nieopublikowane]
- 7. Określenie wpływu procesu fermentacji mlekowej zachodzącej podczas produkcji fermentowanego napoju mlecznego zawierającego wsad konopny na bazie ziela *Cannabis sativa* L. *var. sativa* oraz czasu przechowywania napoju na stabilność, skład i profil kannabinoidów, terpenów oraz wybranych związków lotnych. [P4]

3. MATERIAŁ BADAWCZY I METODY BADAŃ

3.1. Materiał badawczy

Roślina *Cannabis sativa* L. *var. sativa* odmiany "Białobrzeskie" posiada udokumentowaną historię spożycia przez ludzi i od lat wykorzystywana jest jako źródło CBD. Ze względu na potencjalną możliwość zastosowania tej rośliny w produkcji żywności, a tym samym również zawartych w niej kannabinoidów wybrano powyższą odmianę do przeprowadzenia prac doświadczalnych. Rośliny pozyskano z oddziału Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, położonego w Pętkowie, Polska. Rośliny zebrano w szczycie kwitnienia, a dokładnie między dwudziestym dniem po rozpoczęciu kwitnienia, a dziesiątym dniem po zakończeniu kwitnienia [Rozporządzenie (UE) 2017/1155]. Po zbiorze rośliny podzielone zostały na kwiatostany według wielkości: małe (<10cm), średnie (10-20 cm) oraz duże (>20cm) oraz liście, a pozostałe części rośliny (korzenie i łodygi) usunięto. Następnie próbki zamrożono i przechowywano w temperaturze –60°C. Materiał wykorzystano do badań, których wyniki przedstawiono w Publikacji **[P2, P3 oraz P4]** oraz części badań, których wyników nie opublikowano. Jako materiał badawczy wykorzystano również nasiona konopi dostępne komercyjnie na polskim rynku, w celu opracowania metody ekstrakcji kannabinoidów z tego surowca.

Na potrzeby badań opisanych w Publikacji **[P2]** wykorzystano 30 próbek herbat zawierających w składzie susz *Cannabis sativa* L. *var. sativa*, dostępnych na polskim rynku. Próbki herbat zawierały w składzie od 40 do 100% suszu konopnego.

Laboratoryjnie wytwarzano modelowe produkty żywnościowe tj. ciastka kruche zawierające susz konopny w ilości 1, 2 i 3% (w/w) oraz fermentowane napoje mleczne zawierające trzy rodzaje wsadu konopnego (liofilizowany susz konopny, etanolowy ekstrakt konopny oraz olejek konopny) w ilości 0,5, 1 i 2% (w/v) **[P4]**. Pierwszy wsad konopny stanowił liofilizowany susz konopny składający się z 80% kwiatostanów oraz 20% liści pozyskanych z rośliny odmiany "Białobrzeskie". Etanolowy ekstrakt konopny przygotowano poprzez ekstrakcję alkoholem liofilizowanego suszu konopnego przygotowanego według procedury opracowanej na potrzeby badań. Ostatni stosowany wariant dodatku wsadu konopnego stanowił olejek konopny dostępny na polskim rynku jako suplement diety, zawierający 18% CBD+CBDA (1650 mg) (Full Spectrum, Polska). Do przygotowania fermentowanych napojów mlecznych wykorzystano mleko UHT o zawartości tłuszczu wynoszącej 3,8%. Do fermentacji zastosowano kulturę starterową YC-X11 zakupioną w CHR Hansen (Hørsholm, Dania).

Materiał do wykonanych badań biegłości dla próbek suszu konopnego dostarczony został przez ASTM International (USA) (HFL2301 oraz HFL2305).

3.1.1. Wzorce i odczynniki chemiczne

Certyfikowane materiały odniesienia kannabinoidów tj. CBD, CBDA, CBG, CBC, CBN, CBNA, CBDVA, CBL, CBLA o stężeniu 1,0 mg/mL (MeOH) zakupiono w Restek GmbH (Bad Homburg, Niemcy). CBGA, CBCA, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THCVA, CBDV, Δ^9 -THCV zostały zakupione w LGC Standards Sp. z o.o. (Łomianki, Polska).

Certyfikowane wzorce terpenów charakterystycznych dla rośliny *Cannabis sativa* L. tj. (α -bisabolol, kamfen, δ -3-karen, β -kariofilen, geraniol, guaiol, α -humulen, p-cymen, isopulegol, d-limonen, linalool, β -myrcen, nerolidol, ocimen, α -pinen, β -pinen, α -terpinen, γ -terpinen, terpinolen) o stężeniu 1,0 mg/mL zakupiono w LGC Standards Sp. z o.o. (Łomianki, Polska). Acetonitryl (ACN), metanol (MeOH), woda (o czystości do LC-MS), octan etylu oraz etanol zostały zakupione w Witko (Łódź, Polska). Kwas mrówkowy oraz mrówczan amonu (o czystości do LC-MS) zakupiono w Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Certyfikowany materiał referencyjny suszonych (HEMP-1) mielonych konopi został zakupiony od National Research Council, (Kanada).

3.2. Metody badań

3.2.1. Analiza chromatograficzna i spektometria mas

3.2.1.1. Kannabinoidy

Analizę zawartości 17 kannabinoidów wykonano techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) przy użyciu ultra-wysokosprawnego chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas z podgrzewanym źródłem jonów typu elektrorozpylanie (UHPLC-HESI-MS) (Thermo Fisher Scientific, Waitham, MA, USA). Rozdziały chromatograficzne prowadzono na kolumnie chromatograficznej typu C18 Cortecs o wymiarach 2,1 x 100 mm i średnicy ziarna 1,6 μ m (Waters, Miliford, MA, USA). Opracowano metodę analityczną a następnie poddano ją walidacji. Szczegółowe parametry metody przedstawiono w Publikacji [**P2].** Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej obejmowało m.in. etapy homogenizacji, ekstrakcji z użyciem cieczy ekstrakcyjnej (świeże elementy rośliny, susz oraz nasiona konopne – metanol, fermentowane napoje mleczne – acetonitryl, ciastka kruche zawierające wsad konopny – MeOH:CHCl₃ (95:5, v/v)) oraz dalsze rozcieńczania. Wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania TraceFinderTM 5.1 (Thermo Fisher Scientific Waitham, MA, USA).

3.2.1.2. Terpeny i wybrane związki lotne

Analizę zawartości 19 terpenów w materiale roślinnym przeprowadzono z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektometrią mas (GC-MS) za pomocą

chromatografu gazowego Agilent 7890B sprzężonego z jednokwadrupolowym spektrometrem mas 5975C wyposażonym w autowtryskiwacz CTC PAL (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono przy użyciu kolumny kapilarnej ze spiekanej krzemionki RTX-Wax plus 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent, Santa Clara, CA, USA) z fazą na bazie glikolu polietylenowego. Konfiguracja była wyposażona w kolumnę ochronną/lukę retencji o wymiarach 5 m x 0,53 mm. Program temperaturowy pieca chromatografu: 2 minuty podtrzymania w temperaturze 40°C, narost 10°C min⁻¹ do 70°C (3 minuty podtrzymania), narost 5°C min⁻¹ do 100°C, narost 5°C min⁻¹ do 100°C, narost 5°C min⁻¹ do 250°C (10 minut podtrzymania). Do wszystkich analiz stosowano stałą objętość nastrzyku wynoszącą 1 µL ekstraktu. Zastosowano wkładki do portów dozownika bez dzielnika strumienia wyposażone w watę szklaną. Temperatura dozownika wynosiła 230°C. Natężenie przepływu helu przy nastrzyku wynosiło 1,5 ml/min. Temperatura źródła jonów/analizatora spektrometru masowego wynosiła odpowiednio 230/150°C. Linia transferowa GC pracowała w temperaturze 250°C. Spektrometr mas został skalibrowany względem FC-43 zgodnie z zaleceniami producenta. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej obejmowało m.in. ekstrakcji próbki (2g świeżego lub suszonego materiału) z użyciem cieczy ekstrakcyjnej (octan etylu), etapu homogenizacji oraz rozcieńczania. Wyniki wyrażono w mg/kg po uwzględnieniu suchej masy materiału badawczego.

Przygotowane modelowe produkty zawierające wsad konopny poddano również analizie fazy nadpowierzchniowej (head-space) za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME - solid phase microextraction) i dalszej analizie na drodze chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HS-SPME-GC-MS). W celu przeprowadzenia analizy frakcji lotnej pod względem zawartości omawianych terpenów i wybranych związków lotnych charakterystycznych dla danego produktu modelowego, do 10 mililitrowego naczynka odważono po 1 g zhomogenizowanego fermentowanego napoju mlecznego lub rozdrobnionego ciastka kruchego zawierających wsad konopny. Dodawano 100µl roztworu standardu wewnętrznego (roztwór uretanu o stężeniu 10 mg/ml). Naczynko zamykano i umieszczano w termostacie. Do naczynka wprowadzono igłę SPME, następnie wysuwano włókno (CAR/PDMS/DVB) i prowadzono ekstrakcję składników fazy nadpowierzchniowej (terpenów) przez 30 min. w temperaturze 40°C. Po zakończeniu ekstrakcji włókno przenoszono do komory chromatografu gazowego, gdzie próbka była desorbowana. Układ chromatografu gazowego i spektrometru mas był identyczny jak zastosowany wcześniej. W próbkach analizowano 19 związków zaliczanych do terpenów oraz wybrane związki lotne charakterystyczne dla fermentowanego napoju mlecznego (kwas octowy, kwas masłowy, kwas kaprylowy, kwas
propionowy, 2-butatnon, 2-pentatnon, 2-heptanon, acetoina, etanol, alkohol laurylowy) oraz dla ciastek kruchych (2-pentatnon, 2-heptanon, acetoina, 2-nonanon, kwas octowy, furfural, 2-metylopirazyna, heksanal, heptanal oraz oktanal) [Zaręba i wsp. 2008, Rutkowska i wsp. 2023]. Analizy części związków wykonano wyłącznie jakościowo. Dla każdego rodzaju produktu i wariantu dodatku przeprowadzono analizę w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.2.2. Część technologiczna

3.2.2.1. Suszenie wybranych części rośliny Cannabis sativa L. var. sativa "Białobrzeskie"

Warunki suszenia dobierano na podstawie dostępnych danych o parametrach stosowanych dla tego typu materiału roślinnego opisanych w literaturze [Kwaśnica i wsp. 2023, Thamkaew i wsp. 2021]. Suszenie tradycyjne (Metoda 1) opierało się na suszeniu przygotowanych świeżych próbek rośliny Cannabis sativa L. Suszenie prowadzono w dobrze wentylowanym pomieszczeniu bez dostępu światła, z niską wilgotnością względną powietrza (52±1%) [Das i wsp. 2022]. Próbki kwiatostanów i liści rozłożone były na cienkiej bibule. Temperatura powietrza w pomieszczeniu wynosiła 20±1°C. Zawartość wody w próbkach (MC) sprawdzano co 24h. Próbki przed poddaniem procesowi liofilizacji (metoda 2) były zamrożone w temperaturze -60°C i następnie suszone w temperaturze 25±1°C przez 24 h z wykorzystaniem liofilizatora Alpha 1-4 LSCplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Niemcy). Do przeprowadzenia suszenia konwekcyjnego (metoda 3a-c) wykorzystano suszarkę laboratoryjną (KBC G-100/250, Warszawa, Poland) z naturalnym obiegiem powietrza. Każdorazowo sprawdzano temperaturę dla uzyskania jednakowych warunków procesu. Próbki suszono w temperaturach 50, 60 i 70°C, a ich waga była mierzona co 1 godzinę. Proces suszenia prowadzono do uzyskania MC 10±1% wag. Określono czasu niezbędny do uzyskania założonej wartości parametru. Suszenie próbek przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a wyjściowa masa próbki każdorazowo wynosiła 50±2g. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w Publikacji [P3].

3.2.2.2.Modelowe ciastka kruche z dodatkiem wsadu konopnego

Kruche ciastka zostały przygotowane zgodnie z przepisem podanym w Tabeli 1. Do przygotowania ciastek użyto mąkę pszenną o niskim wyciągu i zawartości popiołu białego na poziomie 0,52 % s.m. Receptura dla ciastek kruchych zastosowanych jako kontrola wynosiła: 300 g mąki pszennej, 200 g masła, 100 g cukru białego, a także jedno świeże jajko (około 70 g). Kruche ciasteczka konopne zostały opracowane poprzez zastąpienie mąki pszennej liofilizowanym suszem konopnym w ilości 1, 2 lub 3% (Tabela 1).

Składnik	Poziom zastąpienia mąki pszennej (%)					
(g)	0	1	2	3		
Mąka pszenna	100	99	98	97		
Masło	200	200	200	200		
Cukier	100	100	100	100		
Jajko	70	70	70	70		
Liofilizowany susz konopny	0	1	2	3		

Tabela 1. Receptura ciastek kruchych (kontrola) oraz zawierających wsad konopny w postaci liofilizowanego suszu konopnego.

W pierwszym etapie mąkę pszenną i cukier wymieszano za pomocą miksera KitchenAid Classic. Mieszanie prowadzono do uzyskania jednolitej konsystencji ciasta (3 min). Następnie dodano masło i mieszano wszystkie składniki przez kolejne 5 minut. W ostatnim kroku dodano jajo kurze i mieszano ciasto przez kolejne 3 minuty. Następnie ciasto umieszczono w prasie do ciastek (Ernesto, model HG00972). Uformowano ciastka o następujących wymiarach: 20 x 30 x 5 mm. Ciastka pieczono w piecu elektryczno-powietrznym (Piccolo Wachtel Winkel, Niemcy) w temperaturze 160°C przez 30 minut i w temperaturze 200°C przez 20 minut. Po upieczeniu kruche ciastka schłodzono, zapakowano i przechowywano w temperaturze pokojowej do dalszych badań.

3.2.2.3. Modelowe fermentowane napoje mleczne z dodatkiem wsadu konopnego

Do probówki odważono ustaloną wcześniej ilość każdego z dodatków i dodano 10 mL mleka UHT. Następnie przygotowane próbki poddano pasteryzacji przez 5 minut w temp. 93 ± 2 °C. Po przeprowadzeniu procesu pasteryzacji próbki schłodzono do temp. ok. 42 ± 2 °C. Dodano 0,01% zakwasu zawierającego ~10⁶ jtk/cm³ bakterii kwasu mlekowego (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*). Kolejnym etapem było przeprowadzenie procesu fermentacji napojów mlecznych przez ok. 3-4 h w 43°C do uzyskania pH ~4.6 w każdym z wariantów. Uzyskane produkty po zakończeniu fermentacji schłodzono. Każdy z wariantów doświadczeń wykonano w 3 powtórzeniach.

3.2.3. Analiza mikrobiologiczna fermentowanych napojów mlecznych z dodatkiem wsadu konopnego

Oznaczenie liczby mikroorganizmów charakterystycznych dla jogurtu przeprowadzono z wykorzystaniem technik płytkowych zgodnie z normą ISO [PN-ISO 7889:2003].

Do oznaczenia *Streptococcus thermophilus* wykorzystano agar M17 (Merck, Warszawa, Polska), a inkubację prowadzono w warunkach tlenowych w 37°C przez 48h. Liczbę *Lactobacillus bulgaricus* oznaczono z użyciem agaru MRS w warunkach beztlenowych w 37±1°C przez 72h.

3.2.4. Pomiar pH fermentowanych napojów mlecznych z dodatkiem wsadu konopnego

Pomiar pH wykonano przed rozpoczęciem fermentacji, następnie prowadzono przez cały proces fermentacji napoju mlecznego, 24h po przechowywaniu w warunkach chłodniczych oraz w 7, 14, 21 i 28 dniu przechowywania przy użyciu SevenExcellence pH metr S400 (Mettler-Toledo, Warszawa, Polska).

3.2.5. Pomiar składowych barwy ciastek kruchych z dodatkiem wsadu konopnego

Instrumentalny pomiar składowych barwy powierzchni ciastek kruchych został wykonany w systemie L*a*b* (L* - jasność (0-100%); a* - oś barwy od zielonej (-a*) do czerwonej (+a*); b* - oś barwy niebieskiej (-b*) do żółtej (+b*)) przy użyciu chromametru (konica Minolta; CR-400; Japonia) metodą odbiciową z zastosowaniem głowicy pomiarowej 8 mm, iluminantu D₆₅ oraz kąta obserwacji 2°.

Przed rozpoczęciem pomiarów urządzenie skalibrowano za pomocą wzorca bieli o składowych: L* = 98,45, a* = -0,10 oraz b* = -0.13 [Wyrwisz i wsp. 2016]. Pomiar parametrów barwy ciastek kruchych wykonano oddzielnie w 10 losowo wybranych ciastkach. Na podstawie uzyskanych wyników parametrów barwy L*, a* oraz b* obliczono ogólną różnicę barwy (ΔE) pomiędzy próbami za pomocą następującego równania (1):

$$\Delta \mathbf{E} = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

gdzie:

 ΔE – ogólna różnica barwy;

 $L^* - L_0^*$ - rożnica wartości parametru L* między poszczególnymi próbami a próbą kontrolną;

 $a^* - a_0^*$ - różnica wartości parametru a* między poszczególnymi próbami a próbą kontrolną;

 $b^* - b_0^*$ - różnica wartości parametru b* między poszczególnymi próbami a próbą kontrolną.

3.2.6. Ocena sensoryczna modelowych produktów spożywczych

Ocenę sensoryczną przeprowadzono z wykorzystaniem ilościowej analizy opisowej (QDA). Analizę przeprowadzono zgodnie z normą ISO [ISO 13299:2016] w celu oceny

właściwości sensorycznych próbek modelowych produktów spożywczych zawierających w swoim składzie wsad konopny. QDA jest metodą, która została uznana za skuteczne narzędzie do pomiaru cech sensorycznych różnych produktów spożywczych [Sadowska i wsp. 2015]. Test sensoryczne przeprowadzono po uzyskaniu zgody Uczelnianej Komisji Etycznej (UEC) ds. Badań Naukowych z Udziałem Ludzi (UKE/14/2023) z dnia 13.12.2023 r. (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie). Ocena została przeprowadzona przez 6-osobowy przeszkolony panel sensoryczny. Wyniki zostały wyrażone w j.u. (jednostkach umownych).

3.2.6.1. Fermentowane napoje mleczne

Do oceny użyto około 5g każdego z przygotowanych wariantów fermentowanych napojów mlecznych. Atrybuty, które najbardziej spójnie opisywały przygotowane produkty zostały wybrane i zdefiniowane przez panel. Wybrano następujące atrybuty: barwa zielona, barwa typowa dla jogurtu, zapach jogurtowy, kwaśny, słodki, obcy "trawiasty", smak słodki, kwaśny, kwasowy, gorzki, obcy "trawiasty", konsystencja i gęstość. Intensywność tych atrybutów została zmierzona przy użyciu 10-centymetrowej liniowej niestrukturalnej skali graficznej, zakotwiczonej od 0 (brak) do 10 (bardzo intensywny). Ponadto, na podstawie wyżej wymienionych cech wyróżniających, ogólna jakość sensoryczna próbek została dodatkowo określona przy użyciu oddzielnej skali od 0 (niska) do 10 (wysoka).

3.2.6.2. Ciastka kruche

Do oceny użyto po 1 ciastku o wymiarach 20 x 30 x 5 mm z każdego wariantu. Atrybuty, które najbardziej spójnie opisywały przygotowane produkty zostały wybrane i zdefiniowane przez panel. Wybrano następujące atrybuty: kolor typowy dla ciastek kruchych, kolor zielony, smak słodki, maślany, gorzki, obcy "trawiasty", zapach typowy dla ciastek kruchych, zapach obcy, kruchość, konsystencja. Intensywność tych atrybutów została zmierzona przy użyciu 10-centymetrowej liniowej niestrukturalnej skali graficznej, zakotwiczonej od 0 (brak) do 10 (bardzo intensywny). Ponadto, na podstawie wyżej wymienionych cech wyróżniających, ogólna jakość sensoryczna próbek została dodatkowo określona przy użyciu oddzielnej skali od 0 (niska) do 10 (wysoka).

3.2.7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników badań wykonano przy użyciu oprogramowania Statistica 13.0 (StatSoft, Kraków, Polska). Do oceny istotności różnic pomiędzy wynikami wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test Tukey'a na poziomie ufności 95%. Wszystkie doświadczenia wykonywano w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach.

4. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

4.1. Opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania kannabinoidów w świeżych i suszonych elementach rośliny oraz nasionach *Cannabis sativa* L.

Przed rozpoczęciem realizacji badań przeprowadzono obszerny przegląd literatury w celu zebrania aktualnej wiedzy na temat rośliny Cannabis sativa L. var. sativa oraz charakterystycznych dla niej związków bioaktywnych – kannabinoidów. Zebrano informacje dotyczące aspektów prawnych stosowania konopi w technologii żywności, głownie limitów dla Δ^9 -THC (wykazującego działanie psychoaktywne na organizm człowieka), a także możliwości analizy kannabinoidów za pomocą chromatografii cieczowej i gazowej [P1]. Przedstawiono ograniczenia płynące z wykorzystania techniki GC-MS, która wymaga przeprowadzenia form kwasowych kannabinoidów w ich pochodne, aby umożliwić prawidłowe oznaczenie tych związków. Opierając się na analizie danych literaturowych na potrzeby realizacji badań i wykonania oznaczeń zawartości kannabinoidów w badanych próbkach zdecydowano się na wykorzystanie techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Zastosowanie tej techniki pozwoliło na jednoczesne oznaczanie neutralnych jak i kwasowych form kannabinoidów, które oznaczane z użyciem techniki chromatografii gazowej wymagałyby przeprowadzenia w odpowiednie pochodne. Porównano skuteczność ekstrakcji kannabinoidów ze świeżego jak i suszonego ziela konopnego z wykorzystaniem różnych cieczy ekstrakcyjnych tj. metanol, etanol, acetonitryl, heksan oraz mieszanina etanolu z heksanem (7:3, v/v) [P2]. Doświadczalnie wybrano najlepszą ciecz ekstrakcyjną (metanol), która pozwoliła na wyekstrahowanie maksymalnej liczby kannabinoidów obecnych w materiale roślinnym, zarówno świeżym jak i suszonym. W niniejszej pracy poddano analizie również zawartość kannabinoidów w nasionach konopnych. Charakterystyka nasion konopi została szczegółowo opisana w przeglądzie piśmiennictwa (część 1.1 oraz P1). Podobnie jak w przypadku wcześniejszych doświadczeń, porównano wydajność ekstrakcji prowadzonej z wykorzystaniem różnych cieczy ekstrakcyjnych MeOH, ACN oraz EtOH. Doświadczalnie wybrano najlepszą ciecz ekstrakcyjną MeOH, która pozwoliła na wyekstrahowanie maksymalnej ilości kannabinoidów obecnych w badanych nasionach (23,54 mg/kg) i jednocześnie minimalną ilość związków powodujących interferencje chromatograficzne. Uzyskane wyniki pozwoliły na weryfikację i potwierdzenie Hipotezy 1 [H1] - dobór układu ekstrakcyjnego ma wpływ na wydajność ekstrakcji kannabinoidów i terpenów z materiału roślinnego. Po zoptymalizowaniu parametrów procesu izolacji badanych substancji oraz rozdziału chromatograficznego dokonano optymalizacji parametrów pracy spektrometru mas.

Prace ukierunkowane były na uzyskanie najwyższej czułości, odpowiedniej powtarzalności pomiarów i ograniczenie szybkości zanieczyszczania źródła jonów. Po określeniu warunków pracy, przeprowadzono proces walidacji metody. Jako matryce na potrzeby walidacji wykorzystano świeże kwiatostany oraz liście konopi oraz certyfikowany materiał odniesienia w postaci suszu (CRM) HEMP-1 (National Research Council, Kanada), a w przypadku nasion wykorzystano komercyjnie dostępne oczyszczone nasiona konopne z Cannabis sativa L. var. sativa. Do oceny parametrów statystycznych metody posłużono się wartościami odzysku z próbek fortyfikowanych laboratoryjnie, certyfikowanego materiału referencyjnego oraz powtarzalnością wartości odzysku. Dla większości analizowanych substancji poziom odzysku mieścił się w granicach 80-105% (świeże i suszone ziele konopne) oraz 92-103% (nasiona konopne). Szczegółowe wyniki walidacji dla nasion konopnych zgromadzone są w Tabeli S1, w Aneksie. Dla suszonego i świeżego ziela konopnego szczegółowe wyniki walidacji zgromadzone są w Tabeli 2 oraz S1, w Publikacji [P2] – materiały uzupełniające. Rozszerzona niepewność pomiarów (K=2, a=0,05) wynosiła <10% dla wszystkich badanych związków. Opracowana metoda analityczna charakteryzowała się wysoką precyzją i dokładnością. Uzyskane wyniki zawartości kannabinoidów dla próbki nasion przedstawiono w Tabeli S1 oraz S2, w Aneksie. Zakres analityczny, współczynnik korelacji oraz wartości granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) (wyrażone w µg/mL) opisane w Publikacji [P2] oraz przedstawione w Tabeli S1 – Aneks, miały zastosowanie we wszystkich zrealizowanych badawczych. Poprawność metody potwierdzono w badaniu zadaniach biegłości zorganizowanym przez ASTM, którego wyniki w tym wartości wskaźnika z-score umieszczono w Tabelach S2 i S3, w Publikacji [P2] – materiały uzupełniające.

Dotychczas zaledwie w kilku opublikowanych pracach skupiono się na analizie kannabinoidów w poszczególnych częściach rośliny konopi [Ibrahim i wsp. 2018, Kleinhenz i wsp. 2020, Kalinová i wsp. 2021]. W pracy wykonanej przez Kleinhenz i wsp. [2020] wykazano znacznie większą zawartość kannabinoidów w kwiatostanach i liściach (kolejno 46076 oraz 52021 mg/kg) w porównaniu do próbek analizowanych w ramach niniejszej pracy. Wykazane różnice pomiędzy całkowitą zawartością kannabinoidów w elementach rośliny mogą wynikać z różnicy w odmianie rośliny, różnego stopnia dojrzałości rośliny oraz innego położenia geograficznego miejsc gdzie prowadzono uprawy konopi. Odnotowane przez badaczy stężenie CBGA (1935 mg/kg) było ponad 10-krotnie wyższe niż oznaczone w niniejszej pracy (164,3 mg/kg). Także Kalinova i wsp. [2021] wykazali różnice w poszczególnych częściach rośliny (kwiatostany i liście) pod względem zawartości kannabinoidów w dwóch najpopularniejszych odmianach "Finola" oraz "Białobrzeskie".

W kwiatostanach i liściach odmiany "Białobrzeskie" stwierdzono większą zawartość CBD (kwiatostany 262,9 mg/kg, liście 56,7 mg/kg) i CBDA (kwiatostany 11519 mg/kg, liście 4267 mg/kg) w porównaniu do odmiany "Finola", która zawierała odpowiednio 135,4 mg/kg (kwiatostany), 16,54 mg/kg (liście) CBD i 8707 mg/kg (kwiatostany), 1792 mg/kg (liście) CBDA. Odmiana "Finola" charakteryzowała się wyższą zawartością CBGA w kwiatostanach (1345 mg/kg) niż odmiana "Białobrzeskie" (905,4 mg/kg) [Kalinovái wsp. 2021]. Zawartość CBDA i CBD oznaczona w powyższej pracy dla kwiatostanów i liści była istotnie wyższa niż te określone w naszym badaniu dla tej samej odmiany roślin. Wskazane różnice w zawartości poszczególnych związków w analizowanych częściach rośliny mogą wynikać z kilku przyczyn. Pierwszą z nich jest brak wystandaryzowanych metod testowania, a także sposobu przygotowania próbki przed oznaczeniem. W wielu pracach nie podaje się w jakim okresie został przeprowadzony zbiór roślin co również ma wpływ na zawartość analizowanych substancji, których stężenie zmienia się wraz ze stopniem dojrzałości rośliny co potwierdzają inni badacze [Fischedick i wsp. 2010, Aizpurua-Olaizola i wsp. 2014, Eržn i wsp. 2021]. Kolejna przyczyna, która potwierdzaja autorzy [Fischedick i wsp. 2010, Eržn i wsp. 2021] są warunki wzrostu oraz położenie geograficzne, które mają istotny wpływ na zawartość kannabinoidów. Jak potwierdza Park i wsp. [2022] występujący na wczesnym etapie kwitnienia stres suszy istotnie wpływa na zmianę profilu kannabinoidów w roślinie, zmieniając akumulację CBD i Δ^9 -THC, a zwiększając akumulacje CBG nawet o 40%.

4.1.2. Ocena występowania kannabinoidów w wybranych produktach konopnych

W ramach pracy opracowaną metodę oznaczania kannabinoidów wykorzystano dodatkowo do oceny występowania tych związków w 30 próbkach herbat dostępnych na polskim rynku, zawierających w swoim składzie susz *Cannabis sativa* L. *var. sativa* oraz próbki nasion konopnych. Szczegółowe wyniki zawartości analizowanych 17 kannabinoidów umieszczono w Tabeli 5, w Publikacji [**P2**] oraz w Tabeli S3 - **Aneks.** Na podstawie wyników uzyskanych w Publikacji [**P2**] wykazano istotne statystycznie różnice (α =0,01) pomiędzy całkowitą zawartością 17 kannabinoidów w analizowanych próbkach. Biorąc pod uwagę procentową zawartość suszu konopnego w analizowanych herbatach, nie można jednoznacznie stwierdzić, że produkty złożone wyłącznie z suszu konopnego. Knezevic i wsp. [2021] określili zawartość wybranych kannabinoidów (CBDA, CBD, Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THC, CBN) w herbatach na bazie liści konopi. Oznaczone średnie zawartości poszczególnych związków to 4,1 mg/kg CBDA, 802,0 mg/kg CBD, 111,0 mg/kg Δ^9 -THCA-A, 76,0 mg/kg Δ^9 -THC

zgodne z tymi uzyskanymi w ramach niniejszej pracy. Herbaty na bazie liści konopi zawierały znacznie mniej Δ^9 -THC niż te zawierające kwiatostany [Knezevic i wsp. 2021]. Celowość oceny zawartości wybranych kannabinoidów w herbatach potwierdzają wyniki uzyskane przez innych badaczy [Gallo-Molina i wsp. 2019, Kladar i wsp. 2021]. Wykazali oni, że w herbatach na bazie konopi zawartość psychoaktywnego Δ^9 -THC przekraczała dopuszczalny poziom w roślinie wynoszacy 0,3% suchej masy [Rozporzadzenie UE 2021/2115]. Pacifici i wsp. [2017] również przeanalizowali herbaty konopne pod kątem zawartości kannabinoidów. Autorzy stwierdzili obecność CBDA, CBG, CBD, CBN, Δ^9 -THC, CBC i Δ^9 -THCA-A w suszonej herbacie na poziomach wynoszących średnio 61800, 600, 26600, 900, 33700, 1200 i 28200 mg/kg, odpowiednio. Występowanie kannabinoidów w tak szerokim zakresie zawartości w poszczególnych herbatach może być związane między innymi z dodatkami stosowanymi w tych produktach, takimi jak zioła lub suszone owoce, których proporcja (0-60%) wpływa na skład herbaty konopnej. Czyste herbaty konopne analizowane w naszym badaniu, oparte wyłącznie na suszonych konopiach (kwiatostany i liście), miały wyższe zawartości kannabinoidów niż herbaty zawierające 40-100% suszonych konopi. Szeroka gama kannabinoidów w gotowych produktach, takich jak suszone konopne herbaty oparte o ziele Cannabis sativa L. var. sativa sugeruje, że konieczne jest kontrolowanie poziomu i profilu kannabinoidów w gotowych produktach dostępnych na rynku, aby wykluczyć ewentualne przekroczenia Δ^9 -THC w produkcie.

Dla próbek nasion odnotowano najwyższe stężenia dla CBDA (21,54 mg/kg), CBD (1,09 mg/kg), Δ^9 -THCA-A (0,49 mg/kg) oraz CBG (0,35 mg/kg). Natomiast nie odnotowano obecności (<LOQ) CBC, CBL, CBN, Δ^9 -THCV, CBDVA, Δ^9 -THCVA oraz CBCA. Zawartość oznaczonego Δ^9 -THC wynosiła 0,11 mg/kg i nie przekroczyła dozwolonej zawartości tego związku w nasionach konopi, która wynosi 3 mg/kg według Rozporządzenia Komisji (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności. Uzyskane wyniki sugerują, że w komercyjnych oczyszczonych nasionach konopi zawartość psychoaktywnego Δ^9 -THC jest na niskim poziomie, a dominują CBDA oraz jego neutralna forma CBD. W badaniach przeprowadzonych przez Jang i wsp. [2020] stężenie Δ^9 -THC mieściło się w zakresie 0,06-5,91 mg/kg, CBD od 0,32 do 25,55 mg/kg. W kolejnej pracy wykonanej przez Christinat i wsp. [2020] analizowano m.in. próbki trzech nasion konopi. Zawartość CBD mieściła się w zakresie 0,49-1,06 mg/kg, CBDA 1,22-6,36 mg/kg, a Δ^9 -THC 0,15-0,21 mg/kg. Opracowana metoda oznaczania kannabinoidów w nasionach gwarantuje wysoką wydajność ekstrakcji oraz precyzję. A uzyskane wyniki analizy są zbliżone do wyników uzyskanych przez innych naukowców





Cannabinoids—Characteristics and Potential for Use in Food Production

Joanna Kanabus *🗅, Marcin Bryła 🗅, Marek Roszko 🗅, Marta Modrzewska and Adam Pierzgalski 🕒

Department of Food Safety and Chemical Analysis, Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; marcin.bryla@ibprs.pl (M.B.); marek.roszko@ibprs.pl (M.R.); marta.modrzewska@ibprs.pl (M.M.); adam.pierzgalski@ibprs.pl (A.P.)

* Correspondence: joanna.kanabus@ibprs.pl

Abstract: Scientific demonstrations of the beneficial effects of non-psychoactive cannabinoids on the human body have increased the interest in foods containing hemp components. This review systematizes the latest discoveries relating to the characteristics of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. var. *sativa*, it also presents a characterization of the mentioned plant. In this review, we present data on the opportunities and limitations of cannabinoids in food production. This article systematizes the data on the legal aspects, mainly the limits of Δ 9-THC in food, the most popular analytical techniques (LC-MS and GC-MS) applied to assay cannabinoids in finished products, and the available data on the stability of cannabinoids during heating, storage, and access to light and oxygen. This may constitute a major challenge to their common use in food processing, as well as the potential formation of undesirable degradation products. Hemp-containing foods have great potential to become commercially popular among functional foods, provided that our understanding of cannabinoid stability in different food matrices and cannabinoid interactions with particular food ingredients are expanded. There remains a need for more data on the effects of technological processes and storage on cannabinoid degradation.

Keywords: bioactive compound; cannabis; cannabidiol; tetrahydrocannabinol; food safety; food analysis; cannabinoids; hemp food

1. Introduction

Cannabis sativa L. is one of the oldest cultivated plants on the planet. Initially, it was used by humans as a source of roughage in animal fodder and as a textile fiber; over time, it was used as a source of food and medicine [1,2]. The plant contains bioactive compounds called cannabinoids [3]. The medicinal use of hemp in Europe dates to the 13th century, however their anticonvulsant, analgesic, and antiemetic properties were not confirmed until the 19th century [3,4]. In Europe, at the end of the 1950s, Russia and Italy were the leading countries in land area used for the cultivation of hemp, as well as in the quality of the products obtained [5,6]. However, after it was observed that hemp's Δ 9-THC induces psychotropic effects, the awareness of its adverse effects on the human body increased, and because of this, numerous countries ceased to grow the plant and use its seeds and flowers in food production. After many years, hemp has gained popularity owing to its low soil and hydrological requirements; it can be grown on almost every soil, regardless of climatic conditions and without special fertilizers. Thanks to these advantages, hemp is becoming a symbol of sustainable farming. Non-narcotic hemp varieties have also been found to have positive effects in the treatment of many diseases [3,6].

Canada is one of the first countries to allow industrial hemp cultivation and remains a major distributor in its production and export, including in food [6,7]. The European Union is the second largest producer of *Cannabis sativa* L. in the world, with centers in France, the Netherlands, Lithuania, and Romania [7,8]. For centuries, *C. sativa* L. has



Citation: Kanabus, J.; Bryła, M.; Roszko, M.; Modrzewska, M.; Pierzgalski, A. Cannabinoids— Characteristics and Potential for Use in Food Production. *Molecules* **2021**, 26, 6723. https://doi.org/10.3390/ molecules26216723

Academic Editors: Severina Pacifico and Bruno Botta

Received: 4 October 2021 Accepted: 2 November 2021 Published: 6 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). been used as an invaluable source of plant fiber. In the last decade, there has been a growing interest in hemp seeds, which contain compounds that have beneficial effects on the human body and considerable nutritional value [6]. Considering the significant interest of scientists in the potential health benefits of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. var. *sativa* in food production, we aim to summarize the latest knowledge in terms of the characteristics of the plant, cannabinoids, and assess the potential of cannabinoids for use in food. Documentation was performed via the Scopus, ScienceDirect, and Google Scholar databases, mostly selecting publications after the year 2010.

2. Cannabis sativa L. var. sativa—Classification and Characteristics

Cannabis sativa L. belongs to the order Urticales and the family Cannabaceae. It is an annual plant that grows in the Northern Hemisphere in moderate climates [9]. The exact areas in which hemp originally grew are not known because the plant has spread all over the world and has been evolving for centuries [1–9]. There are reports of the cultivation and use of *Cannabis sativa* L. in the Neolithic period. The first documented evidence of the pharmaceutical use of the plant was found in cave artefacts dating to ca. 700 BCE. More detailed analyses suggest that *Cannabis sativa* L. may have originated in Central Asia, and then spread to Mediterranean countries, Eastern and Central European countries, and, in particular, to Afghanistan and Pakistan. There are reports of two other centers of species diversity of *Cannabis sativa* L., these being Hindustani and European–Siberian [8,10].

Hemp is characterized by a small number of broadly spaced branches and long, palmately compound leaves. On one branch, 3–13 leaves are present [9]. Hemp is mostly diclinous. Female plants are frost-resistant and grown in greenhouses or in countries without low temperatures where they can survive for several years. It is important to say that the monoecious hemp, thanks to its better usability, has largely replaced the dioecious hemp in Europe. *Cannabis sativa* L. reaches a height of 1–5 m, depending on the environment. Usually, its vegetative period lasts for 3–4 months [1,9,11–14].

Hemp's considerable genetic variability makes its taxonomic classification more difficult. Studies comparing the content of chemical compounds between groups of cultivated and wild plants have led to contradictory interpretations and multiple hemp classifications. At present, 750 natural compounds have been identified in hemp that represent different chemical classes, indicating a very complex phytochemistry [2,13]. Its primary metabolites include amino acids, fatty acids, and steroids. Its secondary metabolites include phytocannabinoids, flavonoids, terpenoids, lignans, and alkaloids [15]. Phytocannabinoids are the best-studied hemp compounds. The discovery and understanding of the biosynthetic pathway of phytocannabinoids are crucial to show that the concentration of each compound present in the plant is determined genetically because different genotypes are characterized by different cannabinoid profiles [6].

The number of species in the genus *Cannabis* has been disputed by taxonomists for a long time. There is no clearly defined nomenclature in literature for Cannabis. The simplest division of the plants in the genus is into three separate species: Cannabis sativa (fiber hemp), *Cannabis indica* (Indian hemp), and *Cannabis ruderalis* (considered to be a wild form) [1,9]. An alternative classification distinguishes Cannabis chemotypes based on cannabinoid content. Chemotype I is medicinal and contains large amounts of psychoactive Δ 9-THC $(\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol). Chemotype II has intermediate properties between medicinal and fiber hemps. Chemotypes III and IV are fibrous and contain large amounts of nonpsychoactive cannabinoids, with relatively low amounts of psychoactive compounds. The last group (chemotype V) is fibrous and contains no cannabinoids [1]. Farinon et al. [6] categorized only three chemotypes based on Δ 9-THC and cannabidiol (CBD) content. These are chemotype I, with a low ratio of CBD to Δ 9-THC (more than 0.2% Δ 9-THC content in plant dry matter during the flowering period, grown for recreational/narcotic purposes); chemotype II, with the two main cannabinoids, CBD and Δ 9-THC, at similar concentrations, but usually with slightly higher CBD content (for medicinal purposes); and chemotype III, characterized by a high CBD content, with Δ 9-THC content not exceeding

0.2% of plant dry matter (used for industrial purposes and in food). Currently, all the varieties are treated as one diverse species, *Cannabis sativa* L., with varieties being *C. sativa* L. var. *sativa*, *C. sativa* L. var. *indica*, and *C. sativa* L. var. *ruderalis* [16]. This classification has also been used in the work of.

C. sativa L. produces a small fruit referred to as achenes in botany, but commonly referred to as "seeds". The pericarp is a protective layer for the grain contained in it. The fruit consists of an embryo and mainly two seed leaves that are rich in oils, carbohydrates, and proteins [17]. C. sativa L. var. sativa seeds are characterized by a high fiber (27–36 g/100 g), fat (25–35 g/100 g), protein (21–28 g/100 g), and carbohydrate (20–30 g/100 g) content. The chemical composition of seeds also includes fatty acid esters, amides, amines, phytosterols, terpenes, phenolic compounds, and cannabinoids [1,2,6,17,18]. They further contain phosphorus, potassium, magnesium, sulphur, calcium, iron, and zinc, as well as vitamins A, C, and E [2,6]. The unique nutritional value of hemp seeds stems from their high content of essential unsaturated fatty acids (approximately 80% of total fatty acid content) [17]. The ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids in hemp seed oil is usually 2:1 or 3:1, which is considered optimal for human health [19]. Linoleic acid accounts for more than half of the total fatty acid content (LA, 18:2, n-6). The remaining fatty acids include linolenic acid (ALA, 18:3, n-3), oleic acid (OA, 18:1, n-9), palmitic acid (PA, 16:0), and γ -linolenic acid (GLA, 18:3, n-6) [18]. It should be remembered that maintaining the appropriate ratio of omega-6 to omega-3 acids depends on a used method of oil extraction (cold pressing is recommended), the origin of the variety, and the type of seeds [20]. Hemp seed-derived proteins include albumin, globular protein, and estidine, the consumption of which has a beneficial effect on regulating human metabolism. Estidine is the most abundant component, accounting for approximately 82% of total protein in hemp seeds [6]. Estidine has a high biological value because its structure is similar to that of globulins present in blood serum, which means that these compounds can be used for the biosynthesis of immunoglobulins, hormones, and enzymes [21]. This protein contains all the essential amino acids [22]. The amino acid profile of hemp seed protein is comparable to that of chicken eggs, but also to that of soybeans, which feature high concentrations of arginine, glycine, and histidine [22,23]. Callaway [23] confirmed these nutritional properties of hemp seeds by finding considerable amounts of protein and essential unsaturated fatty acids. Despite the positive effect of hemp seed-derived protein, attention needs to be given to the antinutritional compounds present in hemp seeds. These contain phytic acid and trypsin inhibitors, which can negatively affect human digestive function [22].

The characteristic scent and flavor of hemp are attributed to terpenes. Both mono- and sesquiterpenes have been isolated from hemp roots and aerial parts. At least 200 different terpenes of the 20,000 known in nature have been found. In most hemp varieties, the most common is monoterpene myrcene as well as sesquiterpenes such as β -caryophyllene and α -humulene. Among the remaining terpenes found in *Cannabis sativa* L. var. *sativa* are α -pinene, limonene, linalool, bisabolol, and (E)- β -farnesene [24,25]. According to some studies, hemp terpenes have antidepressant, anti-inflammatory, and anxiolytic effects. They participate in photosynthesis and have a protective role in plants [2]. André et al. [11] demonstrated that, as the flowers develop, their content of sesquiterpenes decreases, while their content of monoterpenes increases. At the end of the flowering period, monoterpenes account for more than 50% of terpenes in flowers. It is difficult to study the precise content of terpenes in plants because, depending on geographic location, terpene profiles can differ within the same variety [1,8,11,25]. Ingallina et al. [26] showed that each of the analyzed species is characterized by a specific terpenoid profile in the inflorescences. The caryophyllene E, caryophyllene oxide, and humulene were always present, and the content of the compounds was variable depending on the variety and the growth period.

Fibrous hemp inflorescences, as a by-product in the textile industry, are a source of polyphenol compounds with demonstrated health-promoting properties [25]. Flavonoids constitute the largest class of polyphenols and have been divided into six main sub-classes: flavonos, flavonols, flavanones, flavanols, isoflavones, and anthocyanidins [2,25].

Flavonoids make up about 10% of the total compounds present in hemp. The group of flavonoids isolated from flowers, leaves, and pollen includes the O-glycoside aglycone derivatives apigenin, luteolin, orientin, kaempferol, and quercetin, but also cannflavins A and B, which are methylated isoprenoid flavones unique to hemp [2,15]. In tests conducted by André et al. [11], the flavonoid content in hemp inflorescences was determined depending on flowering time. It was observed that the content of phenolic compounds decreased as the flowers developed, with the highest content reported in flowers collected in the early flowering phase. Ingallina et al. [26] also demonstrated a decrease in the content of flavonoids during inflorescence maturation. Spano et al. [27] showed an increase in the content of polyphenic compounds in the first and second phase of inflorescence maturation. The decrease in the content of this group of compounds took place at the end of maturation. In particular, phenolic acids and flavonoids were present among the high concentration of polyphenolic compounds in the inflorescences. Despite the differences in the concentration of flavonoids depending on the variety, it was found that the female inflorescences mainly contained flavone derivatives (apigenin and luteolin). Male inflorescences contain fewer flavonoids than female inflorescences but are characterized by the presence of two unique flavonol compounds, quercetin-O-sophoroside and kaempferol-O-phosphoroside. Flavonoids can constitute approximately 2.5% of the dry matter of hemp leaves and inflorescences, while in the roots and seeds they are present in negligible amounts [25]. Stilbenoids are another group of phenolic compounds that demonstrate a protective and insect-repelling role in hemp. These compounds are present in the leaves, stems, and cannabis resin. Other secondary metabolites of Cannabis sativa L. var. sativa are alkaloids that show a wide range of bioactivities. They act as end products of metabolism and as animal repellents. Multiple alkaloids have been isolated from leaves, stems, and seeds, these being choline, nurine, muscarine, and hordenine [2,15,28,29].

Cannabis sativa L. var. *indica* is used for marijuana, hash, and hash oil; these are narcotic preparations because they contain high amounts of psychoactive Δ 9-THC [30]. *Cannabis sativa* L. var. *indica* is particularly common in Southeast and Central Asia. It can be found in European countries and rarely found in South America, Australia, and Africa [1,9]

According to an EIHA report [8], over the years 2010–2013, the production of the seeds for food purposes in the US increased by 92%. In 2013, the production of flowers and leaves used in medicine, dietary supplements, and oils increased by 3000% compared to 2010. In 2019, the size of the global cannabis market was valued at USD 123.9 billion. The market is expected to grow at an annual growth rate of 14.3% from 2020 to 2027. The liberalization of hemp cultivation (mainly of varieties with low THC content), the potential use of hemp plants in the treatment of chronic diseases, and the use of hemp as a food ingredient are major factors contributing to the growth of the hemp cultivation market [8,30].

3. Hemp Cannabinoids

Cannabinoids (phytocannabinoids) are one of the most important hemp bioactive compounds [1]. They are meroterpenoids with resorcinol cores containing an isoprenyl, alkyl, or aralkyl side chain in the para position. An alkyl side chain is usually composed of an uneven number of carbon atoms. Orcinoids contain one carbon atom, three varinoids, and five carbon atoms. Cannabinoids containing an even number of carbon atoms in the side chain occur very rarely in plants. *Cannabis sativa* L. usually produces alkyl cannabinoids that are characterized by a monoterpene-isoprenyl (C10) moiety and a pentyl (C5) side chain [13,31]. The ring structure originates from geranyl pyrophosphate [16]. A typical cannabinoid structure is shown in Figure 1.



Figure 1. Typical cannabinoid structures (e.g., CBD) differ in carboxylic acid, neutral form, and alkyl side chain [13,16,31].

Phytocannabinoids are synthesized in the glandular trichomes of the plant, primarily found in female inflorescences. Hemp seeds usually contain very small amounts of cannabinoids or none whatsoever. When the glandular trichomes crack, such as due to the impact of higher temperatures, a viscous coating (resin) forms on the surface of the plant, which covers all the elements of inflorescence elements, including the seeds. Resin cannabinoids may be considered as a seed contaminant [17,31]. Based on chromatographic analysis, cannabinoids are present at much lower concentrations in stems, pollen, and roots [15]. Since the beginning of studies relating to the cannabinoids present in *Cannabis sativa* L., more than 100 cannabinoids have been identified, some of them having a beneficial effect on the functioning of the human body [3].

Selected cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. are presented in Table 1. Currently, it is believed that cannabinoids are initially synthesized in an acidic form and then, only as a result of decarboxylation and/or the appropriate enzymes, they are converted into their neutral forms [31,32].

Compound Name	Acronym	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	Structural Formula	Compound Nature
Cannabigerol	CBG	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316.48	HO HO	neutral
Cannabigerolic acid	CBGA	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	360.49	OH COOH HO	acidic

Table 1. Chosen cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. [1,14,30,33–35].

	Table 1. Cont.						
Compound Name	Acronym	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	Structural Formula	Compound Nature		
Cannabidiol	CBD	$C_{21}H_{30}O_2$	314.46	OH HO	neutral		
Cannabidiolic acid	CBDA	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.47	OH COOH HO	acidic		
∆9- Tetrahydrocannabinol	Δ9-ТНС	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46	OH OH	neutral		
Δ9- Tetrahydrocannabinolic acid A	Φ9-THCA	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.47	ОН СООН	acidic		
Δ8- Tetrahydrocannabinol	Δ8-THC	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46	OH OH	neutral		

			lable 1. Cont.		
Compound Name	Acronym	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	Structural Formula	Compound Nature
Cannabichromene	СВС	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46	OH O	neutral
Cannabichromenic acid	CBCA	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.47	ОН СООН	acidic
Cannabinol	CBN	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310.43	OH OH	neutral
Cannabinolic acid	CBNA	C ₂₂ H ₂₆ O ₄	354.44	ОН СООН	acidic
Cannabicyclol	CBL	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46	OH O	neutral
Cannabicyclolic acid	CBLA	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.47	ОНСООН	acidic

Table 1. Cont.

Compound Name	Acronym	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	Structural Formula	Compound Nature
Cannabivarin	CBV	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	282.38	OH OH	neutral
Cannabidivarin	CBDV	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.41	OH HO	neutral
Cannabidivarinic acid	CBDVA	$C_{20} H_{26} O_4$	330.42	ОН СООН НО	acidic
Cannabielsoin	CBE	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330.46	HO HO	neutral
Cannabitriol	CBT	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346.46	HO OH OH	neutral

 Table 1. Cont.



Multiple studies have shown that the first step in cannabinoid biosynthesis is the formation of olivetolic acid, but its biosynthetic pathway has not yet been fully elucidated [16,32,36]. The biosynthesis of cannabigerolic acid (CBGA) occurs in the presence of olivetolic acid precursors and geranyl pyrophosphate with the participation of prenylase geranyl diphosphate:olivetolate geranyltransferase (GOT). This enzyme catalyzes the first step in the synthesis of cannabinoids. This reaction produces CBGA and cannabigerovanic acid; these are also precursors for the synthesis of many other cannabinoids that are produced [3,16,17,22,32,37]. Subsequently, after the isoprenylation step, oxidative cyclase becomes active, which generates further reactions through specific enzymes. CBGA transformations catalyzed by tetrahydrocannabinolic acid synthase lead to the formation of tetrahydrocannabinolic acid (Δ 9-THCA). However, as a result of the activity of cannabidiol acid synthase, CBGA transformation leads to the formation of cannabidiolic acid (CBDA), while the conversion of CBGA catalyzed by cannabichromenic acid synthase allows for the formation of cannabichromenic acid (CBCA). Then, as a result of the decarboxylation of these compounds, many products can be formed: Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), cannabidiol (CBD), and cannabichromen (CBC). The same reaction pathway is observed in the biosynthesis of the remaining cannabinoid acids from cannabigerovarinic acid [6,17,22,32,38]. The biosynthesis pathways of selected cannabinoids are illustrated in Figure 2.



Figure 2. Biosynthesis pathways of selected cannabinoids [13,17,33,39].

The best-known cannabinoids that occur in *Cannabis sativa* L. are Δ 9-THC and CBD. The global interest in CBD is growing due to its demonstrated analgesic, anti-inflammatory, and anxiolytic properties [1,39–41]. The chemical structure of CBD was determined by Mechoulam and Shvo in 1963 [42], with Δ 9-THC being an isomer of this compound. The properties of selected neutral cannabinoids are listed in Table 2.

	Table 2. Properties of selected neutral cannabinoids.								
	Compound Name (Acronym)	Potential Health Benefits	Psychoactive Effects on the Human Body	Cannabis sativa L. Variety in Which the Compound Is Present at Relatively High Concentrations	Use (Medicine, Dietary Supplements, Food)	Effects on the Endocannabinoid System	References		
abinoids	Cannabigerol (CBG)	Antineoplastic	None demonstrated	All varieties	Food, medicine	Low affinity to the CB1 and CB2 receptors, and shows an ability to inhibit anandamide uptake	[16,27,32,43,44]		
anna	Cannabichromen (CBC)	Antidepressant	None demonstrated	All varieties	Medicine	-	[27,32]		
Non-psychoactive c	Cannabidiol (CBD)	Analgesic, anti-inflammatory, anxiolytic, and antineoplastic	None demonstrated	All varieties, but mainly in <i>Cannabis</i> sativa L. var. sativa	Dietary supplements, food	Weak antagonistic action against the CB1 and CB2 receptors, and eliminates the effects of Δ9-THC	[31,44-48]		
	Δ9- Tetrahydrocannabivarin (Δ9-THCV),	Treatment of obesity and epilepsy	None demonstrated	All varieties, but mainly in <i>Cannabis</i> <i>sativa</i> L. var. <i>sativa</i>	Medicine	Partial agonist of the CB2 receptors and antagonist of the CB1 receptors	[49,50]		
ids	Δ9- Tetrahydrocannabinol (Δ9-THC)	Improves sleep and stimulates appetite in cancer patients	Demonstrated	All varieties, but mainly in <i>Cannabis</i> sativa L. var. indica	Medicine	Binds and activates the CB1 receptors	[31,51–53]		
Psychoactive cannabinoi	Δ8- Tetrahydrocannabinol (Δ8-THC)	Anti-glaucoma, and supports the treatment of damaged epithelium of the cornea	Demonstrated, but weaker than Δ 9-THC	All varieties, but mainly in <i>Cannabis</i> sativa L. var. indica	Medicine	Binds and activates the CB1 receptors	[54,55]		
	Cannabinol (CBN)		Demonstrated, but 10× weaker than Δ9-THC	All varieties	-	Binds cannabinoid receptors, showing higher affinity to the CB2 receptors and weak agonism to the CB1 receptors	[25,44]		

The strongest psychoactive cannabinoid, Δ 9-THC, belongs to a group of compounds that are subject to very strict international control. This was the first phytocannabinoid isolated from *Cannabis sativa* L. [54,56,57] and is a degradation product of Δ 9-THCA [58]. It occurs in the highest concentrations in Cannabis sativa L. var. indica and interacts with the signaling system of the endocannabinoid cell in the human body. It plays a regulatory role in key functions including memory, homeostasis, appetite, and reproduction [2]. The Δ 9-THC binds and activates the CB1 receptors of the endocannabinoid system, which are mainly present in the central nervous system as well as in the digestive tract, liver, fatty tissue, kidneys, muscles, and heart. Activation of these receptors inhibits the release of hormones (prolactin, estradiol, and progesterone) and neurotransmitters (acetylcholine, dopamine, and serotonin). The endocannabinoid system also includes CB2 receptors that are present on the surface of immune cells. Their activation stimulates the release of antiinflammatory cytokines [51,52]. The most common route of administration of Δ 9-THC to humans is the oral route, from there it is easily distributed into vascularized tissues such as the liver and lungs [1,25,39-41]. As a drug, Δ 9-THC is used to induce appetite and for its antiemetic properties for people undergoing chemotherapy, but it is also used to improve sleep [31,53]. Δ 8- Tetrahydrocannabinol (Δ 8-THC) is an isomer of Δ 9-THC, which differs by the location of the double bond. This compound also demonstrates psychoactive properties but is much more chemically stable than Δ 9-THC [44].

Phytocannabinoids with confirmed psychoactive properties include Δ 8-THC, which shows a slightly weaker effect on cannabinoid receptors. Its anti-glaucoma properties have also been confirmed, which is due to the compound's ability to affect the intraocular pressure in humans [31,59]. Moreover, cannabinol (CBN), which remains a poorly studied compound, shows tenfold weaker psychoactive properties than Δ 9-THC [25]. This product of Δ 9-THCA degradation is produced when the acid is heated. Its acidic form is present in the entire *Cannabis sativa* L. plant. CBN binds cannabinoid receptors, showing higher affinity for CB2 receptors, and it is a weak agonist for CB1 receptors [44].

CBD is one of the best-studied cannabinoids present in *Cannabis sativa* L. This compound does not have narcotic effects; therefore, it is highly likely that it can be used therapeutically [25,31]. From in vitro studies, CBD is characterized by a weak antagonism for CB1 and CB2 receptors [44,46]. Afrin et al. [47] and Kis et al. [48] confirmed in their studies the benefits of CBD use in patients with lung cancer, breast cancer, and leukaemia. CBD is also noted for its anticonvulsant, anxiolytic, and anti-rheumatoid arthritis properties. To reduce the psychotic symptoms induced by Δ 9-THC, CBD can be used to eliminate the negative effects of Δ 9-THC on hippocampus-dependent memory [31,44].

In addition to CBD, confirmed non-psychoactive properties have been attributed to cannabigerol (CBG), one of the major cannabinoids produced by *Cannabis sativa* L., which is present in much lower amounts than Δ9-THC and CBD. It was the first compound to be purified from *Cannabis sativa* L. resin. The structural property of this compound is the presence of a linear isoprenyl residue. Hemp varieties with significantly higher CBG content are referred to as type IV cannabis (containing significant amounts of non-psychoactive cannabinoids). Due to the lack of narcotic effects, CBG is gaining popularity, with varieties being developed that produce larger amounts of CBG and CBGA [16,25,32]. The acidic form of CBG and CBGA is a precursor for the biosynthesis of other important cannabinoids. CBG has a low affinity for CB1 and CB2 cannabinoid receptors; however, it inhibits the functioning of the endocannabinoid system [43,44,57].

CBC is another compound that does not have psychoactive effects in humans. It occurs in dried hemp material in considerable amounts because its synthesis relies on the decarboxylation of CBCA induced by heating. Although it is present in all *Cannabis* varieties, its properties have not been fully elucidated. The isoprene residue of the compound is oxidatively bound to the resorcinol ring. In many varieties of *Cannabis*, the presence of CBC is associated with the presence of Δ 9-THC. CBC is only one of the major cannabinoids, which is characterized by blue fluorescence under UV light [25,32]. Δ 9-Tetrahydrocannabivarin (Δ 9-THCV) is a homologue of Δ 9-THC, whose side chains contribute to effects other than Δ 9-THC, which makes it a phytocannabinoid with non-psychoactive properties. Considerably higher amounts of Δ 9-THCV are present in fibrous hemp than in *Cannabis sativa* L. var. *indica*. Δ 9-THCV is a partial agonist of the CB2 receptor, whose activity has been measured both in vitro and in vivo [25,44,58].

Although more than 100 phytocannabinoids present in hemp have already been discovered, most of them have not been fully characterized yet [35]. We know very little about cannabidivarin (CBDV), cannabivarin, cannabielsoin, cannabicyclol, cannabitriol, and cannabitriol. CBDV is a CBD derivative that differs from cannabidiol only in that it has a shorter side chain. It has a very weak affinity for CB1 and CB2 receptors. The psychoactive properties of this compound have not yet been confirmed [25,44,60]. Cannabivarin, also known as cannabivarol, is a CBN analogue with a shorter side chain. It is present in small amounts in *Cannabis sativa* L. and is rarely found in fresh plants but mainly present in dried hemp. This compound can be obtained as a result of Δ 9-THCV oxidation [25,44]. CBD can be produced by the photooxidation of CBDA and CBD [32,44]. Cannabitriol is produced by heating CBC; its biosynthesis begins when the oxidation of Δ 9-THC begins. The affinity of these compounds for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors has not yet been described [44].

In 2019 [61], new phytocannabinoids—cannabiphorol and Δ 9-tetrahydrocannabiphorol—were isolated from hemp. These compounds have seven carbon alkyl chains. They are the first phytocannabinoids that contain more than five carbon atoms in the chain, which is unlike most of the cannabinoid compounds isolated from *Cannabis sativa* L. Based on in vitro studies, the capacity of tetrahydrocannabiphorol to bind to the CB1 receptor is 30 times higher than that of Δ 9-THC [61].

Although cannabinoids have gained popularity for their beneficial effects in humans, which have been confirmed in many cases, reports on their antimicrobial properties should also be noted but are still rare and often overlooked. Appendino et al. [62] examined the antimicrobial properties of the major cannabinoids CBD, CBC, CBG, Δ 9-THC, and CBN, showing that each had activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Ali et al. [63] confirmed that hemp extracts have antimicrobial effects. Extracts containing mainly Δ9-THC and CBD are active against Gram-positive bacteria (Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus), while the remaining cannabinoids show bactericidal effects on Gramnegative bacteria (Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa). For fungi, hemp water and acetone extracts were compared. The acetone extract showed higher antimicrobial activity against the bacteria Pseudomonas aeruginosa and Vibrio cholerae, as well as against the fungi Cryptococcus neoformans and Candida albicans. This could indicate that acetone extracts contain more extracted cannabinoids than water extracts [64]. As confirmed by Ali et al. [63], numerous fungi can metabolise cannabinoids without adversely affecting Aspergillus niger. Iseppi et al. [65] concluded that hemp essential oils show promise of being antibacterial against Gram-positive bacteria; unfortunately, they were ineffective against Gram-negative bacteria. The oils with a mixture of bioactive substances, including cannabinoids, showed a stronger antibacterial effect, which was probably due to the synergistic interactions between the compounds present in the oils. They found that hemp essential oils inhibited bacterial proliferation, which can ultimately improve the microbiological quality of finished products containing hemp extracts, oils, or components. A study by Frassinetti et al. [66] showed that Cannabis sativa L. seed extract had selective inhibitory activity against pathogenic strains. It also inhibited the production of biofilms by Staphylococcus aureus. The study did not specify which compounds (e.g., cannabinoids) present in the extracts were responsible for such effects on bacteria. The use of seed extracts or other components of Cannabis sativa L. may be an alternative to other methods used to control microbial growth in finished products available on the food market.

The constantly increasing interest in hemp and its compounds has led to a growing concern about the safety of dietary supplements, dried hemp, and food containing cannabinoids. Over the past decade, many studies on the properties of cannabinoids have opened up new possibilities for the use of cannabinoids other than Δ 9-THC and CBD in addressing

multiple human health problems. Despite this, many properties of cannabinoids present at lower concentrations than the main cannabinoids have yet to be discovered; the acquisition of this knowledge will allow for the wider use of such an abundant group of compounds in medicine and functional food production.

Cannabinoids may be introduced into the human body through both the respiratory and digestive tracts. For this article, their bioavailability and effects on the human body after ingestion will be reviewed. Despite the constantly growing interest of consumers in cannabinoids, there is still a lack of knowledge about their metabolic and homeostatic effects.

The most popular cannabinoid consumer products are dietary supplements, food and beverages containing hemp extracts or Cannabis sativa L. plant components [67]. The consumption of CBD and Δ 9-THC causes their bioavailability to decrease (< 20%) because they are degraded in the acidic environment of the stomach and also in the intestines by enzymes [68,69]. The oral administration of cannabinoids leads to an intensive increase in the hepatic metabolism of these compounds. The maximum plasma concentrations of $\Delta 9$ -THC and CBD after the consumption of hemp products are reached much later (1–2 h after consumption) than after smoking marijuana [70,71]. The application of hemp products to the oral mucous membrane allows for higher plasma concentrations to be achieved faster than ingestion [71]. In medicine, ingestion is the most frequent route of administration for medicinal therapies [70]. It has been demonstrated that Δ 9-THC passes through the placenta and can reach the fetus, but concentrations in fetal blood are usually lower than in maternal blood [72]. It was demonstrated that the ingestion of two Δ 9-THC doses (0.75 and 1.5 mg) per day was safe and well-tolerated by elderly patients suffering from dementia. Δ 9-THC was quickly assimilated in the body of these persons, with maximum plasma concentrations of this compound (0.41 and $1 \mu g/L$ at 1 and 2 h following ingestion, respectively) reached rapidly [73]. Cannabinoids are metabolized in the liver, and they take several days to be removed from the body. The half-life of Δ 9-THC and CBD after ingestion is very difficult to quantify because it is influenced by the balance between the plasma and the fatty tissue [70,71]. Ingested Δ 9-THC is 80–90% excreted in the form of carboxy and hydroxy derivatives, while CBD, which is not metabolized, is excreted in the feces [67,69,70].

According to the available literature, there is no evidence to confirm that the excessive use of cannabinoids (mainly Δ 9-THC) may lead to overdose or death, but there are reports of children falling into comas after consuming these compounds [69,74]. For many years, it has been commonly believed that the overuse of *Cannabis sativa* L. leads to addiction. It is presently believed that the most frequent disorders resulting from long-term *Cannabis* use are increased blood pressure, bronchitis, and reduced lung capacity in persons who smoke it. Certain cannabinoids can also affect fertility and the immune system, as well as cause mood problems and anxiety [69].

There are still many unknowns related to the action and/or interactions of most cannabinoids in the human body. It is extremely important to understand the pathways of cannabinoid transformation and degradation after consuming products containing these compounds for their toxicity in order to ensure food safety. Further studies are needed to gain insight into the benefits of using such products and their long-term adverse health effects in humans, which are still unclear, especially for cannabinoids that occur in lower amounts than CBD and Δ 9-THC.

4. Cannabis sativa L. in Food Production—Opportunities and Limitations

In recent years, there has been an increasing consumer interest in hemp seeds and the products that contain them. The growing popularity of such products translates into an ever-growing product range. Presently, the most popular food products are produced from seeds, hemp flour, and hemp oil. [39,44,75]. Products containing cannabinoids are made by adding cannabis flour derived from the seeds as well as cannabinoid oils and/or extracts. The proportion of a given addition affects the final content of these compounds in the finished product, but the content mainly of THC must not exceed permissible limits [44,76–79].

The concentration of cannabinoids in the oils depends on the variety and the seed cleaning process. Cannabinoids are considered by some to be an impurity in pressed hemp oils [17]. The use of hemp in food processing is extremely difficult due to the differences in the cannabinoid content in plants. A study by Hazekamp and Fischedick [9] showed that nominal cannabinoid concentrations in plants of the same type but in varied geographical locations differed by more than 25%. To mitigate such differences, we can implement strict control over the varieties and their growing methods to ensure greater homogeneity or mix the extracts to ensure the desired homogeneity [9,77–79].

Regulations regarding the permitted content of cannabinoids in food products vary around the world. Legal restrictions usually only apply to Δ 9-THC and do not include Δ 9-THCA, which converts into Δ 9-THC after thermal treatment. Although legal limits differ from country to country, the ranges are usually expressed in mg/kg (ppm) of the final product [39]. Examples of legal limits applicable to selected countries are presented in Table 3.

Table 3. Limitation of Δ 9-THC content in food (ppm).

	Oil from Seeds	Seeds	Total Content in Food	References
Germany total content of Δ9-THC and Δ 9-THCA	5	-	0.02–10	[79,80]
Italy total content of Δ9-THC and Δ9-THCA	5	2	2	[81]
Switzerland Δ9-THC	20	10	-	[82]
Australia, New Zealand total content of Δ 9-THC and Δ 9-THCA	10	5	<5	[83]
Croatia Δ9-THC	-	-	2–20	[84]
Denmark Δ9-THC	10	5	0.5	[85]

In Europe, *Cannabis sativa* L. varieties can be used in food production wherein the total content of Δ 9-THC and Δ 9-THCA in blossoming or fruiting plant tips from which the resin has not been removed does not exceed 0.2% of dry matter. [86]. Only seeds from hemp can be used for food purposes. Other hemp parts and their extracts are classified as "novel foods" in accordance with the Regulation of the European Parliament and the Council (EU) 2015/2283 of 25 November 2015. This regulation defines the term as food that had not been traditionally consumed within the EU before 15 May 1997 [87]. This group includes foods with new or modified molecular structures; foods derived from products produced by microorganisms, fungi, or seaweed; and whole plants or substances extracted from them. *Cannabis sativa* L. var. *sativa* seed extracts and their derivative products containing cannabinoids are considered "novel foods" because no history of their consumption has been demonstrated. However, using plant parts other than seeds can be dangerous because the cannabinoid content in different parts of the plant will vary depending on the variety or the growing conditions; this might constitute a threat to human health.

The European Food Safety Authority [88] has established the acute human reference dose (ARfD) for Δ 9-THC as 1 µg Δ 9-THC/kg. According to the recommendations of the European Commission, there is a need to monitor food made from hemp or containing

hemp components in terms of their content of $\Delta 8$ -THC, CBN, CBD, and $\Delta 9$ -THCV [89]. Despite the established acceptable limits for Δ 9-THC in many products containing cannabinoids, considerable breaches have occurred [90]. Products containing CBD are not explicitly regulated by the EU because CBD is not classified as a controlled substance. Therefore, consumers have no legal guarantee of the quality of a given product [45]. According to studies by Bonn-Miller et al. [91], as much as 69% of the 84 products from different vendors from the US containing CBD were characterized by erroneous labelling, while in 42% of the products, the concentration of this compound did not match the one declared by the manufacturer. In Germany, 67 products containing CBD were analyzed. In 25% of these, the Δ 9-THC content exceeded the ARfD [92]. Producers should ensure that products containing cannabinoids are correctly labelled. Research is also necessary to show the changes in these compounds during storage in order to ensure that the consumer is able to consume the product with the declared amount of cannabinoids throughout its shelf-life. Another challenge is that many countries have their own limits for the content of these substances in finished products. The lack of uniformity prevents the distribution of these products beyond the borders of the country in which they were produced [93].

Hemp extracts are characterized by a resinous, oily texture and their solubility in organic solvents, fats, and alcohols. The appropriate selection of the form (oil, extract) in which the cannabinoids are to be added to the finished product is important so that they have adequate solubility and do not affect the formulation of the finished product. Extracts containing Δ 9-THC and/or CBD usually dissolve in edible oils (e.g., coconut or olive). However, further use of these extracts in processing requires the preparation of an oil and water mixture. Therefore, liquid formulations in which the oil phase is dispersed in the aqueous phase ensure good solubility in water and reduce the susceptibility of the cannabinoids contained in them during oxidation [94–96]. Oil-water emulsions containing cannabinoids are used in the production of tinctures, soft capsules, and beverages. This type of emulsion requires surfactants (emulsifiers) such as polysaccharides, proteins, and phospholipids. The choice of emulsifier depends on the emulsion type, oil molecular composition, and ionic strength of the aqueous extract. Solid hemp products are difficult to produce due to the oily and resinous character of hemp extracts. To solve this problem, support substances are used to form a lipid matrix for the controlled release of cannabinoids and to prevent the degradation of these compounds. Phospholipids are the most effective emulsifiers for cannabinoid-containing emulsions (mainly $\Delta 9$ -THC and CBD) [96–99]. The lipidic properties of cannabinoids are also the reason why these compounds are highly susceptible to oxidation, which compromises their storage stability. Another problem for producers is to ensure homogeneity of concentration in each portion of the product. The control of water activity in the product, as well as the adjustment of proper packaging (appropriate portions, inaccessibility to oxygen and light) are the measures that will improve the quality and durability of such products. It is also necessary to develop standardized methods for the quantification of compounds and the full characterization of cannabinoids to assess bioactivity and bioavailability. In order to determine the bioavailability of cannabinoids from food, further research needs to be conducted on the food matrices used and the oils used as carriers [100]. Examples of opportunities and limitations that may have an impact on the use of cannabinoids in food production are presented in Figure 3.



Figure 3. Major opportunities and limitations that may have an impact on the potential use of cannabinoids in food production [94–100].

Knowledge of the changes that occur during hemp oil storage under different conditions is extremely important when considering their potential use in food processing. As confirmed by Rupasinghe et al. [101], hemp seed oil is highly susceptible to rancidity caused by heat and long-term storage. Hemp seed oil contains acidic cannabinoids, especially cannabidiolic acid, which are present at the highest concentrations in oil. The ratio of CBDA to CBD present in hemp oil is a good indicator of correct oil storage conditions and production processes as well as the freshness of a particular product. Long storage times and incorrect storage conditions may lead to the degradation of CBDA to CBD [102,103].

Processing raw materials with increased temperatures, such as by drying, heating, and combustion, changes the content of cannabinoids. As a result of these processes, non-psychoactive carboxylic acids are transformed into neutral cannabinoids by decarboxylation [103–105]. Δ 9-THC, derived from Δ 9-THCA as a result of decarboxylation, is transformed into CBN under the influence of light and oxygen during further oxidation processes [96]. No enzymes participate in the decarboxylation of cannabinoid acids, which only occurs under the influence of temperature; the higher the temperature, the faster the process [17]. Methods of analysis of compounds present in a product may cause structural changes in cannabinoids, but the optimum times and temperatures for decarboxylation have not yet been determined.

In food processing, hemp seeds are mainly pressed to obtain oil and used for the production of hemp flour. They are also ground to serve as a source of plant-based protein and dietary fiber. Originally, the ground seeds and flour were added to energy bars, flavored yoghurt, and baked foods [101,106,107]. Steinbach [108] developed a production process for pralines and chocolates containing hemp seeds. In 2009, Shim [109] used hemp seed oil and hemp seeds to produce bread and confectionery products. Guang and Wenwei [110] developed a patent for hemp flour in the production of functional foods because its consumption increased the level of high-density lipoproteins and balanced the levels of other glycerides. Berghofer et al. [111] obtained hemp seed milk, which did not change color or become bitter after pasteurization. According to Bisterfeld von Merr [112], adding hemp juice to alcoholic beverages may benefit digestion. The health effects of consuming products containing hemp oil and seeds have not yet been fully established. The benefits reported so far include reductions in total cholesterol and blood pressure in those who consume these products [20]. A very important aspect concerning the use of cannabinoids is to enable the easiest possible application of these compounds to food. Considering the differences in content and quality of individual cannabinoids in plants from different geographical areas, it is necessary to apply alternative methods for synthesis and isolation of these compounds. One of these methods is the use of synthetic biology for the synthesis of cannabinoids in heterologous hosts. Due to the increasing susceptibility of plants to climate change and disease, plants may synthesize fewer cannabinoids than

originally. Chemical synthesis is required to ensure the availability of these compounds. The biosynthesis of cannabinoids by modified and carefully selected microbial strains may provide an alternative to traditional methods of cannabinoid extraction. The biosynthesis of major cannabinoids requires the discovery and characterization of all key enzymes involved in the synthesis of these compounds. Synthetic biology may enable the extraction of more compounds presents in *Cannabis sativa* L. at low concentrations [113].

Nowadays, more and more consumers are interested in foods, that contain cannabinoids. As a result, producers are competing with each other to use cannabinoids in the widest possible range of products. Many aspects influence the possibilities and limitations for the use of cannabinoids in food production in the future. It is important to understand the effects of cannabinoids on the human body and its tissues. It is also necessary to determine the long-term exposure to these compounds during the consumption of cannabis foods and the possible side effects of this. Monitoring the amount and periodicity of consumption and the quality of hemp products will allow us to determine the exposure to cannabinoids. Social anxiety, prejudice, and insufficient knowledge are also barriers to the development of this type of food. It is also necessary to regulate the permissible limits of not only THC but other cannabinoids in products. Given the number of positive reports on cannabinoids and their effects on the human body, the concerns about adding them to food are unfounded. It is important to precisely characterize the properties of each cannabinoid, as the properties known so far suggest that these compounds could replace many common drugs in the future.

5. Analytical Techniques for Food Cannabinoids

From the perspective of food safety, the analysis of cannabinoids in food products made from hemp is extremely important. The aim of such analysis is to minimize the risk resulting from the presence of psychoactive substances that have an adverse effect on the human body. The choice of the technique for determining the presence of cannabinoids depends on the nature of certain compounds as well as the levels of these analytes in the tested material [39].

Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) identifies only neutral cannabinoids with low molecular weights. This leads to the decarboxylation of the acidic cannabinoids and the transformation into their neutral forms under the influence of high temperatures in a chromatography column furnace [96,114]. Derivatization is used to prevent the decarboxylation of cannabinoids. This consists of transforming molecules into a more stable and volatile compound [14,115]. Despite the required additional stage of sample preparation, GC-MS is often used because of its simplicity, speed, and high sensitivity for determining total cannabinoid content (neutral and acidic) [34,75,116]. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) allows for the identification and determination of both neutral and acidic cannabinoids without decarboxylation and derivatization, which is an advantage over GC-MS [96,117]. The determination of cannabinoids by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with UV detection allows for high detection limits. It further allows for the quantification of the main compounds present in the matrix at relatively high concentrations. However, it has the disadvantages of low sensitivity and specificity, which limits the detection of cannabinoids present at low concentrations that are too high [118]. An ultraviolet (UV) detection is most frequently used for analyzing the high concentrations of cannabinoids present in plant materials [119,120]. The use of HPLC coupled to a flame ionization detector (FID) is limited as acidic cannabinoids (i.e., CBDA and Δ 9-THCA) cannot be determined by this method [121]. However, mass spectrometry, particularly tandem mass spectrometry (MS/MS), is considerably more sensitive than UV detection or FID [39,102,121].

Marchetti et al. [122] used the method 13C-qNMR Spectroscopy to determine the nonpsychoactive cannabinoids in fiber-type *Cannabis sativa* L. (hemp). This method provided reliable results compared to a more consolidated HPLC technique. 13C-qNMR Spectroscopy offered sufficiently precise and sensitive results, with LOQ values lower than 750 μ g/mL. This technique is suitable and advantageous for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in hemp extracts. Moreover, it is a good alternative to the chromatographic methods and could be applied in both the plant material and its derivatives.

In 1975, Smith was one of the first to use HPLC-UV to analyze the cannabinoids present in *Cannabis sativa* L. His analyzes led to the identification of eight major cannabinoids (CBD, CBDA, CBN, Δ 9-THC, CBC, cannabinolic acid, Δ 9-THCA, and CBCA) [123]. In their research on the cannabinoids present in plant material, De Backer et al. [120] used HPLC with a diode array detector (DAD). This allowed for assays of the content of certain cannabinoids in plant samples, which made it possible to specify the level of psychoactive effect of a given plant and also to identify multiple types of fibrous hemp. Currently, most cannabinoid determination methods specifically relate to Δ 9-THC, Δ 9-THCA, CBD, CBDA, and CBN. This is related to the EU's recommendation to regulate the content of certain cannabinoids in food [89]. The most common method of food analysis is liquid chromatography coupled with mass spectrometry because it enables assays for the content of acidic cannabinoids, which may be converted into their psychoactive neutral forms, such as through thermal processing [118].

In the literature, there is little information on the cannabinoid content of the cannabis contained in foods and beverages. Most authors concentrate on analyzing hemp itself: its inflorescences, leaves, seeds, and extracts, as well as hemp oils. RP-HPLC-UV was used for the quantitative and qualitative determination of the cannabinoids present in the two inflorescence samples of the same hemp variety, Cannabis sativa L. var. sativa. The largest differences in the content of cannabinoids were observed for CBDA (sample 1-0.88 g/100 g of inflorescence; sample 2-0.93 g/100 g of inflorescence). The contents of Δ -9-THC and Δ -8-THC were below 0.1 g/100 g of inflorescence. Δ 9-THCV was not present in any sample. CBGA, which is a precursor for the synthesis of other cannabinoids, has been detected at very low concentrations. The remaining analyzed cannabinoids had similar or the same concentrations in the two samples [124]. Similar studies were carried out by Žampachová et al. [125] who analyzed the content of cannabinoids in Cannabis sativa L. var. sativa inflorescences using nano-LC-UV. As expected, the highest levels were reported for CBDA (23.8–40.9 mg/g) and CBD (5.9–32.5 mg/g). The presence of CBGA (37.5 and 31.8 mg/g) and CBG (10.9 and 2.3 mg/g) was quantified in two analyzed samples. None of the analyzed fibrous hemp samples had a Δ 9-THC content exceeding 0.2% of the dry plant mass. The authors concluded that their method was faster and more selective than other methods, such as HPLC and UHPLC. Other authors reported no differences in cannabinoid content between the upper and lower parts of the inflorescence. Both Δ 9-THC and CBD were present at the highest concentrations in bracts compared to the whole inflorescences. The authors also emphasized that the differences in the chemical composition between plants of the same variety depend on the growth cycle, harvest period, and the storage of harvested materials [126]. Cardenia et al. [127] developed a rapid GC/MS method for the quantification of cannabinoids present in *Cannabis sativa* L. inflorescences. The compounds with the highest concentrations were CBDA (5.2 g/100 gof inflorescence) and CBD (1.56 g/100 g of inflorescence). CBGA and CBC occurred in amounts lower than 1 g/100 g of inflorescence. The remaining cannabinoids were either not detected or detected at very low concentrations. Jang et al. [128] analyzed commercially available hemp seeds and hemp seed oil for Δ 9-THC, CBD, and CBN content. In hemp seeds, the concentration of Δ 9-THC ranged from 0.06 to 5.91 mg/kg of seeds, the CBD concentration was within 0.32–25.55 mg/kg, while CBN ranged from 0.01 to 1.5 mg/kg. In commercially available hemp oils, the determined $\Delta 9$ -THC content ranged from 0.3 to 19.73 mg/L, CBD from 6.66 to 63.40 mg/L, and CBN from 0.11 to 2.31 mg/L. The low CBN concentration in all the analyzed samples indicates the freshness of the seeds and oil as well as the storage conditions.

To ensure the safety of food and finished food products containing cannabinoids, it is necessary to quantify the cannabinoids both as a raw material and as the finished product. A comparison of the methods used for these analyses is shown in Table 4.

Matrix

Hemp oil

Hemp oil

Hemp oil

Hemp oil

Beer, liqueur, seeds, oil hemp

Analytical Technique	Sample Preparation Method (Extraction, Purification)	Cannabinoids Determined	LOQ/LOD	References
HPLC-UV HPLC-MS/MS	Extraction with 2-propanol	CBDA, Δ9-THCA, CBD, Δ9-THC, CBG, CBN, CBDV	1 mg/kg/0.2 mg/kg	[102]
HPLC-HRMS	Extraction with 2-propanol	CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN, Δ9-THC, Δ8-THC, CBC, Δ9-THCA	-	[129]
GC-MS	Extraction with diethyl ether	CBD, CBN, Δ9-THC	0.03–0.1 mg/kg/-	[130]
HPLC-Q-Exactive-Orbitrap- MS	-	CBD, Δ9-THC, CBN, CBG, CBDA, Δ9-THCA, CBGA	-	[45]
GC-MS	Extraction with hexane/isopropanol mixture (9:1)	CBD, CBN, Δ9-THC	0.001–0.002/0.0003–0.0006 mg/kg	[131]
HPLC-DAD	Extraction with 95% or 100% ethanol depending on the matrix type	CBD, CBDA, Δ9-THC, Δ9-THCA, CBN, Δ8-THC, CBG, CBGA, CBDV, Δ9-THCV, CBC	10 mg/kg/- (for all products)	[132]
	Extraction with 95% or 100%	CBD, CBDA, Δ9-THC,	(1	

Hemp oil and commercially available consumer products (dietary supplements, food, candies, beverages)	HPLC-DAD	Extraction with 95% or 100% ethanol depending on the matrix type	CBD, CBDA, Δ9-THC, Δ9-THCA, CBN, Δ8-THC, CBG, CBGA, CBDV, Δ9-THCV, CBC	10 mg/kg/- (for all products)	[132]
Hemp oil and commercially available consumer products (among others: dietary supplements, food, candies, beverages)	GC-MS	Extraction with 95% or 100% ethanol depending on the matrix type	CBD, CBDA, Δ9-THC, Δ9-THCA, CBN, Δ8-THC, CBG, CBGA, CBDV, THCV, CBC	-/1 mg/kg (for all products)	[75]
Hemp oils Hemp-based extract	HPLC-UV/DAD	Extraction with isopropanol	CBG CBD	1.8 mg/kg/0.5 mg/kg 2.3 mg/kg/0.7 mg/kg	[133]
Hemp seeds, hemp protein				0.15 mg/kg/-	
Hemp oil			CBD, CBDA, Δ 9-THC,	0.6 mg/kg/-	[39]
Raw and powdered milk	LC-MS/MS	Extraction with acetonitrile, OuEChERS	CBDV, CBDVA, CBG, CBGA,	0.005 mg/kg/-	
Tea, coffee, chocolate		Queenbio	THCV, THCVA, Δ8-THC	0.15 mg/kg/-	
Mayonnaise				0.006 mg/kg/-	-

Matrix	Analytical Technique	Sample Preparation Method (Extraction, Purification)	Cannabinoids Determined	LOQ/LOD	References		
Food products	LC-MS/MS	Extraction with methanol:chloroform mixture (9:1, <i>v/v</i>)	Δ9-THC, THCA, Δ8 -THC, CBN, CBD, CBDA, CBG,	0.02 mg/kg/0.006 mg/kg	[105]		
Beverages		Extraction with methanol	CBGA THCV	0.002 mg/kg/0.6 mg/kg			
Milk				0.00413–0.00873 mg/kg/0.00444–0.00893 mg/kg	[134]		
Hemp seeds	LC-MS/MS	Extraction with methanol, SPE	Δ9-THC, Δ9-THC-OH, Δ9-THCA	0.00310–0.00678 mg/kg/0.00352–0.00722 mg/kg			
Chocolate, energy bars, oils		Filter only, SPE, dispersive-SPE, QuEChERS, EMR-lipid		0.00003 mg/kg/0.00001 mg/kg	[135]		
Candies and jellies	LC-MS/MS	Filter only SPE dispersive-SPE	Δ 9-THC, CBD				
Powdered hemp protein, snacks, and cereals		QuEChERS					
Fermented mead with the addition of extracts from inflorescences, leaves, and stems	HPLC-FID	Extraction with hexane/ethyl acetate mixture (9:1 <i>v/v</i>)	CBD, CBN	-/0.01 mg/L	[136]		
Tinctures and oils			CBDA CBD Δ9-THCA				
Food products (honey, candies, jellies, cookies)	HPLC-DAD	Extraction with 95% or 100% $\Delta 9$ - ethanol depending on the CBC	Δ9-THC, Δ8 -THC, CBN, CBC, CBG, CBGA, CBDV,	1–10 mg/kg/4–40mg/kg (depending on the matrix)	[122]		
Beverages			Δ 9-THCV				

Lachenmeier et al. [92] used LC-MS/MS to determine the content of Δ 9-THC in 67 food samples. As much as 25% contained Δ 9-THC at concentrations exceeding the lowest observed level of adverse effect, which was 2.5 mg Δ 9-THC/day, while 43% were classified as unsuitable for consumption because they exceeded the ARfD of 1 μ g Δ 9-THC/kg [85]. Christinat et al. [39] used LC-MS/MS to analyze the presence of 15 cannabinoids in hemp oil and seed samples, as well as in tea, coffee, chocolate, mayonnaise samples, and one milk sample collected from cows fed with hemp. The study demonstrated that products belonging to the same category may have very different cannabinoid profiles and levels, although components from a *Cannabis* plant were added to each product, accounting for 10% of the entire product composition. The CBD content in cow's milk was 0.0095 mg/kg, and the compound was never determined in this matrix. In mayonnaise, none of the cannabinoids were measured above the limit of quantification. Teas, coffees, and chocolates containing hemp leaves or flowers were characterized by a higher content of cannabinoids than products containing hemp seeds. This is not surprising because leaves and inflorescences contain much more cannabinoids than hemp seeds. Brighenti et al. [133] developed a method for quantifying the non-psychoactive cannabinoids (CBDA, CBGA, CBG, and CBD) in Cannabis sativa L. inflorescences and hemp oils, as well as in ethanolic hemp-based extracts and hemp balms, using HPLC-UV/DAD (diode array detector). The CBDA and CBD content of hemp inflorescences ranged from 0.1 to 46.8 mg/g and from 0.1 to 23.9 mg/g of dry matter, respectively. CBGA is a precursor for the synthesis of other compounds; therefore, its content in inflorescences amounted to <9.5 mg/g dry matter, while CBG was <6.5 mg/g dry matter. In the hemp oils, the highest concentration (78.6 mg/mL) was reported for CBD. The remaining cannabinoids were not detected in the oils, or they were present in small amounts. Only CBD (193.7 mg/g) was present in the ethanolic hemp extract. With hemp balm, the content of CBDA amounted to 44.7–80.4 mg/g of the product, CBD amounted to 7.6-13.8 mg/g, while CBGA and CBG were present in considerably lower concentrations, 2.0-3.9 mg/g and 0.4 mg/g, respectively. One of the hemp balms did not contain CBGs. Ciolino et al. [132], by using HPLC-DAD, also quantified 11 cannabinoids in 60 food products, mainly dietary supplements and beverages. This method can be used to quantify these compounds in multiple food products (e.g., candies, beverages, oils, and dietary supplements) as well as in extracts and plant formulations. In commercial buds, the dominant cannabinoid was Δ 9-THCA (138–241 mg/g). Among all the dietary supplement samples analyzed by the authors, the most abundant cannabinoid was CBD (144–350 mg/g). However, the precursor of CBD (CBDA) was not detected or was present in small amounts, which may indicate that the production process involved a thermal processing that led to the decarboxylation of CBDA. In other studies by the same authors, GC-MS was used to quantify 11 cannabinoids present in the extract samples from different parts of the plant as well as in food (candies, beverages, dietary supplements, and hemp oils). In extracts of fresh hemp inflorescences, the content of Δ 9-THC was 10% lower than the content of Δ 9-THCA. A considerably higher Δ 9-THC content was observed in hemp oils. The dominant cannabinoids in hemp seed oils were CBDA and CBD, while Δ 9-THC and Δ 9-THCA were present in small amounts. CBN was not detected in the oil samples. The CBD content in dietary supplements was 145 mg/g. Dietary supplements also contained small amounts of other cannabinoids (CBDV, Δ9-THC, CBC, CBG, CBDA, and CBN), up to 5 mg/g of the product. Detecting cannabinoids that are present in lower concentrations than CBD can provide valuable information on the quality of the added hemp extracts (degree of enrichment with a certain ingredient and degree of decarboxylation of acidic cannabinoids). After analyzing the ethanol extracts up to 3 days after their preparation, it was found that all the cannabinoids were stable [75]. Pisciottano et al. [105] developed a method for the determination of Δ9-THC, Δ9-THCA-A, Δ8-THC, CBN, CBD, CBDA, CBG, CBGA, and Δ 9-THCV in food, beverages, and animal fodder. Their analysis included 100 samples of products from the Italian market, including 78 food products and 16 beverages. CBD and CBDA were the most frequently identified cannabinoids (78% and 84%, respectively). Samples of hemp seed flour and the flour mixture had high concentrations

of CBD, ranging from 1.48 to 14.7 mg/kg. A high concentration of Δ 9-THC and Δ 9-THCA aggregates was determined in hemp seeds and flour (2.0 mg/kg), oil (5.0 mg/kg), and dietary supplements (2.0 mg/kg). The acidic form of CBDA was found more frequently in beverages. A significant amount of Δ 9-THCV and CBN (> 1 mg/kg) was found in honey samples with added CBD and a herbal mixture containing hemp. In their studies, Citti et al. [102] demonstrated that hemp oils are characterized by a total Δ 9-THC content ranging from 5 to 10 mg/kg. This value is higher than the legal limits in many countries only if the aggregate content of Δ 9-THCA and Δ 9-THC are taken into account. If only neutral Δ 9-THC is analyzed, then its content in the samples generally does not exceed 2 mg/kg. Escrivá et al. [134] analyzed the occurrence of Δ 9-THC in milk and infant formula as well as in hemp seeds. In three out of five samples of infant formula, the Δ 9-THC content ranged from 4.76 to 56.11 ng/g. In the samples of hemp seeds that were used as an ingredient of cow fodder, 0.82 mg Δ 9-THC/kg of seeds was determined. No Δ 9-THC was detected in the milk samples. Lee et al. [135] used LC-MS/MS to quantify CBD and Δ 9-THC content in products containing cannabinoids divided into three groups: group 1 (high fat)—chocolate, energy bars, and oils; group 2 (high sugar)—candies and jellies; and group 3 (other products)—powdered hemp protein, snacks, and cereals. The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) method was used to clean the samples, which is often used for extracting samples to the solid phase or to clean them to eliminate matrix contamination (e.g., sugars, organic acids, lipids, and fatty acids). Of the 30 food samples containing cannabinoids, CBD was detected in 15 samples in amounts ranging from 70 to 31.31 mg/kg. The Δ 9-THC content in 12 food products was 0.08–98.62 mg/kg. Both chocolate and hemp oil samples featured the highest CBD and Δ 9-THC content among the analyzed products. In their research, Fernández et al. [130] compared the contents of CBD, CBN, and $\Delta 9$ -THC in hemp oils with a declared CBD content of 20 mg/mL (two samples) and in oils without any of the above, defined cannabinoids (eight samples), using GC-MS. In both oils, the CBD concentrations (22 mg/mL) were consistent with those declared by the manufacturer. The Δ 9-THC and CBN concentrations in these oils were very low (1 mg/mL). The results for the remaining oils differed significantly from each other. Only three oil samples from this group contained CBD, with concentrations ranging from 0.3 to 1.5 mg/mL. A considerably higher discrepancy was observed for Δ 9-THC (0-29 mg/mL) and CBN (0-3.4 mg/mL). Such a high Δ 9-THC content can, with excessive consumption of a given oil, induce narcotic effects (especially in children) [137]. Pellegrini et al. [131] used GC-MS to quantify CBD, Δ 9-THC, and CBN in selected food samples containing cannabinoids. The highest Δ 9-THC content was observed in scented grass (350 ng/g) and hemp seeds (328 ng/g). CBD was not detected in the seeds, whereas a high concentration was detected in the liqueur. Beer and liqueur did not contain CBN, while scented grass had the highest concentration (160 ng/g). Romano et al. [136] conducted two independent experiments involving mead fermentation with the addition of each plant component separately (inflorescences, leaves, and stems) as well as with the addition of their blends in different proportions of individual plant components at 0.25 and 0.50% (w/v). The meads were fermented for five weeks at 25 °C. After fermentation, HPLC-FID analysis was conducted to quantify CBD and CBN in the finished products. CBD was detected at 0.26 mg/L and 0.49 mg/L. This compound naturally occurs in the greatest amount in inflorescences. No CBN was detected; this is mainly produced by Δ 9-THC degradation, while the plant material used in the experiments contained less than 0.2% of Δ 9-THC in dry matter. Dubrow et al. [122] analyzed the content of selected cannabinoids using HPLC-DAD in random products from the US market. The authors analyzed 147 products that were divided into the following groups: tinctures and oils, powders and capsules, food products (honey, candies, and cookies), jellies, beverages, and products for animals. CBD accounted for >98% of the cannabinoid profile in 46 samples, which suggests that the products were made using CBD isolates or highly purified extracts, such as jellies (14.05 mg/g). The highest Δ 9-THC concentration among the analyzed samples was reported for the tinctures and oils group (3.34 mg/g); in most samples, Δ 9-THCA

was not detected or it did not exceed 0.1 mg/g of the product. CBN was present in the tinctures and oils group (1.42 mg/g). Pavlovic et al. [45] assessed the quality of 14 oils containing CBD, commercially available in European countries. Nine of the samples had CBD concentrations higher than their declared content. The CBD content in the oil samples fell within 1875 to 48,879 mg/kg, indicating an enormous variability and suggesting that stricter regulations relating to CBD content in food products need to be implemented. The authors also quantified Δ 9-THC and CBN. The Δ 9-THC content exceeded 0.2% in only one of the analyzed samples, although the manufacturer declared that the product did not contain Δ 9-THC. Most samples also contained CBN, a product of Δ 9-THC oxidation. The detection of this compound in hemp oil suggests that it was produced through an improper process or extraction processes, or that the finished product was improperly stored.

The analysis of the cannabinoids present in food entails challenges related to the matrices in which these compounds are present, as well as the correct choice of how samples must be prepared for the chosen technique. As cannabinoid content differs by 25% within a single cannabis strain, the use of these plants in food production necessarily generates differences in the cannabinoid profile in finished products [9]. There is a clear need to develop effective and efficient cannabinoid assays. GC-MS is the most frequently used technique to determine cannabinoids; however, the quantitative determination of these compounds requires an additional derivatization process to prevent the decarboxylation of acidic cannabinoids [14,34,138]. HPLC-DAD and HPLC-UV constitute good alternatives to GC, but the specificity and sensitivity of these techniques are much lower than those of GC. Researchers often analyze cannabinoids using LC-MS/MS, which can be used to determine both acidic and neutral compounds without affecting their structure and degradation degree [78,138].

6. Cannabinoid Stability

Current data relating to the stability of individual cannabinoids are limited. Most authors have concentrated on two main compounds, Δ 9-THC and CBD. There is still a lack of knowledge on the products formed by the thermal degradation of cannabinoids; these require characterization and toxicological assessments. To ensure the safety of cannabinoid-containing products, the cultivation conditions of the plants from which the extracts are obtained should be standardized in the region and the stability of the extract during storage should be checked [92]. As confirmed by Lindholst [139], from a chemical point of view, using ethanol or methanol as solvents for cannabinoids improves their stability, while the opposite effect is achieved with chloroform. Extracts derived from seeds, resin, or inflorescences containing cannabinoids can be temporarily stored in chloroform. Understanding how cannabinoids change during thermal treatment or storage under improper conditions is extremely important because cannabinoid degradation products can potentially demonstrate health benefits or have an adverse effect on human health. In the future, adding these compounds to food will mean fulfilling all labeling requirements for cannabinoid-containing products [140].

6.1. Cannabinoid Stability with Respect to Temperature, Time, and Light

The first reports relating to the effect of temperature and light on cannabinoid stability were presented by Fairbarin et al. in 1976 [141]. These studies involved the storage of dried hemp leaves and dried hemp inflorescences ground together at 5 °C without light and at 20 °C with and without light for 98 weeks. The analyses also included samples of powdered cannabis resin stored in packaging at 20 °C with and without light. During storage at 5 °C in the dark, the Δ 9-THC content in the samples of ground leaves and inflorescences decreased by 10%. Storing the leaf and inflorescence samples at 20 °C in the dark caused the Δ 9-THC content to decrease by 25%, while for the samples stored in light, the content dropped by 63%. Powdered cannabis resin was collected from the surface, from a layer 2 mm below the surface, and from the middle of the package in which the resin was stored. The Δ 9-THC content on the powder surface decreased from 11.6 to

5.2%. However, in samples collected 2 mm below the surface and from the middle, the content decreased to 11.4% [141]. Grafström et al. [142] emphasized the role of oxygen in the cannabinoid degradation in resin. They observed that the resin samples stored with access to air exhibited much faster degradation of Δ 9-THC and CBD, both in the presence and absence of light. They found that CBD was more stable than Δ 9-THC regardless of the storage conditions (light and temperature). Trofin et al. [143] showed that both temperature and light affect the stability of cannabinoids (Δ 9-THC, CBN, and CBD) extracted from resin samples using methanol:chloroform (9:1, v/v) extraction. In the first year of storage at 22 °C with light (variant 1), the degradation of Δ 9-THC was 1.02 times higher than that of samples stored in the dark under refrigerated conditions (4 °C) (variant 2). CBN formation in the same samples stored according to variant 1 was 1.10 times faster than that of samples stored according to variant 2. An opposite relationship was observed for CBD content. With variant 1 storage, the CBD concentration of this compound was reduced by 0.62 times compared to the samples stored in the dark at 4 °C. Lindholst [139] assessed the stability of four cannabinoids (CBN, CBG, CBD, and Δ 9-THC) during the storage of resin and resin extracts (20–22 $^{\circ}$ C with and without light and $-20 ^{\circ}$ C without light). Cannabinoids were also extracted using methanol:chloroform at a ratio of 9:1 (v/v). The initial cannabinoid concentrations in the resin were 0.4, 0.4, 3.5, and 11.7%. During the storage of resin samples and resin extracts for 4 years, the total Δ 9-THC concentration decreased in samples exposed to light (up to 1–2%). In resin samples stored in the dark for the first 240 days, there was an increase in the Δ 9-THC concentration, which, in subsequent years of storage, was only slightly lower than the initial concentration. The extract samples were characterized by higher Δ 9-THC degradation than observed in the resin samples stored in daylight. In all the resin samples, CBD and CBG remained stable for the entire period of storage in the dark at -20 °C. An increase in CBN along with a decrease in total Δ 9-THC was observed during storage at 20 °C, but no direct correlation was observed between CBN synthesis and Δ 9-THC degradation. Lindholst [139] also carried out studies related to the storage of hemp resin extracts. The half-life of acidic Δ 9-THC in the resin extracts was 10 times shorter than that observed in hemp resin samples. This could be due to differences in sample volumes, which could lead to increased light exposure, contributing to faster degradation. No significant differences were observed for hemp resin extracts during dark storage. The changes in Δ 9-THC concentrations may be a consequence of the degradation into other compounds in addition to CBN.

In another study, Trofin et al. [144] analyzed the effect of storage conditions on the concentrations of Δ 9-THC, CBD, and CBN in hemp oil samples. Cannabinoids were extracted using methanol:chloroform (9:1, v/v). The hemp oil samples were stored for 4 years at 4 °C with and without light at 22 °C in dark glass bottles. The Δ 9-THC concentration decreased in all samples during storage. A higher reduction in the Δ 9-THC content was observed when the samples were stored in light at 22 °C (content reduction of 89.9%) compared to refrigerated conditions (4 °C) in the dark (content reduction of 83.8%). In addition, an increase in the CBN concentration was observed regardless of the storage conditions. In samples stored in light at 22 °C, the concentration increased by 87.2%. Under refrigerated conditions, the concentration of this compound was reduced by 83.2%.

Citti et al. [102] analyzed the effect of temperature and storage time on the stability and decarboxylation degree of CBDA in hemp oil. The samples were stored at 5, 20, and 25 °C. The half-life of CBDA in the hemp oil samples stored at 5 °C was approximately 20 months. When the oil was stored at 20 and 25 °C, the half-lives were 49 and 20 days, respectively. Meija et al. [145] conducted stability testing on seven cannabinoid pairs (CBC, Δ 9-THC, CBN, CBG, CBD, Δ 9-THCV, and CBDV, as well as their acidic forms) in dried hemp material stored in the dark at temperatures ranging from -20 to 40 °C). The average monthly degradation of Δ 9-THCA + Δ 9-THC was 2% at 20 °C. It was observed that the storage of these compounds at 4 °C did not ensure long-term (more than 12 months) cannabinoid stability. Zamengo et al. [146] defined the average degradation of Δ 9-THC within 100 days, which amounted to 12% at 22 °C (3–4% per month). Peschel [147] examined the stability of CBDA, CBD, Δ 9-THC, Δ 9-THCA, CBG, and CBGA in two hemp variants during the storage of hemp tinctures (20 °C with light and 4 °C without). Storage with exposure to light at 20 °C contributed to the increased decarboxylation of Δ 9-THCA, CBDA, and CBGA compared to storage in the dark at 4 °C. The author also showed that neutral cannabinoids degraded slower at 4 °C than at a higher temperature. The main process that occurs during the long-term storage of hemp tinctures is the decarboxylation reaction of cannabinoids. After storing the tinctures for 3 months at 20 °C with exposure to light, both Δ 9-THCA and Δ 9-THC were completely degraded. During 15 month storage at 4 °C, a decrease in the content of Δ 9-THCA was observed while a simultaneous increase in the content of Δ 9-THC was observed, but the aggregate content of these compounds decreased. The aggregate content of CBGA and CBG during both storage variants did not change significantly.

Pacifici et al. [148] analyzed the stability of cannabinoids present in hemp tea and hemp oils. During the storage of tea at 20 °C, a significant reduction (<50%) was observed as compared to the initial Δ 9-THC and CBD concentrations after 3 and 7 days, respectively. The stability of Δ 9-THCA, CBDA, and CBN was observed up to 14 days. At 4 °C, the reduction in the content of Δ 9-THC, CBN, CBG, and CBC amounted to 65% after 3 days of storage. CBDA remained stable for 14 days. For Δ 9-THCA and CBD, their concentrations decreased by 70 and 40%, respectively, after 7 days of storage. For hemp oils, the highest drop (28%) in Δ 9-THC content was observed for oil made from inflorescences that had not been previously heated after 14 days of storage at 20 °C. For all the remaining cannabinoids, losses from 80 to 85% were reported after 14 days of storage, regardless of the storage conditions. Under all storage conditions, hemp oil showed the highest stability.

Milay et al. [149] attempted to determine the optimum storage conditions (1 year) for dried hemp inflorescences and their extracts to maintain cannabinoid content. The samples were stored in the dark at different temperatures (-80, -30, 4, and 25 °C), whereas for extracts, the solvents also differed (olive oil, ethanol, or dimethyl sulfoxide). For both inflorescences and extracts, storage at 25 °C caused the greatest changes in cannabinoid content, which made such conditions the most unfavorable for storing samples containing these compounds. The storage of whole inflorescences and extracts at 4 $^{\circ}$ C is optimal for maintaining the natural cannabinoid content in the samples. The use of olive oil as a solvent improves cannabinoid stability. The acidic cannabinoids present in inflorescences were much less susceptible to decarboxylation than hemp extracts under the same storage conditions, depending on the solvent used. In ground inflorescence samples, the decarboxylation process was more intense than in the whole inflorescence. McRae and Melanson [119] stored samples of extracts obtained from dried and ground inflorescences at -20 °C for 8 weeks, demonstrating that these storage conditions maintain the stability of the cannabinoids extracts over this period. Despite the use of very low temperatures and a limited exposure to light, the authors observed slow decarboxylation after 8 weeks.

Mudge et al. [150] assessed the stability of cannabinoid standards dissolved in 80% methanol and stored at -20, 4, and 22 °C without light access. The standards were prepared separately and mixed. For separately prepared standards, significant changes in the content of Δ 9-THCA and CBDA were observed after 30 h at 20 °C, and amounted to 6.3 and 9.6%, respectively. The standards mixed and stored at -20 °C were degraded after 48 h of storage and the reduction in the contents of Δ 9-THCA and CBDA content amounted to 8.1 and 10.6%, respectively. Additionally, the research compared the stability of inflorescence extracts prepared using 80% methanol and a mixture of methanol and chloroform (9:1, v/v) during storage in the dark at 4 and 22 °C. It was concluded that methanol:chloroform extracts were stable at 4 °C for 48 h and 22 °C for 36 h. Extracts in 80% methanol were also stable at 4 °C for 48 h, but increasing the temperature led to reduced cannabinoid stability after 24 h.

Based on the above results, it can be concluded that the longest stability of cannabinoids, both neutral and acidic, requires them to be stored in the dark. The use of refrigerated temperatures reduces the loss of cannabinoids during storage caused by decarboxylation.

6.2. Cannabinoid Stability with Heating

The available knowledge regarding the stability of cannabinoids during heating is insufficient to confirm that products containing cannabinoids are a safe additive or ingredient. There is a lack of data on the stability of these compounds during processing, and the degradation products of these compounds are not fully known. One of the studies carried out by Turek and Florian [151] confirmed that each increase in heating temperature of hemp oil causes a twofold increase in the cannabinoid degradation rate. Thermal degradation and oxidation are reactions that lead to undesirable changes in edible oils, including hemp oil. The knowledge of the effect of both reactions on the quality of hemp oil is essential to maintain the proper quality of oils used for food production. According to many studies, hemp oil is considered unstable because it contains large amounts of unsaturated acids (e.g., α -linoleic acid and γ -linolenic acid), which are susceptible to oxidation during heating and storage [152–154].

Dussy et al. [115] heated pure Δ 9-THCA for 15 min at 160 °C, which resulted in the complete conversion of Δ 9-THCA to Δ 9-THC, while CBN was additionally formed during heating at 180 °C. The decarboxylation rate constant determined by Wang et al. (2016) for Δ 9-THCA was twice as high as those for CBDA. The conditions under which the synthesis Δ 9-THC reached its maximum efficiency were: 10 min at 145 °C, 15 min at 130 °C, and 20 min at 110 °C. In contrast, the maximum concentration for CBD was achieved after heated under the following conditions: 10 min at 145 °C, 30 min at 130 °C, and 50 min at 110 °C.

Citti et al. [102] examined the decarboxylation of compounds present in hemp oil when heated. The experiment was carried out in two variants: open and closed vials with hemp oil. The first variant involved heating the samples in an oven; after 15 min, one vial was removed, cooled down to room temperature, diluted, and analyzed using HPLC-UV. This was repeated at 80, 90, 100, 110, and 120 °C. The second variant involved heating closed vials containing hemp oil in an oven at 120 °C; after 15 min, one vial was removed, cooled down to room temperature, diluted, and analyzed using HPLC-UV. The results obtained for the first variant showed that at temperatures below 100 °C, the aggregate concentrations of CBD and CBDA were not subject to significant changes (a drop of 1% and 2%). The decarboxylation of CBDA below 100 $^{\circ}$ C led to the formation of CBD. Using a temperature of 100 °C led to a 20% decrease in the aggregate content of these compounds. Heating at 110 °C and 120 °C caused the aggregate content of these compounds to drop by 30 and 60%, respectively. At 120 °C, CBDA decarboxylation and CBD degradation were simultaneously observed. It was concluded that the higher the process temperature, the more the CBD concentration decreased, as was the aggregate content of the two compounds formed. During the reaction carried out in closed vials at 120 °C, a linear decrease in CBDA content was observed with the simultaneous formation of CBD, although the loss of its aggregate concentration was about 11%. These experiments demonstrated that both the increased temperature and oxygenation during heating affect CBDA decarboxylation, and the influence of these factors also leads to the degradation of neutral CBD.

Casiraghi et al. [155] analyzed samples of hemp inflorescences subjected to high temperatures (85–145 °C) before cannabinoid extraction. They concluded that the optimal temperature was 115 °C. Under such heating conditions, the complete decarboxylation of Δ 9-THCA to Δ 9-THC occurred within 40 min and did not lead to the formation of CBN. According to the authors, heating the inflorescences before further extraction makes it possible to obtain extracts or oils with high concentrations of neutral cannabinoids that affect the human body, unlike the acidic cannabinoids.

Pacifici et al. [148] analyzed the content of CBDA and Δ 9-THCA in hemp oil obtained from hemp inflorescences pre-heated in an oven at 145 °C for 30 min. Pre-heating led to the complete decarboxylation of CBDA and Δ 9-THCA, but no significant increase in Δ 9-THC concentration was observed in contrast to CBD, which resulted from the degradation of CBDA.

Taschwer and Schmid [156] carried out stability tests on Δ 9-THCA and Δ 9-THC at different temperatures (50, 100, and 150 °C) for samples of dried and ground hemp inflorescences. The samples (stored at 50 °C) were collected every 2 h for the first 8 h; in the other temperature variants (100 and 150 $^{\circ}$ C), the samples were collected every 1 h for the first 8 h. The final samples were collected 24 h after the start of the storage period. The contents of individual cannabinoids in the sample were expressed as percentages. A slight effect of the temperature of 50 °C on the decarboxylation process was observed (Δ 9-THCA concentration changed from 12.21 to 11.69%). The same conditions for Δ 9-THC led to an increase in concentration from 1.51 to 2.12%, which was caused by the decarboxylation of Δ 9-THCA. The conditions of 100 °C and 150 °C caused the complete decarboxylation of Δ 9-THCA within 2 h and 1 h, respectively. For Δ 9-THC, at 100 °C the maximum possible compound concentration was achieved, which was 12.28%, but this reduced to 4.79% after 24 h. However, as a result of heating Δ 9-THC at 150 °C, the maximum possible concentration of this compound (12.77%) was achieved after only one hour, but after 24 h, the concentration had dropped to 0.19%. The research showed that the storage of hemp samples at -25 °C for 4 months did not cause changes in the content of Δ 9-THCA and Δ 9-THC during and after the storage period.

Peschel [147] studied the influence of pasteurization on the cannabinoid content (total cannabinoids, the aggregate content of Δ 9-THC, Δ 9-THCA, and CBN) in ethanol-based tinctures at 70 °C for 2 h and at 80 °C for 20 min. They found that both pasteurization methods affected the total cannabinoid content or the aggregate content of Δ 9-THCA, and CBN in tinctures, resulting in a maximum loss of 20%. Pasteurization did not accelerate the Δ 9-THCA decarboxylation reaction.

Knezevic et al. [157] measured residual cannabinoid (CBDA, CBD, Δ 9-THCA, Δ 9-THC, and CBN) in teas prepared from fibrous hemp. The samples were prepared at different temperatures (43, 55, 70, 85, and 97 °C), volumes (59, 100, 150, 200, and 241 mL), and times (6, 10, 15, 20, and 24 min). The initial CBDA content in the plant material was 4073 mg/kg. The CBDA content decreased from 1524 mg/kg at 43 °C (6 min) to 617 mg/kg at 97 °C (24 min). The concentration of CBD increased as the brewing temperature increased. The initial level was 802 mg/kg, while after brewing at 97 °C (24 min) it increased to 1710 mg/kg. The Δ 9-THCA residue concentration in the infusion was only affected by the water temperature. The lowest Δ 9-THCA (29 mg/kg) content was recorded after brewing at 43 °C (6 min), with an initial value of 111 mg/kg. The Δ 9-THC was present in the plant material before brewing at 76 mg/kg. The concentration changed with the brewing temperature and time. It was concluded that brewing at 97 °C (24 min) ensured the highest Δ 9-THC (116 mg/kg) content in tea. Brewing the hemp teas at 70 °C (15 min/150 mL) slightly increased the CBN content to 65 mg/kg compared to the initial value of 52 mg/kg.

Ryu et al. [158] compared the loss of neutral cannabinoids in hemp inflorescences with the loss of cannabinoids obtained from their extracts when heated at a maximum of 135 °C for 30 min. In all cases, the content of CBD and Δ 9-THC increased, but in the case of hemp inflorescences, the content of neutral cannabinoids increased with time and did not decrease after 30 min. In the inflorescence extracts, the increase in the cannabinoid concentration was much lower than that in the fresh material, while at the end of the heating process, both CBD and Δ 9-THC decreased.

Despite many studies relating to the stability of cannabinoids in hemp extracts and plants containing these compounds when processing plant material, there remain many questions to be resolved, particularly regarding the effect of oxygen when heating certain cannabinoids. Recent reports on the stability of cannabinoids in food matrices show that the environment in which we store products containing cannabinoids, the heating temperature, and matrix affect the stability of cannabinoids in the finished product. One of the recent studies looks at the stability of these compounds in chocolate. The influence of the matrix on the stability of the cannabinoid molecule is shown. The degree of matrix (chocolate) interference depends on two factors: the chemical composition of the chocolate and the chemical structure of the cannabinoids [159]. Another study determining the stability of
cannabinoids in brownie found no significant effect of matrix ingredients on the stability of individual cannabinoids in the final product [160]. There is no definitive information in the literature regarding the effect of the matrix components of a given product on the stability of cannabinoids. It is extremely important to conduct such studies in order to determine the stability of these compounds in various food matrices. The methods of producing and heating of final products containing dried hemp, hemp seeds, or hemp oil, which contain cannabinoids, need to be accurately analyzed, as well as their potential degradation or transformation in the presence of other food ingredients.

7. Conclusions

Cannabis sativa L. is gaining popularity for its biological properties, which are primarily associated with both psychoactive and non-psychoactive cannabinoids. Hemp seeds and their oils are also recognized for their high nutritional and health-promoting properties. Current knowledge on *Cannabis sativa* L. var. *sativa* is very broad and allows for its accurate characterization. The constantly increasing interest in hemp and its compounds has led to human health safety concerns associated with the use of dietary supplements, dried hemp, and foods containing cannabinoids. Over the past decade, many studies on the properties of cannabinoids have opened up new possibilities for using them, other than Δ 9-THC and CBD, in addressing multiple human health problems. Although our knowledge of the effects of the main cannabinoids (CBD, Δ9-THC, and CBG) on the human body is very broad, there is still insufficient information about the bioactivity of the lower concentrations of cannabinoids that are formed through the transformations of the main cannabinoids. Expanding this knowledge will allow for a wider use of this broad group of compounds in food production, potentially for functional foods. Based on the available knowledge, it is not possible to choose a clear-cut technique for quantifying cannabinoids in all matrices. Depending on the product, it is necessary to adjust the methods to the matrix in which the compounds of interest are present. There are numerous discrepancies in the quantifications of cannabinoids in inflorescences and hemp oils, likely caused by environmental conditions and the plant developmental stage. Similar correlations have been observed in studies on food. Depending on the Cannabis sativa L. var. sativa plant part, hemp oil, or extract, there are significant differences in final concentrations of cannabinoids in finished food products. Our current knowledge on cannabinoid stability during heating or storage under different conditions is not sufficient to determine the level of degradation of these compounds. There is a lack of information on the effects of food matrix ingredients and the effects of technological processes (e.g., fermentation) on cannabinoid stability. It is necessary to develop optimal methods for the processing of foods containing such compounds. Defining any strategies for handling finished products (storage time and conditions) will enable the preservation of their bioactive ingredients and thus the preservation of the benefits of this type of food. Nowadays, the most significant unknown is the cannabinoid degradation products present in food; therefore, cannabinoid degradation pathways need to be studied to ensure food safety and maintain the trust of consumers. Expanding our currently inadequate knowledge on hemp will allow for the safe use of cannabinoids in food production, including functional food, which is currently attracting much interest among consumers.

Author Contributions: Conceptualization, J.K., M.B. and M.R.; formal analysis, J.K., M.B. and M.R; resources, J.K.; writing—original draft preparation, J.K., M.M. and A.P.; writing—review and editing, J.K., M.B. and M.R.; visualization, J.K., M.M., and A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Pellati, F.; Borgonetti, V.; Brighenti, V.; Biagi, M.; Benvenuti, S.; Corsi, L. *Cannabis sativa* L. and non psychoactive cannabinoids: Their chemistry and role against oxidative stress, inflamation and cancer. *BioMed Res. Int.* **2018**, 2018, 1691428. [CrossRef]
- 2. Salami, S.A.; Martinelli, F.; Glovino, A.; Bachari, A.; Arad, N.; Mantri, N. It is our turn to get *Cannabis* high: Put cannabinoids in food and health baskets. *Molecules* **2020**, *25*, 4036. [CrossRef]
- 3. Karas, J.A.; Wong, L.J.M.; Paulin, O.K.A.; Mazeh, A.C.; Hussein, M.H.; Li, J.; Velkov, T. The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics* **2020**, *9*, 406. [CrossRef]
- 4. Baker, D.; Pryce, G.; Giovannoni, G.; Thompson, A.J. The therapeutic potential of *Cannabis*. *Lancet Neurol.* 2003, *2*, 291–298. [CrossRef]
- 5. Da Porto, C.; Decorti, D.; Natolino, A. Potential oil yield, fatty acid composition, and oxidation stability of the hempseed oil from four *Cannabis sativa* L. cultivars. *J. Diet. Suppl.* **2014**, *12*, 1–10. [CrossRef]
- 6. Farinon, B.; Molinari, R.; Costantini, L.; Merendino, N. The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients* **2020**, *12*, 1935. [CrossRef]
- Congressional Research Service: Hemp as an Agricultural Commodity (CRS Report RL32725). Available online: https://fas.org/ sgp/crs/misc/RL32725.pdf (accessed on 2 August 2021).
- 8. *Cannabis* Cultivation Market Size, Share & Trends Analysis Report by Biomass (Hemp, Marijuana), by Application (Medical Consumption, Recreational Consumption), by Region, and Segment Forecasts. (Repoert ID GVR-3-68038-803-9). Available online: https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/Cannabis-cultivation-market# (accessed on 24 October 2021).
- 9. Hazekamp, A.; Fischedick, J.T. Cannabis—From cultivar to chemovar. Drug Test. Anal. 2012, 4, 660–667. [CrossRef] [PubMed]
- 10. Soorni, A.; Fatahi, R.; Haak, D.C.; Salami, S.A.; Bombarely, A. Assessment of Genetic Diversity and Population Strucutre in Iranian *Cannabis* Germplasm. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15668. [CrossRef] [PubMed]
- 11. André, A.; Leupin, M.; Kneubühl, M.; Pedan, V.; Chetschik, I. Evolution of the polyphenol and terpene content, antioxidant activity and alant morphology of eight different fiber-type cultivars of *Cannabis sativa* L. cultivated at three sowing densities. *Plants* **2020**, *9*, 1740. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Small, E.; Cronquist, A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976, 25, 405–435. [CrossRef]
- 13. Hartsel, J.A.; Eades, J.; Hickory, B.; Makriyannis, A. Cannabis sativa and hemp. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity;* Guptam, C.R., Ed.; Academis Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 735–754.
- 14. Micalizzi, G.; Vento, D.; Alibrando, F.; Donnarumma, D.; Dugo, P.; Mondello, L. *Cannabis sativa* L.: A comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1637*, 461864. [CrossRef]
- 15. Flores-Sanchez, I.J.; Verpoorte, R. Secondary metabolism in Cannabis. Phytochem. Rev. 2008, 7, 615–639. [CrossRef]
- ElSohly, M.A.; Radwan, M.M.; Gul, W.; Chandra, S.; Galal, A. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. In *Phytocannabinoids: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; Volume 103. [CrossRef]
- 17. Citti, C.; Braghiroli, D.; Vandelli, M.A.; Cannazza, G. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 147, 565–579. [CrossRef]
- Alonso-Esteban, J.I.; González-Fernández, M.J.; Fabrikov, D.; Torija-Isasa, E.; de Cortes Sánchez-Mata, M.; Guil-Guerrero, J.L. Hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties: Fatty acid profiles and upgrading of γ-linolenic acid–containing hemp seed oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2020, *122*, 1900445. [CrossRef]
- 19. Bartkiene, E.; Schleining, G.; Krungleviviute, V.; Zadeike, D.; Zavistanaviciute, P.; Dimaite, I.; Kuzmaite, L.; Riskeviciene, V.; Juodeikiene, G. Development and quality evaluation of lacto-fermented product based on hulled and not hulled hempseed (*Cannabis sativa* L.). *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *72*, 544–551. [CrossRef]
- 20. Spano, M.; Di Matteo, G.; Rapa, M.; Ciano, C.; Ingallina, C.; Cesa, S.; Menghini, L.; Carradori, S.; Giusti, A.M.; Di Sotto, A.; et al. Commercial hemp seed oils: A multimethodological characterization. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 6933. [CrossRef]
- 21. Pojić, M.; Dapčević Hadnađev, T.; Hadnađev, M.; Rakita, S.; Brlek, T. Bread supplementation with hemp seed cake: A by-product of hemp oil processing. *J. Food Qual.* 2015, *38*, 431–440. [CrossRef]
- 22. Leonard, W.; Zhang, P.; Ying, D.; Fang, Z. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019, 19, 282–308. [CrossRef] [PubMed]
- 23. Callaway, J.C. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 2004, 140, 65–72. [CrossRef]
- 24. Casano, S.; Grassi, G.; Martini, V.; Michelozzi, M. Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa* L. *Acta Hortic*. **2011**, *925*, 115–121. [CrossRef]
- 25. Tomko, A.M.; Whynot, E.G.; Ellis, L.D.; Dupré, D.J. Anti-cancer potential of cannabinoids, terpenes and flavonoids present in *Cannabis. Cancers* 2020, *12*, 1985. [CrossRef] [PubMed]
- Ingallina, C.; Sobolev, A.P.; Circi, S.; Spano, M.; Fraschetti, C.; Filippi, A.; Di Sotto, A.; Di Giacomo, S.; Mazzoccanti, G.; Gasparrini, F.; et al. *Cannabis sativa* L. inflorescences from monoecious cultivars grown in central Italy: An untargeted chemical characterization from early flowering to ripening. *Molecules* 2020, 25, 1908. [CrossRef]

- 27. Spano, M.; Di Matteo, G.; Ingallina, C.; Botta, B.; Quaglio, D.; Ghirga, F.; Balducci, S.; Cammarone, S.; Campiglia, E.; Giusti, A.M.; et al. A multimethodological characterization of *Cannabis sativa* L. inflorescences from seven dioecious cultivars grown in Italy: The effect of different harvesting stages. *Molecules* 2021, 26, 2912. [CrossRef]
- 28. Wen, W.; Alseekh, S.; Fernie, A.R. Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2020**, *55*, 100–108. [CrossRef]
- Horanin, A.; Bryndal, I. Hemp—Active ingredients, medicinal properties and using. *Res. Pap. Wroc. Univ. Econ.* 2017, 494, 76–84. [CrossRef]
- Carus, M.; Karst, S.; Kauffmann, A.; Hobson, J.; Bertucelli, S. *The European Hemp Industry: Cultivation, Processing and Applications for Fibres, Shives and Seeds*; European Industrial Hemp Association: Brussels, Germany, 2013; pp. 1–9. Available online: https://www.votehemp.com/wp-content/uploads/2018/09/13-03_European_Hemp_Industry.pdf (accessed on 24 October 2021).
- 31. Gülck, T.; Møller, B.L. Phytocannabinoids: Origins and biosynthesis. Trends Plant Sci. 2020, 25, 985–1004. [CrossRef]
- 32. Ujváry, I.; Hanuš, L. Human metabolites of cannabidiol: A review on their formation, biological activity, and relevance in therapy. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2016**, *1*, 90–101. [CrossRef] [PubMed]
- 33. Hanuš, L.O.; Meyer, S.M.; Muñoz, E.; Taglialatela-Scafati, G.; Appendino, G. Phytocannabinoids: A unified critical inventory. *Nat. Prod. J.* **2016**, *33*, 1357–1392. [CrossRef] [PubMed]
- Nahar, L.; Guo, M.; Sarker, S.D. Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. *Phytochem. Anal.* 2019, *31*, 135–146. [CrossRef] [PubMed]
- Radwan, M.M.; Chandra, S.; Gul, S.; ElSohly, M.A. Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of *Cannabis*. *Molecules* 2021, 26, 2774. [CrossRef]
- 36. Taura, F.; Tanaka, S.; Taguchu, C.; Fukamizu, T.; Tanaka, H.; Shoyama, Y.; Morimoto, S. Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2061. [CrossRef] [PubMed]
- 37. Fellermeier, M.; Zenk, M.H. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* **1998**, 427, 283–285. [CrossRef]
- 38. Tahir, N.M.; Shahbazi, F.; Rondeau-Gagné, S.; Trant, J.F. The biosynthesis of the cannabinoids. J. Cannabis Res. 2021, 3, 7. [CrossRef]
- Christinat, N.; Savoy, M.C.; Mottier, P. Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. *Food Chem.* 2020, 318, 126469. [CrossRef]
- 40. Bonini, S.; Premoli, M.; Tambaro, S.; Kumar, A.; Maccarinelli, G.; Memo, M.; Mastinu, A. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, 227, 300–315. [CrossRef] [PubMed]
- Palazzoli, F.; Citti, C.; Licata, M.; Vilella, A.; Manca, L.; Zoli, M.; Vandelli, M.A.; Forni, F.; Cannaza, G. Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, *150*, 25–32. [CrossRef] [PubMed]
- 42. Mechoulam, R.; Shvo, Y. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* **1963**, *19*, 2073–2078. [CrossRef]
- De Petrocellis, L.; Ligresti, A.; Schiano Moriello, A.; Iappelli, M.; Verde, R.; Stott, C.G.; Cristino, L.; Orlando, P.; Di Marzo, V. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: Pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 2013, *168*, 79–102. [CrossRef] [PubMed]
- 44. Morales, P.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H. Molecular targets of the phytocannabinoids—A complex picture. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2017**, *103*, 103–131. [CrossRef] [PubMed]
- 45. Pavlovic, R.; Nenna, G.; Calvi, L.; Panseri, S.; Borgonovo, G.; Giupponi, L.; Cannazza, G.; Giorgi, A. Quality traits of "cannabidiol oils": Cannabinoids content, terpene fingerprint and oxidation stability of European commercially available preparations. *Molecules* **2018**, *23*, 1230. [CrossRef] [PubMed]
- 46. Thomas, A.; Baillie, G.L.; Phillips, A.M.; Razdan, R.K.; Ross, R.A.; Pertwee, R.G. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 613–623. [CrossRef]
- 47. Afrin, F.; Chi, M.; Eamens, A.L.; Duchatel, R.J.; Douglas, A.M.; Schneider, J.; Gedye, C.; Woldu, A.S.; Dun, M.D. Can hemp help? Low-THC *Cannabis* and non-THC cannabinoids for the treatment of cancer. *Cancer* **2020**, *12*, 1033. [CrossRef] [PubMed]
- Kis, B.; Ifrim, F.C.; Buda, V.; Avram, S.; Pavel, I.Z.; Antal, D.; Paunescu, V.; Dehelean, C.A.; Ardelean, F.; Diaconeasa, Z.; et al. Cannabidiol—from plant to human body: A promising bioactive molecule with milti-target effects in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5905. [CrossRef] [PubMed]
- 49. Atakan, Z. *Cannabis*, a complex plant: Different compounds and different effects on individuals. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **2012**, 2, 241–245. [CrossRef] [PubMed]
- 50. Carrillo-Salinas, F.J.; Navarrete, C.; Mecha, M.; Feliu, A.; Collado, J.A.; Cantarero, I.; Bellido, M.L.; Muñoz, E.; Guaza, C. A cannabigerol derivative suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94733. [CrossRef]
- 51. Pacher, P.; Batkai, S.; Kunos, G. The endocannabinoid system as emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 2006, *58*, 389–462. [CrossRef]
- 52. Fine, P.G.; Rosenfeld, M.J. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides Med. J.* **2013**, *4*, e0022. [CrossRef]
- 53. Chanda, D.; Neumann, D.; Glatz, J.F.C. The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2019**, *140*, 51–56. [CrossRef]

- 54. Thapa, D.; Cairns, E.A.; Szczesniak, A.M.; Toguri, J.T.; Caldwell, M.D.; Kelly, M.E.M. The cannabinoids D8THC, CBD, and HU-308 act via distinct receptors to reduce corneal pain and inflammation. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2018**, *3*, 11–20. [CrossRef]
- 55. Vági, E.; Balázs, M.; Komóczi, A.; Kiss, I.; Mihalovits, M.; Székely, E. Cannabinoids enriched extracts from industrial hemp residues. *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2019**, *63*, 357–363. [CrossRef]
- 56. Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1646–1647. [CrossRef]
- 57. Ramirez, C.L.; Fanovich, M.A.; Churio, M.S. Cannabinoids: Extraction methods, analysis, and physicochemical characterization. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2019**, *61*, 143–173. [CrossRef]
- 58. Marcu, J.P. An overview of major and minor phytocannabinoids. *Neuropathol. Drug Addict. Subst. Misuse* 2016, 1, 672–678. [CrossRef]
- Hippalgaonkar, K.; Gul, W.; ElSohly, M.A.; Repka, M.A.; Majumdar, S. Enhanced solubility, stability, and transcorneal permeability of δ-8-tetrahydrocannabinol in the presence of cyclodextrins. AAPS PharmSciTech 2011, 12, 723–731. [CrossRef] [PubMed]
- Rosenthaler, S.; Pöhn, B.; Kolmanz, C.; Huu, C.N.; Krewenka, C.; Huber, A.; Kranner, B.; Rausch, W.D.; Moldzio, R. Differences in receptor binding affinity of several phytocannabinoids do not explain their effects on neural cell cultures. *Neurotoxicol. Teratol.* 2014, 46, 49–56. [CrossRef]
- 61. Citti, C.; Linciano, P.; Russo, F.; Luongo, L.; Iannotta, M.; Maione, S.; Laganà, A.; Capriotti, A.L.; Forni, F.; Vandelli, M.A.; et al. A novel phytocannabinoid isolated from *Cannabis sativa* L. with an in vivo cannabimimetic activity higher than Δ9-tetrahydrocannabinol: Δ9-Tetrahydrocannabiphorol. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20335. [CrossRef] [PubMed]
- 62. Appendino, G.; Gibbons, S.; Giana, A.; Pagani, A.; Grassi, G.; Stavri, M.; Smith, E.; Rahman, M.M. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1427–1430. [CrossRef]
- 63. Ali, E.M.M.; Almagboul, A.Z.I.; Khogali, S.M.E.; Gergeir, U.M.A. Antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L. *Chin. Med.* **2012**, *3*, 61–64. [CrossRef]
- 64. Lone, T.A.; Lone, R.A. Extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. plant and its potential antimicrobial activity. *Univers. J. Med. Dent.* **2012**, *1*, 51–55.
- 65. Iseppi, R.; Brighenti, W.; Licata, M.; Lambertini, A.; Sabia, C.; Messi, P.; Pellati, F.; Benvenuti, S. Chemical characterization and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules* **2019**, *24*, 2302. [CrossRef]
- Frassinetti, S.; Gabriele, M.; Moccia, E.; Longo, V.; Di Giola, D. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT Food Sci. Technol.* 2020, 124, 109149. [CrossRef]
- 67. Huestis, M.A. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, Δ9-tetrahydrocannabinol. In *Cannabinoids*; Handbook of Experimental Pharmacology; Pertwee, G.R., Ed.; Springer: Heidelberg/Berlin, Germany, 2005.
- Garrett, E.R.; Hunt, C.A. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharm. Sci.* 1974, 63, 1056–1064. [CrossRef]
- 69. Gonçalves, J.; Rosado, T.; Soares, S.; Simão, A.Y.; Caramelo, D.; Luís, Â.; Fernández, N.; Barroso, M.; Gallardo, E.; Duarte, A.P. *Cannabis* and its secondary metabolites: Their use as therapeutic drugs, toxicological aspects, and analytical determination. *Medicines* **2019**, *6*, 31. [CrossRef]
- 70. Grotenhermen, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. Clin. Pharmacokinet. 2003, 42, 327-360. [CrossRef]
- 71. Lucas, C.J.; Galettis, P.; Schneider, J. The pharmacokinetic and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *84*, 2477–2482. [CrossRef] [PubMed]
- 72. Grant, K.S.; Petroff, R.; Isoherranen, N.; Stella, N.; Burbacher, T.M. *Cannabis* use during pregnancy: Pharmacokinetics and effects on child development. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *182*, 133–151. [CrossRef]
- 73. Ahmed, A.I.A.; van der Elsen, G.A.H.; Colbers, A.; Kramers, C.; Burger, D.M.; van der Marck, M.A.; Olde Rikkert, M.G.M. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of multiple oral doses of delta-9-tetrahydrocannabinol in older persons with dementia. *Psychopharmacology* **2015**, *232*, 2587–2595. [CrossRef]
- 74. Degenhardt, L.; Hall, W. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. *Lancet* **2012**, *379*, 55–70. [CrossRef]
- 75. Ciolino, L.A.; Ranieri, T.L.; Taylor, A.M. Commercial *Cannabis* consumer products part 1: GC-MS quantitative analysis of *Cannabis* cannabinoids. *Forensic Sci. Int.* **2018**, *289*, 429–437. [CrossRef] [PubMed]
- 76. Lachenmeier, D.W.; Walch, S.G. Analysis and toxicological evaluation of cannabinoids in hemp food products—A review. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **2005**, *4*, 812–826.
- 77. Fischedick, J.T.; Hazekamp, A.; Erkelens, T.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2058–2073. [CrossRef]
- Aizpurua-Olaizola, O.; Omar, J.; Navarro, P.; Olivares, M.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 7549–7560. [CrossRef] [PubMed]
- 79. European Industrial Hemp Association. Reasonable Guidance Values for THC (Tetrahydrocannabinol) in Food Products. Available online: http://eiha.org/media/2017/09/17-09-18-THC-Position-paper_EIHA.pdf (accessed on 2 August 2021).

- 80. BgVV Recommends Guidance Values for THC (Tetrahydrocannabinol) in Hemp-Containing Foods (07/2000). Available online: http://www.bfr.bund.de/en/presseinformation/2000/07/bgvv_recommends_guidance_values_for_thc_tetrahydrocannabinol_ __in_hemp_containing_foods-1309.html (accessed on 2 August 2021).
- 81. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service: Italian industrial hemp overview (Report No. IT2020-0001). Available online: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Italian% 20Industrial%20Hemp%20Overview%202020%20_Rome_Italy_02-18-2020 (accessed on 2 August 2021).
- 82. European Industrial Hemp Association (EIHA). Evaluation of Limit and Guideline Values of THC (Tetrahydrocannabinol) in Hemp Foods. Available online: https://eiha.org/media/2019/06/19-06-18_Limit-and-guideline-values-for-THC-in-hempfoods. pdf (accessed on 2 August 2021).
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). Australia New Zealand Food Standards Code—Standard 1.4.4—Prohibited and Restricted Plants and Fungi (No. F2016C00169). 2017. Available online: https://www.legislation.gov.au/Details/F2017C010 47/Download (accessed on 2 August 2021).
- Croatian Food Agency (HAH). Scientific Opinion on the Health Effects of Hemp Products Consumed (Oil, Seeds) (HAH Publication No. HAH-Z-2011-4). 2011. Available online: https://www.hah.hr/znanstveno-misljenje-o-utjecaju-na-zdravljeproizvoda-od-konoplje-koji-se-konzumiraju-ulje-sjemenke/ (accessed on 2 August 2021).
- 85. Danish Veterinary and Food Administration (DVFA). Guidance Levels for Tetrahydrocannabinol Content in Foodstuffs from Industrial Hemp. 2018. Available online: https://www.foedevarestyrelsen.dk/SiteCollectionDocuments/Kemi%20og%20 foedevarekvalitet/GMONovel%20foodNanoBestraaling/Information%20on%20webpage%20about%20guidance%20levels% 20for%20THC%20in%20hemp_EN.pdf (accessed on 2 August 2021).
- 86. Regulation (EU) 1307/2013. Available online: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:347:0608: 0670:en:PDF (accessed on 2 August 2021).
- 87. Regulation (EU) 2015/2283. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R228 3&from=EN (accessed on 2 August 2021).
- 88. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risks for human health related to the presence of tetrahydrocannabinol (THC) in milk and other food of animal origin. *Front. Pharmacol.* **2015**, *13*, 4141. [CrossRef]
- Commision Recommendation EU (2016/2115). Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri= CELEX:32016H2115&from=PLp (accessed on 3 August 2021).
- 90. Montoya, Z.; Conroy, M.; Heuvel, B.D.V.; Pauli, C.S.; Park, S.H. *Cannabis* contaminant limit pharmacological use of cannabidiol. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1439. [CrossRef]
- 91. Bonn-Miller, M.O.; Loflin, M.J.E.; Thomas, B.F.; Marcu, J.P.; Hyke, T.; Vandrey, R. Labeling accuracy of cannabidiol extracts sold online. *JAMA* 2017, *318*, 1708–1709. [CrossRef]
- Lachenmeier, D.W.; Habel, S.; Fischer, B.; Herbi, F.; Zerbe, T.; Bock, V.; Rajcic de Rezende, T.; Walch, S.G.; Sproll, C. Are side effects of cannabidiol (CBD) products caused by tetrahydrocannabinol (THC) contamination? *F1000Research* 2020, *8*, 1394. [CrossRef]
- Barrus, D.G.; Capogrossi, K.L.; Cates, S.C.; Gourdet, C.K.; Peiper, C.N.; Novak, S.P.; Lefever, T.W.; Wiley, J.L. Tasty THC: Promises and Challenges of *Cannabis* Edibles. *Methods Rep. RTI Press* 2016. [CrossRef]
- Sun-Waterhouse, D.; Penin-Peyta, L.; Wdhwa, S.S.; Waterhouse, G.I.N. Storage stability of phenolic-fortified avocado oil encapsulated using different polymer formulations and co-extrusion technology. *Food Bioprocess. Technol.* 2012, *5*, 3090–3102. [CrossRef]
- 95. Ruiz Ruiz, J.C.; Ortiz Vazques, E.D.L.L.; Segura Campos, M.R. Encapsulation of vegetable oils as source of omega-3 fatty acids for enriched functional foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, *57*, 1423–1434. [CrossRef]
- Chen, P.; Rogers, M.A. Opportunities and challenges in developing orally-administered *Cannabis* edibles. *Curr. Opin. Food Sci.* 2019, 28, 7–13. [CrossRef]
- 97. Teo, A.; Dimartino, S.; Lee, S.J.; Goh, K.K.T.; Wen, J.; Oey, I.; Ko, S.; Kwakm, H.S. Interfacial structures of whey protein isolate (WPI) and lactoferrin on hydrophobic surfaces in a model system monitored by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and their formation on nanoemulsions. *Food Hydrocoll.* 2016, *56*, 150–160. [CrossRef]
- Charoen, R.; Jangchud, A.; Jangchud, K.; Harnsilawat, T.; Naivikul, O.; McClements, D.J. Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: Whey protein, gum arabic, and modified starch. *J. Food Sci.* 2011, 76, E165–E172. [CrossRef] [PubMed]
- 99. Ozturk, B.; Argin, S.; Ozilgen, M.; McClements, D.J. Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. *J. Food Eng.* **2014**, *142*, 57–63. [CrossRef]
- 100. Rasera, G.B.; Ohara, A.; Soares de Castro, R.J. Innovative and emerging applications of *Cannabis* in food and beverage products: From an illicit drug to a potential ingredient for health promotion. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *115*, 31–41. [CrossRef]
- 101. Rupasinghe, H.P.V.; Davis, A.; Kumar, K.S.; Murray, B.; Zheljazkov, V.D. Industrial hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an emerging source for value-added functional food ingredients and nutraceuticals. *Molecules* **2020**, *25*, 4078. [CrossRef]
- Citti, C.; Pacchetti, B.; Vandelli, M.A.; Forni, F.; Cannazza, G. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). J. Pharm. Biomed. Anal. 2018, 149, 532–540. [CrossRef]
- 103. Formato, M.; Crescente, G.; Scognamiglio, M.; Fiorentino, A.; Pecoraro, M.T.; Piccolella, S.; Catauro, M.; Pacifico, S. (-)cannabidiolic acid, a still overlooked bioactive compound: An introductory review and preliminary research. *Molecules* 2020, 25, 2638. [CrossRef]

- 104. Thomas, B.F.; ElSohly, M.A. (Eds.) Biosynthesis and Pharmacology of Phytocannabinoids and Related Chemical Contituents. In *The Analytical Chemistry of Cannabis: Quality Assessment, Assurance, and Regulation of Medicinal Marijuana and Cannabinoid Preparations*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015.
- 105. Pisciottano, I.M.; Guadagnuolo, G.; Soprano, V.; Esposito, M.; Gallo, P. A survey of Δ9-THC and relevant cannabinoids in products from the Italian market: A study by LC–MS/MS of food, beverages and feed. *Food Chem.* **2021**, 346, 128898. [CrossRef]
- 106. House, J.D.; Neufeld, J.; Leson, G. Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. J. Agric. Food Chem. **2010**, 58, 11801–11807. [CrossRef]
- 107. Montserrat-de la Paz, S.; Marin-Aguilar, F.; Garcia-Giménez, M.D.; Fernández-Arche, M.A. Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil: Analytical and phytochemical characterization of the unsaponifiable fraction. J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 1105–1110. [CrossRef] [PubMed]
- 108. Steinbach, W. Hemp Pralines. DE Patent 19746830C1, 12 August 1999. Available online: https://patents.google.com/patent/DE1 9746830C1/en (accessed on 5 August 2021).
- Shim, J.S. Manufacturing Method of Bread Containing Blue Ginseng Seed. KR Patent 100,927,544 B1, 19 November 2019. Available online: https://patents.google.com/patent/KR100927544B1/en (accessed on 5 August 2021).
- Guang, H.; Wenwei, C. Application of powder of whole Cannabis sativa seeds for preparing functional food with adjuvant therapy of lowering blood fat. China Patent 100,998,414B, 30 December 2006. Available online: https://patents.google.com/patent/CN100998414B/en (accessed on 5 August 2021).
- 111. Berghofer, E.; Pollmann, K.; Traby, M.; Frenkenberger, C. Method for Producing Hemp Milk. CA Patent 2,505,350 C, 15 May 2012. Available online: https://patents.google.com/patent/CA2505350C/en (accessed on 5 August 2021).
- 112. Bisterfeld von Merr, G. Method of Obtaining Hemp Plant Juice and Use of Same for the Production of Beverages. U.S. Patent 8,778,418 B2, 15 July 2014. Available online: https://patents.google.com/patent/US8778418B2/en (accessed on 5 August 2021).
- 113. Carvalho, Â.; Halkjær Hansen, E.; Kayser, O.; Carlsen, S.; Stehle, F. Desinging microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids. *FEMS Yeast Res.* 2017, 4, fox037. [CrossRef]
- 114. Dussy, F.E.; Hamberg, C.; Luginbühl, M.; Schwerzmann, T.; Briellmann, T.A. Isolation of Δ9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ9-THC in *Cannabis* products. *Forensic Sci. Int.* **2005**, *149*, 3–10. [CrossRef]
- 115. Fodor, B.; Molnár-Perl, I. The role of derivatization techniques in the analysis of plant cannabinoids by gas chromatography mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, *95*, 149–158. [CrossRef]
- 116. Radwan, M.M.; Wanas, A.S.; Chandra, S.; ElSholy, M.A. Natural cannabinoids of *Cannabis* and methods of analysis. In *Cannabis sativa L.: Botany and Biotechnology*; Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 161–182. [CrossRef]
- 117. Berman, P.; Futoran, K.; Lewitus, G.M.; Mukha, D.; Benami, M.; Shlomi, T.; Meiri, D. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in *Cannabis. Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14280. [CrossRef]
- 118. McRae, G.; Melanson, J.E. Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in *Cannabis* and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 7381–7393. [CrossRef]
- De Backer, B.; Debrus, B.; Lebrun, P.; Theunis, L.; Dubois, N.; Decock, L.; Verstraete, A.; Hubert, P.; Charlier, C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in *Cannabis* plant material. *J. Chromatogr. B* 2009, *877*, 4115–4124. [CrossRef]
- Gul, W.; Gul, S.W.; Radwan, M.M.; Wanas, A.S.; Khan, I.I.; Sharaf, M.H.; ElSohly, M.A. Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of *Cannabis* using high-performance liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 2015, 98, 1523–1528. [CrossRef]
- 121. Dubrow, G.A.; Pawar, R.S.; Srigley, C.; Fong Sam, J.; Talavera, C.; Parker, C.H.; Noonan, G.O. A survey of cannabinoids in hemp-derived products from the United States marketplace. *J. Food Compos. Anal.* 2021, *97*, 103800. [CrossRef]
- Marchetti, L.; Brighenti, V.; Rossi, M.C.; Sperlea, J.; Pellati, F.; Bertelli, D. Use of 13C-qNMR Spectroscopy for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules* 2019, 24, 1138. [CrossRef] [PubMed]
- 123. Smith, R.N. High-pressure liquid chromatography of *Cannabis*. Identification of separated constituents. *J. Chromatogr. A* 1975, 115, 101–106. [CrossRef]
- 124. Mandrioli, M.; Tura, M.; Scotti, S.; Toschi, T.G. Fast detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV method in *Cannabis sativa* L. *Molecules* **2019**, 24, 2113. [CrossRef]
- 125. Žampachová, L.; Aturki, Z.; Mariani, F.; Bednář, P. A rapid nano-liquid chromatographic method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. Extracts. *Molecules* **2021**, *26*, 1825. [CrossRef]
- 126. Glivar, T.; Eržen, J.; Kreft, S.; Zagožen, M.; Čerenak, A.; Čeh, B.; Tavčar Benković, E. Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, *145*, 112082. [CrossRef]
- Cardenia, V.; Toschi, T.G.; Scappini, S.; Rubino, R.C.; Rodriguez-Estrada, M.T. Development and validation of a fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. J. Food Drug Anal. 2018, 26, 1283–1292. [CrossRef] [PubMed]
- 128. Jang, E.; Kim, H.; Jang, S.; Lee, J.; Baeck, S.; In, S.; Kim, E.; Kim, Y.; Han, E. Concentrations of THC, CBD, and CBN in commercial hemp seeds and hempseed oil sold in Korea. *Forensic Sci. Int.* **2020**, *306*, 110064. [CrossRef] [PubMed]
- 129. Citti, C.; Linciano, P.; Panseri, S.; Vezzalini, F.; Forni, F.; Vandelli, M.A.; Cannazza, G. Cannabinoid profiling of hemp seed oil by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 120. [CrossRef]

- Fernández, N.; Carreras, L.J.; Larcher, R.A.; Ridolfi, A.S.; Quiroga, P.N. Quantification of cannabinoids in *Cannabis* oil using GC/MS: Method development, validation, and application to commercially available preparations in Argentina. *Planta Med. Int. Open* 2020, 7, e81–e87. [CrossRef]
- 131. Pellegrini, M.; Marchei, E.; Pacifici, R.; Pichini, S. A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *36*, 939–946. [CrossRef]
- Ciolino, L.A.; Ranieri, T.L.; Taylor, A.M. Commercial *Cannabis* consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of *Cannabis* cannabinoids. *Forensic Sci. Int.* 2018, 289, 438–447. [CrossRef] [PubMed]
- Brighenti, V.; Pellati, F.; Steinbach, M.; Meran, D.; Benvenuti, S. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, 143, 228–236. [CrossRef] [PubMed]
- Escrivá, Ú.; Andrés-Costa, M.J.; Andreu, V.; Picó, Y. Analysis of cannabinoids by liquid chromatography-mass spectrometry in milk, liver and hemp seed to ensure food safety. *Food Chem.* 2017, 228, 177–185. [CrossRef] [PubMed]
- Lee, J.H.; Min, M.A.Y.; Han, J.H.; Yang, Y.J.; Kim, H.; Shin, D. Development and validation of LC-MS/MS method with QuEChERS cleanup for detecting cannabinoids in foods and dietary supplements. *Food Addit. Contam. Part A* 2020, 37, 1413–1424. [CrossRef]
- 136. Romano, R.; Aiello, A.; De Luca, L.; Sica, R.; Caprio, E.; Pizzolongo, F.; Blaiotta, G. Characterization of a new type of mead fermented with *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 874–880. [CrossRef] [PubMed]
- Crippa, J.A.; Crippa, A.C.; Hallak, J.E.; Martín-Santos, R.; Zuardi, A.W. Δ9-THC Intoxication by cannabidiol enriched *Cannabis* extract in two children with refractory epilepsy: Full remission after switching to purified cannabidiol. *Front. Pharmacol.* 2016, 7, 359. [CrossRef]
- 138. Lazarjani, M.P.; Torres, S.; Hooker, T.; Fowlie, C.; Young, O.; Seyfoddin, A. Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review. *J. Cannabis Res.* 2020, *2*, 35. [CrossRef]
- 139. Lindholst, C. Long term of stability Cannabis resin and Cannabis extracts. Aust. J. Forensic Sci. 2010, 42, 181–190. [CrossRef]
- 140. King, J.W. The relationship between *Cannabis*/hemp use in foods and processing methodology. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, *28*, 32–40. [CrossRef]
- 141. Fairbarin, J.W.; Liebmann, J.A.; Rowan, M.G. The stability of *Cannabis* and its preparations on storage. *J. Pharm. Pharmacol.* **1976**, 28, 1–7. [CrossRef]
- 142. Grafström, K.; Andersson, K.; Pettersson, N.; Dalgaard, J.; Dunne, S.J. Effects of long term storage on secondary metabolite profiles of *Cannabis* resin. *Forensic Sci. Int.* **2019**, *301*, 331–340. [CrossRef]
- 143. Trofin, I.G.; Dabija, G.; Vaireanu, D.I.; Filipescu, L. The influence of long-term storage conditions on the stability of cannabinoids derived from *Cannabis* resin. *Rev. Chim.* **2012**, *63*, 422–427.
- 144. Trofin, I.G.; Dabija, G.; Vaireanu, D.I.; Filipescu, L. Long-term storage and Cannabis oil stability. Rev. Chim. 2012, 63, 293–297.
- 145. Meija, J.; McRae, G.; Miles, C.O.; Melanson, J.E. Thermal stability of cannabinoids in dried *Cannabis*: Kinetic study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, 1–8. [CrossRef]
- 146. Zamengo, L.; Bettin, C.; Badocco, D.; Marco, V.D.; Miolo, G.; Frison, G. The role of time and storage conditions on the composition of hashish and marijuana samples: A four-year study. *Forensic Sci. Int.* **2019**, *298*, 131–137. [CrossRef]
- 147. Peschel, W. Quality control of traditional *Cannabis* tinctures: Pattern, markers and stability. *Sci. Pharm.* **2016**, *84*, 567–584. [CrossRef]
- 148. Pacifici, R.; Marchel, E.; Salvatore, F.; Guandalini, L.; Busardò, O.; Pichini, S. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of *Cannabis* tea and *Cannabis* oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2017**, *55*, 1555–1563. [CrossRef]
- 149. Milay, L.; Berman, P.; Shapira, A.; Guberman, O.; Meiri, D. Metabolic profiling of *Cannabis* secondary metabolites for evaluation of optimal postharvest storage conditions. *Front. Plant Sci.* 2020, *11*, 583605. [CrossRef]
- 150. Mudge, E.M.; Murch, S.J.; Brown, P.N. Leaner and greener analysis of cannabinoids. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409, 3153–3163. [CrossRef]
- 151. Turek, C.; Florian, C.S. Stability of essential oils: A review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2013, 12, 40–53. [CrossRef]
- 152. Zhong, Y.; Shahidi, F. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 4067–4079. [CrossRef]
- 153. Singh, A.P.; Fathordoobady, F.; Guo, Y.; Singh, A.; Kitts, D.D. Antioxidants help favorably regulate the kinetics of lipid peroxidation, polyunsaturated fatty acids degradation and acidic cannabinoids decarboxylation in hempseed oil. *Sci. Rep.* 2020, 10, 10567. [CrossRef] [PubMed]
- 154. Wang, M.; Wang, Y.H.; Avula, B.; Radwan, M.M.; Wanas, A.S.; van Antwerp, J.; Parcher, J.F.; ElSohly, S.A.; Khan, I.A. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: A novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2016**, *1*, 262–271. [CrossRef] [PubMed]
- 155. Casiraghi, A.; Roda, G.; Casagni, E.; Cristina, C.; Musazzi, U.M.; Franzè, S.; Rocco, P.; Giuliani, C.; Fico, G.; Minghetti, P.; et al. Extraction method and analysis of cannabinoids in *Cannabis* olive oil preparations. *Planta Medica* **2017**, *84*, 242–249. [CrossRef]
- 156. Taschwer, M.; Schmid, M.G. Determination of the relative percentage distribution of THCA and Δ9-THC in herbal *Cannabis* seized in Austria—Impact of different storage temperatures on stability. *Forensic Sci. Int.* **2015**, 254, 167–171. [CrossRef]
- 157. Knezevic, F.; Nikolai, A.; Marchart, R.; Sosa, S.; Tubaro, A.; Novak, J. Residues of herbal hemp leaf teas—How much of the cannabinoids remain? *Food Control* 2021, 127, 108146. [CrossRef]

- 158. Ryu, B.R.; Islam, M.J.; Azad, M.O.K.; Go, E.-J.; Rahman, M.H.; Rana, M.S.; Lim, Y.-S.; Lim, J.D. Conversion characteristics of some major cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) raw. materials by new rapid simultaneous analysis method. *Molecules* 2021, 26, 4113. [CrossRef] [PubMed]
- 159. Dawson, D.D.; Martin, R.W. Investigation of chocolate matrix interference on cannabinoid analytes. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 5699–5706. [CrossRef] [PubMed]
- 160. Wolf, C.E.; Poklis, J.L.; Poklis, A. Stability of tetrahydrocannbinol and cannabidiol in prepared quality control medible brownies. *J. Anal. Toxicol.* **2017**, *41*, 153–157. [CrossRef]

Joanna Kanabus Imię i nazwisko Autora (doktoranta)

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności Jednostka Organizacyjna

OŚWIADCZENIE O PROCENTOWYM UDZIALE AUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI ⁵⁷

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Cannabinoids – *Characteristics* and *Potential* for Use in Food Production *Tytul artykulu*

Molecules, 2021, 26(21), 10.3390/molecules26216723 Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DOI

Joanna Kanabus*, Marcin Bryła, Marek Roszko, Marta Modrzewska, Adam Pierzgalski Autorzy: Imię i nazwisko'; Imię i nazwisko, Imię i nazwisko''; Imię i nazwisko (⁶)

Lp.	Nazwisko i imię	Udział	Rodzaj	Afiliacja	Podpis Autora
	Autora	procentowy	aktywności		
1.	Kanabus Joanna	80%	Opracowanie koncepcji, przygotowanie manuskryptu, redagowanie	IBPRS-PIB Zakład Bezpieczeństwa I Analizy Chemicznej Żywności	damotas Jaouro
2.	Bryła Marcin	5%	Poprawki merytoryczne, redagowanie	IBPRS-PIB Zakład Bezpieczeństwa I Analizy Chemicznej Żywności	Cez
3.	Roszko Marek	5%	Poprawki merytoryczne, redagowanie	IBPRS-PIB Zakład Bezpicczeństwa I Analizy Chemicznej Żywności	Im
4.	Modrzewska Marta	5%	Przygotowanie manuskryptu	IBPRS-PIB Zakład Bezpieczeństwa I Analizy Chemicznej Żywności	Myley
5.	Adam Pierzgalski	5%	Przygotowanie manuskryptu	IBPRS-PIB Zakład Bezpieczeństwa I Analizy Chemicznej Żywności	Per

 ⁵ Wypelnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD
 ⁶ Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez

zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.





Article The Development, Validation, and Application of a UHPLC-HESI-MS Method for the Determination of 17 Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *var. sativa* Plant Material

Joanna Kanabus *🗅, Marcin Bryła 🕩 and Marek Roszko 🕩

Department of Food Safety and Chemical Analysis, Prof. Waclaw Dabrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland * Correspondence: joanna.kanabus@ibprs.pl; Tel.: +48-22-606-39-40

Abstract: Cannabinoids are an important group of secondary metabolites found in the plant *Cannabis sativa* L. The growing interest in the use of hemp in food production (e.g., hemp teas, hemp cookies) makes it necessary to develop a method for determining these compounds in the plant, both fresh and dried. The selection of a suitable extraction liquid for the extraction of cannabinoids and the development of a method for the determination of 17 cannabinoids is a prelude to the development of an effective method for the extraction of these compounds. In the present study, a novel, simple, and efficient method was developed and validated for the determination of up to 17 cannabinoids in fresh plant parts (inflorescences and leaves) of *Cannabis sativa* L. and in dried material, including hemp teas. Analyses were performed using ultra-high-performance liquid chromatography-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry setup operating with a heated electrospray interface (UHPLC-HESI-MS). Based on the comparison, methanol was selected as the best for the extraction of cannabinoids from fresh and dried material. The efficiency and validity of the method were assessed using certified reference material (dried Cannabis) and confirmed by z-score from participation in an international proficiency test conducted by ASTM International for dried hemp.

Keywords: Cannabis sativa L.; cannabinoids; hemp tea; UHPLC-HESI-MS; validation

1. Introduction

Hemp (Cannabis sativa L.) is a very versatile plant and one of the oldest crops in agriculture. The plant has been used to make paper and textiles, and its seeds are a source of fatty acids, amino acids, and fiber [1]. Cannabinoids are synthesized in the plant's glandular trichomes, which are found in the female inflorescences. They are meroterpenoids with resorcinol cores containing an isoprenyl, alkyl, or aralkyl side chain in the para position. More than 120 cannabinoids are known; the best-known are Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD). Δ^9 -THC has been classified as a controlled substance due to its confirmed psychoactive properties. CBD does not exhibit psychoactive properties; instead, it is believed to have analgesic and anti-inflammatory properties [2]. A key element in evaluating the safety of hemp products is assessing the presence of trace amounts of the psychoactive "total Δ^9 -THC". The term "total Δ^9 -THC" refers to the sum of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A), which is readily converted to Δ^9 -THC by heat treatment [1]. The limits set by European Commission (EU) Regulation (EU) 2023/915 are for maximum levels of total Δ^9 -THC in seeds and products derived from them (hemp seed oil—7.5 mg kg⁻¹ and seeds and products derived from seeds—3 mg kg⁻¹) [3]. The European Food Safety Authority (EFSA) set an acute reference dose (ARfD) of 1 μ g kg⁻¹ body weight for "total Δ^9 -THC" [4]. The current changing regulations provide many facilitations and opportunities, due to which the market for hemp products is growing faster and faster.



Citation: Kanabus, J.; Bryła, M.; Roszko, M. The Development, Validation, and Application of a UHPLC-HESI-MS Method for the Determination of 17 Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *var. sativa* Plant Material. *Molecules* **2023**, *28*, 8008. https://doi.org/10.3390/ molecules28248008

Academic Editors: In-Soo Yoon and Hyun-Jong Cho

Received: 12 November 2023 Revised: 28 November 2023 Accepted: 4 December 2023 Published: 8 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/).

The most important and first step in the determination of cannabinoids is their extraction. In recent years, many papers have been focused on technologies for extracting bioactive compounds from Cannabis sativa L., including cannabinoids. One of the conventional methods of extracting cannabinoids is liquid-solid extraction, such as maceration or percolation [5]. However, there is a problem with finding a standard for the method of extracting cannabinoids from fresh or dried *Cannabis sativa* L. There is much information regarding the extraction liquids used during cannabinoid extraction. On the other hand, there is a lack of appropriate comparison of the extraction liquids used to this day to identify the most suitable one for extracting cannabinoids from both fresh and dried plant material. According to several literature reports, the most suitable solvent for cannabinoid extraction is methanol (MeOH) or a mixture of MeOH and chloroform (CHCl₃) in a ratio of 9:1 (v/v). However, chloroform is not recommended as a solvent due to its volatility and high toxicity [6–8]. According to Chen et al. [9], extraction of cannabinoids with ethanol (EtOH) is associated with lower extraction recoveries compared to a mixture of MeOH and CHCl₃. The problem is related to the difficulty in separating the extracted components, as many other substances present in the plant (e.g., fats and waxes) are extracted with EtOH along with cannabinoids [9]. Compared to traditional solvent extraction, supercritical fluid extraction, such as carbon dioxide, allows for easier recovery of cannabinoids with low solvent (CO_2) losses. The extract obtained by this method also requires further purification to remove lipids and waxes [9,10]. Attempts have been made to extract cannabinoids by other techniques. Baranauskaite et al. [11] compared maceration, ultrasound-assisted extraction (UAE), and heat reflux extraction (HRE). The authors concluded that UAE is the optimal extraction technique due to the low time, energy, and cost requirements. According to Brighenti et al. [12], dynamic maceration with EtOH was a more efficient method for extracting cannabinoids from Cannabis sativa L. compared to UAE and microwave-assisted extraction (MAE). The lack of specific regulations regarding the conduct of cannabinoid extraction and the methods used causes differences in the results obtained from extracting these compounds from similar matrices [13]. Taking into account the existing differences in the extraction liquids and methods used, this study undertook the development of an easy extraction method using different extraction liquids to compare the number of cannabinoids that can be extracted from plant material.

Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) is one of the most widely used techniques in the quantitative analysis of cannabinoids. However, using this technique, it is only possible to determine the total content of a given cannabinoid, which is the sum of the acidic and neutral components, because acidic cannabinoids undergo decarboxylation as a result of elevated temperatures during the separation step on the column. An additional complication is the need for compound derivatization [14,15]. The use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) does not require an initial derivatization process before analysis, and no decarboxylation of acidic compounds occurs during this process. This technique is a favorable alternative to GC. Using the LC-MS technique, which exhibits high sensitivity to cannabinoids, it is possible to achieve lower limits of quantification than with the GC-MS technique [1,2].

The aim of this study was (1) to develop a procedure for the extraction of compounds depending on the matrices studied, (2) to select appropriate chromatographic separation parameters for the analytes studied and analysis using an ultra-high-performance liquid chromatography-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry setup operating with a heated electrospray interface, (3) to validate the method, (4) to evaluate the suitability of the technique for assessing the content of cannabinoids in different parts of the *Cannabis sativa* L. *var. sativa* plant, and (5) to evaluate the content of 17 cannabinoids in commercially available products based on *Cannabis sativa* L. *var. sativa*. This is one of the first studies on the analysis of 17 cannabinoids in plant material.

2. Results

2.1. *Optimization of the Procedure for the Extraction of Cannabinoids from the Tested Matrices* 2.1.1. Fresh Parts of Plants

The extraction efficiency of the sum of 17 cannabinoids from inflorescences (small, medium, and big) and leaves was compared using different extraction solvents (MeOH, ACN, EtOH, n-hexane, and EtOH:n-hexane mixture (7:3, v/v)). A three-step extraction was performed using each extraction solvent (5 mL), and the sum of 17 cannabinoids extracted at each extraction step was compared (Figure 1).



Figure 1. Comparison of extracted content of cannabinoids using different solvents from different parts of plant *Cannabis sativa* L. *var. sativa* (S—small inflorescences; M—medium inflorescences; B—big inflorescences) and leaves. a-k—symbol indicates a statistically significant result; n = 3.

The sum of cannabinoids from three extractions with MeOH was taken as the possible maximum amount to be extracted from fresh material. When n-hexane and a mixture of EtOH:n-hexane (7:3, v/v) were used, the recoveries obtained were <70% and were significantly the lowest in terms of the extracted sum of cannabinoids. Based on the obtained results, these two types of extraction liquids were rejected. The first extraction of inflorescences resulted in the extraction of an average of 90% (MeOH), 70% (ACN), and 75% (EtOH) of all analyzed cannabinoids present in the inflorescences. Performing a second extraction allowed for the extraction of 8% (MeOH), 3% (ACN), and 6% (EtOH) more cannabinoids. The third extraction step yielded 2% (MeOH), 0.03% (ACN), and 0.06% (EtOH) cannabinoids. For the leaves, the use of MeOH extracted 92% of the cannabinoids in the first extraction step, 6% in the second, and 2% in the third step. The use of ACN or EtOH to extract 17 cannabinoids from the leaves in the first extraction stage allowed an average of 70 and 79% extraction efficiency, respectively. In the second stage of extraction, 5% of cannabinoids were extracted for two variants of extraction solvents, and in the third stage, 0.05 and 0.04% were extracted. Based on the results, it was concluded that the most suitable extraction liquid for the extraction of 17 cannabinoids from both inflorescences and leaves was MeOH, as the results showed statistically significant differences (p < 0.01) between the contents of the tested compounds in MeOH, ACN, and EtOH extracts, as

well as the extraction efficiency of the given solvent (Figure 1). It was also found that two-stage extraction ensured the extraction of a satisfactory sum of cannabinoids from inflorescences and leaves. In addition, significant differences were observed in the sums of the cannabinoids in the different elements of the plant (inflorescences of different sizes and leaves) (Figure 1). In the case of MeOH extracts, the highest contents of the sum of these compounds were characterized by extracts of small and medium-sized inflorescences.

2.1.2. Dried Plants

The extraction efficiency of the sum of 17 cannabinoids from the control CRM-dried material (HEMP-1) was compared using different extraction solvents (MeOH, ACN, EtOH, n-hexane, and EtOH:n-hexane mixture (7:3, v/v) (Figure 2). During the analyses, Δ^8 -THC was found to be present in the CRM even though there was no specific certified value for this compound. In the results presented here, this compound was taken into account when comparing the extraction efficiency of the sum of 17 cannabinoids from the CRM. A three-step extraction was performed using each extraction solvent (10 mL), and the sum of 17 cannabinoids extracted at each extraction step was compared (Figure 2). In the case of using n-hexane and a mixture of EtOH:n-hexane (7:3, v/v), the obtained recovery results of 69% and 60%, respectively, were the lowest in terms of the extracted sum of cannabinoids. Based on the results obtained, these two types of solvents were discarded. Performing the first stage of extraction allowed the extraction efficiency of 90% (MeOH), 69% (ACN), and 77% (EtOH) of the sum of 17 cannabinoids present in the CRM. The second extraction step yielded 8% (MeOH), 6% (ACN), and 5% (EtOH) of the cannabinoids, while the third extraction step yielded only 2% (MeOH and ACN) and 3% (EtOH).



Figure 2. Comparison of the extracted sum of 17 cannabinoids using different solvents from CRM (HEMP-1). a–e–symbol indicates a statistically significant result; n = 3.

The results showed statistically significant differences (p < 0.01) between the contents of the tested compounds in MeOH, ACN, and EtOH extracts (Figure 2). Based on the results, it was concluded that MeOH was the most suitable extraction liquid and that the two-stage extraction provided a satisfactory sum of the extracted cannabinoid content.

2.2. Optimization of the Cannabinoid Analysis Process Using UHPLC-HESI-MS

Several authors have performed chromatographic separation using mass spectrometry [12,16,17]. Optimization of the mass spectrometer operation (voltage on the capillary, gas flow) was realized based on the analysis of variants of the values of these parameters (unpublished data), and the results of this experiment are presented in Section 4.5. Using a high-resolution mass spectrometer made it possible to achieve better sensitivity of the method and obtain very low quantification limits. The sample's high dilution, described in Section 4.4, indicates that no secondary fragmentation of compounds is required during the analysis. Most of the published work has analyzed fewer cannabinoids than in our work [12,18]. There are first reports of analysis of 17 cannabinoids or more [16,17]. In the studies presented here, the separation of analytes was evaluated using variants presented in the above works. The authors used, among others, water and/or ACN with 0.1% formic acid as mobile phases [12,16,17]. The analyses conducted by the above authors were operated in a mobile phase gradient. In our work, analyses were carried out using the isocratic elution method. Given that several cannabinoids were characterized by the isomerism of these compounds and, as a result, identical molecular weights, chromatographic separation of the tested substances was an important issue. Identification of the compounds in the tested samples was carried out by comparing their retention times and mass spectra with analytical standards for these compounds. Experimentally, it was shown that the most effective mobile phase for the separation of analytes mixture of ACN: 0.02% HCOOH_{aq} and 5 mM HCO₂NH_{4 aq} (75:25, v/v), which enabled separation in the shortest possible time (10 min). This is one of the first methods to allow analysis of cannabinoids in such a short time. The chromatogram for all 17 cannabinoids analyzed in this study is shown in Figure 3.



Figure 3. UHPLC-HESI-MS chromatogram of 17 cannabinoids in a calibration standard concentration of 10 μ g mL⁻¹ for each cannabinoid.

The retention time and precursor ions for the compound are shown in Table 1.

Compound	Retention Time	Precursor Ion [<i>m</i> / <i>z</i>]
CBDVA	1.25	329.1737 [M - H] ⁻
CBDV	1.6	287.1992 [M + H] ⁺
CBDA	1.7	359.2043 [M – H] ⁻
CBGA	1.9	359.2208 [M – H] [–]
CBG	2.2	317.2471 [M + H] ⁺
CBD	2.4	315.2305 [M + H] ⁺
CBNA	2.6	353.1732 [M – H] [–]
Δ ⁹ -THCVA	2.65	329.1744 [M – H] [–]
Δ^9 -THCV	2.85	287.1993 [M + H] ⁺
CBN	3.9	311.2003 [M + H] ⁺
CBCA	4.85	359.2177 [M – H] [–]
Δ ⁹ -THC	4.95	315.2314 [M + H] ⁺
Δ ⁹ -THCA-A	5.0	359.2038 [M – H] ⁻
Δ ⁸ -THC	5.15	315.2305 [M + H] ⁺
CBL	6.1	315.2305 [M + H] ⁺
CBLA	6.5	359.2065 [M – H] ⁻
CBC	6.6	315.2305 [M + H] ⁺

Table 1. Retention time and precursor ions for a specific compound in the UHPLC-HESI-MS system.

2.3. Method Validation

Due to the lack of cannabinoid-free matrix availability, adding these compounds or their internal standards directly to the matrix before extraction is not practiced. Internal standards are most often added to diluted extracts at the final stage of sample preparation [16]. An important element of method validation in the determination of cannabinoids in samples is the determination of the matrix effect. The absolute matrix effect was calculated by comparing the slope of the matched-matrix standard curve with the slope of the standard calibration curve. The matrix effect values obtained for all matrices (inflorescences, leaves, and dried ground hemp) ranged from 97 to 106% (Table 2), and it can be concluded that there is no matrix effect on the final assay result.

To prepare calibration curves of the test substances, solutions of these compounds were prepared. The linearity of each of the analyzed compounds was evaluated based on eight-point calibration curves determined by analyzing standard solutions of different concentration ranges. These ranges were chosen to consider the different levels of cannabinoid content in the plant. The concentration-response relationship of the present method indicated a linear relationship between the concentration and peak area with R^2 values of >0.995 for all 17 cannabinoids. The LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantification) were evaluated by measuring the response at a signal-to-noise ratio (S/N) of \geq 3 for LOD and \geq 10 for LOQ, respectively, in all types of samples spiked with the standard solution. The determined LOD and LOQ values (Table 2) were at an appropriate level, which enabled the identification and quantification of compounds with low concentrations in inflorescences, leaves, and dried hemp material. The LOQ tended to be much lower than the range of the calibration curves since the analyzed compounds did not occur at such low levels; nevertheless, the low LOQ values allow for future analysis of these compounds at much lower levels. The range of calibration curves, coefficients of determination, and LOD and LOQ for each substance are shown in Table 2. According to the AOAC [19], the concentration of added analyte should be no less than the initial concentration, and the fortified test sample's response must not exceed the calibration curve's highest point [19]. The general assumptions of AOAC [19] and ICH [20] for the validation of analytical methods are that the recovery values of the analytes tested should be in the range of 80 to 120%, while the RSD for recovery must not exceed 15%. Recovery analyses were performed for all materials used: fresh inflorescences, leaves, and dried ground hemp (CRM). The recovery and repeatability results of the method obtained in our case meet these criteria. In the case of inflorescences, leaves, and CRM, the recovery values ranged from 97 to 100%, 94% to 101%, and 94 to 103% (depending on the type of compound), respectively, while the RSD value was not greater than 10% (Supplementary Materials Table S1). Most authors report LOQ values in $\mu g kg^{-1}$, but in our work, this parameter is expressed in $\mu g m L^{-1}$ due to the wide range of dilutions used, which affect the final LOQ for a given compound. The LOQ values obtained by Brighenti et al. [12] ranged from 1.8 to $2.5 \ \mu g \ mL^{-1}$, depending on the substance. A lower LOQ (1 $\ \mu g \ mL^{-1}$) was characterized by the method developed by Zivovinovic et al. [6]. De Becker et al. [8] developed a determination method whose LOQs for the analyzed compounds were in the range of $0.06-0.25 \ \mu g \ m L^{-1}$. These values are much higher than those obtained in our work, which allows us to conclude that the present one allows the determination of cannabinoids at much lower concentrations. Differences in the LOQs obtained for the different methods depend on the technique used for cannabinoid analysis.

Compound	Range of Calibration	Coefficient of	LOD	LOQ	LOD	LOQ	Matu	rix Effect (%)	
Compound	Curve [µg mL ⁻¹]	Determination [R ²]	$[\mu g \ m L^{-1}]$	$[\mu g \ m L^{-1}]$	$[m mgkg^{-1}]$	$[m mgkg^{-1}]$	Inflorescences	Leaves	CRM
CBD	0.200-25.600	0.9997	0.0010	0.0030	1.8	6	99	101	100
CBN	0.008-1.024	0.9991	0.0020	0.0070	1.2	4	99	99	99
CBG	0.008-1.024	0.9997	0.0003	0.0009	0.6	2	99	100	100
Δ^9 -THC	0.080-10.240	0.9999	0.0011	0.0036	0.6	2	97	99	97
Δ^8 -THC	0.008-1.024	0.9993	0.0020	0.0060	0.48	1.6	100	100	104
CBC	0.020-2.560	0.9993	0.0050	0.0200	0.6	2	100	99	107
CBL	0.020-2.560	0.9991	0.0020	0.0070	0.6	2	100	100	101
CBDV	0.008-1.024	0.9994	0.0010	0.0020	0.12	0.4	101	100	101
Δ^9 -THCV	0.008-1.024	0.9982	0.0006	0.0020	0.06	0.2	99	100	99
CBDA	0.400-51.200	0.9950	0.0003	0.0009	5.4	18	102	100	106
CBNA	0.002-0.256	0.9947	0.0001	0.0002	0.12	0.4	101	101	106
CBGA	0.020-2.560	0.9967	0.00003	0.0001	0.06	0.2	101	99	101
Δ ⁹ -THCA-A	0.080-10.240	0.9972	0.0004	0.0013	0.6	2	100	100	99
CBCA	0.080-10.240	0.9983	0.0008	0.0030	0.6	2	100	100	102
CBLA	0.020-2.560	0.9954	0.0004	0.0012	0.06	0.2	100	100	100
CBDVA	0.020-2.560	0.9954	0.00003	0.0001	0.06	0.2	98	99	98
Δ ⁹ -THCVA	0.020-2.560	0.9974	0.0001	0.0002	0.01	0.04	99	99	97

Table 2. Range of calibration curves, coefficients of determination, LOD, LOQ, and matrix effect for each of 17 cannabinoids.

Method Validity: Analysis of CRM and Material for the Proficiency Test

The correctness of the method for the determination of cannabinoids was evaluated on the basis of the analysis of certified reference material. Extractions were carried out according to the optimized procedure for dried material described in Section 4.4. The correctness of the method was assessed by analyzing the cannabinoid content of the certified reference material (HEMP-1 CRM—dried ground hemp). This evaluation was performed according to the recommendations of the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM-JRC) [21]. This evaluation consisted of checking whether the absolute difference between the determined analyte content and the certified value was significantly smaller than the composite expanded measurement uncertainty and the uncertainty of the certified value (Table 3). For this purpose, it was necessary to determine the expanded uncertainty of the method, which took into account all relevant sources of uncertainty in the analytical procedure for the determination of cannabinoids (data not presented). The uncertainty of the method was evaluated according to EURACHEM/CITAC guidelines [22]. The composite expanded uncertainty was calculated using the following equation (Equation (1)):

$$u = \sqrt{(0.5U)^2 + (0.5U_{CRM})^2}; U = 2u$$
 (1)

where u is the composite uncertainty, U is the composite expansion intensity, and U_{CRM} is the certified concentration value.

	Declared	l Values	Dete	rmined Values	
Compound	C _{CRM} [mg kg ⁻¹]	U _{CRM} [mg kg ⁻¹]	C [mg kg ⁻¹]	U [mg kg ⁻¹]	n
CBC	325.0	84.0	321.8	25.8	9
CBDV	188.0	32.0	187.3	15.0	9
CBG	47.8	9.4	47.3	3.3	9
CBL	74.1	13.6	74.0	5.2	9
CBN	490.0	70.0	484.2	38.7	9
CBNA	350.0	36.0	344.9	27.6	9
Δ^8 -THC	_ 1	-	21.5	1.9	9
Δ⁹-THC	318.0	86.0	319.4	28.7	9
Δ^9 -THCV	14.3	2.0	14.1	1.3	9
CBDVA	719.0	54.0	714.8	64.3	9
CBD	5410.0	700.0	5398.7	377.9	9
CBGA	117.0	12.0	113.5	9.1	9
Δ ⁹ -THCVA	72.8	6.4	72.3	6.5	9
CBLA	187.0	18.0	184.5	14.8	9
CBCA	448.0	108.0	450.5	40.6	9
Δ ⁹ -THCA-A	979.0	84.0	966.5	87.0	9
CBDA	14,600	800.0	14,536	1308	9
Total Δ^9 -THC content *	1180	140.0	1167	105.0	9
Total CBD content **	18,200	1200	18,147	1633	9

Table 3. Results of the determination of cannabinoids in certified reference material with the declared concentration value.

 C_{CRM} —certified concentration value; C—determined value concentration; U_{CRM}—declared composite expanded uncertainty (k = 2); U—designated expanded compound uncertainty (k = 2); *n*—number of independent repeats; ¹—no certified Δ^8 -THC content in the CRM material analyzed; * total Δ^9 -THC content: Δ^9 -THC + (0.877 × Δ^9 -THCA-A); ** total CBD content: CBD + (0.877 × CBDA) [3].

The results obtained for the proficiency tests for dried hemp provided by ASTM International (HFL2301 and HFL2305) were within the accepted criteria and are the basis for confirming the validity of the developed method (Supplementary Materials Tables S2 and S3). 2.4. Application of the Method to the Determination of Cannabinoids in Different Samples from Cannabis sativa L. var. sativa

2.4.1. Analysis of the Content of 17 Cannabinoids in the Fresh Plant *Cannabis sativa* L. *var. sativa* 'Białobrzeskie'

Using the developed and validated method, the cannabinoid content of inflorescence and leaf samples (n = nine samples for each part from nine different plants) was evaluated. The results of the content of each of the 17 cannabinoids are presented in Table 4. The research material used in the study, i.e., *Cannabis sativa* L. *var. sativa* "Bialobrzeskie" is a plant that, on a plant dry weight basis, can contain a maximum of 0.3% Δ^9 -THC. The plant is known for its high CBD content and is used on an industrial scale to produce cannabinoid-containing foods [23,24].

Table 4. Content of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *var. sativa* "Białobrzeskie". The results of the contents of the individual 17 cannabinoids are presented on a dry weight basis.

Comment		Part of the Plant	$[\mathrm{mg}\mathrm{kg}^{-1}]$	
Compound	Small Inflorescences	Medium Inflorescences	Big Inflorescences	Leaves
СВС	$16.8\ ^{\mathrm{c}}\pm1.2$	12.4 $^{ m b}\pm 0.6$	10.4 $^{\mathrm{b}}$ \pm 1.3	$3.2~^{a}\pm0.2$
CBDV	$0.7~^{ m ab}\pm0.1$	$0.4~^{ m a}\pm 0.1$	$0.7~^{ m ab}\pm 0.1$	$0.8~^{\mathrm{b}}\pm0.1$
CBG	$25.1~^{\mathrm{b}}\pm0.7$	$40.4~^{ m c}\pm1.1$	$43.2~^{\rm c}\pm 4.1$	$5.8~^{a}\pm0.3$
CBL	<lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<></th></lod<></th></lod<>	<lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<></th></lod<>	<lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<>	<lod< th=""></lod<>
CBN	<lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<></th></lod<></th></lod<>	<lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<></th></lod<>	<lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<>	<lod< th=""></lod<>
CBNA	$2.3~^{\mathrm{a}}\pm0.2$	$3.4^{\text{ b}} \pm 0.1$	$2.4~^{\mathrm{a}}\pm0.2$	$4.4~^{ m c}\pm 0.2$
Δ^8 -THC	<lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<></th></lod<></th></lod<>	<lod< th=""><th><lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<></th></lod<>	<lod< th=""><th><lod< th=""></lod<></th></lod<>	<lod< th=""></lod<>
Δ ⁹ -THC	11.6 $^{ m b}\pm 0.7$	$16.6 \ ^{ m c} \pm 0.5$	$5.9~^{\mathrm{a}}\pm0.5$	$6.0\ ^{\mathrm{a}}\pm0.3$
Δ ⁹ -THCV	$0.2~^{ m a}\pm 0.1$	$0.2~^{ m a}\pm 0.1$	0.3 $^{\rm a}\pm 0.1$	5.9 $^{ m b}\pm 0.2$
CBDVA	721.3 $^{\rm c}$ \pm 79.8	$665.2\ ^{ m c}\pm70.7$	$385.7 \text{ b} \pm 37.7$	92.1 $^{\rm a}\pm1.4$
CBD	$61.1~^{a}\pm2.6$	$65.7~^{\mathrm{a}}\pm7.4$	44.5 $^{\mathrm{a}}$ \pm 1.5	$168.7 \ ^{\mathrm{b}} \pm 23.2$
CBGA	152.5 $^{\mathrm{a}} \pm 16.4$	189.6 $^{\mathrm{a}}$ \pm 26.3	150.9 $^{\rm a}$ \pm 12.5	171.6 $^{\rm a}\pm$ 12.2
Δ ⁹ -THCVA	47.9 $^{ m c}\pm 6.9$	$26.9~^{\mathrm{b}}\pm1.2$	$25.2^{\text{ b}} \pm 2.7$	$6.1~^{a}\pm0.5$
CBLA	17.7 $^{\mathrm{a}}$ \pm 2.7	$17.5~^{ m a}\pm0.9$	14.7 $^{\rm a} \pm 1.5$	31.8 $^{\mathrm{b}}\pm0.5$
CBCA	$1371 \text{ d} \pm 87.7$	592.2 $^{ m b}$ \pm 28.4	$818.4~^{\rm c}\pm74.9$	276.3 $^{\mathrm{a}} \pm 17.1$
Δ ⁹ -THCA-A	$1418 \ ^{ m d} \pm 87.6$	$620.2\ ^{ m b}\pm 22.9$	842.8 $^{ m c}$ \pm 77.1	239.9 $^{\rm a}\pm16.5$
CBDA	$8146^{\text{ b}} \pm 305.9$	9047 $^{ m b}$ \pm 1347.3	$6122 {}^{\mathrm{b}} \pm 863.8$	1992 a \pm 285.5
Total	1255.3 $^{ m d}$ \pm 44.2	560.6 ^b \pm 11.7	745.1 $^{ m c}$ \pm 38.8	216.4 $^{\mathrm{a}} \pm 8.4$
Total CBD content **	7205 ^c \pm 154.3	$8000 ^{\text{c}} \pm 677.5$	5413 ^b \pm 432.7	1915 a \pm 154.4
The average sum of 17 cannabinoids	11,993 ^c \pm 259.5	11,298 ^c ± 303.9	$8447^{\text{ b}}\pm675.8$	$3004 \ ^{a} \pm 240.4$

* total Δ^9 -THC content: Δ^9 -THC + (0.877 × Δ^9 -THCA-A); ** total CBD content: CBD + (0.877 × CBDA) [3]; a–d—values within lines followed by the same letter are not significantly different according to $\alpha = 0.01$.

The realized research made it possible to conclude that the level of some cannabinoids in different parts of the plant varied. The highest total content of the tested compounds was found in small inflorescences (11,993 mg kg⁻¹), while the lowest was found in leaves (3004 mg kg⁻¹). It was found that samples of big inflorescences had a statistically significant (p < 0.01) lower sum of 17 cannabinoids than that determined in small and medium inflorescences. Analyzing individual substances, the highest contents were recorded for CBDA, which was the dominant cannabinoid in all elements of the plant. Samples of small inflorescences had significantly (p < 0.01) higher contents of Δ^9 -THCA-A and CBCA. The inflorescences and leaves showed no evidence (<LOD) of cannabinoids such as CBL, CBN, and Δ^8 -THC. There were no statistically significant differences (p < 0.01) in the content of CBD, CBDA, CBLA, CBGA, and CBDV in inflorescences of different sizes. Based on the analyses, the leaves were found to have a significantly (p < 0.01) higher content of cannabinoids such as CBD, CBGA, CBLA, and CBNA compared to all analyzed inflorescences. When analyzing the cannabinoids in the plant, it is also important to consider the total Δ^9 -THC content and total CBD content, which indicates the total content of acid and neutral forms of Δ^9 -THC and CBD. Statistically significant differences (p < 0.01) were found in total Δ^9 -THC content and total CBD content in both inflorescences and leaves.

2.4.2. Analysis of Cannabinoid Content in Teas Based on Cannabis sativa L. var. sativa

The objective of this study was also to analyze the content of cannabinoids in commercially available teas based on *Cannabis sativa* L. *var. sativa*. Thirty samples of teas containing 40 to 100% dried hemp in their composition were analyzed. The results of the content of these compounds in each sample are shown in Table 5 and Supplementary Materials Table S4.

Table 5. The percentage content of the *Cannabis sativa* L. *var. sativa* and the sum of 17 cannabinoid content determined, and the total content of Δ^9 -THC and CBD in the tea samples (mg kg⁻¹).

Sample	Percentage Content of Cannabis sativa L. var. sativa	The Average Sum of 17 Cannabinoids	The Total Δ^9 -THC Content *	The Total CBD Content **
1	100%	$15,\!680^{\mathrm{ghi}}\pm1254$	372.3 ^e ± 6.5	13,084 ^p ± 21
2	100%	$13,769 \text{ fghi} \pm 1101$	$514.5^{\text{j}} \pm 5.4$	$10,852^{\text{ kl}} \pm 20$
3	100%	9823 $^{\rm cde} \pm 785$	100.4 $^{\mathrm{a}} \pm 5.1$	$3205^{d} \pm 10^{d}$
4	100%	13,282 $^{\mathrm{efgh}}\pm1062$	$517.4^{\text{j}} \pm 2.4$	$8998~^{\rm g}\pm14$
5	80%	15,521 ^{ghi} ± 1241	984.9 $^{ m t} \pm 5.0$	12,382 ° ± 100
6	75%	14,317 $^{ m fghi} \pm 1145$	273.7 $^{ m c}$ \pm 10.0	10,938 klm \pm 20
7	75%	$17,513^{ij} \pm 1401$	$724.1^{ ext{ pq}} \pm 1.3$	13,686 $^{ m q}$ \pm 233
8	75%	$13,461 \text{ efgh} \pm 1076$	$650.4~^{ m m}\pm 2.8$	10,659 $^{ m jk}\pm 118$
9	75%	18,181 $^{ m ghi} \pm 1454$	$716.6 {}^{\mathrm{pq}} \pm 5.7$	13,551 $^{ m q} \pm 61$
10	40%	10,678 $^{ m cdefghi} \pm 854$	$617.0^{\ 1} \pm 4.9$	7320 $^{\mathrm{e}}\pm57$
11	100%	13,866 $^{\mathrm{fghi}}\pm1109$	712.7 $^{ m pq}\pm5.7$	$11,054^{\text{lmn}} \pm 60$
12	70%	$8876 \text{ bc} \pm 710$	447.0 $^{ m h}$ \pm 1.5	7103 ^e ± 70
13	70%	$8946^{\rm \ bc}\pm715$	$436.3^{\text{h}} \pm 5.6$	7220 ^e ± 53
14	70%	16,845 $^{ m hij}\pm1281$	951.2 $^{\rm r} \pm 5.7$	9726 $^{\mathrm{i}}\pm161$
15	70%	$9416^{bcd} \pm 753$	492.8 $^{ m i}\pm1.8$	7383 ^e ± 81
16	70%	12,255 $^{ m cdefgh} \pm 980$	$641.5\ ^{ m m}\pm 1.6$	7176 $^{ m e} \pm 253$
17	100%	5960 $^{\mathrm{ab}}\pm476.8$	193.3 $^{ m b}$ \pm 3.6	747.6 $^{\mathrm{a}}\pm17$
18	100%	4107 $^{\mathrm{a}} \pm$ 328.6	$399.1 \text{ g} \pm 5.6$	$2922~^{\rm b}\pm74$
19	100%	12,698 $^{ m cdefgh}\pm1015$	$504.4~^{\mathrm{ij}}\pm2.8$	10,437 $^{ m jk}\pm$ 92
20	75%	2962 $^{\mathrm{a}}\pm236$	$323.9 \text{ d} \pm 1.2$	$2106^{\text{ b}}\pm181$
21	75%	3774 $^{\mathrm{a}} \pm 301$	$376.1~^{\mathrm{fg}}\pm1.6$	2714 $^{\rm c}\pm132$
22	100%	$15,162^{ m ghi}\pm1213$	726.1 $^{ m q} \pm 1.7$	12,267 ° ± 151
23	70%	9506 $^{\mathrm{cdef}} \pm$ 760	$389.2 \text{ f} \pm 1.1$	7922 $^{ m f}\pm 86$
24	100%	13,811 $^{ m fghi}\pm1104$	552.4 $^{ m k}$ \pm 2.9	11,704 $^{ m n} \pm 224$
25	100%	13,102 $^{ ext{defgh}} \pm 1048$	$625.0^{1} \pm 2.5$	9619 $^{ m hi}\pm 83$
26	100%	12,084 $^{ m cdefg} \pm 966$	554.8 $^{ m k}$ \pm 2.8	9324 $^{ m gh}\pm106$
27	100%	13,208 $^{ ext{defgh}} \pm 1056$	$661.9^{\text{ n}} \pm 4.6$	$10,\!174^{\mathrm{j}}\pm100$
28	100%	14,176 $^{\mathrm{fghi}}\pm1134$	$684.5 ^{\mathrm{o}} \pm 3.3$	$11,331 \text{ mn} \pm 61$
29	100%	9673 $^{\rm bcde} \pm 773$	684.7 $^{\mathrm{o}}$ \pm 2.8	7461 $^{\rm e}\pm98$
30	60%	$19,723^{\text{ j}} \pm 1577$	707.8 $^{\rm p} \pm 1.0$	16,703 $^{\rm r}\pm47$

* total Δ^9 -THC content: Δ^9 -THC + (0.877 × Δ^9 -THCA-A); ** total CBD content: CBD + (0.877 × CBDA) [3]; a–r values within columns followed by the same letter are not significantly different according to $\alpha = 0.01$.

The realized research made it possible to conclude that the level of content of some cannabinoids in the analyzed teas varied greatly. The highest total content of 17 cannabinoids was recorded in tea No. 30 (60% dried hemp—19,723 mg kg⁻¹), while the lowest was recorded in tea No. 20 (75% dried hemp—2962 mg kg⁻¹). Statistically significant differences (p < 0.01) were found between the total content of the 17 cannabinoids in the analyzed teas. Taking into account the percentage of dried hemp in the analyzed teas, it is not possible to unequivocally conclude that products containing 100% dried hemp contain more cannabinoids compared to teas with a lower percentage of dried hemp. Analyzing individual substances, the highest contents were recorded for CBDA (501.2–11,692 mg kg⁻¹),

CBD (308.0–6448 mg kg⁻¹), and CBGA (33.3–3646 mg kg⁻¹). Δ^9 -THCA-A, which is the precursor for Δ^9 -THC, was present in the tested samples in contents ranging from 58.3 to 948.7 mg kg⁻¹. Δ^9 -THC in the teas analyzed fell within a fairly wide range of content, i.e., from 21.4 to 616.8 mg kg⁻¹, but did not exceed the permissible limit of 0.3% in dry plant material [25]. CBN (4.3–80.0 mg kg⁻¹), Δ^8 -THC (2.5–8.5 mg kg⁻¹), and Δ^9 -THC exhibit psychoactive effects, so it is extremely important to control the content of food products, including teas based on *Cannabis sativa* L. *var. sativa*. A comparison of total Δ^9 -THC content and total CBD content in 30 tea samples was also made. The results are shown in Table 5 and Table S4 (Supplementary Materials). Performing the analysis of total Δ^9 -THC content and total CBD content allows determining the total content of neutral and acid forms of Δ^9 -THC and CBD in the plant. Statistically significant differences (p < 0.01) were found in the total Δ^9 -THC content and total CBD content and total CBD content of Δ^9 -THC and CBD in the plant. Statistically significant differences (p < 0.01) were found in the total Δ^9 -THC content and total CBD content and total CBD content of Δ^9 -THC greater than 0.3% of the dry weight of the *Cannabis sativa* L. *var. sativa* plant (0.01–0.09% of dry weight). The total CBD content ranged from 747.6 to 13,686 mg kg⁻¹ (0.08–1.37% of dry weight).

3. Discussion

3.1. *Optimization of the Procedure for the Extraction of Cannabinoids from the Tested Matrices* 3.1.1. Fresh Parts of Plants

There is little information regarding the extraction of cannabinoids from fresh *Cannabis sativa* L. *var. sativa* plants. Most studies have already analyzed cannabinoids in dried plants. Our results are among the first regarding the comparison of cannabinoid content in different parts of the fresh plant, taking into account inflorescence size. Namdar et al. [26] extracted cannabinoids from fresh inflorescences of Cannabis sativa L. using EtOH, n-hexane, and a mixture of EtOH:n-hexane (7:3 v/v). The authors showed that it was possible to extract the highest sum of the analyzed cannabinoids using a mixture of EtOH:n-hexane (7:3, v/v). The same authors also showed differences in the content of cannabinoids in inflorescences occurring in the upper part of the plant and the lower parts. The study showed that significantly more cannabinoids were found in the top inflorescences, which were also the biggest in the plant. The results obtained by Namdar et al. [26] do not coincide with those obtained in our study, where it was shown that the best extraction liquid is MeOH rather than a mixture of EtOH:n-hexane (7:3, v/v). Our study also showed that small inflorescences contained more cannabinoids than big inflorescences. The differences may be due to a different extraction method, a different plant variety, different growing conditions, a different degree of maturity of the plant at harvest, and different inflorescence structures (higher proportion of leaves/stalk) [26].

3.1.2. Dried Plants

For practical reasons, to evaluate the degree of extraction with the tested solvents, dried ground hemp was used as a certified reference material; this is of particular importance since, on this basis, it is possible to assume a certain sum of the tested compounds. In the literature, one can find many described extraction methods that are based on the use of mainly solvent mixtures. Not every case cited evaluated the same extraction liquids for extracting cannabinoids as in the study presented by us. Hence, it is difficult to have a fair discussion. Zivovinovic et al. [6] compared different solvent mixtures for extracting cannabinoids from Cannabis sativa L. inflorescences. They used mixtures of MeOH:H₂O (4:1, v/v), MeOH:CHCl₃ (9:1, v/v), ACN:H₂O (1:1, v/v) and 100% ACN for extraction. Extraction with ACN yielded the lowest sum of extracted cannabinoid content. A similar observation was observed in our study. The other mixtures used by the authors had similar cannabinoid extraction yields, but for further analysis, the authors chose the ACN:H₂O (1:1, v/v) mixture for practical reasons [6]. A study by Mudge et al. [13] found that using a mixture of MeOH: $H_2O(8:2, v/v)$ yields a similar sum of extracted cannabinoids from the plant compared to a mixture of MeOH:CHCl₃ (9:1, v/v) [13]. McRae and Melanson [16] analyzed the efficiency of a five-step extraction of cannabinoids from dried Cannabis sativa L. material

using a mixture of MeOH:H₂O (8:2, v/v) and MeOH:CHCl₃ (9:1, v/v). They showed that with these mixtures, more than 98% extraction efficiency could be achieved by two-stage extraction. The results obtained by the author confirm that the use of MeOH is legitimate in the extraction of cannabinoids. In the present study, such mixtures were not used because cannabinoids are water-insoluble compounds, and the use of CHCl₃ during the extraction of these compounds, as demonstrated by McRae and Melanson [16], does not increase extraction efficiency, as this liquid is an extremely volatile substance and exhibits high toxicity [6,16].

3.2. Application of the Method to the Determination of Cannabinoids in Different Samples from Cannabis sativa L. var. sativa

3.2.1. Analysis of the Content of 17 Cannabinoids in the Fresh Plant *Cannabis sativa* L. *var. sativa* 'Białobrzeskie'

To date, only a few cases in the literature have presented the distribution of cannabinoids in different parts of the plant [27–29]. Most authors focus mainly on analyzing a few selected cannabinoids. Kleinhenz et al. [28] showed a total cannabinoid content in inflorescences and leaves of 46,076 and 52,021 mg kg $^{-1}$, respectively. Different results were obtained in our study, where the contents of the analyzed substances were at a much lower level. The obtained differences in the total content may be due to the different degrees of maturity of the plant, since, with the maturation of the inflorescences, the contents of cannabinoids change. It should be mentioned that our work obtained differences in the contents of some cannabinoids between different parts of the plant. Kleinhenz et al. [28] recorded the highest concentration of CBGA in inflorescences at 1938 mg kg⁻¹. In our study, the content of this compound in the analyzed inflorescences of Cannabis sativa L. var. sativa "Białobrzeskie" plant was approximately ten times lower, averaging 164.3 mg kg^{-1} . Only in the case of CBD did Kleinhenz et al. [28] show no difference in the content of this compound between inflorescences and leaves [28]. Our study showed more than twice the concentration of CBD in leaves (168.7 mg kg^{-1}) than in medium-sized inflorescences $(65.7 \text{ mg kg}^{-1})$. Kalinova et al. [29] determined the contents of CBD, CBDA, and CBGA in the inflorescences and leaves of the two most popular varieties of Cannabis sativa L. var. sativa "Białobrzeskie" and "Finola". In the inflorescences and leaves of the "Białobrzeskie" variety, more CBD (inflorescences 262.9 mg kg⁻¹, leaves 56.7 mg kg⁻¹) and CBDA (inflorescences 11,519 mg kg⁻¹, leaves 4267 mg kg⁻¹) were determined compared to the "Finola" variety, which contained 135.4 mg kg⁻¹ (inflorescences), 16.54 mg kg⁻¹ (leaves) CBD and 8707 mg kg $^{-1}$ (inflorescences), 1792 mg kg $^{-1}$ (leaves) CBDA, respectively. The "Finola" variety had a higher CBGA content in inflorescences (1345 mg kg⁻¹) than the "Białobrzeskie" variety (905.4 mg kg $^{-1}$) [29]. The CBDA and CBD contents determined by the authors [29] for the inflorescences and leaves were significantly higher than those determined in our study for the same plant variety. Ibrahim et al. [27] also showed differences in CBD and CBDA contents in inflorescences and leaves of Cannabis sativa L. var. sativa fiber hemp. The contents were in the range of $13,100-21,100 \text{ mg kg}^{-1}$ (inflorescences) and 5700–23,000 mg kg⁻¹ (leaves) for CBDA and of 1000–3900 mg kg⁻¹ (inflorescences) and 700–18,600 mg kg⁻¹ (leaves) for CBD. The above study also showed a higher content of CBD and CBDA in inflorescences and leaves extracted from fiber hemp plants than in the research material used in this article. The indicated differences in the content of cannabinoids in different parts of the plant in our article and the cited works may be influenced by several reasons. One of them is the lack of standardized testing methods through which different authors can obtain different results when analyzing plants of the same variety. Another reason is the degree of maturity of the inflorescences and the whole plant. According to Aizpurua-Olaizola et al. [30], the content of major cannabinoids such as CBDA, Δ^9 -THCA-A, and CBGA changes with the maturation of the plant in both inflorescences and leaves. Therefore, when analyzing cannabinoid content, it is important to provide data on when the plant was harvested. As Eržen et al. [31] and Fischedick et al. [32] confirmed, growing conditions and geographic location also affect the plant's cannabinoid content. Droughts or excessive rainfall can induce stress conditions in plants, which can synthesize

cannabinoids to varying degrees. Park et al. [33] reported that in early flowering, drought stress is the main cause of changes in the cannabinoid profile in inflorescences, altering cannabinoid production by reducing CBD and Δ^9 -THC accumulation and increasing CBG accumulation by 40%. Other authors suggest that the plant's production and accumulation of cannabinoids are also affected by light intensity, ambient temperature, the presence of nutrients, high concentrations of heavy metals in the soil, phytohormones, and stresses caused by insect and microbial pathogens [33–36]. Gorelick and Bernstein [36] showed that both supplementation with selected minerals and their deficiency can affect the plant's cannabinoid profile.

3.2.2. Analysis of Cannabinoid Content in Teas Based on Cannabis sativa L. var. sativa

Currently, there are few studies analyzing the cannabinoid content of *Cannabis sativa* L.-based hemp teas or dries as raw material for hemp teas. The few existing ones present varying levels of cannabinoid content in these products [37–39]. Knezevic et al. [38] determined the content of selected cannabinoids (CBDA, CBD, Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THC, CBN) in hemp-leaf-based teas. The results ranged from 4.1 mg kg⁻¹ CBDA, 802.0 mg kg⁻¹ CBD, 111.0 mg kg⁻¹ Δ^9 -THCA-A, 76.0 mg kg⁻¹ Δ^9 -THC, and 52.0 mg kg⁻¹ CBN. The values obtained for hemp-leaf-based teas in the cited work were within the range of occurrence of the analyzed compounds analyzed in our work. Hemp-leaf-based teas contained significantly less Δ^9 -THC than those containing inflorescences [38]. In the study by Kladar et al. [39], the hemp teas analyzed contained both hemp leaves and inflorescences. The determined total Δ^9 -THC content for the tea samples (dry herbal material) ranged from 13 to 8831 mg kg⁻¹. It should be noted that one of the samples analyzed by Kladar et al. [39] contained almost 0.9% total Δ^9 -THC. This value is above the limit set by the EC (EC Regulation 2021/2115), which is 0.3% for Δ^9 -THC on a plant dry weight basis [25]. CBD levels in the samples analyzed ranged from 444 to $25,004 \text{ mg kg}^{-1}$, and CBN levels ranged from 14 to 266 mg kg $^{-1}$ [39]. The quoted cannabinoid contents of the teas far exceed the levels of selected cannabinoids in the teas we analyzed. In the context of assessing the content of Δ^9 -THC, our results indicate that its content was below 0.3% of dry weight. However, in the literature, these contents were generally higher. Gallo-Molina et al. [10] identified this compound at an average level of 3550 mg kg⁻¹ plant, which exceeded the permitted content set by the EU. Pacifici et al. [37] also analyzed hemp teas for cannabinoid content. The authors found the presence of CBDA, CBG, CBD, CBN, Δ^9 -THC, CBC, and Δ^9 -THCA-A in dried tea at levels averaging 61,800, 600, 26,600, 900, 33,700, 1200, and 28,200 mg kg $^{-1}$, respectively. The occurrence of cannabinoids at such a wide level of content in individual teas may be related, among other things, to the additives used in these products, such as herbs or dried fruits, the proportion of which (0–60%) affects the composition of hemp tea. Pure hemp teas analyzed in our study based on dried hemp alone (inflorescences and leaves) tended to have higher cannabinoid content than teas containing 40–100% dried hemp (Table 5). When assessing cannabinoid intake, it is important to consider that teas are made into infusions. Cannabinoids dissolve poorly in water, so incomplete intake of these substances from the product is to be expected. The wide range of cannabinoids in finished products such as dried or hemp teas based on Cannabis sativa L. var. sativa suggests that it is necessary to control the level and profile of cannabinoids in finished products on the market to exclude possible exceedances of Δ^9 -THC in the product.

4. Materials and Methods

4.1. Sample Material

Cannabis sativa L. *var. sativa* cultivars 'Bialobrzeskie' were selected as research material due to its recorded history of human consumption, the widespread use of the plant for CBD extraction, and the production of food containing cannabinoids. The plants were obtained from the Institute of Natural Fibers and Herbaceous Plants in Poznań, Pętkowo, Poland. The plants were harvested at the peak of flowering (between the twentieth day after the

start of flowering and the tenth day after the end of flowering) [40]. The harvested plants were divided into inflorescences and leaves, and the remaining plant parts were removed. Inflorescences were divided by size (length) into small (<10 cm), medium (10–20 cm), and big (>20 cm). The samples prepared in this way were then frozen and stored at -60 °C. Thirty samples of *Cannabis sativa* L. *var. sativa*-based teas available on the Polish market were also analyzed. Certified reference materials of dried (HEMP-1) ground hemp were purchased from the National Research Council Canada. A CRM was used for validation and quality control purposes. This material has been rigorously tested to be homogeneous and stable concerning the 16 cannabinoids except for Δ^8 -THC, for which the concentration was not determined. In this article, an attempt was made to determine Δ^8 -THC in the CRM analyzed. The material for the proficiency tests was dried hemp provided by ASTM International (HFL2301 and HFL2305) (Supplementary Materials Tables S2 and S3).

4.2. Chemicals and Reagents

The certified reference materials of cannabidiol (CBD), cannabidiolic acid (CBDA), cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), cannabinol (CBN), cannabidiolic acid (CBNA), cannabidivarinic acid (CBDVA), cannabicyclol (CBL), and cannabicyclic acid (CBLA) were provided at 1.0 mg mL⁻¹ solutions in methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN) from Restek GmbH (Bad Homburg, Germany). Cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromenic acid (CBCA), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A), Δ^9 -tetrahydrocannabivarinic acid (Δ^9 -THCVA), and cannabidivarin (CBDV) were purchased from LGC Standards. Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV) was provided at 1.0 mg mL⁻¹ solutions in MeOH or ACN from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). The certified purity value for all the CRMs was >98.00%. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)-grade water, ACN, MeOH, ethanol (EtOH), and n-hexane were purchased from Witko (Lodz, Poland). Formic acid and ammonium formate (LC-MS grade) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.3. Preparation of Standard Solutions and Calibration Curves

Standard 100 μ g mL⁻¹ solutions for all 17 cannabinoids were prepared by dissolving 1.0 mL of the compound reference standard in ACN or MeOH using 10 mL volumetric flasks separately. This step was repeated as it was necessary to prepare higher dilutions for most compounds except CBD and CBDA. All solutions were stored at <-80 °C. Eight-point curves were prepared for 17 cannabinoids in different ranges, which were generated using Thermo TraceFinderTM software, version 5.1 (Thermo Fisher Scientific, Pleasanton, CA, USA). Curves in matrix were prepared by adding specific amounts of the standard (as in the curve in solvent) to a previously prepared and appropriately diluted extract (fresh inflorescence, fresh leaves, CRM).

4.4. Preparation of Test Samples

Before starting cannabinoid extraction, all samples previously frozen ($-60 \degree C$) were ground to a fine powder using a Grindomix GM200 grinder (Retsch, Haan, Germany).

Fresh material: 0.1 g was weighed into 50 mL Falcon vial samples of inflorescences or leaves and extracted with MeOH in a volume of 5 mL.

Dried material (ground dried hemp—CRM and hemp tea): 0.1 g to 50 mL Falcon vial samples were weighed and extracted twice with 10 mL of MeOH.

Samples were homogenized (2 min. 5000 rpm) using a Unidrive X 1000 homogenizer, Cat SCIENTIFIC (CAT Scientific Inc., Paso Robles, CA, USA). The prepared samples were then centrifuged (2 min. 10,000 rpm) using an MPW-380R centrifuge from MPW Med. Instruments (Warsaw, Poland). The obtained extracts of the dried material after extraction were mixed. For analyses, 1 mL of extract filtered through a 0.22 μ m 13 mm syringe filter was used (LLG Labware, Meckenheim, Germany). For compounds for which concentrations outside the upper range defined by the calibration curve were observed, the extracts were diluted accordingly with the extraction liquid. Dry weight content

was determined using a WPS 30S balance dryer (Radwag, Radom, Poland) to express cannabinoid levels relative to the dry mass. The level of the studied cannabinoids was calculated according to the following formula (Equation (2)):

С

$$=a/b$$
 (2)

where: C—the content of the studied compound (in $\mu g kg^{-1}$) calculated per dry weight; a—determined content of the studied compound (in $\mu g kg^{-1}$); b—dry weight content (in % of the fresh weight content).

4.5. UHPLC-HESI-MS

Cannabinoids were analyzed using ultra-high-performance liquid chromatography-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry setup operating with a heated electrospray interface (UHPLC-HESI-MS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Analyses were performed on a 2.1 × 100 mm, C18 Cortecs, 1.6 µm chromatography column (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase consisted of a mixture of ACN: 0.02% HCOOH_{aq} and 5 mM HCO₂NH_{4 aq} (75:25, v/v). Elution of analytes was carried out in isocratic mode. A constant flow rate of 0.3 mL min⁻¹ (10 min) and a constant injection volume of 2 µL were used for all analyses. The column thermostat temperature was 20 °C. During ionization in the mass spectrometer, the heated electrospray ionization (HESI) mode of operation was used in both positive and negative polarizations with a scan range of 100–1000 m/z. The parameters of the ionization source were as follows: spray gas flow rate (nitrogen): 50 L h⁻¹; auxiliary gas flow rate (nitrogen): 1 L h⁻¹; spray voltage: +2300 V and -2000 V; capillary temperature: 305 °C.

4.6. Method Validation

The method validation was based on AOAC International guidelines [19] and by the Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 to meet the requirements of the International Council for Harmonization [20]. The proposed analytical method was validated for linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recovery (R), and precision (RSD). Matrix effects were measured by comparing the ratio of the slope coefficient of the calibration curve prepared from the analysis of standards dissolved in a solvent to the slope of the same calibration curve resulting from the study of these standards in the all-tested matrix. A value of 100% indicates that there is no matrix effect. There is signal amplification if the values are >100% and signal attenuation if the values are <100%. The extraction recovery was measured by comparing the peak area of all analyzed matrix spiked with standards before and after extraction.

4.7. Statistical Analyses

Statistical results were analyzed using Statistica 13.1 software (Statsoft, Carlsbad, CA, USA). One-way variance analysis (one-way ANOVA) was used to determine the significant differences between the contents of cannabinoids in plant material. The significance of differences was determined at a significance level of $\alpha = 0.01$. The homogeneity of the groups was determined using the Tukey HSD test.

5. Conclusions

This article presents the characterization of a method for determining up to 17 selected cannabinoids in fresh hemp (inflorescences and leaves) and dried material (CRM and hemp teas). This is one of the first works on the analysis of 17 cannabinoids in such matrices using a 2.1×100 mm, C18 Cortecs, 1.6μ m chromatography column (Waters). The developed method was characterized by desirably low LOD and LOQ values. The method showed correct recovery values of individual compounds and inter- and intraday precision and accuracy values. MeOH was found to be the best extraction liquid for cannabinoids in fresh plant parts

(inflorescences and leaves) are CBDA, Δ^9 -THCA-A, and CBCA, and in teas containing dried hemp CBDA, CBD, CBGA, and Δ^9 -THCA-A. The presence of psychoactive cannabinoids (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, and CBN) in teas available on the food market, which was confirmed in the samples analyzed, may be a problem for manufacturers. Due to the varying levels of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.-based products, further work is needed to develop a standard procedure for extracting these compounds. To date, the levels of permissible contents of total Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A established by EU law apply only to seeds and products derived from them.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www. mdpi.com/article/10.3390/molecules28248008/s1. Table S1: Intra- and inter-day precision data of the determination of cannabinoids in inflorescences, leaves, and CRM (intra-day n = 6; inter-day, day = 3, n = 3 days × 6 = 18). Table S2: Results obtained, average values, and z-score for dried hemp proficiency tests (HFL2301). Table S3: Results obtained, average values, and z-score for dried hemp proficiency tests (HFL2305). Table S4: The content of 17 cannabinoids for each hemp tea sample (mg kg⁻¹).

Author Contributions: Conceptualization, J.K., M.B. and M.R.; methodology, J.K.; validation, J.K.; formal analysis, M.B. and M.R.; investigation, J.K.; resources, J.K.; data curation, J.K.; writing—original draft preparation, J.K.; writing—review and editing, M.B. and M.R.; visualization, J.K.; supervision, M.B. and M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Christinat, N.; Savoy, M.C.; Mottier, P. Development, validation, and application of an LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. *Food Chem.* 2020, 318, 126469. [CrossRef] [PubMed]
- Kanabus, J.; Bryła, M.; Roszko, M.; Modrzewska, M.; Pierzgalski, A. Cannabinoids—Characteristics and potential for use in food production. *Molecules* 2021, 26, 6723. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Regulation (EU) 2023/915. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?toc=OJ%253AL%253A2023%25 3A119%253ATOC&uri=uriserv%253AOJ.L_.2023.119.01.0103.01.POL (accessed on 2 October 2023).
- 4. Scientific Opinion on the Risks for Human Health Related to the Presence of Tetrahydrocannabinol (THC) in Milk and Other Food of Animal Origin. Available online: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4141 (accessed on 2 October 2023).
- 5. Gunjević, V.; Grillo, G.; Carnaroglio, D.; Binello, A.; Barge, A.; Cravotto, G. Selective recovery of terpenes, polyphenols, and cannabinoids from *Cannabis sativa* L. inflorescences under microwaves. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *162*, 113247. [CrossRef]
- Zivovinovic, S.; Alder, R.; Allenspach, M.D.; Steuer, C. Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. *J. Anal. Sci. Technol.* 2018, 9, 28. [CrossRef]
- Patel, B.; Wene, D.; Fan, Z.T. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. J. Pharm. Biomed. Anal. 2017, 146, 15–23. [CrossRef]
- 8. De Backer, B.; Debrus, B.; Lebrun, P.; Theunis, L.; Dubois, N.; Decock, L.; Verstraete, A.; Hubert, P.; Charlier, C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009, *32*, 4115–4124. [CrossRef] [PubMed]
- 9. Chen, C.; Wongso, I.; Putnam, D.; Khir, R.; Pan, Z. Effect of hot air and infrared drying on the retention of cannabidiol and terpenes in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Ind. Crops Prod.* **2021**, *172*, 114051. [CrossRef]
- Gallo-Molina, A.C.; Castro-Vargas, H.I.; Garzón-Méndez, W.F.; Martinez Ramirez, J.A.; Rivera Monroy, Z.J.; King, J.W.; Parada-Alfonso, F. Extraction, isolation, and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. *J. Supercrit. Fluids* 2019, 146, 208–216. [CrossRef]
- Baranauskaite, J.; Marksa, M.; Ivanauskas, L.; Vitkevivius, K.; Liaudanskas, M.; Skyrius, V.; Baranauskas, A. Development of extraction technique and GC/FIF method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. spp. *sativa* (hemp). *Pchytochem. Anal.* 2020, *31*, 516–521. [CrossRef]

- 12. Brighenti, V.; Pellati, F.; Steinbach, M.; Maran, D.; Benvenuti, S. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibretype *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm.* **2017**, *143*, 228–236. [CrossRef]
- Mudge, E.M.; Murch, S.J.; Brown, P.N. Leaner and greener analysis of cannabinoids. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409, 3153–3163. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Citti, C.; Pacchetti, B.; Vandelli, M.A.; Forni, F.; Cannazza, G. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *149*, 532–540. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Lazarjani, M.P.; Torres, S.; Hooker, T.; Fowlie, C.; Young, O.; Seyfoddin, A. Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review. *J. Cannabis Res.* 2020, *2*, 35. [CrossRef] [PubMed]
- 16. McRae, G.; Melanson, J.E. Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in cannabis and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 7382–7393. [CrossRef] [PubMed]
- Addo, P.W.; Sagili, S.U.K.R.; Bilodeau, S.E.; Galdu-Gallant, F.-A.; MacKenzie, D.A.; Bates, J.; McRae, G.; MacPherson, S.; Paris, M.; Raghavan, V.; et al. Microwave and ultrasound-ssisted extraction of cannabinoids and terpenes from *Cannabis* using response surface methodology. *Molecules* 2022, 27, 8803. [CrossRef] [PubMed]
- Song, L.; Carlson, S.; Valenzuela, G.; Chao, M.; Pathipaka, S.B. Development of a validated method for rapid quantification of up to sixteen cannabinoids using ultra-high-performance liquid chromatography diode-array detector with optional electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry detection. J. Chromatogr. A 2022, 1670, 462953. [CrossRef]
- 19. AOAC International Guidelines. 2002. Available online: https://aoac.org (accessed on 2 October 2023).
- 20. ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2 r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline (accessed on 2 October 2023).
- 21. IRMM-JRC. 2010. Available online: https://crm.jrc.ec.europa.eu/graphics/cms_docs/erm1_polish.pdf (accessed on 2 October 2023).
- 22. EURACHEM/CITAC. 2021. Available online: https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides (accessed on 2 October 2023).
- 23. Strzelczyk, M.; Lochynska, M.; Chudy, M. Systematics and botanical characteristics of industrial hemp *Cannabis sativa* L. *J. Nat. Fibres* **2021**, *19*, 5804–5826. [CrossRef]
- Strzelczyk, M.; Chudy, M.; Łochyńska, M.; Gimbut, M.; Krawczyk, K. Influence of cultivar, harvest date, and selected weather conditions on the essential oils content in inflorescences of hemp *Cannabis sativa* L. J. Nat. Fibers 2023, 20, 2163332. [CrossRef]
- 25. Regulation (EU) 2021/2115. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%253A32021R2115 (accessed on 2 October 2023).
- Namdar, D.; Mazuz, M.; Ion, A.; Koltai, H. Variation in the compositions of cannabinoids and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Ind. Crops Prod.* 2018, 113, 376–382. [CrossRef]
- Ibrahim, E.A.; Gul, W.; Gul, S.W.; Stamper, B.J.; Hadad, G.M.; Abdel Salam, R.A.; Ibrahim, A.K.; Ahmed, S.A.; Chandra, S.; Lata, H.; et al. Determination of acid and neutral cannabinoids in extracts of different strains of *Cannabis sativa* using GC-FID. *Planta. Med.* 2018, 84, 250–259. [CrossRef]
- 28. Kleinhenz, M.D.; Magnin, G.; Ensley, S.M.; Griffin, J.J.; Goeser, J.; PAS, L.E.; Coetzee, J.F. Nutrient concentrations, digestibility and cannabinoid concentrations of industrial hemp plant components. *Appl. Anim. Sci.* **2020**, *36*, 489–494. [CrossRef]
- Kalinová, J.P.; Vrchotová, N.; Tříska, J.; Hellerová, Š. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) as a possible source of cannabidiol. J. Cent. Eur. Agric. 2021, 22, 110–118. [CrossRef]
- Aizpurua-Olaizola, O.; Soydaner, U.; Öztürk, E.; Schibano, D.; Simsir, Y.; Navarro, P.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of Cannabis sativa plants from different chemotypes. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 324–331. [CrossRef] [PubMed]
- Eržen, M.; Košir, I.J.; Ocvirk, M.; Kreft, S.; Čerenak, A. Metabolomic analysis of cannabinoids and essential oil profiles in different hemp (*Cannabis sativa* L.). Phenotypes. *Plants* 2021, 10, 966. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Fischedick, J.T.; Hazekamp, A.; Erkelens, T.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L. cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2058–2073. [CrossRef] [PubMed]
- Park, S.H.; Pauli, C.S.; Gostin, E.L.; Staples, S.K.; Seifried, D.; Kinney, C.; Vanden Heuvel, B.D. Effects of short-term environmental stresses on the onset of cannabinoid production in young immature flowers of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *J. Cannabis Res.* 2022, *4*, 1. [CrossRef]
- Berstein, N.; Gorelick, J.; Zerahia, R.; Koch, S. Impact of N. P. K, and humic acid supplementation on the chemical profile of medical Cannabis (*Cannabis sativa* L.). Front. Plant. Sci. 2019, 10, 736. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Husain, R.; Weeden, H.; Bogush, D.; Deguchi, M.; Soliman, M.; Potlakayala, S.; Katam, R.; Goldman, S.; Rudrabhatla, S. Enhanced tolerance of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) plants on abandoned mine land soil leads to overexpression of cannabinoids. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0221570. [CrossRef]
- Gorelick, J.; Bernstein, N. Cannabis sativa L.: Botany and horticulture. In Cannabis sativa L.: Botany and Biotechnology; Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M.A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 444–461.
- Pacifici, R.; Marchei, E.; Salvatore, F.; Guandalini, L.; Busardò, F.P.; Pichini, S. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2017, 55, 1555–1563. [CrossRef]

- Kladar, N.; Srdenoić Čonić, B.; Božin, B.; Torović, L. European hemp-based food products—Health concerning cannabinoids exposure assessment. *Food Control* 2021, 129, 108233. [CrossRef]
- Regulation (EU) 2017/1155. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R115 5&from=ET (accessed on 2 October 2023).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

	N I	Inflores	cences		Leav	ves		С		
	Nominal	Measured	in	2000	Measured	D	DCD	Measured		DCD
	concentration	concentration	·K	-KSD (%)	concentration	K (94)	(%)	concentration	R (%)	(%)
	[µg mL]	[µg mL ⁻¹]	(70)	(70)	[µg mL ⁻¹]	(70)	(70)	[µg mL ⁻¹]		(70)
					CBD					
Intra-	0.200	0.200	100	1	0.200	100	1	0.200	100	1
dav	3.200	3.190	99	3	3.180	99	3	3.190	99	3
	25.600	25.490	99	5	25.550	99	2	25.450	99	2
Inter-	0.200	0.190	95	4	0.190	95	6	0.210	105	6
day	3.200	3.180	99	3	3.170	99	8	3.220	101	8
	25.60	25.190	98	2	25.280	98	6	25.620	100	6
	0.000	0.009	100	1	<u>CBN</u>	100	2	0.009	100	4
Intra-	0.008	0.008	100	1	0.008	100	5	0.008	100	4
day	1.024	1.022	99	2	1.024	100	2	1.024	101	
	0.008	0.008	100	3	0.008	100	5	0.008	100	5
Inter-	0.000	0.008	00	3	0.008	08	5	0.008	08	2
day	1 024	1.022	99	2	1 022	90	3	1 024	100	2
	1.024	1.022	//	2	CBG		5	1.024	100	
	0.008	0.008	100	1	0.008	100	4	0.008	100	1
Intra-	0.128	0.126	98	2	0.127	99	6	0.128	100	4
day	1.024	1.019	99	2	1.022	99	1	1.026	100	2
	0.008	0.008	100	1	0.008	100	3	0.008	100	2
Inter-	0.128	0.125	97	3	0.124	97	5	0.130	102	8
day	1.024	1.015	99	1	1.010	98	9	1.300	100	5
				Δ	⁹ -THC					
T.A.	0.080	0.080	100	1	0.080	100	2	0.080	100	2
Intra-	1.280	1.280	100	2	1.270	100	4	1.290	100	5
uay	10.240	10.240	100	2	10.250	100	2	10.250	100	6
Intor	0.080	0.080	100	3	0.081	101	4	0.081	101	3
- rount dev	1.280	1.230	96	4	1.200	94	1	1.260	98	4
uay	10.240	10.250	100	4	10.230	99	2	10.290	100	1
				Δ	⁸ -THC					
Intra-	0.008	0.008	100	3	0.008	100	4	0.008	100	3
dav	0.128	0.128	100	4	0.128	100	1	0.127	99	5
	1.024	1.022	99	3	1.022	99	8	1.020	99	5
Inter-	0.008	0.008	100	2	0.008	100	3	0.007	88	5
day	0.128	0.128	100	1	0.120	94	4	0.123	96	6
	1.024	1.020	99	3	1.019	99	3	1.018	99	9
	0.020	0.020	100	1	0.022	110	7	0.019	00	1
Intra-	0.020	0.020	100	2	0.022	00	5	0.018	90	4
day	2 560	2 560	100	2	2 550	99	2	2 550	99	
	0.020	0.020	100	1	0.019	95	4	0.017	85	
Inter-	0.320	0.310	97	3	0.316	98	3	0.318	99	7
day	2.560	2.540	99	1	2.500	97	2	2.540	99	1
		2.0.10		-	CBL	~ (
	0.020	0.020	100	1	0.020	100	5	0.021	100	6
Intra-	0.320	0.320	100	1	0.322	100	7	0.321	100	1
day	2.560	2.560	100	2	2.540	99	4	2.520	98	4
.	0.020	0.020	100	2	0.019	95	5	0.018	90	10
Inter-	0.320	0.330	103	6	0.318	99	6	0.316	98	5
uay	2.560	2.540	99	3	2.520	98	5	2.500	98	8
					CBDV					
Intro_	0.008	0.008	100	1	0.008	100	4	0.008	100	3
dav	0.128	0.125	97	4	0.124	97	4	0.122	95	4
	1.024	1.023	99	4	1.022	99	1	1.020	99	3
Inter-	0.008	0.008	100	2	0.008	100	4	0.008	100	3
dav	0.128	0.124	97	4	0.122	95	8	0.120	94	7
J	1.024	1.026	98	5	1.020	99	4	1.018	99	6
				Δ^{2}	-THCV					

Table S1. Intra- and inter-day precision data of the determination of cannabinoids in inflorescences, leaves, and CRM (Intra-day n=6; Inter-day, day=3, n=3 days × 6=18)

Intro	0.008	0.008	100	1	0.008	100	4	0.008	100	4				
dav -	0.128	0.127	99	2	0.124	97	8	0.122	95	7				
uay	1.024	1.022	99	2	1.020	99	8	1.018	99	8				
Inton -	0.008	0.008	100	3	0.008	100	1	0.008	100	2				
dev -	0.128	0.127	99	2	0.120	94	6	0.118	92	8				
uay	1.024	1.022	99	4	1.018	99	2	1.017	99	3				
				(CBDA									
Intro	0.400	0.390	98	4	0.370	96	8	0.415	101	3				
dov -	6.400	6.380	99	2	6.380	101	1	6.420	101	2				
uay	51.200	51.180	99	3	51.150	99	4	51.115	101	5				
Intor -	0.400	0.370	96	6	0.360	95	5	0.390	99	2				
day -	6.400	6.370	99	4	6.340	99	3	6.390	99	3				
uay	51.200	51.150	99	2	51.100	98	4	51.190	99	3				
				(CBNA									
Intro -	0.002	100	3											
day -	0.032	0.032	100	2	0.30	94	6	0.30	94	8				
uay	0.256	0.256	100	1	0.250	98	4	0.249	97	3				
Inton	0.002	0.002	100	3	0.002	100	2	0.002	100	2				
day -	0.032	0.031	97	7	0.029	96	4	0.028	93	7				
uay	0.256	0.253	98	5	0.0248	96	8	0.245	95	6				
	CBGA													
Intro -	0.020	0.020	100	2	0.020	100	2	0.022	100	3				
dav -	0.320	0.320	100	3	0.323	101	1	0.330	103	2				
uay	2.560	2.560	100	3	2.450	96	4	2.560	100	2				
Inter-	0.020	0.020	100	4	0.019	95	7	0.018	90	10				
dav -	0.320	0.310	97	6	0.300	94	6	0.315	98	5				
uay	2.560	2.540	99	4	2.400	94	5	2.500	98	7				
Δ ⁹ -THCA-A														
Intra	0.080	0.080	100	1	0.078	98	3	0.076	96	5				
dav -	1.280	1.260	98	2	1.250	97	3	1.270	99	4				
uay	10.240	10.200	99	3	10.150	99	3	10.210	99	2				
Intor	0.080	0.080	100	1	0.075	94	8	0.073	91	10				
dav -	1.280	1.260	98	2	1.230	96	6	1.235	96	5				
uay	10.240	10.190	99	1	10.035	98	4	10.125	99	2				
				(CBCA									
Intra-	0.080	0.080	100	1	0.078	98	4	0.079	99	3				
dav -	1.280	1.270	99	2	1.260	98	4	1.290	101	5				
uuj	10.240	10.220	99	2	10.200	99	3	10.180	99	2				
Inter-	0.080	0.080	100	1	0.075	94	7	0.077	96	4				
dav -	1.280	1.270	99	3	1.240	97	5	1.250	98	5				
	10.240	10.180	99	3	10.175	99	2	10.140	99	2				
			100	(CBLA	^ -	-	0.010	~-					
Intra-	0.020	0.020	100	2	0.019	95	8	0.019	95	5				
dav -	0.320	0.320	100	2	0.318	99	3	0.316	98	3				
	2.560	2.560	100	2	2.550	99	3	2.545	99	4				
Inter-	0.020	0.020	100	3	0.018	90	10	0.017	85	5				
day -	0.320	0.320	100	4	0.316	98	4	0.315	98	6				
	2.560	2.550	99	<u> </u>	2.500	9/	5	2.458	96	4				
	0.020	0.020	100	<u> </u>	BDVA	100	2	0.020	100					
Intra-	0.020	0.020	100	2	0.020	100	2	0.020	100	<u></u>				
day -	0.320	0.320	100	1	0.316	98	4	0.320	100	4				
	2.560	2.560	100	3	2.560	100	2	2.560	100	1				
Inter-	0.020	0.020	100		0.018	90	10	0.018	90	<u> </u>				
day -	2 540	0.310	9/	5	0.310	90	<u>ð</u>	0.311	9/	<u> </u>				
	2.300	2.340	77	U		90	4	2.320	91	4				
	0.020	0.020	100	<u>Δ'-</u>		00	7	0.019	00	0				
Intra-	0.020	0.020	100	1	0.018	90	/	0.018	90	<u>ð</u>				
day -	2.520	0.320	100	<u> </u>	0.310	98	4	0.518	99	4 2				
	2.300	2.300	100	1 2	2.430	90	<u>∠</u> 0	2.304	101	<u> </u>				
Inter-	0.020	0.020	100	<u> </u>	0.010	<u>80</u> 07	<u> </u>	0.010	<u>80</u> 02	<u>ð</u> 7				
day -	0.320	0.320	100	1	0.512	9/	3	0.299	93	1				
•	2.560	2.550	99	4	2.412	94	4	2.218	8/	6				

¹Method and ²precision recovery values (expressed as % RSD) obtained by enriching each matrix (inflorescences, leaves, CRM) at three different levels for each compound. Recovery was determined based on the equation: % $R = [(C_f - C_u)^* 100]/C_a$, where C_a is the calculated (not analyzed) concentration of analyte added to the test sample; C_f is the concentration of fortified samples; C_u is the concentration for unfortified samples.

Compound	Results (mg kg-1)	Average value (mg kg-1)	z-score
CBD	26,970	33,216	-1.5
CBDA	33,010	42,680	-1.4
CBG	4,520	4 , 930	-0.6
CBGA	27,520	43,280	-2.1
Δº-THC	2 ₇ 070	2 ₇ 120	-0.2
Δ9-ΤΗϹΑ-Α	550	640	-1.0
Δ ⁸ -THC	1.6	4	-0.5
Δ ⁹ -THCV	40	70	-0.3
Ƽ-THCVA	370	-	-
CBDV	730	970	-0.5
CBDVA	2 ₇ 060	2 ₇ 170	-0.4
CBN	200	200	-0.1
CBNA	40	-	-
CBC	3 , 610	37254	0.8
CBCA	680	3,060	-1.5
CBL	120	-	-
CBLA	116	-	-

Table S2. Results obtained, average values and z-score for dried hemp proficiency tests (HFL2301)

Table S3. Results obtained, average values and z-score for dried hemp proficiency tests (HFL2305)

Compound	Results (mg kg ⁻¹)	Average value (mg kg ⁻¹)	z-score
CBD	1 , 981	1,861	0.5
CBDA	4,080	3,480	1.2
CBG	9 , 350	10,400	-0.8
CBGA	50,800	77,380	-
Δ ⁹ -THC	720	630	0.8
Δ9-ΤΗϹΑ-Α	270	220	0.4
∆ ⁸ -THC	0	0	-
Δº-THCV	60	90	-0.3
Δ ⁹ -THCVA	80	-	-
CBDV	310	280	0.2
CBDVA	1100	1260	-1.0
CBN	130	110	0.4
CBNA	1850	-	-

CBC	2240	2381	-0.6
CBCA	1180	1370	-1.0
CBL	20	-	-
CBLA	21	-	-

Table S4. The content of 17 cannabinoids for each hemp tea sample [mg kg ⁻¹].

Sam ple	СВС	CBDV	CBG	CBL	CBN	CBNA	<u> </u>	Δº-THC	Δº- THCV	CBDVA	CBD	CBGA	Δº- THCVA	CBLA	CBCA	Δ ⁹ -THCA- A	CBDA
1	262.5 ¹ ±16	35.4 ^{ijk} ±6 .4	155.3 ^{efghi} ± 17.8	38.0 ⁿ ±7.9	80.0 ⁿ ±1 0.3	19.7 ^{hij} ±2 .0	$4.9^{\text{bcdef}\pm}$ 0.8	122.6 ^{cdef} ± 14.0	0.9 ^{abc} ±0.	95.1 ^{bcd} ±11	5,299 ^{lmn} ±21 1	240.4 ^{ab} ±16.	8.8 ^{bcde} ±1	$40.2^{bcde} \pm 3.2$	115.0 ^{ghijk} ± 17.5	284.7 ^{bcde} ±8.	8,877 ^{ghijkl} ±6 60
2	196.1 ^{ghi} ±7 9	28.6 ^{fghi} ±	234.8 ^{ij} ±21	$14.8^{ijk}\pm1.6$	30.5 ^{hij} ±	17.3 ^{fghi} ±	7.6 ^{fg} ±0.	223.7 ^{jk} ±1	$1.9^{abcdefg}$ +0.2	80.0 ^{bcdef} ±3	$4,880^{\text{klmn}}\pm7$	$716.5^{abcde} \pm 110.6$	7.9 ^{abcd} ±1	65.5 ^{efgh} ±	122.2 ^{hijk} ±	331.6 ^{cdefgh} ± 38.10	6,810 ^{defghijk} ±
3	203.3 ^{ijk} ±1	14.0 ^{bc} ±1	2325 ^m ±19	10.6 ^{cdefghij}	13.3 ^{bcd} ±	2.0ª±0.4	<lod<sup>a</lod<sup>	$49.3^{ab}\pm 4.$	0.5ª±0.1		1,535 ^{abcde} ±2	3,646 ⁱ ±671	4.5ª±1.4	10.0ª±1.	32.5 ^{ab} ±4.4	58.30ª±5.7	1,904 ^{ab} ±292
4	240.0 ^{jkl} ±1	26.3 ^{efgh} ±	416.5 ^k ±32	10.3 ^{bcdefghij}	10.0 ^{abc} ±	8.0 ^{bc} ±0.	3.9 ^{bed} ±	188.7 ^{hij} ±1	2.4 ^{defgh} ±	$100.0^{\text{defgh}} \pm$	2,391 ^{bcdefgh} ±	1,797 ^g ±283	13.3 ^{ghij} ±	70.7 ^{fghi} ±	94.7 ^{efghi} ±5	$374.8^{\text{cdefghi}} \pm$	$7,534^{\text{defghij}} \pm 1$
5	$\frac{5.1}{241.3^{jkl}\pm 1}$	2.9 57.6 ¹ ±4.	.5 96.7 ^{bcdef} ±6	± 0.2 11.8 ^{efghij} ±	0.2 87.3°±7.	$22.0^{jklm} \pm$	<lod<sup>a</lod<sup>	5.0 616.8°±3	$\frac{0.1}{23.8^{n}\pm1.}$	4.0 144.7 ^{ij} ±17	4,428 ^{ijkl} ±27	218.7 ^{ab} ±19.	$\frac{1.9}{26.0^{l}\pm 2.}$	5.0 7.7ª±0.2	.2 49.1 ^{abcd} ±2	20.3 419.7 ^{ghij} ±30	,209 9,070 ^{hijkl} ±1,
6	$126.0^{\text{bcde}} \pm$	4 20.7 ^{cdef} ±	210.9 ^{hi} ±25	10.5 ^{bcdefghij}	20.7 ^{efg} ±	12.0 ^{cdefg}	5.1 ^{bcdef} ±	1.2 160.8 ^{ghi} ±	2.0 ^{bcdefgh}	.9 62.7 ^{bcd} ±5.	2,663 ^{cdefgh} ±	1,155 ^{defg} ±1	6.7 ^{abcd} ±1	48.0 ^{cdef} ±	.5 84.0 ^{defg} ±5.	.2 292.9 ^{bcdef} ±4	9,436 ^{ijkl} ±2,7
7	14.1 190.7 ^{efgh} ±	24.1 ^{defgh}	./ 203.6 ^{ghi} ±1	± 0.2 10.2 ^{bcdefghij}	1.2 31.3 ^{hijk} ±	± 1.5 28.7 ^{mno} ±	0.6 5.0 ^{bcdef} ±	9.5 183.3 ^{ghi} ±	± 0.4 $1.6^{abcdef} \pm$	2 88.0 ^{cdef} ±1.	$\frac{312}{4.516^{jkl}\pm 109}$	/2 890.0 ^{bcdef} ±	.4 12.7 ^{defghij}	3.0 124.0 ^k ±1	1 129.9 ^{jk} ±1	6.9 616.7 ^m ±34.	$\frac{24}{10,457^{kl}\pm 1,0}$
8	25.1 145.3 ^{defg} ±	±1.8 26.1 ^{efgh} ±	6.5 164.3 ^{fghi} ±	$\frac{\pm 1.5}{12.5^{\text{fghij}}\pm 1.}$	3.7 28.0 ^{hij} ±	3.1 22.7 ^{ijkl} ±	1.9 <1.0Dª	$\frac{15.5}{229.4^{jkl}\pm 1}$	0.2 2.0 ^{bcdefgh}	83.3 ^{cdef} ±7.	3,622 ^{fghijkl} ±1	69.2 386.7 ^{abc} ±14	$\frac{\pm 1.5}{10.0^{\text{cdef}}\pm}$	$\frac{0.6}{90.7^{\text{ghij}}\pm}$	$\frac{1.3}{133.5^{jk}\pm 2}$	9 480.0 ^{ijkl} ±29	$\frac{71}{8,024^{\text{defghijk}}\pm}$
	14.9 216.7 ^{ijk} ±5	2.6 30.1 ^{ghij} ±	32.8 299.1 ^j ±32.	0	3.4 35.3 ^{jk} ±2	1.8 27.3 ^{klmn} ±	-LOD	1.6 250.0 ^{kl} ±9.	±0.2 2.7 ^{defgh} ±	7 110.7 ^{efghi} ±	44 5,004 ^{klmn} ±2	.8 1,592 ^{fg} ±15	0.7 10.7 ^{defgh}	7.8 104.0 ^{hij} ±	0.4 204.0 ¹ ±20	.1 532.0 ^{jklm} ±3	946 9,746 ^{jkl} ±1,1
9	.7 112 7 ^{bc} +9	$\frac{4.0}{15.0^{bc}+2}$	8 132 9 ^{defgh} +	15.1 ^{jk} ±2.1	.2 16 7 ^{cde} +	1.4 21 5 ^{ijk} +3	<lod"< th=""><th>8 148 7^{defg}+</th><th>0.1 1 7^{abcdefg}</th><th>12.1 91 3^{cdefg}+8</th><th>11 2 225^{bcdefgh}+</th><th>$\frac{8}{1.292^{\text{efg}}+35}$</th><th>$\pm 1.0$ 14 7^{fghij}+</th><th>13.1 105 3^{hij}+</th><th>.0 144 7^k+5</th><th>6.1 534 0^{jklm}+3</th><th>95 5 809^{defgh}+1</th></lod"<>	8 148 7 ^{defg} +	0.1 1 7 ^{abcdefg}	12.1 91 3 ^{cdefg} +8	11 2 225 ^{bcdefgh} +	$\frac{8}{1.292^{\text{efg}}+35}$	± 1.0 14 7 ^{fghij} +	13.1 105 3 ^{hij} +	.0 144 7 ^k +5	6.1 534 0 ^{jklm} +3	95 5 809 ^{defgh} +1
10	.5 257 2jkl+2	$\frac{.0}{20.2^{\text{cdef}_{\perp}}}$	15.6 100.6 ^{cdef}	0.3	1.6 28 2hijk	.0 10.2ghij	<lod<sup>a</lod<sup>	10.0 171.2 ^{fgh} +	± 0.1	.3	133	8 224 2 ^{ab} +96	1.7 1.7 $10.7^{cdefg_{\perp}}$	15.3 110 7 ^{ijk} +	8	$\frac{3.4}{617.2^{m}+41}$	113
11	<u>1.6</u>	3.9	9.8	2.0	0.6	19.5° ± 1.5	1.8	20.6	0.2	2.3	15	1 1 1 1 1 1 1	1.3	110.7° ± 19.0	k±11.5	6 404 ofthi - 20	1,466
12	155.3 ^{ci} ≝±2 0.0	15.9 ⁰⁰⁴ ± 3.4	121.5 ^{cdelg} ± 17.4	$11.6^{\operatorname{delgmj}\pm}$ 1.0	26.0 ^{ngm} ± 2.8	$10.7^{\text{cut}}\pm$ 1.0	$5.0^{\text{occur}\pm}$	92.7eat±1 6.0	$0.8^{abc}\pm 0.$	43.3 ^{ab} ±8.4	2,686 ^{cdergin} ± 314	108.4"±14. 8	5.3 ^{ab} ±0.9	61.3 ^{cdelg} ± 8.0	90.7 ^{crgm} ±5 .5	404.0 ^{rgm} ±38 .2	5,036 ⁶⁰⁰⁰ ±25
13	150.7 ^{cdef} ± 10.5	18.3 ^{cde} ± 0.2	111.7 ^{cdef} ± 61.5	$6.8^{\text{abcdef}} \pm 1.$	23.2 ^{efgh} ±3.0	9.9 ^{cd} ±1. 2	2.6 ^b ±0. 7	87.3 ^{bc} ±10 .2	0.7 ^{ab} ±0. 1	47.3 ^{abc} ±8. 4	3,016 ^{efghij} ±1 52	133.2ª±14. 4	$6.0^{ab}\pm0.4$	54.7 ^{cdef} ± 10.2	86.2 ^{efgh} ±1 6.6	398.0 ^{efghi} ±2 0.0	4,793 ^{bcde} ±81 5
14	289.7 ¹ ±5. 8	13.2 ^{bc} ±1 .0	404.5 ^k ±39 .9	$11.9^{\text{efghij}} \pm 0.6$	13.3 ^{bcd} ± 2.9	14.8 ^{efghi} ± 1.9	3.4 ^{bc} ±0. 5	119.2 ^{cdef} ± 6.4	0.9 ^{abc} ±0. 1	$80.0^{ ext{bcdef}} \pm 8$.0	2,669 ^{cdefghi} ± 512.8	3,060 ^{hi} ±18 7	20.0 ^k ±2. 6	107.9 ^{jk} ± 15.9	216.4 ¹ ±4. 4	948.7 ⁿ ±83. 6	8,046 ^{defghijk} ± 1,015
15	160.5 ^{def} ±1 3.8	15.7 ^{bcd} ± 1.1	135.1 ^{defgh} ± 3.7	$8.3^{ m abcdefgh}\pm 0.9$	21.7 ^{efg} ± 1.5	11.3 ^{cdef} ± 0.8	$5.0^{ m bcdef} \pm 0.2$	106.8 ^{cd} ±6 .4	0.6ª±0.2	$50.0^{ m abc}{\pm 8.5}$	2,710 ^{defgh} ±6 2.6	265.2 ^{ab} ±40. 1	$5.8^{ m abc}\pm 0.4$	59.1 ^{defg} ± 4.4	92.1 ^{ghij} ±1. 9	440.1 ^{hijk} ±22 .3	5,329 ^{cedfg} ±8 09
16	211.8 ^{hij} ±7	8.1ª±0.6	404.8 ^k ±15	5.9 ^{abcd} ±0.2	7.3 ^{ab} ±0.	$10.0^{cde} \pm 1.4$	3.2 ^b ±0. 7	84.9 ^{bc} ±6. 7	$0.8^{abc} \pm 0.2$	$58.7^{bcd}\pm 8.0$	1,835 ^{abcdef} ±2 38.8	2,679 ^h ±692	14.8 ^{jk} ±2.	94.9 ^{ij} ±4. 6	110.3 ^{ghijk} ± 9.8	634.7 ^m ±28. 7	6,090 ^{defghi} ±4 76
17	102.3 ^b ±2.	4.0ª±0.2	2,032 ¹ ±93	4.7 ^{ab} ±0.1	4.3ª±0.1	$3.9^{ab}\pm 0.$	<lod<sup>a</lod<sup>	21.4ª±1.2	0.5ª±0.1	14.7ª±1.2	308.0ª±14.8	2,730 ^h ±247	6.5 ^{ab} ±0.1	12.7 ^{ab} ±2.	16.7ª±2.1	196.0 ^b ±10.	501.2ª±83.8
18	54.8ª±4.0	21.3 ^{cdefg}	21.6 ^{ab} ±3.2	9.1 ^{abcdefghi} +0.3	46.6 ¹ ±2.	32.4 ^{no} ±0 7	$4.3^{\text{bcde}} \pm$	148.9 ^{efg} ±	5.2 ^k ±0.5	89.3 ^{cdef} ±1 4 5	1,016.7 ^{abcd} ±	104.1ª±36.	17.1 ^{hij} ±0 2	31.3 ^{abcd} ±	47.3 ^{abcd} ±3	285.3 ^{bcde} ±3	2,173 ^{abc} ±32
19	255.6 ^{kl} ±9.	32.6 ^{hij} ±0	76.5 ^{abcde} ±2	23.7 ^{lm} ±0.5	39.5 ^{kl} ±0	21.9 ^{jklmn}	6.1 ^{cdefg} ±	178.8 ^{ghi} ±	19.3 ^m ±1.	92.0 ^{cdefg} ±1	4,586 ^{jklm} ±	107.0ª±12.	8.3 ^{bcde} ±0	58.7 ^{defg} ±	$149.2^{k}\pm 6.$	371.3 ^{cdefghi} ±	6,671 ^{defghij} ±7
20	9 38.2ª±1.7	14.6 ^{bc} ±1	.7 8.1ª±0.6	3.4ª±0.2	.0 33.5 ^{ijk} ±	27.8 ^{lmn} ±	$3.2^{b}\pm 0.$	$93.5^{bc}\pm 3.$	$3.6^{\text{hij}}\pm 0.$	$71.3^{bcde} \pm 2.$	707.8 ^{ab} ±	26.9ª±4.2	.5 13.1 ^{efghij}	26.6 ^{abc} ±5	$33.2^{abc} \pm 2.$	$262.7^{bc} \pm 28.$	1,594 ^{ab} ±244
21	46.3ª±1.7	.3 17.6 ^{cde} ±	9.7ª±0.9	4.9 ^{abc} ±0.5	1.4 46.5 ¹ ±0.	1.4 39.3 ^p ±2.	$2.5^{b}\pm 0.$	1 119.4 ^{cde} ±	2 4.3 ^{jk} ±0.1	93.3 ^{cdfeg} ±1	911.5 ^{abc} ±	33.3ª±8.4	± 0.1 17.9 ^{jk} ±1.	.4 33.1 ^{abcd} ±	8 46.1 ^{abcd} ±1	9 292.7 ^{bcdef} ±2	2,055 ^{abc} ±20
	314.0 ^m ±2	1.4 37.4 ^{ijk} ±1	131.3 ^{defgh} ±	10 5 ^{kl} ±0 2	5 55.5 ^m ±3	7 28.9° ^p ±0	3 8.5 ^g ±2.	$\frac{3.1}{224.5^{jk}\pm 1}$	2.1 ^{cdefg} ±	$\frac{1.0}{139.3^{\text{hij}}\pm 1}$	81.0 6,359 ^{mn} ±	246.4 ^{ab} ±36.	3 12.1 ^{efghij}	$\frac{8.5}{86.7^{ijk}\pm 6.}$.9 188.5 ¹ ±10	$\frac{8.5}{572.0^{\text{lm}}\pm 10.}$	0 6,736 ^{defghij} ±7
	8.1 169.9 ^{efgh} ±	.9 21.3 ^{cdefg}	3.1 43.8 ^{abc} ±0.	19.5 ±0.2	.3 19.3 ^{def} ±	.9 10.1 ^{cde} ±	4	$\frac{0.3}{140.7^{\text{defg}}\pm}$	0.2 1.1 ^{abcd} ±0	4.3 84.0 ^{bcdef} ±1	276 3,968 ^{hijkl} ±	9	±1.5	5 32.1 ^{abcd} ±	.6 69.3 ^{cdef} ±5.	6 283.3 ^{bcd} ±28	08 4.509 ^{bcd} ±59
23	4.4 283.7 ^{lm} ±3	± 1.2 41.6 ^k ± 2	7 62.1 ^{abcd} ±0	5	0.9 24.6 ^{efgh}	0.6 15.1 ^{defgh}	<lod"< th=""><th>7.9 278.2^{lm}±3</th><th>.1 2.6^{efgh}±0</th><th>3.0 106.0^{cdefg}+</th><th>421 6.542ⁿ ±</th><th>3/./⁻±0.2</th><th>3.3"±0.1</th><th>0.8 41.6^{cde}±0</th><th>5 136.5^{jk}±6</th><th>.7 312.7^{cdefg}±9</th><th>1 5.886^{defghi}±7</th></lod"<>	7.9 278.2 ^{lm} ±3	.1 2.6 ^{efgh} ±0	3.0 106.0 ^{cdefg} +	421 6.542 ⁿ ±	3/./ ⁻ ±0.2	3.3"±0.1	0.8 41.6 ^{cde} ±0	5 136.5 ^{jk} ±6	.7 312.7 ^{cdefg} ±9	1 5.886 ^{defghi} ±7
24	.3 117 7 ^{bcd}	4 21 0 ^{cdef}	6 126 2 ^{cdefg}	26.8 ^m ±1.1	±1.2	± 1.9	.8	.9 130 8 ^{defg}	.2 1 1 ^{abcd} ±0	13.3 133 3ghij⊥	$\frac{185}{2.164^{\text{bcdefg}} \pm}$	39.3 ^a ±4.0	$5.0^{ab}\pm 0.8$.2 74.1 ^{fghi} .+	$\frac{1}{1410^{ik+1}}$.9 552 3klm+52	89 8 500 ^{fghijkl} ±1
25	10.1	1.2 ^{±1.0} ±	6.7	0.6	0.9 ±0. 2	±0.8	<lod<sup>a</lod<sup>	5.1	.1 ±0	22.9	2,104 °± 93	1,000 -±	1 4 .3 ² ±0. 3	1.4	5.4	.6 ±52	78

26	$134.4^{bcde} \pm$	$31.3^{hij}\pm1$	$124.3^{\text{cdefg}} \pm$	6 7abcd_1 5	$10.9^{abc} \pm$	13.5 ^{cdefg}	$3.6^{bc} \pm 0.$	$177.1^{ m ghi}\pm$	1.7^{abcdefg}	$164.0^{i} \pm 10.$	$2,860^{efghij} \pm$	$540.7^{\text{abcde}} \pm$	$14.0^{\mathrm{fghij}}\pm$	$60.9^{\text{defg}} \pm$	138.9 ^{jk} ±9.	430.7 ^{hij} ±22.	$7.370^{defghijk} \pm$
20	3.1	.8	7.9	0.7 ± 1.3	0.3	± 0.5	2	0.3	± 0.1	6	502	33.1	0.7	3.9	6	5	1,063
27	$157.5^{\text{defg}} \pm$	$15.9^{bcd} \pm$	$137.6^{\text{defgh}} \pm$	$8.4^{abcdefgh} \pm$	11.6 ^{abcd}	15.3 ^{defgh}	$4.2^{bcde} \pm$	$159.6^{\text{fgh}} \pm$	$2.9^{\text{fghi}}\pm 0.$	$113.3^{\text{fghi}} \pm$	2,219 ^{bcdefgh}	$486.0^{abcd}\pm3$	$14.8^{ghij} \pm$	$92.6^{hij} \pm 7.$	125.2 ^{ijk} ±4	572.7 ^{lm} ±44.	9,071 ^{hijkl} ±64
21	5.6	0.8	1.7	1.3	± 0.6	± 1.3	0.5	8.3	3	5.9	± 417	8.2	1.6	5	.5	3	2
28	$186.5^{\text{fghi}} \pm$	38.7 ^{jk} ±3.	$76.9^{\text{abcde}} \pm 5$	$8.0^{abcdefgh} \pm$	11.6 ^{abcd}	$10.7^{cde} \pm$		206.3 ^{ij} ±9.	4.1 ^{ijk} ±0.	216.3 ^k ±17	$3,494^{\text{fghijk}} \pm$	228.7 ^{ab} ±47.	25.1 ¹ ±4.	$81.5^{ghij} \pm$	$105.6^{\text{fghij}} \pm$	$545.3^{klm}\pm 26$	$8,936^{hijkl} \pm 62$
	14.7	8	.2	1.4	± 0.4	1.6	<lod< td=""><td>7</td><td>1</td><td>.4</td><td>361</td><td>3</td><td>3</td><td>7.2</td><td>7.4</td><td>.4</td><td>7</td></lod<>	7	1	.4	361	3	3	7.2	7.4	.4	7
20	44 28 7 0	87.5 ^m ±5.	58.9 ^{abcd} ±1.	$7.4^{\text{abcdefg}} \pm$	$32.9^{ijk}\pm$	$17.1^{\text{fghi}} \pm$		347.3 ⁿ ±2	$13.3^{1}\pm0.$	280.0 ¹ ±29.	$2,812^{\text{defghij}} \pm$	122 08 4 0	39.4 ^m ±0.	$50.0^{\text{cdef}} \pm$	$65.0^{bcde}\pm 2$	$384.7^{\text{defghi}} \pm$	5,301 ^{cdef} ±1,1
29	44.3 ^{-±} /.0	1 8	8	1.3	0.8	0.6	<lod<sup>*</lod<sup>	7.8	7	3	224	132.0°±4.0 7	7	3.6	.9	13.6	52
30	111.7 ^{bc} ±1	42.3 ^k ±3.	$167.1^{\text{fghi}} \pm$	$13.7^{hij}\!\!\pm\!\!1.2$	$33.9^{ijk}\pm$	$22.1^{ijkl} \pm$	$4.7^{bcde} \pm$	295.6 ^m ±1	$3.0^{\text{ghij}}\pm 0.$	$117.0^{\text{fghi}} \pm$	$6,448^{n} \pm$	189.3 ^{ab} ±24.	11.4 ^{defghi}	$73.8^{\mathrm{fghi}}\pm$	125.9 ^{ijk} ±2	$470.0^{ijkl} \pm 15$	11,692 ¹ ±1,4
	4.8	9	2.4		1.6	0.6	0.5	0.5	2	14.7	1,825	2	± 0.4	4.7	2.2	.1	43
					-						<i>,</i>						

a-o – values within columns followed by the same letter are not significantly different ac-cording for $\alpha = 0.01$

Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów w opracowaniu publikacji ^{1/}

Joanna Kanabus Imię i nazwisko

Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

The Development, Validation, and Application of a UHPLC-HESI-MS Method for the Determination of 17 Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. var. sativa Plant Material *Tytuł artykułu*

Molecules, 2023, 28(24), 8008 DOI:10.3390/molecules28248008 Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DOI

Joanna Kanabus*, Marcin Bryła, Marek Roszko

Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko, Imię i nazwisko; Imię i nazwisko (2)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy udział %	Afiliacja	Podpis Autora	
1	Joanna Kanabus */**	Koncepcja badania, metodologia, analiza formalna i statystyczna, przeprowadzenie badań, zasoby, wizualizacja, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i edycja.	80%	Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno- Spożywczego im. Wacława Dąbrowskiego	Kowobis	
2	Marcin Bryła	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	10%	Państwowy Instytut Badawczy	m	
3	Roszko Marek	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	10%		Am	

 ¹ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD
 ² Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

्रातुः स्वयं प्रतिविधित्व स्वयं स्वयं विश्वास्य स्वयं क्रिया स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स स्वयं साहमान्यः अर्थ स्वित्य देश्वार्थ्य स्वयं स्वयं त्यां स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं स्वयं

hinter Alippent

성상이가 지지않는다. 영화 방법에 관계 관계가 하지만 한다. 지각수

. A terminentet enfantieren an med fan útstelen terminenter (terminenterenteren in diferriet van een een een een

승규는 물건이 없는 것 같아. 것 같아. 같이 같아.

e. 1. sector substantia (h. 1996), (h. 1996), et pare turbor († 1997), an entre a grantserge da september at sje 1. sector substantski krist (h. 1997), (h. 19

יישאילים לא יישאי שארגע איז איז אוראינגע איז אוראינגע אוראין אוראינגע אוראין אוראין אוראינגע איז איז איז איז א איזאילים לא יישאי שארגעלא היוגן דער ג'ינער ג'יני איז איז איזער ג'יני אוראינגע ג'יני איז איז איז איז איז איז איז

found humble of Meaning Joyle, Manpus H. selan

, and the second sec

a na pana sa manangan na manangan na manangan na manangangan ang manangan na manangan manangan manang Saragan s Tang taun sa manangan na manangan na manangan sa manangan tang manangan sa matang manang manang manang Saragan S Tang taun sa manangan na manangan na manangan sa manangan tang manangan sa matang manang manang manang Saragan s
4.2. Opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania terpenów oraz ocena wpływu suszenia elementów rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* wybranymi metodami na sumę oraz profil terpenów

W celu realizacji założeń pracy niezbędne było opracowanie metody oznaczania terpenów w materiale suszonym. W tym celu wykorzystano technikę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury **[P1]** wybrano 3 potencjalne ciecze ekstrakcyjne (octan etylu, n-heksan oraz metanol) do izolacji zawartych w materiale terpenów. Doświadczalnie wybrano najlepszą ciecz ekstrakcyjną dla terpenów, którą był octan etylu. Wykorzystanie tej cieczy pozwoliło na uzyskanie maksymalnej wydajności ekstrakcji tych związków. Wyniki przedstawiono **na rycinie S1 – Aneks.** Uzyskane wyniki pozwoliły na potwierdzenie Hipotezy **[H1]** – dobór cieczy ekstrakcyjnej ma wpływ na ilość ekstrahowanych terpenów.

Po określeniu warunków pracy spektrometru mas, przeprowadzono proces walidacji metody. Jako matrycę na potrzeby walidacji wybrano świeże i suszone elementy rośliny Cannabis sativa L. var. sativa. Podobnie jak dla pozostałych składników, ocenę parametrów statystycznych metody przeprowadzono w oparciu o wartości odzysku z próbek fortyfikowanych oraz powtarzalnością wartości odzysku. Dla większości analizowanych substancji poziom odzysku zarówno dla kwiatostanów i liści w formie świeżej i suszonej mieścił się w granicach 90-103%. Szczegółowe wyniki walidacji zgromadzone są w Tabelach S3-S5, w Aneksie. Rozszerzona niepewność pomiarów (K=2, α=0,05) wynosiła <10% dla wszystkich badanych związków. Opracowana metoda analityczna charakteryzowała się wysoką precyzją i dokładnością. Zawartość terpenów w świeżym badanym materiale roślinnym Cannabis sativa L. var. sativa "Białobrzeskie" była zróżnicowana. Najwyższą zawartością terpenów charakteryzowały się kwiatostany małe (1485 mg/kg) i średnie (1316 mg/kg). Spośród 19 analizowanych terpenów największe stężenie w kwiatostanach odnotowano dla α -pinenu (98,3-217,5 mg/kg), β -kariofilenu (310,7-490,6 mg/kg) oraz α -humulenu (102,6-127,2 mg/kg). W próbkach liści dominował β-kariofilen (32,7 mg/kg). Natomiast zawartość geraniolu oraz p-cymenu mieściła się poniżej granicy oznaczalności metody we wszystkich wariantach próbek.

Na potrzeby realizacji badań oraz weryfikacji hipotezy badawczej **[H2]** zastosowano trzy modelowe techniki suszenia: suszenie w temperaturze otoczenia 20°C, bez dostępu światła (Metoda 1), liofilizację (Metoda 2) oraz suszenie konwekcyjne w trzech wariantach temperatury (Metoda 3a, 50°C, 3b, 60°C i 3c, 70°C). Analizy zawartości 19 terpenów wykonano przy użyciu techniki GC-MS, a wyniki podano w przeliczeniu na suchą masę próbki.

W celu uzyskania próbek o podobnej końcowej charakterystyce przyjęto na podstawie literatury, że suszenie będzie prowadzone do momentu uzyskania zawartości wody wynoszącej 10±1%. W celu uzyskania założonej końcowej wilgotności, doświadczalnie stwierdzono, że proces suszenia metodą 1 powinien być prowadzony przez 10 dni, proces suszenia metoda 2 przez 24h, a suszenie konwekcyjne w temperaturze 50°C (metoda 3a) – 12h, 60°C (metoda 3b) - 8h, 70°C (metoda 3c) - 4h. Uzyskane wyniki zawartości terpenów w analizowanym materiale przedstawiono na Rycinie 2 oraz w Tabeli S7 - **Aneks**. W Tabeli S7 przedstawiono oczekiwaną zawartość związków przy założeniu ubytku wody podczas suszenia do zawartości ok. 10% bez wpływu czynników zewnętrznych tj. temperatura czy światło.



Rycina 2. Wpływ warunków suszenia próbek kwiatostanów różnej wielkości (małe – S, średnie – M, duże – B) oraz liści (L) wybranymi metodami (1 - suszenie w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, 2 - liofilizacja, 3a - suszenie konwekcyjne w temp. 50°C, 3b, suszenie konwekcyjne w temp. 60°C oraz 3c – suszenie konwekcyjne w temp. 70°C (n=3).

A-D – wartości w obrębie tej samej litery w próbkach świeżych lub poddanych suszeniu wybraną metodą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym p<0,05; a-e – wartości w obrębie tej samej litery dla jednego rodzaju próbki (np. liście) nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym p<0,05.

Proces suszenia badanych próbek spowodował na ogół spadek zawartości terpenów, wyjątkiem były próbki liści suszone metodą 1, 2 oraz 3a gdzie odnotowano istotny wzrost stężenia tych związków. Wzrost ten może być spowodowany równoczesnym ubytkiem innych substancji [Spadafora i wsp. 2024]. Istotne obniżenie zawartości terpenów w poszczególnych częściach roślin obserwowano w przypadku próbek suszonych metodą konwekcyjną

w temperaturze 60 i 70°C. Jak potwierdza Chen i wsp. [2021], terpeny bardzo łatwo ulegają utlenieniu do terpenoidów podczas procesu suszenia. Ponadto ze względu na wysoce lotny charakter, terpeny/terpenoidy łatwo odparowują w podwyższonych temperaturach, co może prowadzić do znacznych strat podczas procesu suszenia.

W przypadku metody 1, po zakończeniu suszenia zaobserwowano istotnie (p<0,05) mniejszą zawartość terpenów w kwiatostanach dużych (208,7 mg/kg) w porównaniu do próbek kwiatostanów małych (349,9 mg/kg) i średnich (286,2 mg/kg). Stężenie terpenów w kwiatostanach zmalało nawet 6-krotnie w wyniku suszenia metodą 1. Natomiast w próbkach liści zaobserwowano wzrost sumy tych związków z 61,44 mg/kg do 72,44 mg/kg. Po przeprowadzeniu suszenia nie zaobserwowano obecności δ -3-karenu, ocymenu, γ -terpinenu, nerolidolu, guaiolu oraz α -bisabololu, które obecne były w świeżym materiale. Terpenem, który występował w największej ilości w świeżym jak i suszonym materiale był β -karioflen (świeża roślina – 32,76-490,6 mg/kg, suszona roślina – 23,11-213,6 mg/kg).

Zastosowanie metody 2 do suszenia liści rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* skutkowało uzyskaniem materiału o zbliżonej zawartości terpenów jak w metodzie 1. Natomiast w przypadku kwiatostanów metoda ta pozwoliła na zachowanie większej ilości tych związków w suszonych próbkach (432,9-711,1 mg/kg). W przypadku terpenów tj. geraniolu, nerolidolu, guaiolu oraz α -bisabololu zaobserwowano zwiększenie stężenia, które mogło wynikać z transformacji ich prekursorów skumulowanych w roślinie [Spadafora i wsp. 2024]. β -karioflen również w próbkach kwiatostanów podanych liofilizacji występował w największym stężeniu (219,4-394,8 mg/kg). W przypadku liści dominował α -humulen (29,79 mg/kg).

Suszenie konwekcyjne (metody 3a,3b,3c) powodowało największe straty terpenów. Dobór temperatury suszenia miał wpływ na końcową zawartość terpenów zarówno w kwiatostanach różnej wielkości oraz liściach. Suszenie w wariancie metody 3a powodowało najmniejszy (2-krotny) ubytek tych związków w suszonych kwiatostanach. Natomiast zwiększenie o 10°C temperatury suszenia powodowało ponad 10-krotny wzrost ubytku tych związków. Podobnie jak przy suszeniu w wariancie 1 i 2 obserwowano niewielki wzrost stężenia terpenów w próbkach liści. Zaobserwowano, że zwiększenie temperatury suszenia o 10°C wpływa istotnie statystycznie (p<0,05) na zmniejszenie stężenia terpenów w suszonych konwekcyjnie były α-pinen (1,25-63,39 mg/kg), β-kariofilen (3,57-512,6 mg/kg) oraz α-humulen (1,71-128,9 mg/kg). Kwaśnica i wsp. [2020] potwierdza, że α-pinen jest jednym z dominujących terpenów w suszonym materiale konopnym. Chen i wsp. [2021] wykazali, że

suszenie gorącym powietrzem elementów rośliny Cannabis sativa L. prowadzi do zmniejszenia zawartości sumy terpenów, aż o 71,1%. Związki monoterpenowe, w tym α-pinen, β-pinen, myrcen, limonen oraz ocymen mają stosunkowo niską masę cząsteczkową wynikającą z ich budowy opartej o dwie jednostki izoprenowe. W konsekwencji są związkami lotnymi, przeciwnie do seskiterpenów, w tym β -kariofilenu, guaiolu oraz α -humulenu, które mają większą masę cząsteczkową i są mniej lotne (np. temperatura wrzenia przy ciśnieniu normalnym dla α-pinen wynosi ok. 155°C, a dla β-kariofilenu wynosi ok. 180°C. Porównując spodziewaną zawartość terpenów według założenia po suszeniu do zawartości ok. 10% wody z uzyskanymi wynikami, zaobserwowano, że dobrane metody suszenia w przypadku suszenia tradycyjnego oraz sublimacyjnego skutkowały uzyskaniem materiału zawierającego więcej terpenów. Analizy wykazały istotne różnice pomiędzy zawartością terpenów, a wielkością i rodzajem analizowanej próbki (kwiatostany małe, średnie, duże oraz liście). Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że dobór metody suszenia ma wpływ na końcową zawartość terpenów, a tym samym potwierdzono Hipotezę [H2] - Warunki suszenia wybranych elementów rośliny Cannabis sativa L. var. sativa wpływają na zawartość kannabinoidów oraz terpenów w trakcie i po zakończeniu suszenia.

4.3. Ocena wpływu suszenia elementów rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* wybranymi metodami na sumę oraz profil kannabinoidów

W Publikacji **[P1]** zebrano dane dotyczące stabilności kannabinoidów w matrycach żywnościowych podczas przechowywania w różnych warunkach (ogrzewanie, dostęp światła, czas przechowywania). Zebrane informacje sugerują, że produkty degradacji kannabinoidów mogą wykazywać niekorzystny wpływ na organizm człowieka, a kontrola zawartości tych związków w gotowym produkcie jest istotna dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Podsumowane dane zawarte w Publikacji **[P1]** pozwoliły na określenie perspektywicznych kierunków badań dotyczących kannabinoidów, które powinny być rozwinięte w przyszłości w celu kompleksowego poznania tego zagadnienia.

W ramach pracy dokonano oceny wpływu wybranych metod suszenia na stabilność kannabinoidów w elementach rośliny (kwiatostany różnej wielkości oraz liście). Próbki poddane były takim samym metodom suszenia jak próbki do analizy zawartości terpenów. Uzyskane wyniki zawartości kannabinoidów w świeżych i suszonych częściach rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* przedstawiono w Publikacji **[P3]** (Tabela 1). Wszystkie przedstawione wyniki zostały przeliczone na suchą masę analizowanego materiału roślinnego. W Tabeli S1 w Publikacji **[P3]** – materiały uzupełniające, przedstawiono także spodziewaną

zawartość kannabinoidów przy założonym ubytku wody do zawartości wody wynoszącej 10%, bez wpływu czynników zewnętrznych tj. temperatura, światło.



Rycina 3. Stężenie 17 kannabinoidów w poszczególnych częściach rośliny (kwiatostany małe – S, kwiatostany średnie – M, kwiatostany duże – B, liście – L) suszonych wybranymi metodami (1 - suszenie w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, 2 - liofilizacja, 3a - suszenie konwekcyjne w temp. 50°C, 3b, suszenie konwekcyjne w temp. 60°C oraz 3c – suszenie konwekcyjne w temp. 70°C (n=3).

A-C - wartości w obrębie tej samej litery w próbkach świeżych lub poddanych suszeniu wybraną metodą nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności wynoszącym α =0.01; a-e – wartości w obrębie tej samej litery dla jednego rodzaju próbki (np. liście) nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności wynoszącym α =0.01.

Porównanie sumy 17 kannabinoidów w świeżych kwiatostanach z próbkami kwiatostanów suszonych wybranymi metodami: suszenia tradycyjnego (1), liofilizacji (2) oraz suszenia konwekcyjnego (3a-c) wykazało istotne (α =0,01) różnice w wartości sumy analizowanych kannabinoidów w wybranych częściach rośliny. W przypadku próbek liści zaobserwowano istotnie (p<0,01) niższą zawartość kannabinoidów w próbkach suszonych wszystkimi metodami w porównaniu do zawartości w świeżym materiale. Świeży materiał charakteryzował się zawartością kannabinoidów ogółem na poziomie od 4,516 mg/g (liście) do 11,386 mg/g (średnie kwiatostany). W wyniku zastosowanych procesów suszenia kwiatostanów suma kannabinoidów mieściła się w zakresie od 5,147 mg/g do 22,209 mg/g), w zależności od zastosowanej metody suszenia i wielkości kwiatostanu. Najwyższe stężenie kannabinoidów osiągnięto podczas suszenia kwiatostanów o małych rozmiarach przy użyciu

tradycyjnego suszenia. W przypadku liści, zastosowanie suszenia konwekcyjnego (50°C oraz 70°C) skutkowało najwyższym stężeniem analizowanych kannabinoidów (3,062-3,418 mg/g). W porównaniu do świeżego materiału, zawartość kannabinoidów w liściach suszonych metodą liofilizacji spadła prawie 1,8-krotnie. Suszenie z wykorzystaniem metody tradycyjnego suszenia, spowodowało 2-krotny wzrost zawartości analizowanych kannabinoidów w kwiatostanach w stosunku do świeżego materiału. Zastosowanie metody liofilizacji oraz suszenia konwekcyjnego w temperaturze 50°C skutkowało uzyskaniem materiału o zbliżonej sumie kannabinoidów względem materiału świeżego. Podobnie, suszenie konwekcyjne w różnych temperaturach znacząco wpłyneło na profil kannabinoidów w suszonym materiale. Reasumując, zaobserwowano, że wyższa temperatura suszenia, powoduje wyższy stopień zmian w zawartości kannabinoidów. Suszenie liści z wykorzystaniem metody tradycyjnej, liofilizacji oraz suszenia konwekcyjnego (60°C) dało w efekcie materiał, który nie różnił się statystycznie istotnie (p<0,01) sumą kannabinoidów. Porównując uzyskane wartości kannabinoidów z wartościami teoretycznymi przy zawartości wody wynoszącej 10% zaobserwowano, że uzyskany materiał po suszeniu charakteryzował się większą zawartością poszczególnych związków w porównaniu do wartości teoretycznych. Zaobserwowane zmiany stężeń poszczególnych związków wywołane były m.in. ubytkiem wody, dekarboksylacją form kwasowych kannabinoidów lub utlenianiem [Das i wsp. 2024].

Opisane w dostępnej literaturze naukowej wyniki badań sugerują wzrost zawartości kannabinoidów podczas suszenia różnymi metodami. Esfandi i wsp. [2022], przeprowadzili suszenie próbek Cannabis sativa L. w temperaturach 45, 55 i 65°C oraz w temperaturze otoczenia ze światłem i bez światła. Autorzy wykazali, że zarówno suszenie w temperaturze pokojowej, jak i w różnych wariantach temperaturowych powoduje zmiany w stężeniu analizowanych kannabinoidów (CBD i Δ^9 -THC). Suszenie w wariancie temperaturowym 55°C miało najmniejszy wpływ na sumę tych związków (odnotowano jedynie 3-krotny wzrost), a w wariancie suszenia bez światła wzrost ten był 8-krotny. Metoda suszenia w temperaturze otoczenia z dostępem światła spowodowała 4-krotny wzrost sumy tych dwóch związków. Znaczący wzrost zawartości kannabinoidów podczas suszenia konwencjonalnego może wynikać z niezahamowanego działania enzymów, które biorą udział w konwersji kwaśnych form kannabinoidów do ich form obojętnych [Park i wsp. 2022]. Zastosowanie wariantu temperatury 55°C prawdopodobnie skutkuje zahamowaniem aktywności enzymów i skróceniem czasu suszenia, dzięki czemu zmiany są niższe pomimo zastosowania wyższej temperatury procesu suszenia. Wyniki uzyskane przez Esfandi i wsp. [2022] potwierdzają te uzyskane w ramach niniejszej pracy. Wyższa temperatura suszenia, powoduje większe zmiany w zawartości kannabinoidów w suszonym materiale. Podobnie, Uziel i wsp. (2024) porównali

wpływ temperatur suszenia mikrofalowego (40, 50, 60 i 80°C) kwiatostanów Cannabis sativa L. na stabilność wybranych kannabinoidów. W swojej pracy potwierdzili, że wraz ze wzrostem temperatury suszenia zawartość wybranych kannabinoidów wzrasta nawet 2-krotnie w stosunku do świeżego materiału w przeliczeniu na sucha masę. Wykazali również, że zastosowanie temperatury 50°C podczas suszenia mikrofalowego skutkuje uzyskaniem stężeń statystycznie takich samych jak te uzyskiwane w trakcie suszenia konwencjonalnego. Z dużym prawdopodobieństwem należy założyć, że obserwacja wzrostu całkowitego stężenia kannabinoidów wynika z degradacji kwaśnych kannabinoidów do ich neutralnych form lub form izomerycznych, a także jednoczesnego ubytku wody z materiału roślinnego. Proces degradacji kwaśnych kannabinoidów jest skomplikowany i zależy od wielu czynników, tj. temperatury, czasu oraz warunków środowiskowych (dostęp tlenu i światła). Wzrost stężenia analizowanych związków w wysuszonych próbkach może być również związany z transformacją głównych prekursorów biosyntezy kannabinoidów, tj. kwasu oliwetolowego i pirofosforanu geranylu [Kanabus i in., 2021, Uziel i wsp. 2024]. Brakuje jednak danych na temat wpływu wielkości suszonych kwiatostanów i liści Cannabis sativa L. var. sativa na profil i zawartość omawianych substancji.

Wpływ procesu suszenia na poszczególne kannabinoidy a także ich profil został przedstawiony na Rycinach 1-4, w Publikacji [P3]. Suszone metodą 1 małe (22,209 mg/g) i średnie (18,403 mg/g) kwiatostany miały najwyższe sumaryczne zawartości kannabinoidów, a wartości te były nawet dwukrotnie wyższe niż te określone w świeżym materiale. Największy wzrost stężenia po suszeniu metodą 1 zaobserwowano dla CBC, CBG, CBD oraz Δ^9 -THC. Dominującymi kwasowymi kannabinoidami w analizowanych świeżych próbkach były CBDA, CBCA i Δ9-THCA-A. Największy, nawet 100-krotny wzrost stężenia CBD zaobserwowano w przypadku małych i dużych kwiatostanów, gdzie końcowe stężenia tych związków wynosiły odpowiednio 5,996 i 5,348 mg/g w przeliczeniu na suchą masę kwiatostanu. Zawartość Δ^9 -THC podczas suszenia kwiatostanów w temperaturze pokojowej wzrosła 100-krotnie z 0,012-0,017 mg/g do 0,576-1,136 mg/g. Stężenie prekursora Δ^9 -THC, czyli Δ^9 -THCA-A w świeżych kwiatostanach wahało się od 0,420-0,840 mg/g i uległo obniżeniu po 10 dniach suszenia w temperaturze pokojowej (0,279-0,500 mg/g). Stężenie Δ^8 -THC podczas i po suszeniu nie zostało wykryte powyżej granicy oznaczalności w żadnej z analizowanych próbek. Po 10 dniach suszenia w temperaturze pokojowej całkowita zawartość Δ^9 -THC dla kwiatostanów wynosiła: małe 1,478 mg/g (0,15%), średnie 1,015 mg/g (0,10%) i duże 1,246 mg/g (0,13%), a dla liści 0,341 mg/g (0,03%). Wyniki pokazują, że suszenie przy użyciu opisanej metody nie niesie ze sobą ryzyka przekroczenia dopuszczalnej całkowitej zawartości Δ^9 -THC w suszonych kwiatostanach i liściach (0,3% suchej masy). CBL i CBN, które nie

występowały w świeżym materiale, zostały oznaczone w kwiatostanach suszonych w temperaturze pokojowej w stężeniach odpowiednio 0,550-0,846 mg/g i 0,022-0,033 mg/g, w przypadku liści wartości te były niższe i wynosiły 0,037 mg/g i 0,004 mg/g (LOQ dla CBN oraz CBL wynosiło 0,0014 mg/g). W przypadku liści zaobserwowano spadek zawartości CBGA (do poziomu 0,002 mg/g) podczas suszenia tą metodą w porównaniu do świeżego materiału (0,172 mg/g), przy wzroście stężenia CBG z 0,006 mg/g (świeży materiał) do 0,087 mg/g. W próbkach kwiatostanów zaobserwowano niewielki wzrost stężenia CBDA przy jednoczesnym wzroście stężenia CBD. Wzrost stężenia CBDA mógł być wywołany degradacją jego prekursora CBGA w wyniku działania np. enzymów, których działanie nie zostało zahamowane podczas procesu suszenia. Wyniki niniejszej pracy są zgodne z danymi Esfandi i wsp. [2022], którzy poddali części rośliny Cannabis sativa L. suszeniu w temperaturze otoczenia bez dostępu światła. Autorzy porównali zmiany zawartości CBD i Δ9-THC w świeżym i wysuszonym materiale przy użyciu opisanej metody. Wykazali oni kolejno ponad 7-krotny i 10-krotny wzrost zawartości tych związków po suszeniu. Das i wsp. [2024] poddali próbki konopi suszeniu w temperaturze 30°C. Autorzy zaobserwowali 30% wzrost zawartości Δ^9 -THC w badanych próbkach. Stężenie Δ^9 -THCA-A zmniejszyło się o 25% w stosunku do świeżego materiału. W naszej pracy jednak zastosowanie niższej wartości temperatury, tj. 20°C, spowodowało nawet trzykrotny wzrost zawartości tego związku prawdopodobnie w wyniku rozpadu jego prekursorów np. CBGA.

W wyniku suszenia metodą 2 - liofilizacja, uzyskano suszone kwiatostany małe i średnie, które charakteryzowały się wyższą zawartością sumy kannabinoidów (kolejno 13,461 i 15,362 mg/g) niż wartość określona w świeżym materiale. Spośród wszystkich kannabinoidów analizowanych w kwiatostanach o różnych rozmiarach, najwyższe stężenie odnotowano dla CBDA (5,450-8,490 mg/g), co stanowi około 10% mniej niż zawartość w świeżym materiale (6,122 - 9,047 mg/g). Stężenie CBD, gdy kwiatostany poddano suszeniu sublimacyjnemu, wzrosło z poziomu 0,045-0,066 mg/g do poziomu 1,149-3,890 mg/g (w zależności od wielkości próbki). Intensywne odparowanie wody mogło skutkować obniżeniem temperatury materiału, które mogło wpłynąć na profil kannabinoidów. Odwrotną obserwację odnotowano w przypadku próbek liści. Suszenie tą metodą spowodowało ponad 16-krotny spadek zawartości CBD z 1,680 mg/g do 0,105 mg/g. Zaobserwowane zmiany mogą wynikać z różnic w strukturze i budowie części roślin (wielkość blaszki liściowej, ilość nasion w kwiatostanach, wielkość kwiatostanów). W liściach kannabinoidy są bardziej narażone na działanie czynników fizykochemicznych w porównaniu do kwiatostanów, dlatego zawartość tych związków mogła wzrosnąć w kwiatostanach w wyniku dekarboksylacji ich prekursorów. Po liofilizacji zaobserwowano obecność CBN (0,005-0,017 mg/g) i CBL (0,011-0,311 mg/g),

które nie były wykryte w świeżym materiale roślinnym w stężeniach powyżej granicy oznaczalności (<LOQ). Wykryte poziomy CBN i CBL w suszonym materiale były prawdopodobnie spowodowane degradacją ich kwaśnych prekursorów (CBLA i CBCA), mimo że odnotowano 3-krotny wzrost stężenia tych związków. W liofilizowanych próbkach kwiatostanów i liści całkowita zawartość Δ^9 -THC nie przekroczyła dopuszczalnego poziomu 0,3% suchej masy rośliny. Całkowita zawartość Δ^9 -THC dla poszczególnych próbek kwiatostanów wynosiła: małe - 0,721 mg/g (0,07%), średnie 0,824 mg/g (0,08%), duże -0,575 mg/g (0,06%) i liście – 0,240 mg/g (0,02%). Kilka doniesień naukowych potwierdza, że rośliny suszone z wykorzystaniem liofilizacji charakteryzują się lepszym aromatem oraz większą ilością związków bioaktywnych (np. terpenów) w porównaniu z innymi metodami suszenia [Di Cesare i in., 2003, Thamkaew i wsp. 2021]. Dotychczas większość prac, w których wykorzystano suszenie sublimacyjne koncentrowała się na suszeniu ziół. Danych dotyczących wpływu procesu liofilizacji na części rośliny Cannabis sativa L. nadal brakuje. Jedno z pierwszych badań przeprowadzonych przez Addo i wsp. [2023] donosi, że proces liofilizacji zwiększył stężenie CBDA, CBGA i CBG w suszonych próbkach nawet 3-krotnie w porównaniu do świeżego materiału. Zawartość wymienionych kannabinoidów po suszeniu wahała się odpowiednio od 0,380-0,450 mg/g, 2,870-4,910 mg/g i 0,570-1,330 mg/g. W naszym badaniu stężenia omawianych kannabinoidów wahały się od 1,863-8,490 mg/g, 0,002-0,071 mg/g i 0,018-0,280 mg/g. W przypadku kwiatostanów zaobserwowano wzrost stężenia CBG we wszystkich analizowanych próbkach.

Trzecią metodą wykorzystaną w niniejszej pracy było suszenie konwekcyjne w trzech wariantach temperatury (3a – 50°C, 3b – 60°C, 3c – 70°C). Największy wzrost całkowitej zawartości kannabinoidów w stosunku do świeżego materiału (8,562-11,386 mg/g) nastąpił podczas suszenia kwiatostanów w temperaturze 50°C (9,245-12,183 mg/g). Dominującym kannabinoidem w suszonym materiale w każdym wariancie temperaturowym był CBDA (1,070-6,977 mg/g), którego stężenie zmniejszyło się nawet pięciokrotnie w porównaniu do świeżego materiału. Suszenie metodą 3a skutkowało kwiatostanami zawierającymi znacznie wyższą zawartość CBD niż w próbkach suszonych metodami 3b i 3c. Z drugiej strony, suszenie liści wszystkimi metodami (3a-3c) spowodowało spadek zawartości CBD prawie o połowę. Przypuszcza się, że CBD jest bardziej narażone na degradacje w próbkach liści niż w kwiatostanach. Susząc kwiatostany metodami 3a-3c zaobserwowano obecność CBL (0,019-0,083 mg/g) i CBN (0,002-0,017 mg/g), które nie były wykrywane w świeżym materiale. Natomiast w próbkach liści związki te były obecne tylko w próbkach suszonych metodą 3a (odpowiednio 0,020 mg/g i 0,003 mg/g). Różnice pomiędzy zawartością tych związków mogą wynikać ze struktury suszonych części, w przypadku liści, znacznie większej

powierzchni poddanej suszeniu (wielkość blaszki liściowej), a w przypadku kwiatostanów (ilość nasion w kwiatostanach oraz wielkość kwiatostanów). Wymienione przyczyny skutkują między innymi degradacją tych związków do ich pochodnych lub izomeryzację np. CBD do Δ^9 -THC. Gdy kwiatostany suszono metodami 3b i 3c, zaobserwowano spadek stężeń CBNA i CBN poniżej ich początkowego stężenia. Z kolei w próbkach kwiatostanów suszonych metodami 3a-3c nie obserwowano wzrostu stężenia CBNA oraz Δ⁹⁻THCVA. Stężenie CBGA w kwiatostanach, który jest prekursorem wszystkich analizowanych kannabinoidów, spadło po suszeniu wszystkimi zastosowanymi metodami. Najniższe stężenie odnotowano po suszeniu w temperaturze 70°C (0,002-0,006 mg/g). Zastosowany proces suszenia nie powodował tworzenia Δ^8 -THC w kwiatostanach, ani w liściach. Najwyższe stężenie kannabinoidów ogółem w próbkach liści odnotowano po suszeniu metodą 3a (3,418 mg/g) i było ono niższe niż w świeżym materiale. Dominującym kannabinoidem w liściach był CBDA, który odnotowano na poziomie 1,328 mg/g po suszeniu metodą 3c. W pozostałych wariantach końcowe stężenie tego związku w wysuszonym materiale było o około 10% niższe. Zastosowanie konwekcyjnego suszenia próbek w różnych wariantach temperaturowych również wpłyneło na poziomy Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A i całkowitego Δ^9 -THC. Najwyższe stężenia Δ^9 -THC odnotowano dla małych kwiatostanów (1,230 mg/g - metoda 3b) i liści (0,267 mg/g - metoda 3b i 3c). Zastosowanie metody 3c do suszenia kwiatostanów skutkowało uzyskaniem próbki o najniższym stężeniu Δ^9 -THCA-A (0,080-0,345 mg/g). Uzyskane wartości całkowitego Δ^9 -THC dla próbek suszonych metodą 3a mieszczą się w zakresie 0,400-0,769 mg/g. Dla metody 3b - 0,336-1,560 mg/g, a dla metody 3c -0.337-0.671 mg/g. Nie zaobserwowano przekroczenia dopuszczalnej zawartości tego związku w analizowanych próbkach suszonych niezależnie od metody (3a, 3b, 3c). Otrzymane wyniki potwierdzają, że końcowa zawartość danego związku lub sumy związków zależy nie tylko od temperatury suszenia, ale także od rodzaju i wielkości próbki poddanej temu procesowi. Dane literaturowe dotyczące wpływu procesu suszenia na zawartość/szybkość degradacji kannabinoidów ogólnie wskazują, że ich poziom zmienia się podczas suszenia. Jedno z pierwszych doniesień na temat suszenia części roślin zostało przedstawione przez Turnera i Mahlberga [1984], którzy suszyli próbki liści Cannabis sativa L. przez 24 godziny w temperaturze 37°C, temperaturze pokojowej (2 tygodnie) i 60°C (suszenie w piecu -12 godzin). Zarówno w próbkach suszonych w temperaturze 37°C, jak i 60°C zaobserwowano 2-krotnie wyższą ilość neutralnych kannabinoidów w porównaniu ze świeżym materiałem (w przeliczeniu na suchą masę), co wskazuje, że proces dekarboksylacji zachodzi już w temperaturze 37°C. Chen i wsp. [2021] wykorzystali suszenie gorącym powietrzem (40, 50, 60, 70, 90°C) oraz suszenie podczerwienią (40 i 60°C). Metody te zostały wykorzystane przez autorów do suszenia kwiatostanów roślin Cannabis sativa L. var. sativa. Autorzy stwierdzili, że zastosowanie suszenia podczerwienią spowodowało większą utratę kannabinoidów w porównaniu z suszeniem gorącym powietrzem, odpowiednio o średnio 16,2% i 72,3%. Uziel i wsp. [2024] porównali suszenie mikrofalowe konopi z suszeniem konwencjonalnym. Suszenie mikrofalowe przeprowadzono w 4 wariantach temperatury (40, 50, 60 i 80°C). Autorzy wykazali, że zastosowanie mikrofal w suszeniu konopi znacznie skraca czas suszenia (<4,5 godziny w zależności od zastosowanej temperatury) w porównaniu do suszenia tradycyjnego (10 dni). Potwierdzili również, że stosowanie wysokich temperatur suszenia konopi powoduje zmiany w składzie kannabinoidów obecnych w suszonym materiale. Jak potwierdzili Esfandi i wsp. [2022] wykazano, że temperatura (45, 55, 65°C), a także rodzaj metody suszenia (suszenie z lub bez światła, suszenie w piecu, suszenie próżniowe lub suszenie mikrofalowe) stosowane do suszenia próbek Cannabis sativa L., wpływa na wzrost stężenia wybranych kannabinoidów (CBD i Δ^9 -THC) w suszonym materiale roślinnym. Istnieją również dane wskazujące, że proces suszenia nie wpływa na zmiany zawartości kannabinoidów w suszonym materiale. W badaniu przedstawionym przez Kwaśnicę i wsp. [2023] porównano metodę konwekcyjna 50, 60 i 70°C, metodę próżniowo-mikrofalową oraz metodę łączoną stosowaną do suszenia liści Cannabis sativa L. Jest to pierwsza praca, która nie wykazała wpływu zastosowanej metody suszenia na zmiany w profilu analizowanych kannabinoidów. Uzyskane w pracy i cytowane wyniki innych badaczy potwierdzają potrzebę kontrolowania procesu suszenia Cannabis sativa L., aby wykluczyć potencjalne ryzyko przekroczenia dopuszczalnego poziomu Δ^9 -THC w suszonych materiałach. Stanowi to poważne zagrożenie pod względem zapewnienia bezpieczeństwa żywności, do produkcji której suszone rośliny mogłyby być wykorzystywane. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono Hipotezę [H2] mówiącą o tym, że dobór metody i warunków suszenia wpływa na profil kannabinoidów w materiale roślinnym z Cannabis sativa L. var. sativa.



Effect of Selected Drying Methods on the Cannabinoid Profile of *Cannabis sativa* L. var. *sativa* Inflorescences and Leaves

Joanna Kanabus* [®], Marcin Bryła [®], Marek Roszko [®]

Department of Food Safety and Chemical Analysis, Prof. Waclaw Dabrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology – State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland

The hemp industry uses traditional drying methods based on ambient temperature. However, these methods do not guarantee a high-quality dried product due to the possibility of mold growth. The present study aimed to evaluate the effect of the drying method for parts of the *Cannabis sativa* L. var. *sativa* plant (ambient temperature drying without light, freeze-drying, and convective drying at 50, 60, and 70°C) on the content of 17 cannabinoids. The leaves were separated, and the inflorescences were subdivided according to size. Analyses were performed using UHPLC-HESI-MS. Traditional drying of the inflorescences increased the total cannabinoid content to 17.608–22.209 mg/g DM relative to fresh material (8.562–11.386 mg/g DM). Increasing the drying temperature by 10°C significantly enhanced cannabinoid degradation in the dried inflorescences. The most significant increase in cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol content in the inflorescences was observed during traditional drying (up to 10 times). The greatest decrease in the content of the main acid precursors of cannabinoids, *i.e.*, cannabidiolic acid and Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A, was observed during convective drying (up to 3 times). The present study is one of the first to compare the effects of drying methods on the profile of cannabinoids in selected parts of the *Cannabis sativa* L. plant.

Keywords: cannabinoids, drying, hemp inflorescences, hemp leaves, UHPLC-HESI-MS

INTRODUCTION

Cannabis sativa L. var. sativa is one of the oldest cultivated plants in the world, while cannabinoids are one of the most essential bioactive substances of its plants [Kanabus *et al.*, 2021]. The most common cannabinoids include Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), and their acid forms [Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2014; Pellati *et al.*, 2018], and can be found in both the inflorescences and the leaves [Knezevic *et al.*, 2021], *i.e.*, the parts of the plant where epidermal outgrowths called glandular trichomes are formed, which serve for the biosynthesis and storage of these compounds [Xie *et al.*, 2023]. In contrast, they are found in trace amounts in the seeds [Kanabus *et al.*, 2021]. The interest in hemp seeds as food to date has been mainly due to their high contents of protein (>20 g/100 g) and essential amino acids, and their unique and ideally balanced fatty acid composition (25–35 g/100 g) [Farinon *et al.*, 2020]. A potential benefit from consuming both the inflorescences and leaves of the *C. sativa* plant is the delivery of the cannabinoids to the body. When supplied to the body in adequate doses, cannabinoids exhibit many positive actions to support its functioning. The most important effects are analgesic, sedative, anti-anxiety, and anticonvulsant ones [Baker *et al.*, 2003]. One of the more interesting suggestions for the possible use of the dried extracts from this plant is to apply it as an ingredient in herbal teas or to add it to cakes or dairy products [Das *et al.*, 2022; Kanabus *et al.*, 2021]. However, due to very high psychoactive activity of cannabinoids, it was necessary to regulate their content in food, including in particular their most active

*Corresponding Author: Tel.: +48 606-39-40; e-mail: joanna.kanabus@ibprs.pl (J. Kanabus) Submitted: 25 May 2024 Accepted: 5 November 2024 Published on-line: 2 December 2024



Copyright by Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences 2024 Author(s). This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

representative, *i.e.*, total Δ^9 -THC, the maximum content of which in the dry matter of the plant has been set below 0.3% according the European Union (EU) Commission Regulation No. 2023/915 [Regulation EU 2023/915].

The cannabinoid content depends not only on the part of the plant, but also on its chemotypes, development stage [Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Ubeed et al., 2022], growth conditions (temperature, fertilization, humidity) [Park et al., 2022], and post-harvest treatments such as drying [Das et al., 2022]. Bioactive compounds are usually degraded during processing at elevated temperatures. It is known that acidic cannabinoids are decarboxylated by heating (even at \geq 30°C) [Meija *et al.*, 2022; Wang et al., 2016] or by the action of enzymes (e.g., CBDA synthase) in the plant to produce CBDA from CBGA [Kanabus et al., 2021]. However, there is little information on changes in the cannabinoid profile under the influence of the drying process. Determining the thermal stability of cannabinoids is important for handling plants and selecting the method of drying or processing of C. sativa plant parts for food production [Meija et al., 2022]. Fresh fiber hemp is usually harvested at a high initial moisture content (MC) (usually 80 g/100 g) and should be dried to a safe MC value (10 g/100 g) to prevent the development of harmful microflora [Kwaśnica et al., 2020]. The most common drying method is drying on hangers or trays. This process takes place at 15-20°C and lasts between 3 and 10 days. The structure of the hemp plant restricts airflow near the inflorescences, which can result in mold growth.

The drying of agricultural products is a complex process that involves heat and mass exchange phenomena, and can cause physical, chemical, and biochemical modifications [Addo et al., 2023; Kwaśnica et al., 2020]. Both traditional drying (with or without light at ambient temperature) and hot air-drying are widely used for various plant materials. The heat and moisture exchange rate during the hot air-drying is significantly better than natural air-drying due to forced air convection [Chen et al., 2021]. Convective drying at 40–60°C usually does not adversely affect the quality of the dried material. Still, the long drying time of this process does not guarantee the high quality of the dried plant material [Esfandi et al., 2024]. Freeze-drying is one of the latest methods used to dry plant material. It involves dehydration by sublimation and surface desorption of the frozen product. Freeze-dried products retain nutrients, bioactivity, and color compared to traditionally-dried products [Addo et al., 2023; Kiani et al., 2018]. By operating at low temperatures, freeze-drying potentially reduces the loss of bioactive compounds, thereby ensuring a higher-quality of the dried products [Challa et al., 2021].

The objective of the present study was to compare the profiles of cannabinoids of *C. sativa* var. *sativa* dried using different methods, including freeze-drying; drying at 20°C for 10 days; and convective drying at 50, 60, and 70°C to obtain MC of 10±1 g/100 g.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

The certified reference materials (CRMs) including cannabidiol (CBD), cannabidiolic acid (CBDA), cannabigerol (CBG),

cannabichromene (CBC), cannabinol (CBN), cannabinolic acid (CBNA), cannabidivarinic acid (CBDVA), cannabicyclol (CBL), and cannabicyclic acid (CBLA) were purchased as solutions at the concentration of 1.0 mg/mL in methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN) from Restek GmbH (Bad Homburg, Germany). Cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromenic acid (CBCA), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahydrocannabinol $(\Delta^8$ -THC), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A), Δ^9 -tetrahydrocannabivarinic acid (Δ^9 -THCVA), and cannabidivarin (CBDV) were provided by LGC Standards (Teddington, UK). The solution of Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV) in MeOH (1.0 mg/mL) was obtained from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). The CRMs had a certified purity value of >98.00%. Quality control material (QCM) HEMP-1 in ground hemp form (National Research Council Canada) was used for validation. Solvents of purity for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of water, ACN, and MeOH were purchased from Witko (Łódź, Poland), whereas HCOOH and HCO₂NH₄ (LC-MS grade) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Plant material

The *Cannabis sativa* L. var. *sativa* 'Białobrzeskie' plants were selected for analysis. This variety has a documented history of human consumption and has been used for years for CBD extraction. Plants were obtained from the Institute of Natural Fibres and Herbaceous Plants in Poznań, located in Pętkowo, Poland (52°12'32"N 17°15'17"E). They were harvested at the peak of flowering, specifically between twenty days after the start of flowering and ten days after the end of flowering [Regulation EU 2017/1155]. After harvesting, the plants were divided according to the size of the inflorescences (small (<10 cm), medium (10–20 cm), and large (>20 cm)). Then, the inflorescences (S, M and B groups, respectively) and leaves (L) were collected, and the remaining plant parts (roots and stems) were removed. The samples were then frozen and stored at –60°C.

Drying methods

The drying conditions were chosen based on the usual conditions for this plant material type and the literature [Kwaśnica et al., 2020; Thamkaew et al., 2021]. Each time, the drying process was carried out to achieve MC of approximately 10±1 g/100 g. The drying of the samples was carried out in triplicate, and the sample weight was 50±0.2 g each time. The traditional drying of fresh plant material was carried out on thin blotting paper in a ventilated room without light, with low air humidity (52±2%) [Das et al., 2022]. The ambient temperature in the room was 20±2°C. The moisture content of the samples was checked every 24 h during 10 days. The freeze-drying of frozen samples (-60°C) was performed at 25°C for 24 h in the Alpha 1-4 LSC plus lyophilizer unit (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany). A KBC G-100/250 laboratory dryer (Warsaw, Poland) with natural air circulation was used to carry out convective drying at 50, 60, and 70°C, and the temperature was checked each time for uniform process conditions. Sample weights were recorded every 1 h for the first 12 h. After obtaining MC of 10 g/100 g, all dried samples were ground into a fine powder using a Grindomix GM200 grinder (Retsch, Haan, Germany) and stored until analyzed.

Preparation of extracts

Samples of both fresh and dried hemp material (0.1 g) were extracted using MeOH (fresh material – 5 mL, dried material – 2×10 mL) at $25\pm1^{\circ}$ C for 2 min. Mixtures of solids in solvent were homogenized (2 min, 5000 rpm) using a Unidrive X 1000 homogenizer (CAT Scientific Inc., Paso Robles, CA, USA) and then centrifuged (2 min; 10,000×g) using an MPW-380R centrifuge (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland). Sample preparation procedure was described in detail in our previous publication [Kanabus *et al.*, 2023]. The extracts were filtered through a 0.22 µm (13 mm filter diameter) syringe filter (LLG Labware, Meckenheim, Germany) and directly subjected to cannabinoid analysis.

Determination of cannabinoids

Identification and quantification of the cannabinoids were performed using an ultra-high-performance liquid chromatography-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry setup operating with a heated electrospray interface (UHPLC-HESI-MS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Chromatographic separation was performed using a 2.1×100 mm, C18 Cortecs, 1.6 µm column (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase used in the isocratic mode (0.3 mL/min, 10 min) was a mixture of ACN and an aqueous 0.02% HCOOH and 5 mM HCO₂NH₄ solution (75:25, v/v). Chromatographic and spectral data and spectrometer operation parameters were described in detail in our previous work [Kanabus *et al.*, 2023].

Standard solutions of all 17 cannabinoids with the concentration of 100 μ g/mL were prepared by dissolving 1.0 mL of the compound reference standard in ACN or MeOH using 10-mL volumetric flasks separately. This step was repeated as it was necessary to prepare higher dilutions for most compounds except CBD and CBDA. All solutions were stored at -80° C. Calibration curves in the relevant ranges for the compound were generated using Thermo TraceFinderTM software, version 5.1 (Thermo Fisher Scientific, Pleasanton, CA, USA).

Validation of the method was described in detail in our previous publication [Kanabus *et al.*, 2023]. To confirm and maintain the method's validity, a Certified Reference Material (HEMP-1) analysis was performed for each series of cannabinoid analyses (unpublished data). The recoveries achieved were within the 80–120% target range and fulfilled the guidelines included in ICH 2005 and AOAC 2002 [Kanabus *et al.*, 2023].

The cannabinoid content was determined using a WPS 30S balance dryer (Radwag, Radom, Poland), and respective results were expressed on a dry matter basis (mg/g DM). In addition, total Δ^{9} -THC content was calculated Δ^{9} -THC and Δ^{9} -THCA-A following Equation (1) [Regulation EU 2023/915]:

Total
$$\Delta^9$$
-THC = Δ^9 -THC + (0.877 × Δ^9 -THCA-A) (1)

Statistical analysis

Data were analyzed statistically using Statistica 13 software (Statsoft, Carlsbad, CA, USA). A one-way analysis of variance (one-way ANOVA) was used to determine significant differences (p<0.01) between the mean contents of individual cannabinoids and their sum in the fresh plant material and dried using different methods. The homogeneity of the groups was determined using the Tukey's honestly significant difference (HSD) test.

RESULTS AND DISCUSSION

This study discusses the effect of selected drying methods on the stability of 17 cannabinoids (listed in M&M - Chemicals and reagents) found in the *Cannabis sativa* L. var. *sativa* 'Białobrzeskie' plant. The chromatographic and spectral data used to identify these compounds were presented in our previous study [Kanabus *et al.*, 2023]. The conditions of the drying methods and the time required to obtain the MC of the samples at the level of 10 g/100 g are presented in the Supplementary Materials (**Table S1**). The contents of individual cannabinoids and their sums in fresh inflorescences and leaves, and after their drying by the chosen methods are presented in **Table 1** and **Figures 1–4**. The paper also presents results of determinations of the total Δ^9 -THC content, which was designed to represent the sum of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A equivalents in a given product [Regulation EU 2023/915].

Effect of drying method on total cannabinoid content

The total cannabinoid content determined in the fresh material ranged from 4.516 mg/g DM (leaves) to 11.386 mg/g DM (medium inflorescences) (Table 1). Freeze-drying and convective drying at low temperature (50°C) allowed the preservation of the total content of cannabinoids except for the medium-sized inflorescences. In contrast, inflorescences dried at 60 and 70°C contained less (p<0.01) total cannabinoids than the fresh material. In general, the higher the drying temperature was, the lower was the content of the total cannabinoids in inflorescences. For leaves, a significantly (p<0.01) lower total cannabinoid content was determined in the samples dried *Via* all methods compared to that in the fresh material. Among dried leaves, those obtained by convective drying (50°C and 70°C) had the highest content of total cannabinoids (3.062-3.418 mg/g DM). Compared to the fresh material, the cannabinoid content of leaves dried by traditional drying and freeze-drying decreased around 1.8-fold. The differences in the total cannabinoid content of materials obtained by different methods may result from the different thermal stability of individual cannabinoids and from possible conversions between them, primarily non-enzymatic decarboxylation of acidic cannabinoids to their neutral forms and isomeric forms occurring under the influence of heating and aging [García-Valverde et al., 2022; Grafström et al., 2016; Meija et al., 2022; Wang et al., 2016]. The effects of each drying method used in our study on individual cannabinoid contents were described below in separate subsections concerning drying at ambient temperature, freeze-drying, and convective drying.

Table 1. Cannabinoid content (mg/g dry matter) of fresh Cannabis sativa L. var. sativa small (S), medium (M) and large (B) inflorescences and leaves (L) and after their drying by selected methods.

Cannabinoid	Part of plant	Fresh material	Traditional drying	Freeze-drying	Convective drying			
Cannabinoiu	Part of plant				50°C	60°C	70°C	
СВС	S	0.168±0.010 ^{fA}	1.444±0.150 ^{aA}	0.565±0.020 ^{bA}	0.431±0.030 ^{dB}	0.538±0.038 ^{bcA}	0.208±0.010 ^{eC}	
	М	0.125±0.006 ^{fB}	1.154±0.048 ^{aB}	0.471±0.022 ^{cB}	0.850±0.059 ^{bA}	0.424±0.029 ^{dC}	0.301±0.048 ^{eAB}	
	В	0.104±0.013 ^{fC}	1.470±0.039 ^{aA}	0.291±0.001 ^{eC}	0.422±0.030 ^{cC}	0.535±0.010 ^{bB}	0.366±0.054 ^{dA}	
	L	0.003±0.001 ^{eD}	0.066±0.003 ^{cC}	0.020±0.005 ^{dD}	0.141±0.003 ^{bD}	0.167±0.012 ^{aD}	0.175±0.004 ^{aD}	
	S	0.001±0.001 ^{eA}	0.125±0.014 ^{aB}	0.020±0.001 ^{dA}	0.068±0.005 ^{bA}	0.041±0.003 ^{cA}	0.063±0.004 ^{bA}	
	М	0.001±0.001 ^{eA}	0.150±0.009ªA	0.018±0.008 ^{dA}	0.052±0.004 ^{bB}	0.027±0.002 ^{cB}	0.029±0.004 ^{cB}	
CDDV	В	0.001±0.001 ^{eA}	0.125±0.011 ^{aB}	0.009±0.002 ^{cdB}	0.009±0.006 ^{cdD}	0.023±0.002 ^{bC}	0.007±0.002 ^{dC}	
	L	0.001±0.001 ^{fA}	0.008±0.002 ^{dC}	0.003±0.001 ^{eC}	0.015±0.002 ^{cC}	0.022±0.002 ^{abC}	0.029±0.007 ^{aB}	
	S	0.025±0.007 ^{eB}	1.040±0.026 ^{aA}	0.280±0.015 ^{bA}	0.107±0.008 ^{dA}	0.195±0.014 ^{cA}	0.201±0.023 ^{cA}	
CDC	М	0.040±0.001 ^{eA}	0.627±0.045 ^{aC}	0.193±0.022 ^{bB}	0.080±0.006 ^{cB}	0.193±0.011 ^{bA}	0.053±0.008 ^{dC}	
CDG	В	0.043±0.004 ^{eA}	0.970±0.023 ^{aB}	0.203±0.005 ^{bB}	0.085±0.006 ^{dB}	0.126±0.017 ^{cB}	0.134±0.006 ^{cB}	
	L	0.006±0.003 ^{cC}	0.087±0.003 ^{aD}	0.018±0.003 ^{bC}	0.026±0.008 ^{bC}	0.083±0.004 ^{aC}	0.019±0.009 ^{bD}	
	S	< LOD ^{dA}	0.550±0.015 ^{aC}	0.311±0.030 ^{bA}	0.023±0.002 ^{cA}	0.022±0.001 ^{cAB}	0.022±0.001 ^{cA}	
CBL	М	< LOD ^{eA}	0.687±0.011 ^{aB}	0.261±0.040 ^{bAB}	0.025±0.002 ^{cA}	0.026±0.003 ^{cA}	0.021±0.002 ^{dA}	
	В	< LOD ^{cA}	0.846±0.015 ^{aA}	0.166±0.020 ^{bC}	0.019±0.001 ^{bB}	0.021±0.002 ^{bAB}	0.020±0.002 ^{bA}	
	L	< LOD ^{dA}	0.037±0.004 ^{aD}	0.011±0.001 ^{cD}	0.020±0.003 ^{bB}	< LOD ^{dC}	$< LOD^{dB}$	
	S	< LOD ^{eA}	0.033±0.001ªA	0.017±0.002 ^{bA}	0.003±0.001 ^{dA}	0.014±0.001 ^{cB}	0.014±0.001 ^{cA}	
CDN	М	< LOD ^{eA}	0.022±0.002 ^{aB}	0.013±0.001 ^{cB}	0.002±0.001 ^{dAB}	0.017±0.001 ^{bA}	0.013±0.001 ^{cA}	
CRIV	В	< LOD ^{dA}	0.030±0.001 ^{aA}	0.014±0.003 ^{bAB}	0.002±0.001 ^{cAB}	0.013±0.003 ^{bB}	0.012±0.001 ^{bAB}	
	L	< LOD ^{cA}	0.004±0.001 ^{aC}	0.005±0.002 ^{aC}	0.003±0.001 ^{bA}	< LOD ^{cC}	< LOD ^{cC}	
	S	0.002±0.001 ^{aAB}	0.002±0.001 ^{aB}	0.001±0.001 ^{aB}	0.003±0.001 ^{aB}	0.001±0.001 ^{aA}	0.001±0.001 ^{aA}	
CDNIA	М	0.003±0.001 ^{bA}	0.018±0.001ªA	0.001±0.001 ^{cB}	0.003±0.001 ^{bB}	0.001±0.001 ^{cA}	0.001±0.001 ^{cA}	
CRINA	В	0.002±0.001 ^{abAB}	0.002±0.002 ^{abB}	0.001±0.001 ^{bB}	0.004±0.001 ^{aAB}	0.002±0.001 ^{abA}	0.001±0.001 ^{bA}	
	L	0.004±0.002 ^{abA}	0.001±0.001 ^{bcB}	0.008±0.001 ^{aA}	0.006±0.002 ^{aA}	0.002±0.001 ^{bA}	0.001±0.001 ^{bcA}	
	S	0.012±0.001 ^{cB}	1.136±0.170 ^{aA}	0.405±0.035 ^{bA}	0.398±0.027 ^{bA}	1.046±0.073 ^{aAB}	0.440±0.016 ^{bA}	
	М	0.017±0.001 ^{fA}	0.576±0.021 ^{bC}	0.350±0.004 ^{cB}	0.287±0.020 ^{dB}	1.230±0.031 ^{aA}	0.200±0.007 ^{eD}	
Δ ² -THC	В	0.015±0.001 ^{dA}	1.071±0.025 ^{aAB}	0.179±0.003 ^{cC}	0.219±0.015 ^{bC}	1.153±0.080ªA	0.232±0.006 ^{bC}	
	L	0.005±0.001 ^{eC}	0.148±0.075 ^{bcD}	0.038±0.002 ^{dD}	0.189±0.004 ^{bD}	0.267±0.021 ^{aC}	0.267±0.004 ^{aB}	
	S	0.001±0.001 ^{dB}	0.020±0.002 ^{aA}	0.006±0.001 ^{cA}	0.013±0.001 ^{bA}	0.014±0.002 ^{bA}	0.018±0.003 ^{aA}	
Δº-THCV	М	0.001±0.001 ^{cB}	0.007±0.001 ^{bB}	0.004±0.002 ^{bA}	0.011±0.002 ^{aA}	0.012±0.001ªA	0.006±0.001 ^{bB}	
	В	0.001±0.001 ^{cB}	0.018±0.003 ^{aA}	0.002±0.001 ^{cB}	0.002±0.002 ^{cB}	0.006±0.001 ^{bB}	0.001±0.001 ^{cC}	
	L	0.006±0.003 ^{aA}	0.002±0.002 ^{abC}	0.001±0.001 ^{bB}	0.004±0.002 ^{aB}	0.005±0.001 ^{aB}	0.006±0.001 ^{aB}	
	S	0.721±0.079 ^{abA}	0.575±0.059 ^{cA}	0.806±0.033 ^{aA}	0.472±0.033 ^{dB}	0.733±0.057 ^{abA}	0.416±0.033 ^{dB}	
	М	0.665±0.071 ^{bAB}	0.510±0.087 ^{cAB}	0.521±0.042 ^{cB}	0.587±0.041 ^{bcA}	0.429±0.050 ^{dB}	0.925±0.040 ^{aA}	
CRDAA	В	0.385±0.038 ^{cC}	0.511±0.036 ^{aB}	0.198±0.014 ^{eC}	0.280±0.054 ^{dC}	0.440±0.030 ^{bB}	0.250±0.017 ^{dC}	
	L	0.092±0.014 ^{aD}	0.046±0.009 ^{cC}	0.017±0.002 ^{dD}	0.082±0.008abD	0.020±0.003 ^{dC}	0.021±0.002 ^{dD}	
	S	0.061±0.003 ^{fB}	5.996±0.136ªA	1.575±0.080 ^{eB}	3.450±0.458 ^{bA}	1.947± 0.137 ^{dA}	2.977±0.159 ^{bcA}	
CBD	М	0.066±0.007 ^{fB}	4.443±0.161 ^{aC}	3.890±0.186 ^{bA}	2.450±0.171 ^{cB}	1.849±0.170 ^{dA}	0.864±0.021 ^{eC}	

Table 1 cont. Cannabinoid content (mg/g dry matter) of fresh Cannabis sativa L. var. sativa small (S), medium (M) and large (B) inflorescences and leaves (L) and after their drying by selected methods.

Cannabinoid	Part of plant	Fresh material	Traditional drying	Freeze-drying	Convective drying			
Cannabinolu					50°C	60°C	70°C	
CBD	В	0.045±0.002 ^{cC}	5.348±0.192 ^{aB}	1.149±0.131 ^{bC}	1.640±0.111 ^{bC}	1.007±0.102 ^{bB}	1.058±0.134 ^{bB}	
	L	1.680±0.230 ^{aA}	0.483±0.015 ^{dD}	0.105±0.013 ^{eD}	1.280±0.125 ^{bD}	0.848±0.094 ^{cC}	1.020±0.133 ^{bB}	
	S	0.152±0.016 ^{aB}	0.027±0.002 ^{cB}	0.053±0.013 ^{bB}	0.020±0.001 ^{dA}	0.008±0.002 ^{eB}	0.005±0.001 ^{eA}	
CRGA	М	0.190±0.026 ^{aA}	0.058±0.004 ^{bA}	0.058±0.003 ^{bB}	0.017±0.002 ^{cB}	0.014±0.005 ^{cA}	0.006±0.002 ^{dA}	
CDUA	В	0.151±0.013 ^{aB}	0.020±0.006 ^{cB}	0.071±0.001 ^{bA}	0.016±0.002 ^{cB}	0.006±0.004 ^{dB}	0.002±0.001 ^{eC}	
	L	0.172±0.012 ^{aA}	0.002±0.001 ^{bC}	0.002±0.001 ^{bC}	0.002±0.001 ^{bC}	0.004±0.002 ^{bBC}	0.004±0.001 ^{bB}	
	S	0.048±0.007 ^{aA}	0.011±0.002 ^{dB}	0.011±0.001 ^{dA}	0.008±0.001 ^{eA}	0.020±0.002 ^{bA}	0.015±0.002 ^{cA}	
A9 THCV/A	М	0.027±0.010 ^{aB}	0.018±0.002 ^{bA}	0.006±0.002 ^{dB}	0.008±0.001 ^{dA}	0.012±0.001 ^{cB}	0.013±0.002 ^{cA}	
Δ-IIICVA	В	0.025±0.003 ^{aB}	0.010±0.002 ^{bB}	0.004±0.001 ^{dB}	0.008±0.001 ^{bcA}	0.002±0.001 ^{eD}	0.001±0.001 ^{eC}	
	L	0.006±0.001 ^{aC}	0.001±0.001 ^{cC}	0.002±0.001 ^{cC}	0.002±0.001 ^{cB}	0.005±0.001 ^{abC}	0.006±0.001 ^{aB}	
CBLA	S	0.018±0.003 ^{aB}	0.015±0.001 ^{aB}	0.004±0.002 ^{bB}	0.017±0.002 ^{aB}	0.004±0.001 ^{bC}	0.003±0.001 ^{bC}	
	М	0.018±0.002 ^{aB}	0.017 ± 0.002^{aB}	0.006±0.002 ^{cB}	0.011±0.001 ^{bC}	0.002±0.001 ^{dC}	0.002±0.001 ^{dC}	
	В	0.015±0.002 ^{aBC}	0.011±0.003 ^{bC}	0.004±0.001 ^{dB}	0.017±0.001 ^{aB}	0.013±0.001 ^{abB}	0.009±0.001 ^{cB}	
	L	0.032±0.005 ^{aA}	0.025±0.002 ^{bA}	0.036±0.004 ^{aA}	0.037±0.004 ^{aA}	0.033±0.002ªA	0.032±0.008 ^{aA}	
	S	1.371±0.087 ^{aA}	1.113±0.129 ^{bA}	0.736±0.081 ^{cA}	0.486±0.034 ^{dB}	0.388±0.027 ^{eA}	0.355±0.023 ^{eB}	
CRCA	М	0.592±0.028 ^{aC}	0.480±0.036 ^{cC}	0.540±0.019 ^{abB}	0.414±0.038 ^{dC}	0.256±0.018 ^{fB}	0.370±0.012 ^{eB}	
CDCA	В	0.818±0.075 ^{aB}	0.660±0.024 ^{bB}	0.428±0.022 ^{cC}	0.638±0.037 ^{bA}	0.401±0.028 ^{cA}	0.416±0.036 ^{cA}	
	L	0.276±0.017 ^{aD}	0.279±0.025 ^{aD}	0.228±0.035 ^{bD}	0.172±0.023 ^{cD}	0.079±0.012 ^{dC}	0.079±0.004 ^{dC}	
	S	0.420±0.017 ^{aC}	0.390±0.011 ^{bB}	0.360±0.016 ^{cC}	0.275±0.025 ^{dC}	0.289±0.027 ^{dB}	0.264±0.021 ^{dB}	
	М	0.600±0.023 ^{aB}	0.500±0.064 ^{bcA}	0.541±0.032 ^{bA}	0.550±0.029 ^{bA}	0.478±0.017 ^{cA}	0.281±0.018 ^{dB}	
ΔΙΠርΑ-Α	В	0.840±0.077ªA	0.279±0.013 ^{dC}	0.451±0.080 ^{bAB}	0.440±0.051 ^{bB}	0.464±0.028 ^{bA}	0.345±0.069 ^{cA}	
	L	0.240±0.017 ^{aD}	0.220±0.024 ^{aC}	0.230±0.025 ^{aD}	0.241±0.013 ^{aC}	0.079±0.013 ^{bC}	0.080±0.015 ^{bC}	
	S	8.146±0.305 ^{bB}	9.750±0.758ªA	8.420±0.514 ^{bA}	6.427±0.450 ^{cA}	2.785±0.195 ^{dA}	2.092±0.108 ^{eB}	
CBDA	М	9.047±0.347ª ^A	9.140±0.284ª ^A	8.490±0.448 ^{abA}	6.977±0.551 ^{cA}	2.512±0.176 ^{dA}	2.063±0.116 ^{dB}	
	В	6.122±0.863 ^{aC}	6.427±0.223 ^{aB}	5.450±0.227 ^{bB}	5.446±0.381 ^{bB}	1.547±0.104 ^{dB}	3.220±0.144 ^{cA}	
	L	1.992±0.285 ^{aD}	1.060±0.121 ^{cC}	1.863±0.281 ^{aC}	1.199±0.192 ^{bcC}	1.070±0.073 ^{cC}	1.328±0.071 ^{bC}	
	S	11.127±0.778 ^{bcA}	22.209±1.554ª ^A	13.461±0.942 ^{bB}	12.183±0.852 ^{bA}	8.043±0.563 ^{dA}	7.163±0.501 ^{dA}	
Total	М	11.386±0.796 ^{cA}	18.403±1.288 ^{aB}	15.362±1.075 ^{bA}	12.124±0.848 ^{cA}	7.478±0.523 ^{dA}	5.147±0.360 ^{eC}	
cannabinoids	В	8.562±0.599 ^{bB}	17.608±1.232 ^{aB}	8.619±0.603 ^{bC}	9.245±0.647 ^{bB}	5.564±0.389 ^{cB}	6.077±0.425 ^{cB}	
	L	4.516±0.316 ^{aC}	2.472±0.173 ^{cC}	2.587±0.181 ^{cD}	3.418±0.239 ^{bC}	2.687±0.188 ^{cC}	3.062±0.214 ^{bD}	

Results are shown as mean \pm standard deviation (*n*=3). Values in the rows marked with different letters (a–f) differ significantly (ρ <0.01). Values in the columns (separately for each compound) marked with different letters (A–D) differ significantly (ρ <0.01). LOD, limit of detection. The full names of the compounds are listed in the "Chemicals and reagents" subsection.

Effect of traditional drying on cannabinoid profile

The total content of cannabinoids in the inflorescences decreased slightly during the initial period of the process, reaching a minimum value after 2 (small and large inflorescences) or 4 (medium inflorescences) days of drying, and then began to increase successively until the 10th day (**Figure 1**). In the case of leaves, the decrease in the total content lasted longer, until the 5th day of drying, and was definitely greater (more than 2-fold), whereas the further increase was less spectacular than in the case of inflorescences (**Figure 2**). The highest increase, up to 100-fold, in the content after traditional drying was determined for CBC, CBG, CBD, and Δ^9 -THC (**Table 1**). The content of CBD increased the most and the final content of this compound in inflorescences ranged from 4.443 to 5.348 mg/g DM.



Figure 1. Changes in the cannabinoid profile during traditional drying (20°C, 10 days, without access to light) of *Cannabis sativa* L. var. *sativa* small (S), medium (M) and large (B) inflorescences.

Values marked with different letters (a–f for S, A–F for M, α – ζ for B inflorescences) differ significantly (ρ <0.01). The full names of the compounds are listed in the "Chemicals and reagents" subsection.



Figure 2. Changes in the cannabinoid profile during traditional drying (20°C, 10 days, without access to light) of *Cannabis sativa* L. var. *sativa* leaves. Values marked with different letters (a–i) differ significantly (p<0.01). The full names of the compounds are listed in the "Chemicals and reagents" subsection.

The Δ^9 -THC content during drying of the inflorescences at 20°C increased from 0.012–0.017 mg/g DM to 0.576–1.136 mg/g DM. The main acidic cannabinoids in the fresh samples were CBDA, CBCA, CBDVA, and Δ^9 -THCA-A. The content of the Δ^9 -THC precursor, Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A), in fresh inflorescences ranged from 0.420–0.840 mg/g DM and decreased

after 10 days of drying at ambient temperature (0.279–0-500 mg/g DM). A decrease was also recorded in the contents of CBCA and CBDVA in inflorescences as well as CBDVA and CBDA in leaves. Our study results were in line with those of Esfandi *et al.* [2024], who dried parts of the *C. sativa* L. plant at ambient temperature without light. These authors compared changes in CBD

and Δ^9 -THC contents in fresh and dried material and showed successively more than 7-fold and 10-fold increases in the content of these compounds after drying. A higher Δ^9 -THC content in traditionally dried inflorescences compared to the fresh material was also reported by Uziel *et al.* [2024]. In turn, Das *et al.* [2024] dried hemp samples at 30°C and observed a 0.30-fold increase in Δ^9 -THC content. The content of Δ^9 -THCA-A decreased 0.25-fold relative to fresh material. Similar results were obtained in the present study, and a decrease in the content of this compound was observed as well.

In the case of *C. sativa* inflorescences and leaves, a decrease in CBGA content was observed compared to the fresh material, with a simultaneous increase in CBG content (**Table 1**). Moreover, an increase in CBDA content and a simultaneous increase in CBD content were noted in small and large inflorescences. Based on these observations, it can be assumed that CBGA was converted at 20°C by enzymes, such as cannabidiolic acid synthase, allowing the formation of CBDA and then both compounds underwent non-enzymatic decarboxylation to the neutral forms CBG and CBD. The enzymatic inter-conversion of CBGA to CBDA is well established in the biosynthesis pathway of cannabinoids during plant growth [Kim *et al.*, 2022; Taura *et al.*, 2007]. In turn, Meija *et al.* [2022] reported that decarboxylation of CBDA to CBD was likely to occur even during storage of dried inflorescences at ambient temperature.

CBL and CBN, which were absent in the fresh material (<limit of detection, LOD), were determined in the inflorescences dried at ambient temperature in the range of 0.550–0.846 mg/g DM and 0.022–0.033 mg/g DM, respectively; for the leaves, the values were lower at 0.037 mg/g DM and 0.004 mg/g DM (**Table 1**). The Δ^{8} -THC was not determined in any of the samples analyzed.

After 10 days of drying at 20°C without light, the total Δ^9 -THC content was 1.478, 1.015, and 1.246 mg/g DM in the small, medium and large inflorescences, respectively, and 0.341 mg/g DM in the leaves, indicating that this drying method poses no risk of exceeding the total Δ^9 -THC content in the dried matter of plants according to the Commission Regulation (EU), which is 0.3% [Regulation EU 2023/915].

Effect of freeze-drying on cannabinoid profile

After freeze-drying of different-sized inflorescences and leaves of *C. sativa*, no Δ^8 -THC was detected in any sample. Of all the cannabinoids identified in inflorescences of different sizes, the highest content was found for CBDA (5.450–8.490 mg/g DM), which was approximately 0.1 times lower than its content in the fresh material (6.122–9.047 mg/g DM) (**Table 1**). When the inflorescences were subjected to freeze-drying, the content of CBD increased from 0.045–0.066 mg/g DM to 1.149–3.890 mg/g DM (depending on the size of inflorescences). The opposite observation was noted for the leaf samples. Drying by this method resulted in a more than 16-fold decrease in CBD content, *i.e.*, from 1.680 to 0.105 mg/g DM. Both CBN and CBL, which were not detected in the fresh plant material (<LOD), were found in the freeze-dried material (at 0.005–0.017 mg/g and 0.011–0.311 mg/g, respectively), probably due to the decarboxylation

of their acidic precursors (CBNA and CBLA, respectively). In freezedried inflorescence and leaf samples, the total Δ^9 -THC content did not exceed the target level of 0.3% of plant dry matter, but its values were relatively high: 0.721 mg/g DM (small inflorescence), 0.824 mg/g DM (medium inflorescence), 0.575 mg/g DM (large inflorescence), and 0.240 mg/g DM (leaves).

Several literature reports suggest that freeze-drying retains more aromatic and bioactive compounds in dried plants than other drying methods especially those involving heating [Di Cesare *et al.*, 2003; Thamkaew *et al.*, 2021]. While most of the works focus on the freeze-drying of herbs, there is a lack of information on the bioactive compound profile of *C. sativa* individual plant parts dried using this method. One of the first studies carried out by Addo *et al.* [2023] reported that the freeze-drying increased the contents of CBDA, CBGA, and CBG in dried samples by up to 3-fold compared to the fresh material. The contents of the listed cannabinoids after drying were in the range of 0.380–0.450 mg/g, 2.870–4.910 mg/g, and 0.570–1.330 mg/g, respectively. In our study, the contents of the cannabinoids in question fell within the ranges of 1.863–8.490 mg/g DM, 0.002–0.071 mg/g DM, and 0.018–0.280 mg/g DM, respectively.

Effect of convective drying on cannabinoid profile

The convective drying of inflorescences of different sizes and leaves was carried out using three temperatures: 50°C, 60°C, and 70°C. The changes in the total and individual cannabinoid contents during the drying of the inflorescences and leaves are shown in Figures 3 and 4, respectively. The total cannabinoid content of the small, medium and large inflorescences dried at 70°C decreased during the initial period of the process, reaching a minimum value after 2 h of drying. In the case of drying at 50°C and 60°C, the content of cannabinoids remained similar throughout the drying period. The most significant decrease in cannabinoid content was observed in all inflorescences dried at 60°C after the 8th h of drying. In the case of leaves dried at 50°C, an increase in the total content of cannabinoids was recorded up to 10 h of drying, while a further two-hour drying under these conditions resulted in a decrease in the total content of these compounds. For leaves dried at 60°C and 70°C, cannabinoid degradation was noted after 4 h of drying. The predominant cannabinoid in the dried inflorescences in each temperature variant was CBDA (1.070-6.977 mg/g DM), the content of which decreased up to fivefold compared to the fresh material (Table 1). Convective drying at 50°C resulted in inflorescences having a significantly higher CBD content than the samples dried at the other temperatures tested. On the other hand, the convective drying of leaves at all temperatures decreased CBD content by up to half. In the dried inflorescences (all condition variants), the occurrence of CBL (0.019-0.083 mg/g DM) and CBN (0.002-0.017 mg/g DM), which were not detected in the fresh material, was observed. In contrast, in leaves, these compounds were present only in the samples dried at 50°C (0.020 and 0.003 mg/g DM, respectively). The content of CBGA in the inflorescences decreased after drying at all temperatures and was the lowest after drying at 70°C (0.002–0.006 mg/g DM). The convective drying did



Figure 3. Changes in the cannabinoid profile during convective drying at 50°C (A), 60°C (B), and 70°C (C) of Cannabis sativa L. var. sativa small (S), medium (M) and large (B) inflorescences.

Values marked with different letters (a–c for S, A–C for M, α – δ for B inflorescences) differ significantly (p<0.01). The full names of the compounds are listed in the "Chemicals and reagents" subsection.



Figure 4. Changes in the cannabinoid profile during convective drying at 50°C (A), 60°C (B), and 70°C (C) of *Cannabis sativa* L. var. *sativa* leaves. Values marked with different letters (a–e) differ significantly (p<0.01). The full names of the compounds are listed in the "Chemicals and reagents" subsection.

not affect the formation of Δ^8 -THC in either inflorescences or leaves. The dominant cannabinoid in leaves was CBDA, whose content was recorded at 1.328 mg/g DM after processing at 70°C. In the variant at 60°C, the final content of this compound in the dried material was significantly lower.

The convective drying at different temperatures also significantly affected the levels of Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A, and total Δ^9 -THC in the dried samples (Table 1, Figures 3 and 4). The highest content of Δ^9 -THC was recorded for medium inflorescences dried at 60°C (1.230 mg/g DM). Among the dried leaves, those processed at 60 and 70°C had the highest Δ^9 -THC content (0.267 mg/g DM). The convective drying of inflorescences and leaves at 70°C resulted in the samples having the lowest content of Δ^9 -THCA-A (0.080–0.345 mg/g DM). The values of total Δ^9 -THC calculated for the samples dried at 50°C were in the range of 0.400–0.769 mg/g DM, for these dried at 60°C the range was 0.336–1.560 mg/g DM, and content in materials dried at 70°C ranged from 0.337 to 0.671 mg/g DM. The total Δ^9 -THC contents determined in all analyzed samples were within the safe limit stipulated in the Commission Regulation (EU) [Regulation EU 2023/915].

Literature data on the effect of the drying process on cannabinoid content/degradation rates indicate that levels of neutral cannabinoids increase after drying. One of the first reports on drying plant parts was presented by Turner & Mahlberg [1984], who dried leaf samples of C. sativa L. for 24 h at 37°C, at room temperature (2 weeks), and at 60°C (oven drying – 12 h). In the samples dried at both 37°C and 60°C, a 2-fold higher amount of neutral cannabinoids was recorded compared to the fresh material, indicating that the decarboxylation process was already occurring at 37°C. Chen et al. [2021] used hot air drying (40, 50, 60, 70, 90°C) and infrared drying (40 and 60°C) to dry the inflorescences of C. sativa L. var. sativa plants. They showed that increasing the ambient temperature to 90°C significantly facilitated the decarboxylation of CBDA (from 0.2% to 14.1%) and also that the use of infrared drying resulted in a higher loss of cannabinoids compared to hot air drying by 16.2% and 72.3% on average, respectively. Uziel et al. [2024] compared microwave drying of hemp with conventional drying. Microwave drying was carried out at 4 temperature variants (40, 50, 60 and 80°C). The authors showed that the use of microwaves in drying hemp significantly shortened the drying time (<4.5 h depending on the temperature used) compared to traditional drying (10 days). They also confirmed that the use of high drying temperatures in cannabis caused changes in the composition of the cannabinoids present in the dried material. The cited article showed that the highest contents of CBDA and Δ^9 -THCA-A decarboxylation products were determined in the samples dried at 80°C, whereas in our study – in the samples dried at 50°C. These differences may be due to the initial content of these cannabinoids and their precursors in the fresh material. As confirmed by Esfandi et al. [2024], temperature (45, 55, 65°C) as well as drying method type (drying with or without light, oven drying, vacuum drying or microwave drying) used to dry C. sativa L. samples, affect the increase in on the contents of selected cannabinoids (CBD

and Δ^9 -THC) in the dried plant material. There are also data indicating that the drying process did not affect the cannabinoid content of the dried material. The study presented by Kwaśnica et al. [2023] compared the 50, 60, and 70°C convective method, the vacuum-microwave method, and combination thereof used to dry the leaves of C. sativa L. and showed that the drying method did not affect changes in the profile of the cannabinoids analyzed. The results we obtained and those cited above confirm the need to control the drying processes of the C. sativa L. plant parts, as there is a risk of exceeding the acceptable level of Δ^9 -THC in the dried samples. This poses a severe risk in terms of ensuring the safety of the food produced from the dried plants. The chosen drying process conditions may not have been sufficient to inhibit the activity/activity of the enzymes by which the precursors of the selected cannabinoids are synthesised, and thus changes in the the sum and the profile of individual cannabinoids. Acidic cannabinoids can also be synthesised. The higher temperature of the drying process results in enhanced water diffusion from the dried material, thus resulting in a shorter drying time. Intense evaporation of water from the plant material may have resulted in a lower temperature of the material (not measured during the experiment), which affected the profile of the cannabinoid compounds. In addition, a greater loss of water results in a slower rate of decarboxylation. To confirm this, it would be necessary to determine the changes/kinetics of enzymatic activity during the drying process in order to find conditions (time and water content) that cause a reduction in enzyme activity and accompanying chemical reactions.

CONCLUSIONS

The study highlights the influence of the size (small, medium, large inflorescences) and parts (inflorescences and leaves) of Cannabis sativa L. var. sativa and the effect of the drying process on the cannabinoid content of the dried materials. The use of higher temperatures, i.e., 50°C, 60°C and 70°C, made it possible to determine differences in the content changes of cannabinoids during drying. It was found that increasing the drying temperature by 10°C contributed to greater degradation of the analyzed compounds. Traditional drying resulted in dried inflorescences containing up to 2 times more of the analyzed compounds compared to the fresh material. In the case of leaf samples, drying via all methods tested resulted in a decrease in the total cannabinoid contents (up to 2-fold). Appropriately selected drying conditions of the C. sativa L. var. sativa plant parts make it possible to obtain safe (containing an acceptable total Δ^9 -THC content) raw material, which can be used to produce hemp-containing foods or dietary supplements.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

The following are available online at https://journal.pan.olsztyn.pl/Effect-of-Selected-Drying-Methods-on-the-Cannabinoid-Profile-of-Cannabis-sativa-L,195594,0,2.html; Table S1. Conditions and time of drying by the chosen method necessary to obtain moisture content of 10±1 g/100 g in the dried parts of the plant

RESEARCH FUNDING

The research has not received external funding.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interest.

ORCID IDS

 M. Bryła
 https://orcid.org/0000-0002-1855-3610

 J. Kanabus
 https://orcid.org/0000-0001-9804-5570

 M. Roszko
 https://orcid.org/0000-0003-1848-2100

REFERENCES

 Addo, P.W., Chouvin-Bosse, T., Taylor, N., Macpherson, S., Paris, M., Lefsrud, M. (2023). Freeze-drying *Cannabis sativa* L. using real-time relative humidity monitoring and mathematical modeling for the cannabis industry. *Industrial Crops Products*, 199, art. no. 116754.

https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116754

- Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis* sativa L. plant by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 7549-7560. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8177-x
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A. (2016). Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plant from different chemotypes. *Journal of Natural Products*, *79*(2), 324-331. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949
- Baker, D., Pryce, G., Giovannoni, G., Thompson, A.J. (2003). The therapeutic potential of *Cannabis*. *The Lancet Neurology*, 2(5), 291-298. https://doi.org/10.1016/51474-4422(03)00381-8
- Challa, S.K.R., Misra, N.N., Martynenko, A. (2021). Drying of cannabis state of the practices and future needs. *Drying Technology*, 39(14), 2055–2064. https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1752230
- Chen, C., Wongso, I., Putnam, D., Khir, R., Pan, Z. (2021). Effect of hot air and infrared drying on the retention of cannabidiol and terpenes in industrial hemp (*Cannabis sativa* L). *Industrial Crops Products*, *172*, art. no. 114051. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114051
- Das, P.C., Vista, A.R., Tabil, L.G., Baik, O. (2022), Postharvest operations of *Cannabis* and their effect of cannabinoid content: A review. *Bioengineering*, 9(8), art. no. 364.
 - https://doi.org/10.3390/bioengineering9080364
- Das, P.C., Bail, O.D., Tabil, L.G. (2024). Microwave-infrared drying of cannabis (*Cannabis sativa* L.): Effect on drying characteristics, energy consumption and quality. *Industrial Crops and Products*, 211, 118215. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118215
- Di Česare, L.F., Forni, E., Viscardi, D., Nani, R.C. (2003). Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(12), 3575–3581. https://doi.org/10.1021/jf0210800
- Esfandi, A., Mehrafarin, A., Jari, S.K., Badi, H.N., Larijani, K. (2024). Variability in color and phytochemical properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) upon drying techniques; an opportunity for industrial products. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, *13*(1), 79-86.

https://doi.org/10.22034/JMPB.2023.128276

- Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7) art. no. 1935. https://doi.org/10.3390/nu12071935
- García-Valverde, M.T., Sánchez-Carnerero Callado, C., Díaz-Liñán, M.C., Sánchez de Medina, V., Hidalgo-García, J., Nadal, X., Hanuš, L., Ferreiro-Vera, C. (2022). Effect of temperature in the degradation of cannabinoids: From a brief residence in the gas chromatography inlet port to a longer period in thermal treatments. *Frontiers in Chemistry*, *10*, art. no. 1038729. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1038729
- Grafström, K., Andersson, K., Pettersson, N., Dalgaard, J., Dunne, S.J. (2019). Effects of long term storage on secondary metabolite profiles of cannabis resin. *Forensic Science International*, 301, 331-340. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.035

 Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M., Modrzewska, M., Pierzgalski, A. (2021). Cannabinoids – Characteristics and potential for use in food production. *Molecules*, 26(21), art. no. 6723.

- https://doi.org/10.3390/molecules26216723
- Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M. (2023). The development, validation, and application of a UHPLC-HESI-MS method for the determination of 17 cannabinoids in *Cannabis sativa* L. var. sativa plant material. *Molecules*, 28(23), art. no. 8008. https://doi.org/10.3390/molecules28248008

- Kiani, S., Minaei, S., Ghasemi-Varnamkhasti, M. (2018). Real-time aroma monitoring of mint (*Mentha spicata* L.) leaves during the drying process using electronic nose system. *Measurement*, *124*, 447-452. https://doi.org/10.1016/i.measurement.2018.03.033
- Kim, A.L., Yun, Y.J., Choi, H.W., Hong, Ch.H., Shim, H.J., Lee, J.H., Kim, Y.Ch. (2022). Profiling cannabinoid contents and expression levels of corresponding biosynthetic genes in commercial *Cannabis (Cannabis sativa* L.) cultivars. *Plants*, 11(22), art. no. 3088.

https://doi.org/10.3390/plants11223088

- Knezeivc, F., Nikolai, A., Marchart, R., Sosa, S., Tubaro, A., Novak, J. (2021). Residues of herbal hemp leaf teas – How much of the cannabinoids remain? *Food Control*, *127*, art. no. 108146. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108146
- Kwaśnica, A., Pachura, N., Masztalerz, K., Figiel, A., Zimmer, A., Kupczyński, R., Wujcikowska, K., Carbonell-Barrachina, A.A., Szumny, A., Różański, H. (2020). Volatile composition and sensory properties as quality attributes of fresh and dried hemp flowers (*Cannabis sativa L.*). *Foods*, *9*(8), art. no. 1118.
- https://doi.org/10.3390/foods9081118
 Kwaśnica, A., Pachura, N., Carbonell-Barrachina, Á.A., Issa-Issa, H., Szumny, D., Figiel, A., Masztalerz, K., Klemens, M., Szumny, A. (2023). Effect of drying methods on chemical and sensory properties of *Cannabis sativa* leaves. *Molecules*, 28(24), art. no. 8089.

https://doi.org/10.3390/molecules28248089

 Meija, J., McRae, G., Miles, Ch.O., Melanson, J.E. (2022). Thermal stability of cannabinoids in dried cannabis: a kinetic study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(1), 377-384.

https://doi.org/10.1007/s00216-020-03098-2

 Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., Corsi, L. (2018). *Cannabis sativa* L., and non psychoactive cannabinoids: The chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. *BioMed Research International*, 2018, art. no. 1691428.

https://doi.org/10.1155/2018/1691428

- Park, S.H., Pauli, C.S., Gostin, E.L., Staples, S.K., Seifried, D., Kinney, C., Vanden Heuvel, B.D. (2022). Effects of short-term environmental stresses on the onset of cannabinoid production in young immature flowers of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Cannabis Research*, *4*, art. no. 1. https://doi.org/10.1186/s42238-021-00111-y
- 24. Regulation EU 2021/2115 of the European Parliament and of the Council of 2 December 2021 establishing rules on support for strategic plans to be drawn up by Member States under the common agricultural policy (CAP Strategic Plans) and financed by the European Agricultural Guarantee Fund (EAGF) and by the European Agricultural Fund for Rural Development (EA-FRD) and repealing Regulations (EU) No 1305/2013 and (EU) No 1307/2013.
- https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2021/2115/oj

 25.
 Regulation EU 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006.
- https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj
 Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., Morimoto, S. (2007). Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters*, *581*(16), 2929-2934.
 https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.043
- Thamkaew, G., Sjoholm, I., Galindo, F.G. (2021). A review of drying methods for improving the quality of dried herbs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(11), 1763-1786. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1765309
- Turner, J.C., Mahlberg, P.G. (1984). Effects of sample treatment on chromatographic analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Journal* of Chromatography A, 283, 165–171. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96251-4
- Ubeed, H.M.S.A.L., Wills, R.B.H., Chandrapala, J. (2022). Post-harvest operations to generate high-quality medicinal cannabis products: a systematic review. *Molecules*, 27(5), art. no. 1719.

https://doi.org/10.3390/molecules27051719

- Uziel, A., Milay, L., Procaccia, S., Cohen, R., Burstein, A., Sulimani, L., Shreiber-Livne, I., Lewitus, D., Meiri, D. (2024). Solid-state microwave drying for medical cannabis inflorescences: A rapid and controlled alternative to traditional drying. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 9(1), 397-408. http://doi.org/10.1089/can.2022.0051
- Wang, M., Wang, Y.H., Avula, B., Radwan, M.M., Wanas, A.S., van Antwerp, J., Parcher, J.F., ElSohly, M., Khan, I.A. (2016). Decarboxylation study of acidic cannabinoids: A novel approach using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. Cannabis and Cannabinoid Research, 1(1), 262–271. https://doi.org/10.1089/can.2016.0020
- Xie, Z., Mi, Y., Kong, L., Gao, M., Chen, S., Chen, W., Meng, X., Sun, W., Chen, S., Xu, Z. (2023). Cannabis sativa: Origin and history, glandular trichome development, and cannabinoid biosynthesis. Horticulture Research, 10(9), art. no. 150. https://doi.org/10.1093/hr/uhad150

Effect of Selected Drying Methods on the Cannabinoid Profile of Cannabis sativa L. var. sativa Inflorescences and Leaves

Joanna Kanabus*, Marcin Bryła, Marek Roszko

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1. Conditions and time of drying by the chosen method necessary to obtain moisture content of 10 ± 1 g/100 g in the dried parts of the plant.

Table S1. Conditions and time of drying by the chosen method necessary to obtain moisture content of 10 ± 1 g/100 g in the dried parts of the plant.

Sample	Moisture content before drying	Traditional drying (10 days, 20°C, without light)	Freeze-drying (25°C, 24 h)	Convective drying at 50°C (12 h)	Convective drying at 60°C (8 h)	Convective drying at 70°C (4 h)
Small inflorescences	76±0.6	9±0.8	9±0.8	9±0.8	10±1.0	11±1.0
Medium inflorescences	75±0.6	11±1.0	10±1.0	11±1.0	11±1.0	10±1.0
Large inflorescences	77±0.7	10±1.0	10±1.0	11±1.0	11±1.0	11±1.0
Leaves	73±0.5	10±1.0	10±1.0	11±1.0	9±0.8	10±1.0

Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów w opracowaniu publikacji ^{s/}

Joanna Kanabus Imię i nazwisko

Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności / Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Effect of Selected Drying Methods on the Cannabinoid Profile of Cannabis sativa L. var. sativa Inflorescences and Leaves

Tytuł artykułu

Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2024, 74(4):408-418

https://doi.org/10.31883/pjfns/195594 Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DOI

Joanna Kanabus *, Marcin Bryła, Marek Roszko

Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko, Imię i nazwisko; Imię i nazwisko (⁹)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy udział %	Afiliacja	Podpis Autora
1	Kanabus Joanna */**	Koncepcja badania, metodologia, analiza formalna i statystyczna, przeprowadzenie badań, zasoby, wizualizacja, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i edycja	80%	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności / Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno- Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy	Lanobs
2	Bryła Marcin	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	10%		$/\gamma$
3	Roszko Marek	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	10%		(DL

 ⁸ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD
 ⁹ Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

4.4. Ocena wpływu procesu pieczenia pieczywa cukierniczego z dodatkiem suszu pozyskanego z *Cannabis sativa* L. *var. sativa* na stabilność termiczną kannabinoidów, terpenów oraz wybranych związków lotnych

W ramach pracy dokonano ocenę wpływu procesu pieczenia pieczywa cukierniczego (ciastka kruche) z dodatkiem liofilizowanego suszu z *Cannabis sativa* L. *var. sativa* na stabilność analizowanych związków. Uzyskane wyniki wykorzystano do zweryfikowania postawionej w pracy Hipotezy **[H3]**. W ramach prowadzonych doświadczeń modelowych przygotowano ciastka kruche zawierające 1, 2 oraz 3% (w/v) suszu konopnego i wypieczono je w dwóch różnych wariantach temperatury 160°C i 200°C w ustalonym czasie. Uzyskany produkt przedstawiono na Rycinie 4.



Wypiek w 160°C

Rycina 4. Ciastka kruche (kontrola i próbki zawierające susz konopny) po wypieczeniu w dwóch wariantach temperatury 160°C (30 min) i 200°C (20 min).

Po wypieczeniu oceniono barwę wypieczonych ciastek, a także wykonano analizy zawartości kannabinoidów oraz terpenów. Analizy wykonywano z częstotliwością 7 dni przez kolejne 28 dni przechowywania w temperaturze pokojowej. Do poprawnej analizy kannabinoidów w przygotowanych próbkach niezbędne było opracowanie metody ekstrakcji tych związków z gotowego produktu. Izolację kannabinoidów prowadzono z wykorzystaniem MeOH:CHCl₃ (95:5,v/v). Zastosowany układ ekstrakcyjny zapewnił wysoką skuteczność ekstrakcji. Poprawność metody i podstawowe jej parametry określono w standardowej procedurze stosowanej w ramach niniejszej pracy. Do doświadczeń walidacyjnych wykorzystano próbkę ciastek kruchych bez dodatku wsadu konopnego (próbka kontrolna). Do oceny parametrów statystycznych metody posłużono się wartościami odzysku z próbek fortyfikowanych laboratoryjnie oraz powtarzalnością wartości odzysku. Dla większości

analizowanych substancji poziom odzysku mieścił się w granicach 90-98%. Szczegółowe wartości granicy wykrywalności, granicy oznaczalności, wyniki walidacji, zakres analityczny oraz uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli S1 oraz S8 - **Aneks**. Rozszerzona niepewność pomiarów (K=2, α =0,05) wynosiła <10% dla wszystkich badanych związków. Wyniki zawartości kannabinoidów w gotowych produktach przedstawiono na Rycinach 5-6 oraz w Tabelach S9 i S10– **Aneks**.



Rycina 5. Zawartość 17 kannabinoidów w ciastkach kruchych wypieczonych w temperaturze 160°C przez 30 minut, zawierających wsad na bazie suszu konopnego, oraz podczas 28 dni przechowywania (n=3). a-c – wartości w obrębie tej samej litery dla jednego rodzaju próbki (np. 1% wsadu konopnego) nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05.



Rycina 6. Zawartość 17 kannabinoidów w ciastkach kruchych wypieczonych w temperaturze 200°C przez 30 minut, zawierających wsad na bazie suszu konopnego, oraz podczas 28 dni przechowywania (n=3). a-c – wartości w obrębie tej samej litery dla jednego rodzaju próbki (np. 1% wsadu konopnego) nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05

Zastosowanie różnej temperatury wypieku oraz ilości wsadu konopnego do ciastek kruchych skutkowało uzyskaniem modelowych produktów zawierających różne ilości kannabinoidów. Najwyższy stopień degradacji sumy kannabinoidów obserwowano w próbkach zawierających 3% dodatku suszu konopnego. Proces wypieku pieczywa cukierniczego nie prowadził do powstania Δ^8 -THC, CBN oraz CBL. Natomiast w wyniku działania temperatury stężenie wszystkich analizowanych kannabinoidów uległo obniżeniu niezależnie od zastosowanej temperatury wypieku. Biorąc pod uwagę znaczny udział tłuszczu w recepturze ciastek kruchych można przypuszczać, że dzięki temu działanie temperatury nie wpłynęło na całkowitą degradację tych związków. Kannabinoidy to związki łatwo rozpuszczalne w tłuszczu, który w tym przypadku zadziałał ochronnie na te substancje. Zastosowanie niższej temperatury wypieku i dłuższego czasu wypieku (o 10 minut) skutkowało uzyskaniem ciastek kruchych o mniejszej zawartości analizowanych związków. Może to wynikać z dłuższego działania temperatury na produkt podczas pieczenia. Poddanie przechowywaniu próbek modelowych ciastek kruchych pozwoliło na określenie stabilności zawartych w produkcie kannabinoidów w czasie. Dominującymi związkami przed wypiekiem w ciastkach były CBDA (1% wsadu - 6,080 mg/100g produktu), CBCA (1% wsadu - 0,990 mg/100g) oraz CBD (1% wsadu 0,640 mg/100g produktu). Natomiast w wyniku wypieku wartości te uległy obniżeniu nawet 3-krotnie w dwóch wariantach temperatury wypieku. Podczas przechowywania gotowych ciastek przez 28 dni stężenie psychoaktywnego Δ^9 -THC utrzymywało się na zbliżonym poziomie dla próbek wypieczonych w dwóch wariantach temperatury. Z tego wynika, że produkt ten nie stanowi zagrożenia i jest bezpieczny do spożycia, a matryca zapewnia stabilność Δ^9 -THC podczas przechowywania. Natomiast stężenie CBD, który jest potencjalnie najbardziej pożądanym związkiem w tego typu produktach uległo zmianie

w próbkach wypieczonych w temp. 200°C. W czasie 28 dni przechowywania tych próbek obserwowano nawet 10-krotny wzrost stężenia CBD, który między innymi spowodowany był dekarboksylacją jego kwasowego prekursora CBDA. Jest to pierwsza praca skupiająca się na analizie kannabinoidów w modelowym pieczywie cukierniczym z dodatkiem liofilizowanego suszu konopnego. Dotychczas do przygotowania produktów konopnych wykorzystywano mąkę konopną, nasiona konopi lub pozyskany z nich koncentrat białka konopnego, a także olej z nasion konopi, które oczyszczone nie zawierały w składzie kannabinoidów [Cerino i wsp. 2021].

Kolejną częścią pracy obejmowała określenie zawartości terpenów w przygotowanych modelowych ciastkach konopnych. Dodatkowo sprawdzono obecność 10 podstawowych związków lotnych charakterystycznych dla analizowanego produktu cukierniczego (2-pentanon, 2-heptanon, acetoina, 2-butanon, kwas octowy, furfural, 2-metylopirazyna, heksanal, heptanal, oktanal). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli S11 - Aneks. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono obecność trzech terpenów (α-pinen, d-limonen, β-kariofilen) oraz wszystkich wymienionych powyżej związków lotnych. Ubytek pozostałych terpenów obecnych w suszu konopnym, który został zastosowany jako dodatek do ciastek, wywołany został działaniem wysokiej temperatury podczas wypieku. Jak potwierdzają autorzy [Giarnetti i wsp. 2015, Merlino i wsp. 2022] obecność ketonów (tj. 2-butanon, 2-pentanon, 2-heptanon oraz acetoina) w przygotowanych modelowych produktach wynika z rozkładu cukru, który spowodowanego również działanie wysokiej temperatury. Natomiast zaobserwowana obecność aldehydów nasyconych tj. heksanal, heptanal lub oktanal związana jest z autooksydacją kwasu linolowego lub oleinowego zachodzącą podczas pieczenia pieczywa cukierniczego [Merlino i wsp. 2022]. Za maślany zapach ciastek kruchych odpowiadają m.in. 2-pentanon, 2-heptanon, oraz 2-butanon, których obecność również potwierdzono w niniejszej pracy [Rutkowska i wsp. 2023].

Uzyskane wyniki pozwoliły na weryfikację Hipotezy **[H3].** Wykazano, że zarówno warunki procesu pieczenia (tj. zastosowana temperatura i czas wypieku), jak i czas przechowywania gotowego pieczywa cukierniczego ma wpływ na stabilność kannabinoidów oraz terpenów w gotowym produkcie. Wykazano także obecność związków lotnych charakterystycznych dla przygotowanego produktu modelowego, co potwierdza poprawność procesu wypieku pieczywa cukierniczego.

4.4.1. Pomiar składowych barwy ciastek kruchych z dodatkiem wsadu konopnego

Dodatkowym aspektem zbadanym w pracy było określenie barwy wypieczonych ciastek. Pomiar został wykonany w oparciu o składowe barwy określone metodą CIE Lab dla wypieczonych w dwóch wariantach temperatury ciastek kontrolnych oraz zawierających wsad konopny. Uśrednione wyniki pomiarów parametrów barwy L*, a*, b* oraz ΔE wraz z odchyleniem przedstawiono w Tabeli 2 i 3.

Tabela 2. Parametry barwy ciastek kruchych zawierających wsad konopny w ilości 1, 2 i 3% (w/v) wypieczonych w temperaturze 160°C przez 30 min.

Wypiek 160°C, 30 min.	L*	a*	b*	ΔΕ
Kontrola	71,41±0,68	$1,08{\pm}0,15$	27,51±0,38	-
Ciastko 1%	61,68±4,36	-6,20±0,82	27,36±2,05	12,15
Ciastko 2%	53,56±1,96	-6,83±0,05	26,15±0,63	19,57
Ciastko 3%	51,55±0,61	-6,92±0,30	25,74±1,02	21,47

Tabela 3. Parametry barwy ciastek kruchych zawierających wsad konopny w ilości 1, 2 i 3% (w/v) wypieczonych w temperaturze 200°C przez 20 min.

Wypiek 200°C, 20 min.	L*	a*	b*	ΔΕ
Kontrola	70,96±0.23	1,93±0.15	29,51±0.24	-
Ciastko 1%	63,42±1.31	-5.60±0.69	29,54±2.11	10,65
Ciastko 2%	55,22±0.55	-7,08±0.16	28,11±0.51	18,19
Ciastko 3%	52,36±0.46	-7,42±1.00	26,84±1.66	20,98

Ciastka kruche charakteryzowały się barwą kremową, a wartości parametru L* dla ciastek kontrolnych wypieczonych w dwóch wariantach temperatury nie różniły się istotnie. Wartości tego parametru wraz ze zwiększającą się ilością dodatku suszu konopnego malały, co świadczy o znacznym pociemnieniu produktu. Wartości ujemne parametru a* świadczą o znacznym udziale barwy zielonej w produkcie. W obu wariantach wypieczonych ciastek zaobserwowano niewielki spadek wartości b*, a bardziej żółtą barwa charakteryzowały się ciastka pieczone w niższej temperaturze. Zastosowanie wyższej temperatury wypieku również skutkowało

pogorszeniem parametrów barwy dla wszystkich wariantów ciastek. Większe wartości ΔE pokazują większe zmiany w barwie pomiędzy ciastkami kontrolnymi a zawierającymi wsad konopny w różnej ilości. Różnicę barw ΔE >5 interpretuje się jako bardzo wyraźną [Wierzbicka i wsp. [2000]. Jak potwierdza Nemś i wsp. [2022] zastąpienie mąki produktem konopnym w tym przypadku nasionami skutkuje uzyskaniem ciastek o ciemniejszej barwie w porównaniu do próby kontrolnej. Uzyskane przez autorów produkty również charakteryzowały się największym udziałem koloru zielonego, który wzrastał wraz z ilością dodatku. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są tożsame z powyżej przytoczonymi.

4.4.2. Ocena sensoryczna ciastek kruchych zawierających wsad konopny

W celu sprawdzenia akceptowalności sensorycznej przygotowanych ciastek kruchych zawierających wsad konopny przeprowadzono ocenę sensoryczną z wykorzystaniem metody QDA. Wyróżniki jakości sensorycznej wraz z definicją oraz wyniki oceny profilowej przedstawiono na Rycinie 11 oraz w Tabelach S12-S14 - **Aneks**. Wśród ocenianych cech wyróżniono kolor typowy dla ciastek kruchych, kolor zielony, smak słodki, maślany, gorzki oraz obcy, zapach typowy dla ciastek kruchych i obcy, a także oceniono kruchość, konsystencję oraz jakość ogólną modelowych ciastek kruchych. Ocenie sensorycznej poddano ciastka wypieczone w dwóch wariantach temperatury 160 i 200°C.



Rycina 11. Jakość ogólna ciastek kruchych zawierających wsad konopny oraz próbek kontrolnych wypieczonych w dwóch wariantach temperatury (160 i 200°C).

Najlepszą ogólną jakością (9,99-7,10) charakteryzowały się ciastka wypieczone w temperaturze 160°C we wszystkich wariantach ilości dodatku i próbki kontrolne. W drugim wariancie próbek cecha ta została oceniona niżej (8,77-5,11). W próbkach ciastek wypieczonych w wyższej temperaturze bardziej wyczuwalny był zapach i smak obcy, ciastka były również mniej słodkie i bardziej gorzkie. Żadne z ciastek zawierających wsad konopny nie miało koloru typowego dla ciastek kruchych. Zaobserwowano istotne różnice w wynikach oceny profilowej pomiędzy próbkami zawierającymi maksymalne ilości zastosowanego dodatku (3% wsadu) w porównaniu do ciastek zawierających jedynie 1%. Ciastka zawierające 3% wsadu konopnego w postaci suszu otrzymywały gorsze oceny podczas oceny sensorycznej. Wskazuje to na to, że proces pieczenia powoduje zmianę cech sensorycznych wsadu konopnego. Biorąc pod uwagę wyróżniki takie jak kruchość i konsystencja wykazano, że bardziej kruche były ciastka wypieczone w 200°C, ale lepszą konsystencją charakteryzowały się ciastka wypieczone w 160°C. Najbardziej zielony kolor miały próbki zawierające 3% wsadu konopnego.

Powyżej opisane wyniki są jednymi z pierwszych w zakresie oceny sensorycznej modelowych ciastek kruchych zawierających w swoim składzie liofilizowany susz konopny. Dotychczas opublikowano pracę dotyczącą analizy sensorycznej wypieków piekarniczych – biszkoptów zawierających w swoim składzie mąkę konopną. Wykazano, że próbki zawierające w składzie więcej mąki konopnej charakteryzowały się zapachem i smakiem typowym dla konopi, były bardziej zielone od pozostałych oraz biszkopty były bardziej kruche niż w innych analizowanych wariantach [Talens i wsp. 2022]. Autorzy potwierdzili potencjał i możliwość wykorzystania półproduktów na bazie konopi do produkcji żywności co również potwierdzają wyniki uzyskane w niniejszej pracy.
Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów w opracowaniu publikacji ^{1/}

Joanna Kanabus Imie i nazwisko

Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Exploring the stability of cannabinoids during model baking of shortbread biscuits with dried hemp: analysis of pre- and post-baking levels. *Tytut artykutu*

Artykuł gotowy do przesłania do wybranego czasopisma z listy JCR

Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DOI

Joanna Kanabus*, Marcin Bryła, Sylwia Stępniewska, Joanna Markowska, Marek Roszko Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko; Imię i nazwisko; Imię i nazwisko (²)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy udział %	Afiliacja	Podpis Autora
1	Joanna Kanabus */**	Koncepcja badania, metodologia, analiza formalna i statystyczna, przeprowadzenie badań, zasoby, wizualizacja, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i edycja.	72%	Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-	Homobs
2	Marcin Bryła	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	6%	Spozywczego im. Wacława Dąbrowskiego	10
3	Sylwia Stępniewska	Przeprowadzenie badań, zasoby, recenzja i edycja.	10%	Instytut Badawczy	Step.
4.	Joanna Markowska	Przeprowadzenie badań, zasoby, recenzja i edycja.	6%		Madroulo
4	Marek Roszko	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	6%		A

¹ Wypelnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

² Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdka/gwiazdkami.

4.5. Ocena wpływu procesu fermentacji mlekowej zachodzącej podczas produkcji fermentowanego napoju mlecznego zawierającego wsad konopny na stabilność kannabinoidów, terpenów oraz wybranych związków lotnych

W celu realizacji celu badawczego, którym było określenie wpływu procesu fermentacji na stabilność związków biologicznie aktywnych przygotowano fermentowane napoje mleczne zawierające w swoim składzie wsad konopny. Jako dodatek wykorzystano liofilizowany susz konopny, etanolowy ekstrakt konopny oraz olejek konopny w ilości 0,5, 1 oraz 2% (w/v). Sprawdzono wpływ rodzaju wsadu konopnego na końcową zawartość kannabinoidów w gotowym produkcie, wartość pH, żywotność bakterii kwasu mlekowego podczas 28 dni przechowywania chłodniczego fermentowanego napoju mlecznego. Próbki do analiz pobierano co 7 dni. Uzyskane produkty przedstawiono na Rycinie 7. Wyniki uzyskane dla tego zadania badawczego opublikowano w Publikacji **[P4].**



Przed wymieszaniem

Olej konopny Ekstrakt konopny

Susz konopny



Po wymieszaniu

Rycina 7. Fermentowane napoje mleczne z dodatkiem różnego rodzaju (olej konopny, susz konopny, ekstrakt konopny) oraz ilości (0%, 1%, 2%) wsadu konopnego 24h po zakończeniu fermentacji przed i po wymieszaniu.

Do poprawnej oceny zawartości kannabinoidów w przygotowanych próbkach niezbędne było opracowanie metody ekstrakcji tych związków z gotowego produktu. Jako ciecz ekstrakcyjną wykorzystano ACN, dzięki której uzyskano wysoką skuteczność ekstrakcji. Aby potwierdzić poprawność metody przeprowadzono walidację. Jako matrycę wykorzystano próbkę fermentowanego napoju mlecznego (kontrola). Do oceny parametrów statystycznych metody posłużono się wartościami odzysku próbek fortyfikowanych oraz powtarzalnością wartości odzysku. Dla większości analizowanych substancji poziom odzysku mieścił się w granicach 88-105%. Szczegółowe wartości LOD, LOQ, wyniki walidacji oraz zakres analityczny przedstawiono w Tabeli S1 oraz w Publikacji [P4]. Rozszerzona niepewność pomiarów (K=2, α =0,05) wynosiła <10% dla wszystkich badanych związków. Wyniki zawartości kannabinoidów w gotowych produktach przedstawiono na Rycinach 8-10.





Rycina 8. Suma 17 kannabinoidów w fermentowanych napojach mlecznych zawierających wsad konopny na bazie olejku konopnego w ilości 0,5, 1 i 2% (w/v), przed i po fermentacji oraz podczas 28 dni przechowywania chłodniczego (4°C).

a-f – wartości w obrębie tej samej litery (dla jednej ilości wsadu, np. 0,5%) nie różnią się istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05; A-C wartości w obrębie tej samej litery (czas przechowywania) nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05.



Rycina 9. Suma 17 kannabinoidów w fermentowanych napojach mlecznych zawierających wsad konopny na bazie liofilizowanego suszu konopnego w ilości 0,5, 1 i 2% (w/v), przed i po fermentacji oraz podczas 28 dni przechowywania chłodniczego (4°C).

a-c- wartości w obrębie tej samej litery (dla jednej ilości wsadu, np. 0,5%) nie różnią się istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05; A-C wartości w obrębie tej samej litery (czas przechowywania) nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05.



Rycina 10. Suma 17 kannabinoidów w fermentowanych napojach mlecznych zawierających wsad konopny na bazie etanolowego ekstraktu konopnego w ilości 0,5, 1 i 2% (w/v), przed i po fermentacji oraz podczas 28 dni przechowywania chłodniczego (4°C).

a-d– wartości w obrębie tej samej litery (dla jednej ilości wsadu, np. 0.5%) nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05; A-C wartości w obrębie tej samej litery (czas przechowywania) nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05.

Zastosowanie różnych form dodatku konopnego skutkowało uzyskanie fermentowanych napojów mlecznych charakteryzujących się różną zawartością kannabinoidów. Największą początkową sumą 17 kannabinoidów charakteryzował się fermentowany napój mleczny zawierający wsad konopny na bazie olejku konopnego (np. 1% - 103 mg/100g produktu), a najmniej tych związków zawierały próbki z dodatkiem ekstraktu konopnego (np. 1% - 8,14 mg/100g produktu). Przeprowadzenie procesu fermentacji napojów mlecznych z dodatkiem ekstraktu konopnego istotnie przyczyniło się do ponad 10-krotnej degradacji obecnych w produkcie kannabinoidów. W próbkach zawierających susz konopny oraz z dodatkiem 0,5% olejku konopnego nie obserwowano istotnego zmniejszenia sumy kannabinoidów po procesie fermentacji. Zastosowanie wsadu konopnego w postaci olejku lub suszu konopnego zapewnia nawet 10-krotnie większe stężenie kannabinoidów, które naturalnie obecne są w roślinie lub umożliwia skoncentrowanie większej ilości związków dzięki rozpuszczeniu ich w oleju. Lipidy działają ochronnie na te związki zapobiegając ich degradacji w wyniku np. utleniania lub obróbki termicznej w procesie pasteryzacji. Tłuszcz posiada wyższa temperaturę wrzenia niż woda czy etanol, dzięki czemu rozpuszczone w nim związki tj. kannabinoidy nie ulegają nadmiernemu podgrzaniu co zapobiega dekarboksylacji kwasowych związków. Związki obecne w suszu konopnym również są w mniejszym stopniu narażone na działanie tlenu ze względu na obecność tkanki roślinnej. Wybór wsadu w postaci etanolowego ekstraktu konopnego nie gwarantuje efektu ochronnego dla substancji bioaktywnych wyekstrahowanych z rośliny. Poddanie przechowywaniu przygotowanych próbek fermentowanych napojów mlecznych pozwoliło na określenie stabilności zarówno sumy 17 analizowanych kannabinoidów oraz pojedynczych związków. Zastosowanie wsadu w postaci olejku konopnego pozwoliło na uzyskanie produktów, które po 4 tygodniowym przechowywaniu charakteryzowały się taką samą lub wyższą suma kannabinoidów w gotowym produkcie. Zawartość kannabinoidów w próbkach zawierających susz konopny podczas przechowywania nie zmieniła się istotnie we wszystkich wariantach. Suma 17 kannabinoidów w próbkach zawierających etanolowy ekstrakt konopny na początku przechowywania była istotnie wyższa niż po zakończeniu przechowywania we wszystkich wariantach gdzie zmniejszyła się o połowę. Dominującymi kannabinoidami we wsadzie na bazie olejku konopnego były CBD (1% wsadu - 42,57 mg/100g produktu) oraz CBG (1% wsadu - 51,11 mg/100g produktu),

a we wsadach na bazie suszu konopnego oraz ekstraktu konopnego dominował CBDA (kolejno dla 1% wsadu - 5,32 mg oraz 3,75 mg/100g produktu). Stężenie CBD po przeprowadzeniu fermentacji oraz po przechowywaniu próbek zawierających wsad na bazie olejku konopnego wzrosło 2-krotnie. W przypadku CBG stężenie tego związku uległo 10-krotnej redukcji (w przeliczeniu na 100g gotowego produktu) po procesie fermentacji, a podczas przechowywania obserwowano stopniowy wzrost stężenia, ale nie osiągnął on poziomu równego świeżemu produktowi. W próbkach z dodatkiem etanolowego ekstraktu konopnego proces fermentacji spowodował ponad 90% degradację CBDA, którego stężenie podczas przechowywania również malało. Po przeprowadzeniu fermentacji w analizowanych próbkach z ekstraktem konopnym nie zaobserwowano obecności innych kannabinoidów tj. CBC, CBG, CBDV, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCVA, CBN, CBNA, CBL oraz CBLA. We wszystkich wariantach dodatków nie stwierdzono obecności Δ^8 -THC, a proces produkcji fermentowanego napoju mlecznego z każdym rodzajem wsadu konopnego również nie przyczynił się do powstania tego związku. W próbkach zawierających susz konopny podczas przechowywania nie obserwowano obecności CBL oraz CBLA. Stosowanie wsadów konopnych do żywności fermentowanej na bazie konopi niesie ze sobą również ryzyko występowania psychoaktywnego Δ^9 -THC oraz jego prekursora Δ^9 -THCA. W wyniku prowadzenia procesu fermentacji we wszystkich wariantach próbek obserwowano ponad 90% degradację tych związków. Przechowywanie przez 28 dni w warunkach chłodniczych nie wpływało na zmiany stężeń omawianych związków. Zaobserwowany spadek stężenia Δ 9-THC oraz Δ 9-THCA prawdopodobnie wywołany został działaniem temperatury podczas pasteryzacji mleka ze wsadem konopnym oraz działaniem tlenu.

Pomimo redukcji zawartości, istnieje ryzyko występowania Δ^9 -THC w produktach zawierających wsad konopny. Należy podkreślić, że dostarczone do organizmu drogą pokarmową zarówno Δ^9 -THC, a także CBD ulegają degradacji w kwaśnym środowisku żołądka oraz są rozkładane przez enzymy w jelitach. W konsekwencji ich biodostępność wynosi <20% [Garrett i Hunt 1974, Gonçalves i wsp. 2019].

W 2015 opublikowana przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) opinia naukowa sugeruje, że ostra dawka referencyjna dla całkowitego Δ^9 -THC wynosi 1 µg Δ^9 -THC/kg masy ciała dla dorosłego człowieka [EFSA 2015]. Natomiast pogłębiona analiza przez Europejskie Stowarzyszenie Konopi Przemysłowych (EIHA) sugeruje, że wartość ta jest zbyt rygorystyczna i wynosi 7 µg Δ^9 -THC/kg masy ciała [EIHA 2020]. Potencjalne ryzyko związane z występowaniem tego związku może zostać obliczone w oparciu o zawartość Δ^9 -THC i Δ^9 -THCA: stężenie Δ^9 -THC + (0,877 x stężenie Δ^9 -THCA-A) [Rozporządzenie

Komisji UE 915/2023]. Na podstawie opinii można założyć, że przeciętne bezpieczne dzienne spożycie całkowitego Δ^9 -THC dla osoby ważącej 70 kg wynosi wg EFSA - 70 µg, a według EIHA to 490 µg. Porównanie teoretycznej zawartości Δ^9 -THC dla przygotowanych modelowych jogurtów konopnych przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Całkowita zawartość Δ^9 -THC przed i po fermentacji oraz po 28 dniach przechowywania (opracowanie własne Kanabus i wsp. 2024 – Tabela 1).

Formantowany	Iloáá	Całl	kowita zawartość Δ^9 -T	HC*								
nenéi mleozny	dodatku	[mg	[mg/100g gotowego produktu]									
		Derad forme on to sig	Do formanta di	Po 28 dniach								
	70 (W/V)	Fized lennentacją	Foreintentacji	przechowywania								
oleiku	0,5	$0,21^{b} \pm 0.01$	$0,04^{a} \pm 0.01$	$0,04^{a} \pm 0.01$								
konopnego	1	$0,42^{b} \pm 0.04$	$0,42^{b} \pm 0.04 \qquad 0,05^{a} \pm 0.01$									
konopiiego	2	$0,83^{b} \pm 0.08$	$0,07^{a} \pm 0.01$	$0,07^{a} \pm 0.01$								
liofilizowanego	0,5	$0,98^{b} \pm 0.04$	$0,03^{a} \pm 0.01$	$0,03^{a} \pm 0.01$								
suszu	1	$1,98^{b} \pm 0.09$	$0,05^{a} \pm 0.01$	$0,05^{a} \pm 0.01$								
konopnego	2	$3,94^{b} \pm 0.12$	$0,07^{a} \pm 0.01$	$0,07^{a} \pm 0.01$								
etanolowego	0,5	$0,84^{b} \pm 0.02$	$0,02^{a} \pm 0.01$	$0,02^{a} \pm 0.01$								
ektraktu	1	1,68 ^b ±0.03	$0,03^{a} \pm 0.01$	$0,03^{a} \pm 0.01$								
konopnego	2	$3,34^{b} \pm 0.06$	$0,06^{a} \pm 0.01$	$0,06^{a} \pm 0.01$								

*stężenie Δ^9 -THC + (0,877 x stężeniu Δ^9 -THCA-A) [Rozporządzenie Komisji UE 915/2023]. a-b– wartości w obrębie tej samej litery w wierszu nie różnią się istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05.

Na podstawie uzyskanych wyników całkowitego Δ^9 -THC dla próbek zawierających wsad konopny można stwierdzić, że gotowy produkt po fermentacji oraz po 28 dniach przechowywania chłodniczego jest bezpieczny <u>dla</u> potencjalnego konsumenta ważącego 70 kg i spożywającego 100g gotowego produktu dziennie.

W dalszej części pracy określono stężenie terpenów w przygotowanych modelowych fermentowanych napojach mlecznych. Dodatkowo określono obecność 10 podstawowych związków lotnych charakterystycznych dla analizowanego produktu mlecznego (kwas octowy, kwas masłowy, kwas kaprylowy, kwas propionowy, 2-butatnon, 2-pentatnon, 2-heptanon, acetoina, etanol, alkohol laurylowy) (Tabela S15 – Aneks). Analizy wykonano 24h po przeprowadzeniu fermentacji. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono obecność

β-kariofilenu oraz d-limonenu we wszystkich analizowanych próbkach oraz wszystkich wymienionych powyżej związków lotnych. We wszystkich fermentowanych napojach mlecznych zawierających wsad konopny zaobserwowano obecność terpenów tj. α-humulenu oraz neoridolu. W wariantach napojów z olejem konopnym obserwowano obecność β-myrcenu, a we wszytkich próbkach zawierających susz konopny oznaczono obecność terpenów tj. α-pinenu, kamfenu, β-pinenu, Δ-3-karenu. Wybrane związki lotne również były wykrywane przez Beshkova i wsp. [2004] oraz Zaręba i sp. [2008]. Obecność 2-butanonu, 2-pentanonu czy 2-heptanonu wynika z przebiegających przemian biochemicznych wywołanych obecnością enzymów charakterystycznych dla mleka, a także procesami autooksydacyjnymi czy aktywnością metaboliczną mikroorganizmów [Zaręba i wsp. 2008]. Inne składniki tj. kwas masłowy czy ketony mogą powstawać w wyniku degradacji kwasów tłuszczowych, a także wolnych aminokwasów i tych uwalnianych z białek podczas obróbki termicznej mleka [Ardo 2004].

Uzyskane wyniki pozwoliły na weryfikację Hipotezy **[H4].** Wykazano, że proces fermentacji mlekowej zachodzącej podczas produkcji fermentowanego napoju mlecznego ma wpływ na stabilność i skład kannabinoidów i terpenów. Potwierdzono także, że forma wsadu konopnego (susz, olejek, ekstrakt) ma wpływ na stabilność zawartych w nim kannabinoidów i terpenów oraz na końcową zawartość analizowanych związków w gotowym produkcie. Potwierdzono, obecność charakterystycznych związków powstałych w wyniku prowadzenia fermentacji przez bakterie kwasu mlekowego przy jednoczesnej obecności wsadu konopnego w produkcie.

4.5.1. Ocena liczby żywotnych komórek bakterii kwasu mlekowego w gotowym produkcie oraz w czasie przechowywania chłodniczego

W ceku potwierdzenia poprawności przebiegu procesu fermentacji, sprawdzono liczbę żywych komórek *S. thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* zastosowanych jako kultra starterowa. Bakterie te stanowią charakterystyczną mikroflorę dla fermentowanych napojów mlecznych – jogurtów oraz posiadające potwierdzone właściwości probiotyczne [Codex Alimentarius 243-2003]. Analizy wykonano po fermentacji oraz 1, 7, 14, 21 i 28 dnia przechowywania. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 2 – Publikacja [**P4**]. Początkowa liczba żywych komórek *S. thermophilus* po fermentacji mieściła się w zakresie od 10,0 do 8,7 log jtk/mL i nieznacznie uległa obniżeniu po 28 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych i wahała się między 8,1 a 9,3 log jtk/mL. Największy spadek liczby żywych bakterii S. thermophilus odnotowano w fermentowanym napoju mlecznym zawierającym 1%

etanolowego ekstraktu konopnego, natomiast w pozostałych wariantach tego dodatku ilość bakterii nieznaczenie wzrosła. Pod koniec przechowywania najmniejszą ilością bakterii charakteryzował się fermentowany napój mleczny z dodatkiem 2% olejku konopnego.

Początkowa liczba bakterii *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* była niższa niż liczba *S. thermophilus* i mieściła się w zakresie od 8,8 do 8,1 log jtk/mL w świeżych fermentowanych napojach mlecznych. Najbardziej istotne wahania w ilości bakterii obserwowano w próbce zawierającej 2% olejku konopnego. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że sam dodatek wsadu konopnego nie powoduje istotnego zahamowania wzrostu bakterii zarówno *S. thermophilus* jak i *L. delbrueckii*. Natomiast na końcową ilość bakterii w produkcie po fermentacji i po 28 dniach przechowywania wpływa ilość zastosowanego dodatku konopnego (np. 2% olejku konopnego).

Głównym wyznacznikiem potencjalnych właściwości funkcjonalnych jogurtu jest obecność i ilość komórek bakterii jogurtowych i probiotycznych przez cały deklarowany okres przydatności do spożycia na zalecanym poziomie (6 log jtk/mL) (Codex Alimentarius 243-2003). Wymóg ten był spełniony we wszystkich przygotowanych jogurtach przez cały okres przechowywania. Dodatkowo wartości te przekraczały 8 log jtk/mL we wszystkich próbkach eksperymentalnych, co dodatkowo poprawia prozdrowotny potencjał fermentowanych napojów mlecznych. Zgodnie z danymi EFSA zawartość bakterii na tak wysokim poziomie wpływa m.in. na poprawę procesu trawienia laktozy u osób z obniżoną zdolnością do syntezy laktazy jelitowej [Kycia i wsp. 2020, Łopusiewicz i wsp. 2022].

Do chwili obecnej nie ma dostępnych wyników badań dotyczących wykorzystania wsadu na bazie *Cannabis sativa* L. *var. sativa* (etanolowy ekstrakt konopny, olejek konopny czy susz konopny) w produkcji fermentowanych napojów mlecznych. Brakuje także informacji na temat wpływu tych dodatków na przeżywalność bakterii. Dotychczas prowadzone badania dotyczyły dodatku ziół lub przypraw do jogurtów. Illupapalayam i wsp. [2014] przeprowadzili porównanie wpływu dodatku cynamonu, kardamonu oraz gałki muszkatołowej na przeżywalność bakterii podczas 28 dni przechowywania w warunkach chłodniczych (4°C). W zależności od zastosowanego szczepu i obserwowanej zmienności żywotności tych bakterii po 4 tygodniach przechowywania wszystkie jogurty zawierały akceptowalny poziom bakterii fermentacji mlekowej. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki oraz przez Illupapalayam i wsp. [2014] są porównywalne w odniesieniu do ilości log jednostek tworzących kolonie w naturalnym jogurcie probiotycznym po procesie fermentacji.

4.5.2. Ocena zmiany wartości pH podczas produkcji i przechowywania fermentowanego napoju mlecznego zawierającego wsad konopny

Podczas wytwarzania fermentowanego napoju mlecznego określono także zmianę wartości pH podczas fermentacji oraz w trakcie 28 dni przechowywania w warunkach chłodniczych. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 3- Publikacja [P4]. Podczas procesu fermentacji tempo zmian pH było większe w próbkach kontrolnych, zawierających etanolowy ekstrakt konopny (0,5%) oraz susz konopny (0,5 i 1%) niż w pozostałych wariantach. Wskazuje to na różnice w aktywności kultur starterowych w obecności zastosowanych wsadów konopnych. Początkowa wartość pH mleka wynosiła 6,6, a sam dodatek różnych rodzajów wsadu spowodował niewielki wzrost wartości pH do wartości 6,68. Proces fermentacji prowadził do uzyskania końcowej wartości pH zbliżonej do 4,6. Po wyprodukowaniu napojów, pH wszystkich próbek mieściło się w zakresie od 4,55 do 4,65, natomiast po 24 godzinach przechowywania wartość pH zmniejszyła się i wynosiło od 4,40-4,55. W czasie 28 dni przechowywania chłodniczego stwierdzono spadek pH we wszystkich analizowanych próbkach fermentowanych napojów mlecznych. Próbka kontrolna oraz zawierająca 0,5% ekstraktu konopnego charakteryzowały się najniższym pH (4,13) po zakończeniu przechowywania. Za to najwyższą wartość pH odnotowano dla próbki zawierającej 2% wsadu w postaci suszu konopnego. Stwierdzono, że dodatek olejku konopnego (w każdej ilości) oraz większy udział (1 i 2%) pozostałych wsadów w próbkach znacząco wpływa na wydłużenie procesu fermentacji oraz wyższe wartości pH napojów po okresie przechowywania. Autorzy dostępnych wyników dotyczących fermentowanych napojów mlecznych skupiali się na produktach zawierających m.in. suszone wytłoki owocowe. Znamirowska i wsp. [2018] przygotowali jogurty zawierające sproszkowany susz z wytłoków jabłkowy w ilości 1,5 i 3%. Zastosowana przez autorów kultura starterowa była taka sama jak w naszej pracy (YC-X11). Autorzy nie wykazali różnic w wartości pH pomiędzy próbą kontrolną a próbkami zawierającymi suszone wytłoki jabłkowe.

4.5.3. Ocena sensoryczna fermentowanych napojów mlecznych zawierających wsad konopny

Wytworzone fermentowane napoje mleczne poddano ocenie sensorycznej metodą QDA. Definicje wybranych wyróżników jakościowych oraz uzyskane wyniki przedstawiono na Rycinach 12-14 oraz w Publikacji **[P4]**. Wśród ocenianych cech znalazły się zielony kolor i typowy kolor jogurtu, aromat jogurtu, kwaśny, słodki, obcy "trawiasty" aromat, kwaśny smak, gorzki smak, konsystencja, gęstość i ogólna jakość przygotowanych fermentowanych napojów mlecznych.



Rycina 12. Wyróżniki aromatu fermentowanych napojów mlecznych z dodatkiem wsadu konopnego (skala: 0 -niewyczuwalny, 10 – bardzo intensywny)



Rycina 13. Wyróżniki smaku fermentowanych napojów mlecznych z dodatkiem wsadu konopnego (skala: 0 -niewyczuwalny, 10 – bardzo intensywny)



Rycina 14. Gęstość, konsystencja oraz jakość ogólna fermentowanych napojów mlecznych z dodatkiem wsadu konopnego (skala 0-10; gęstość: bardzo rzadka - bardzo gęsta; konsystencja: gładka - wyczuwalne elementy; ogólna jakość: zła - bardzo dobra).

Stwierdzono, że dodatek suszonych konopi (we wszystkich wariantach) miał negatywny wpływ na ogólną jakość przygotowanych próbek. Najlepszą ogólną jakość (9,50) uzyskano dla próbki kontrolnej ze względu na najbardziej odpowiednią gęstość konsystencji, najbardziej wyczuwalny aromat fermentowanego mleka i kolor typowy dla tradycyjnego jogurtu. Spośród napojów fermentowanych zawierających wsad konopny, najlepszą ogólną jakością charakteryzowały się próbki zawierające 0,5% ekstraktu konopnego, a nieco niższe wyniki uzyskano dla próbek z dodatkiem oleju konopnego (wszystkie warianty). Najniższą ogólną jakością charakteryzowały się próbki z dodatkiem 2% suszu konopnego. Ten wariant został oceniony najniżej, ponieważ charakteryzował się zielonym kolorem, najmniej słodkim zapachem, znaczącym obcym "trawiastym" smakiem i gorzkim smakiem. Z drugiej strony należy wspomnieć, że postrzegany gorzki smak i nieodpowiednia tekstura zawierająca grudki wynikały z użycia suszonego produktu, co mogło wpłynąć na percepcję sensoryczną członków zespołu oceniającego. Fermentowane napoje mleczne zawierające olej konopny zostały ocenione bardzo dobrze pod względem tekstury, która była gładka i kremowa w ustach. Zwiększenie ilości tłuszczu w próbkach spowodowało poprawę lepkości i tekstury, co zostało pozytywnie odebrane przez panel sensoryczny. Próbki z dodatkiem ekstraktu z konopi (wszystkie warianty) miały kolor najbardziej zbliżony do typowego jogurtu. Próbki te

charakteryzował najmniej kwaśny i obcy "trawiasty" zapach. Wariant próbki zawierający 0,5% ekstraktu z konopi był najmniej kwaśny ze wszystkich próbek zawierających ekstrakt z konopi.

Podobnie jak w przypadku ciastek kruchych, przedstawione w niniejszej pracy wyniki prezentują jedne z pierwszych badań w zakresie analizy sensorycznej fermentowanych napojów mlecznych wytworzonych z dodatkiem konopi. Opublikowane wcześniej wyniki badań koncentrowały się na ocenie produktów wytworzonych z użyciem ekstraktów z ziół lub roślin bardziej powszechnie stosowanych w produkcji żywności niż *Cannabis sativa* L. Prace obejmowały między innymi wykorzystanie cynamonu, kardamonu, czosnku czy trawy cytrynowej [Illupapalayam i wsp. 2014, Helal i Tagliazucchi 2018]. Illupapalayam i wsp. [2014] przeprowadzili ocenę sensoryczną jogurtów (metodą QDA z wykorzystaniem takiej samej skali oceny) z oleożywicami przypraw wyekstrahowanymi z kardamonu, cynamonu i gałki muszkatołowej. Przygotowane jogurty osiągnęły akceptację sensoryczną wyższą niż 7 j.u. we wszystkich przypadkach. W niniejszej pracy tylko jogurty zawierające ekstrakty z konopi (każdy wariant ilości dodatku) zostały ocenione niżej niż 7 j.u.





Article Exploring the Presence of Cannabinoids in Hemp-Infused Fermented Milk Drinks: An Analysis of Pre- and Post-Fermentation Levels

Joanna Kanabus^{1,*}, Marcin Bryła¹, Katarzyna Kycia², Joanna Markowska³ and Marek Roszko¹

- ¹ Department of Food Safety and Chemical Analysis, Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; marcin.bryla@ibprs.pl (M.B.); marek.roszko@ibprs.pl (M.R.)
- ² Inter-Department Problem Group for Diary Industries, Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; katarzyna.kycia@ibprs.pl
- ³ Department of Refrigeration Technology and Technique, Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Al. Marszalka J. Pilsudskiego 84, 92-202 Lodz, Poland; joanna.markowska@ibprs.pl
- * Correspondence: joanna.kanabus@ibprs.pl

Abstract: Yoghurts are the most popular fermented dairy products. Consumer attention is directed towards products containing inputs that enrich the product with bioactive substances. The growing interest in the *Cannabis sativa* L. plant has resulted in the development of a market for hemp products. The main aim of this research work was to determine the effect of the lactic fermentation process on the stability of cannabinoids in fermented milk beverages containing hemp inputs (hemp oil, dried hemp, ethanolic hemp extract) at 0.5, 1 and 2% (w/v). The effect of the type of hemp input on the technological process (i.e., pH value, viability of LAB during 28 days of storage) was also checked and the sensory quality of the prepared samples was evaluated. It was shown that the choice of type/form and amount of hemp addition influenced the final cannabinoid content of the product after fermentation and post-fermentation, but no effect on the survival of yoghurt bacteria or pH changes during storage was confirmed. Fermented milk drinks containing hemp oil had the highest cannabinoid content. The QDA results of the sensory evaluation of the yoghurts show that the most acceptable product in terms of overall quality is the yoghurt containing 0.5% hemp extract and 2% hemp oil.

Keywords: cannabinoids; fermentation; fermented milk drinks; hemp oil; dried hemp; hemp extract

1. Introduction

Yoghurt is one of the leading dairy products. According to Codex Alimentarius [1], yoghurt is defined as fermented milk with symbiotic starter cultures of Streptococcus thermophilus and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. The yoghurt bacteria (probiotics) must be present in the yoghurt at a minimum of 10⁷ CFU/mL throughout the shelf life, and manufacturers must declare their presence on the label. Probiotics are 'live microorganisms that confer health benefits to the host when administered adequately' [2]. The quality of this fermented dairy beverage is primarily determined by its physical properties, i.e., texture, stability (rate of syneresis) and appropriate consistency [3]. The aforementioned physical characteristics of yoghurt are primarily influenced by the conditions of the fermentation process (e.g., heat treatment of the milk, time and temperature of the process, and cooling time and rate). The quality of yoghurt is undoubtedly influenced by the ingredients used (e.g., milk proteins, stabilisers, fibre and prebiotics), which are usually used for technological, functional or nutritional reasons [3–5].

Functional foods have been proven to have a beneficial effect on one or more bodily functions over and above the nutritional impact, which effect amounts to an improve-



Citation: Kanabus, J.; Bryła, M.; Kycia, K.; Markowska, J.; Roszko, M. Exploring the Presence of Cannabinoids in Hemp-Infused Fermented Milk Drinks: An Analysis of Pre- and Post-Fermentation Levels. *Molecules* 2024, 29, 5056. https:// doi.org/10.3390/molecules29215056

Academic Editor: Antonio-José Trujillo

Received: 27 September 2024 Revised: 22 October 2024 Accepted: 24 October 2024 Published: 26 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). ment in health and well-being and a reduction in the risk of disease [6,7]. These foods are distinguished by their content of bioactive substances, which stimulate the desired metabolic pathway. In contrast, according to Świderski and Kolanowski [8], functional foods should be separated from functional additives. Substances added to food can be divided into two groups: food additives used in the technological process, which directly or indirectly can become food ingredients, and substances added to preserve or improve the nutritional value [7]. These include, among other things, texture stabilisers (agar, inulin, carrageenan, pectin), flavourings (fruit and vegetable injections, cereal grains, nuts, plant extracts), as well as substances of plant origin containing bioactive substances (caffeine, fibre). One of the plant-based additives may be dried Cannabis sativa L. var. sativa plant, as well as extracts or oils of hemp, which contain cannabinoids. This group of compounds has proven health-promoting properties for the human body (e.g., anticonvulsant, anxiolytic and anti-rheumatoid arthritis properties), among which there are two main compounds, i.e., the non-psychoactive CBD (cannabidiol) and the psychoactive Δ^9 -THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) [9]. The positive aspects of adding cannabinoids to food in different charge forms is that the nutritional value of the prepared product can be improved. By introducing cannabinoids dissolved in oil, we also provide omega-3 and omega-6 unsaturated fatty acids, which support the human body's function. The use of dried hemp allows us to increase the amount of protein in the yoghurt and fibre, which also play an important role in human nutrition [9,10]. The development of a hemp extract product with a specific CBD content requires adequate research and knowledge of the raw material. The resulting dried/extract quality depends on the plant variety, growing conditions, harvest time and extraction methods. Cannabinoids are chemically transformed over time by heating, oxidation and interaction with other food components, including enzymes. Therefore, it is essential to estimate the degree of degradation of active ingredients in the food matrix and the product's suitability for consumption [10].

The main aim of this study was to evaluate the influence of the fermentation process and storage time on changes in the cannabinoid profile of model fermented milk drinks with hemp inputs (hemp oil, dried hemp, ethanolic hemp extract) at 0.5, 1 and 2% (w/v). Also, the effect of the hemp addition to the fermented milk drink on changes in pH and lactic acid bacteria viability before and after fermentation and during 28 days of storage was evaluated. In addition, the sensory quality and overall quality of the prepared beverages were also assessed. This is the first paper focusing on preparing fermented dairy beverages with hemp inputs and analysing selected parameters, including the cannabinoid content of the prepared samples.

2. Results and Discussion

2.1. Determination of Cannabinoids in Fermented Milk Drink Samples

The main aim of this study was to evaluate changes in the cannabinoid profile during the production of a fermented dairy beverage by adding different hemp inputs in three variants of additive amounts (0.5, 1 and 2% (w/v)). Figure 1 shows the finished fermented milk drinks with hemp inputs before (A) and after mixing (B).

Validation of the method for the determination of cannabinoids in hemp fermented milk drinks was carried out, and the results (LOD—limit of detection, LOQ—limit of quantitation, R%—recovery rate and RDS%—method repeatability) are presented in Tables S1 and S2 (Supplementary Materials). The effect of storing the prepared samples before 28 days under refrigeration (4 °C) was also checked, and samples for analysis were taken every 7 days. The results obtained for the 17 cannabinoids analysed are shown in Figures 2–4 and Tables S3–S5 (Supplementary Materials).

A - Before mixing





Figure 1. Finished fermented milk drink before (A) and after mixing (B) (own preparation).



Figure 2. Sum of 17 cannabinoids in fermented dairy milk with hemp oil inputs (0.5%, 1% and 2% (w/v)) before and after fermentation and during 4 weeks of storage. ^{a-f}—the different small letters in one amount of the input used, for example, 0.5%, indicate a significant difference ($\alpha < 0.05$) influenced by storage time; ^{A–C}—the different capital letters within the different samples during a specific period of production and storage, e.g., 'after fermentation', indicate significant differences ($\alpha < 0.05$).



Figure 3. Sum of 17 cannabinoids in fermented dairy milk with dried hemp inputs (0.5%, 1% and 2% (w/v)) before and after fermentation and during 4 weeks of storage. ^{a–d}—the different small letters in one amount of the input used, for example, 0.5%, indicate a significant difference ($\alpha < 0.05$) influenced by storage time; ^{A–C}—the different capital letters within the different samples during a specific period of production and storage, e.g., 'after fermentation', indicate significant differences ($\alpha < 0.05$).



Figure 4. Sum of 17 cannabinoids in fermented dairy milk with hemp extract inputs (0.5%, 1% and 2% (w/v)) before and after fermentation and during 4 weeks of storage. ^{a–d}—the different small letters in one amount of the input used, for example, 0.5%, indicate significant differences ($\alpha < 0.05$) influenced by storage time; ^{A–C}—the different capital letters within the different samples during a specific period of production and storage, e.g., 'after fermentation', indicate significant differences ($\alpha < 0.05$).

Different forms of hemp additive resulted in the production of fermented milk drinks characterised by varying levels of cannabinoids. The highest initial total of 17 cannabinoids was characterised by beverages containing a hemp oil-based input (e.g., 1%—103 mg/100 g of product), while the least amount of these compounds was contained in beverages with hemp extract added (e.g., 1%—8.14 mg/100 g of product). Carrying out the fermentation process of dairy beverages with the addition of hemp extract significantly contributed to a more than 10-fold degradation of the cannabinoids present in the product.

In fermented milk drinks containing dried hemp and with the addition of 0.5% hemp oil, no significant reduction in total cannabinoids was observed after the fermentation process. The use of hemp inputs in the form of hemp oil or dried hemp provides up to 10 times the concentration of cannabinoids that are naturally present in the plant or allows more compounds to be concentrated by dissolving them in oil. Cannabinoids are compounds readily soluble in fat, which protects these compounds by preventing their degradation through, for example, oxidation or the heating necessary for pasteurisation and fermentation. The compounds in dried hemp are also not directly exposed to temperature or oxygen, as they are located in the glandular trichomes, where they are synthesised and stored in the plant. The choice of a feedstock in the form of an ethanolic hemp extract does not guarantee a protective effect on the bioactive substances extracted from the plant. Selecting a suitable extraction solvent is important, e.g., herbal extracts. For such extracts, it is possible to use water or ethyl alcohol. Other solvents, i.e., hexane or dichloromethane, are not allowed, and their potential use for extraction requires the solvent to be removed and such a product to be subjected to in vitro and in vivo testing to exclude toxicity [11]. Consumer expectations give direction to yoghurt producers, which should focus on the quantity and variety of products with unique added value.

By exposing the prepared samples of fermented dairy drinks to storage, the stability of both the sum of the 17 analysed cannabinoids and the individual compounds could be determined. The use of inputs in the form of hemp oil yielded products which, after 4 weeks of storage, were characterised by a comparable or higher sum of cannabinoids in the beverage. The cannabinoid content of milk beverages containing dried hemp oil during storage did not change significantly in any variants. The sum of 17 cannabinoids in samples containing ethanolic hemp extract at the beginning of storage was considerably higher than after storage in all variants, where it decreased by more than 90%. The fermentation process significantly affected cannabinoid degradation in the cannabinoid extract product. The high degradation of these compounds (compared to other inputs) may have been due to the absence of structure-stabilising factors for the cannabinoid molecule, which are present in the hemp oil-based and dried inputs [12]. The predominant cannabinoids in the hemp oil-based inputs were CBD (1% input—42.57 mg/100 g of product) and CBG (1% input—51.11 mg/100 g of product), while CBDA was the predominant cannabinoid in the hemp-dried and hemp extract-based inputs (for 1% input—5.32 mg and 3.75 mg/100 g of product, respectively) (Tables S3–S5).

The concentration of CBD increased up to 2-fold after fermentation and storage of the samples containing the hemp oil-based batch, depending on the amount of additive. In the case of CBG, the concentration of this compound, depending on the amount of additive, decreased by up to 10-fold after fermentation, and a gradual increase in concentration was observed during storage, but did not reach the level for the fresh product (milk with the batch before fermentation). The increase in the concentration of CBD and the decrease in the amount of other compounds may be due to, for example, decarboxylation of the acidic precursors for this compound and also the possible isomerisation of Δ 9-THC to CBD [9]. In samples with ethanolic hemp extract added, the fermentation process resulted in more than 90% degradation of CBDA, the concentration of which also decreased during storage.

After fermentation, no cannabinoids were observed in the hemp extract samples analysed, i.e., CBC, CBG, CBDV, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCVA, CBN, CBNA, CBL and CBLA. No Δ^8 -THC was found in any additive variants, and the production process of the fermented dairy beverage with each hemp input also did not contribute to this compound. During storage, CBL and CBLA were not observed in yoghurt samples containing dried hemp. The use of hemp-based batches also carries a risk of the psychoactive Δ^9 -THC and its precursor Δ^9 -THCA. As a result of the fermentation process, more than 90% degradation of these compounds was observed in all variants of fermented milk drinks. Refrigerated storage for 28 days did not affect changes in the concentrations of the compounds in question. Despite the potential risk of Δ^9 -THC in products containing hemp inputs, it has been confirmed that, when delivered to the body via the oral route, both Δ^9 -THC and CBD are degraded in the acidic environment of the stomach and are broken down by enzymes in the gut, resulting in a bioavailability of <20% [13,14]. The observed decrease in Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA concentrations was probably caused by the effect of temperature during the pasteurisation of milk with hemp inputs and the impact of oxygen [15,16].

In 2015, the European Food Safety Authority (EFSA) published a scientific opinion that an adult human's acute reference dose for total Δ^9 -THC should be 1 µg Δ^9 -THC/kg body weight [17]. In contrast, an in-depth European Industrial Hemp Association (EIHA) analy-

sis suggests that this value is too stringent and should be increased to 7 µg Δ^9 -THC/kg body weight. A total daily intake of 5 mg Δ^9 -THC results in a LOEL (Lowest Observable Adverse Effect Level) of 0.07 mg Δ^9 -THC/kg body weight (b.w.) per day, assuming a body weight of 70 kg [18]. Based on this, it can be assumed that the average daily intake of total Δ^9 -THC for a person weighing 70 kg is 70 µg according to the EFSA and 490 µg according to the EIHA. The following equation can be used to assess the potential risk of Δ^9 -THC being present at too high a level in the resulting finished product: the amount of Δ^9 -THC + (0.877 × amount of Δ^9 -THCA-A) [19]. A comparison of the assumptions presented and the results obtained for the prepared model hemp fermented milk drinks are shown in Table 1.

Table 1. Total Δ^9 -THC content before and after fermentation and after 28 days of storage in fermented milk drinks with hemp inputs.

		[1	Total Δ^9 -THC Content ¹ ng/100 g of Ready Product]
	Amount of Hemp Additive % (<i>w</i> /v)	Before Fermentation	After Fermentation	After 4 Weeks of Storage
	0.5	$0.21 \ ^{ m b} \pm 0.01$	0.04 $^{\rm a}\pm 0.01$	$0.04~^{\mathrm{a}}\pm0.01$
Sample with hemp oil	1.0	$0.42~^{ m b}\pm 0.04$	0.05 $^{\rm a}\pm 0.01$	$0.05~^{\rm a}\pm0.01$
	2.0	0.83 $^{\mathrm{b}}\pm0.08$	0.07 $^{\rm a}\pm 0.01$	0.07 $^{\rm a}\pm 0.01$
Sample with dried	0.5	$0.98~^{ m b}\pm 0.04$	$0.03~^{\mathrm{a}}\pm0.01$	$0.03~^{\mathrm{a}}\pm0.01$
bomp	1.0	$1.98~^{ m b}\pm 0.09$	0.05 a \pm 0.01	$0.05~^{\rm a}\pm0.01$
nemp	2.0	$3.94^{\text{ b}} \pm 0.12$	0.07 $^{\mathrm{a}}$ \pm 0.01	$0.07~^{\mathrm{a}}\pm0.01$
	0.5	$0.84~^{ m b}\pm 0.02$	$0.02~^{\mathrm{a}}\pm0.01$	$0.02~^{\mathrm{a}}\pm0.01$
Sample with hemp	1.0	$1.68 {}^{ m b} \pm 0.03$	0.03 $^{ m a}$ \pm 0.01	0.03 $^{\rm a}\pm 0.01$
extract	2.0	$3.34^{\text{ b}} \pm 0.06$	$0.06~^{a}\pm0.01$	0.06 $^{\rm a}\pm 0.01$

¹ The amount of Δ^9 -THC + (0.877 × amount of Δ^9 -THCA-A) [19]. ^{a,b}—the different small letters within the same row indicate a significant difference ($\alpha < 0.05$).

Based on the total Δ^9 -THC content results obtained for the samples containing the hemp inputs, it can be concluded that the finished product after fermentation and after 28 days of refrigerated storage is safe for a potential consumer weighing 70 kg and consuming 100 g of finished product per day.

2.2. Viability of Yoghurt Cultures

Changes in the number of viable cells of *S. thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* after fermentation and during 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage at 4 °C are shown in Table 2.

Table 2. Changes in microbial counts of yoghurt cultures (log cfu/mL) after fermentation and after 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage at 4 °C in hemp-enriched fermented milk drinks.

	Amount of Hemp	After	Storage Time (Days)										
	Additive	Fermentation	1	7	14	21	28						
	Control	$9.2 ^{\text{Ab}} \pm 0.1$	$10.5 ^{\text{Bb}} \pm 0.1$	9.1 $^{\rm Aab}\pm 0.1$	$9.0 \ ^{\rm Aa} \pm 0.2$	$9.3 \ ^{\rm Aa} \pm 0.1$	$9.3 \ ^{\rm Aa} \pm 0.1$						
	Hemp extract 0.5%	$8.7~^{ m Ac}\pm0.1$	9.0 $^{ m Aba} \pm 0.3$	$9.1 \ ^{ m Bab} \pm 0.1$	$9.0~^{ m Aba}\pm0.2$	$9.1 \ ^{\mathrm{Ba}} \pm 0.2$	$9.1 \ ^{\mathrm{Ba}} \pm 0.1$						
	Hemp extract 1%	$10.0 \ ^{\rm Cd} \pm 0.1$	9.0 $^{ m Aba}\pm 0.1$	$9.2 \ ^{\mathrm{Bab}} \pm 0.2$	$8.9~^{ m Aa}\pm0.1$	$8.8~^{\mathrm{Aa}}\pm0.2$	8.8 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.2$						
_	Hemp extract 2%	$8.9^{\mathrm{~Aac}}\pm0.1$	9.2 $^{\mathrm{Ba}}\pm0.1$	9.0 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$	$8.9~^{ m Aa}\pm0.1$	9.0 $^{ m Aba}\pm 0.1$	9.0 $^{ m Aba} \pm 0.1$						
Streptococcus	Dried hemp 0.5%	9.0 $^{ m Aab}\pm 0.1$	9.2 $^{ m Aa}\pm 0.1$	8.9 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$	9.2 $^{ m Aab}\pm 0.1$	9.0 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.2$	9.0 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$						
thermophilus	Dried hemp 1%	9.1 $^{ m Aab}$ \pm 0.1	9.0 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$	8.9 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$	$9.3 \ ^{ m Aab} \pm 0.3$	$9.2~^{ m Aa}\pm0.5$	9.2 $^{ m Aa}\pm0.5$						
	Dried hemp 2%	$9.1 \ ^{ m Bab} \pm 0.1$	9.0 $^{ m Aba}\pm 0.1$	$8.8~^{ m Aa}\pm0.1$	$9.4~^{ m Cb}\pm0.1$	9.0 $^{ m Aba}\pm 0.1$	9.0 $^{ m Aba} \pm 0.1$						
	Hemp oil 0.5%	$8.9 \ ^{ m Aabc} \pm 0.1$	9.1 $^{ m Aa}\pm 0.1$	$8.9~^{ m Aa}\pm0.1$	$9.1 \ ^{ m Aab} \pm 0.1$	$9.2~^{ m Aa}\pm0.4$	9.2 $^{ m Aa}\pm0.2$						
	Hemp oil 1%	9.0 $^{ m Aabc} \pm 0.1$	9.1 $^{ m Aa}\pm 0.1$	$8.8~^{ m Aa}\pm0.2$	$9.1~^{ m Aab}\pm 0.1$	8.8 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.3$	$8.8~^{\mathrm{Aa}}\pm03$						
	Hemp oil 2%	9.0 $^{ m Aabc} \pm 0.1$	9.2 $^{ m Aba}\pm 0.1$	$9.7~^{\text{Bb}}\pm0.6$	9.0 $^{\rm Aa}\pm 0.1$	$8.1 \ ^{\text{Cb}} \pm 0.2$	$8.1^{\rm ~Cb}\pm0.1$						

	Amount of Hemp	After	ter Storage Time (Days)									
	Amount of Hemp Additive Control Hemp extract 0.5% Hemp extract 1% Hemp extract 2% Dried hemp 0.5% Dried hemp 1% Dried hemp 2% Hemp oil 0.5% Hemp oil 1%	Additive Fermentation		7	14	21	28					
	Control	$8.5 \ ^{ m Aab} \pm 0.1$	$8.2 ^{\text{Ba}} \pm 0.1$	$8.3 ^{\text{Bad}} \pm 0.1$	$8.4~^{\rm Aa}\pm0.1$	$8.5 \text{ Abc} \pm 0.1$	$8.5 \ ^{ m Abc} \pm 0.1$					
	Hemp extract 0.5%	$8.6 \ ^{\mathrm{Cab}} \pm 0.1$	$8.3~^{ m Aba}\pm0.1$	$8.5 \ ^{\mathrm{BC}} \pm 0.1$	8.2 $^{\mathrm{Aa}} \pm 0.1$	8.2 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.2$	8.2 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$					
	Hemp extract 1%	8.4 $^{\mathrm{Aa}} \pm 0.2$	$8.2~^{ m Aa}\pm0.1$	$8.3 \ ^{ m Aabd} \pm 0.1$	$9.2 \ ^{ m Bb} \pm 0.2$	8.2 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.2$	8.2 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$					
Lactobacillus	Hemp extract 2%	$8.2~^{ m Ac}\pm 0.1$	$8.3 \ ^{ m Aab} \pm 0.1$	$8.2~^{ m Aa}\pm0.1$	$8.4~^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$	8.2 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$	8.2 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$					
delbrueckii	Dried hemp 0.5%	$8.8~^{ m Ab}\pm0.1$	$8.6 \ ^{ m ACe} \pm 0.1$	$8.4 \ ^{ m BCabc} \pm 0.1$	$8.3 \ ^{\mathrm{Ba}} \pm 0.1$	$8.6~^{ m Ac}\pm0.2$	$8.6~^{\rm Ac}\pm0.1$					
ssp.	Dried hemp 1%	$8.6 \ ^{ m Aab} \pm 0.1$	$8.6 ^{ ext{Abc}} \pm 0.1$	$8.3 \ ^{ m Aabc} \pm 0.1$	8.3 $^{\mathrm{Aa}} \pm 0.3$	$8.3~^{ m Aab}\pm 0.1$	$8.3 \ ^{ m Aab} \pm 0.1$					
bulgaricus	Dried hemp 2%	$8.4~^{ m Aba}\pm 0.1$	$8.4~^{ m ABab}\pm0.1$	$8.4~^{ m Abe}\pm 0.1$	8.5 $^{Ca}\pm0.1$	$8.3 ^{ ext{Aabc}} \pm 0.2$	$8.3 \ ^{ m Aabc} \pm 0.1$					
	Hemp oil 0.5%	$8.5 ^{ ext{Bab}} \pm 0.1$	$8.3~^{ m Aa}\pm0.1$	$8.3 \ ^{ m Aabd} \pm 0.1$	8.3 $^{\mathrm{Aa}} \pm 0.1$	$8.3 ^{ ext{Aabc}} \pm 0.1$	$8.3 \ ^{ m Aabc} \pm 0.1$					
	Hemp oil 1%	$8.5~^{ m Aba}\pm0.1$	$8.3~^{ m Aba}\pm0.1$	$8.4~^{ m ABabc}\pm 0.1$	8.5 $^{\mathrm{Ba}}\pm0.2$	8.2 $^{\mathrm{Aa}}\pm0.1$	$8.2 \ ^{\rm Aa} \pm 0.1$					
	Hemp oil 2%	$8.1~^{ m Ac}\pm 0.1$	$8.6 \ ^{ m ABCb} \pm 0.1$	$8.8~^{\mathrm{Ce}}\pm0.1$	$8.6 \ ^{\mathrm{BCa}} \pm 0.1$	$8.2 ^{ ext{Aba}} \pm 0.2$	$8.2 ext{ Aba} \pm 0.1$					

Table 2. Cont.

^{a–d}—the different small letters within the same row indicate a significant difference ($\alpha < 0.05$) influenced by storage time in one type of yoghurt; ^{A–C}—the different capital letters within the same column indicate significant differences ($\alpha < 0.05$) influenced by the type and amount of hemp input to the yoghurt, e.g., hemp extract.

The initial number of live *S. thermphilus* cells after fermentation ranged from 10.0 to 8.7 log cfu/mL and decreased slightly after 28 days of refrigerated storage and ranged from 9.3 to 8.1 log CFU/mL. The greatest decrease in the number of live *S. thermophilus* bacteria was recorded for the sample containing 1% ethanolic hemp extract, while the number of bacteria increased slightly in the other variants of this additive. The use of three different hemp batches did not adversely affect the number of *S. thermophilus* bacteria during cold storage, and at the end of storage, the beverage with 2% hemp oil had the lowest amount of the bacteria in question.

The initial number of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* was lower than that of *S. thermophilus* and ranged from 8.8 to 8.1 log CFU/mL in the fresh fermented milk drinks. After 28 days of refrigerated storage, *Lactobacillus* viability did not decrease significantly and ranged from 8.6 to 8.2 log CFU/mL. The initial and final amounts of viable Lactobacillus bacteria were the same in the control sample and with 2% hemp extract added. The most significant variation in the number of bacteria was observed in the drinks sample containing 2% hemp oil. Based on the statistical analysis, it was found that the addition of the hemp batch alone did not significantly inhibit the growth of both *S. thermophilus* and *Lactobacillus* bacteria. However, the final number of the bacteria in question in the product after fermentation and after 28 days of storage is influenced by the amount of hemp additive used (e.g., 2% hemp oil).

The main determinant of fermented dairy beverages' potential therapeutic and prophylactic properties is the presence and number of yoghurt and probiotic bacteria cells throughout the declared shelf life at the recommended level (7 log CFU/mL) [1]. This requirement was met in all prepared samples throughout the shelf life. In addition, the values exceeded 8 log CFU/mL in all experimental samples, further enhancing the healthpromoting potential of the finished product. According to EFSA (2010) claims, a bacterial content at such a high level improves lactose digestion in people with reduced intestinal lactase synthesis capacity [4,20,21].

Up to now, there have been no studies on the use of *Cannabis sativa* L. *var. sativa*based additives (ethanolic hemp extract, hemp oil or dried hemp) in the production of fermented milk drinks. There is also a lack of information on the effect of these additives on bacterial survival. Research to date has looked at the addition of herbs or spices to yoghurt. Illupapalayam et al. [22] compared the effects of adding cinnamon, cardamom and nutmeg on bacterial survival during 28 days of refrigerated storage (4 °C). Depending on the strain used and the observed variability in the viability of these bacteria after 4 weeks of storage, all samples analysed contained acceptable levels of lactic fermentation bacteria. The results obtained by us and by Illupapalayam et al. [22] are comparable to the number of log colony-forming units in natural probiotic yoghurt and were 8 log CFU/mL or higher [22,23]. This is the first study demonstrating the potential use of the *Cannabis sativa* L. *var. sativa* plant in the food industry. However, it is important to see how the hemp batches used and the amounts of additives affect the survival of other important probiotic bacteria.

2.3. pH

Changes in pH before and after fermentation and during 28 days of storage at 4 °C are shown in Table 3.

Table 3. Changes in pH after fermentation and during storage (4 weeks) of a fermented dairy drink with hemp input.

		Ch	anges During	Fermentation	(h)		Changes During Storage (Week)						
Milk UHT 3.8%	Milk with Hemp Additive	1	2	3	4	24 (h)	1	2	3	4			
	-	$5.88 \stackrel{\rm Cb}{=} \pm 0.05$	${\begin{array}{c}{4.87}}^{\rm Dc}\pm\\{0.03}\end{array}}$	${}^{4.58}_{-0.02} {}^{\rm Dd *} \pm$		${\begin{array}{*{20}c} 4.50 \ ^{\rm Abe} \\ 0.02 \end{array}} \pm$	${}^{\rm 4.22^{Df}\pm}_{\rm 0.01}\pm$	${\begin{array}{c} 4.19 } ^{\rm Eg} \pm \\ 0.01 \end{array}}$	${}^{\rm 4.13 \ ^{Dh} \pm}_{\rm 0.01} \pm$	${}^{\rm 4.13 \ ^{Dh} \pm}_{\rm 0.01} \pm$			
	${}^{6.66}_{-0.03}{}^{\mathrm{Aba}}_{-0.03}\pm$	$5.92 \stackrel{\rm Bb}{=} \pm 0.04$	${\begin{array}{*{20}c} 4.95 \\ 0.02 \end{array}}^{\rm BCc} \pm$	${}^{4.65\ {\rm Cd}*}_{0.01}\pm$		${}^{\rm 4.53\ Abe}_{\rm \ 0.04}\pm$	${}^{\rm 4.23^{Df}\pm}_{\rm 0.01}$	${}^{\rm 4.22{}^{\rm Df}}_{\rm 0.01}\pm$	${}^{\rm 4.13 \ ^{Dg} \pm}_{\rm 0.02} \pm$	$\begin{array}{c} 4.13 \\ \pm 0.05 \end{array}^{\text{CDg}}$			
6.60 ^a ± 0.05	$6.68^{ m Aba} \pm 0.03 \\ 6.68^{ m Aba} \pm 0.03$	$6.00 \stackrel{\text{Bb}}{=} \pm \\ 0.02 \\ 6.12 \stackrel{\text{Ab}}{=} \pm \\ 0.02 \end{cases}$	$\begin{array}{r} 5.00 {}^{\rm Bc} \pm \\ 0.04 \\ 5.19 {}^{\rm Ac} \pm \\ 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{r} 4.71 {}^{\rm Bd} \pm \\ 0.02 \\ 4.81 {}^{\rm Ad} \pm \\ 0.04 \end{array}$	$\begin{array}{r} 4.63 \\ \pm \ 0.02 \\ 4.65 \\ ^{\rm Ae*} \pm \\ 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{c} 4.46 {}^{\rm ABf} \pm \\ 0.04 \\ 4.52 {}^{\rm Af} \pm \\ 0.02 \end{array}$	$\begin{array}{r} 4.27 {}^{\rm Cg} \pm \\ 0.02 \\ 4.32 {}^{\rm Bg} \pm \\ 0.01 \end{array}$	$4.25 \stackrel{ m CDg}{\pm 0.02} \\ 4.27 \stackrel{ m Ch}{\pm 0.02} \\ 0.02$	$\begin{array}{c} 4.15\ ^{\rm CDh} \\ \pm\ 0.01 \\ 4.20\ ^{\rm Ci}\ \pm \\ 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{c} 4.15 \\ \pm \ 0.02 \\ 4.17 \\ ^{\rm Cij} \pm \\ 0.03 \end{array}$			
	${}^{6.61\ {\rm Aa}}_{0.03}\pm$	$5.52 \stackrel{{ m Eb}}{0.04} \pm$	${\begin{array}{*{20}c} 4.75 {}^{\rm Ec} \\ 0.04 \end{array}} \pm$	${}^{4.55{}^{\rm Dd}*}_{0.03}\pm$		${\begin{array}{*{20}c} 4.40 & {}^{\rm Be} \\ 0.02 \end{array}} \pm$	${\begin{array}{*{20}c} 4.32 ^{Bf} \pm \\ 0.01 \end{array}}$	${\begin{array}{c}{4.22}}^{\rm Dg}\pm\\{0.02}\end{array}}$	${\begin{array}{*{20}c} 4.16 {}^{\rm Ch} \\ 0.02 \end{array}} \pm$	${\begin{array}{*{20}c} 4.14 ^{\rm Di} \pm \\ 0.04 \end{array}}$			
	$\begin{array}{c} 6.64 \ ^{\rm Aa} \pm \\ 0.01 \\ 6.65 \ ^{\rm Aa} \pm \\ 0.04 \\ 6.60 \ ^{\rm Aa} \pm \\ 0.02 \\ 6.61 \ ^{\rm Aa} \pm \\ 0.02 \\ 6.61 \ ^{\rm Ab} \pm \\ 0.02 \\ 6.61 \ ^{\rm Ab} \pm \\ 0.02 \\ 6.60 \ ^{\rm Aba} \pm \\ 0.00 \\ 6.60 \ ^{\rm Aba} \pm \\ 0.04 \end{array}$	$\begin{array}{l} 5.52 \stackrel{\rm Eb}{=} \pm \\ 0.04 \\ 5.63 \stackrel{\rm Db}{=} \pm \\ 0.02 \\ 5.89 \stackrel{\rm Cb}{=} \pm \\ 0.05 \\ 5.89 \stackrel{\rm Cb}{=} \pm \\ 0.02 \\ 5.98 \stackrel{\rm Bb}{=} \pm \\ 0.05 \\ 0.05 \end{array}$	$\begin{array}{r} 4.77 {}^{\rm Ec} \pm \\ 0.05 \\ 4.96 {}^{\rm Cc} \pm \\ 0.01 \\ 4.94 {}^{\rm BCc} \pm \\ 0.05 \\ 4.92 {}^{\rm Cc} \pm \\ 0.04 \\ 5.04 {}^{\rm Bc} \pm \\ 0.06 \end{array}$	$\begin{array}{r} 4.57 {}^{\rm Dd}* \pm \\ 0.01 \\ 4.75 {}^{\rm Bd} \pm \\ 0.03 \\ 4.71 {}^{\rm BCd} \pm \\ 0.05 \\ 4.72 {}^{\rm Bd} \pm \\ 0.05 \\ 4.75 {}^{\rm ABd} \pm \\ 0.06 \end{array}$	$\begin{array}{r} 4.65 & ^{\rm Ae*} \pm \\ & 0.01 \\ 4.59 & ^{\rm Be*} \pm \\ & 0.02 \\ 4.58 & ^{\rm Be*} \pm \\ & 0.02 \\ 4.65 & ^{\rm Ae*} \pm \\ 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{l} 4.46 \ ^{\rm Abe} \pm \\ 0.04 \\ 4.52 \ ^{\rm Af} \pm \\ 0.02 \\ 4.53 \ ^{\rm ABf} \pm \\ 0.04 \\ 4.48 \ ^{\rm ABf} \pm \\ 0.03 \\ 4.55 \ ^{\rm Af} \pm \\ 0.04 \end{array}$	$\begin{array}{l} 4.35 {}^{\rm Bf} \pm \\ 0.02 \\ 4.55 {}^{\rm Af} \pm \\ 0.02 \\ 4.27 {}^{\rm Cg} \pm \\ 0.03 \\ 4.27 {}^{\rm Cg} \pm \\ 0.01 \\ 4.27 {}^{\rm Cg} \pm \\ 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{l} 4.31 {}^{\rm Bf} \pm \\ 0.03 \\ 4.48 {}^{\rm Ag} \pm \\ 0.03 \\ 4.25 {}^{\rm Cg} \pm \\ 0.01 \\ 4.25 {}^{\rm Cg} \pm \\ 0.01 \\ 4.26 {}^{\rm Cg} \pm \\ 0.02 \end{array}$	$\begin{array}{l} 4.26 \ ^{\rm Bg} \pm \\ 0.03 \\ 4.40 \ ^{\rm Ah} \pm \\ 0.02 \\ 4.17 \ ^{\rm Ch} \pm \\ 0.01 \\ 4.20 \ ^{\rm Ch} \pm \\ 0.02 \\ 4.25 \ ^{\rm Bg} \pm \\ 0.02 \end{array}$	$\begin{array}{c} 4.18\ ^{\rm Ch}\pm\\ 0.03\\ 4.36\ ^{\rm Ahi}\pm\\ 0.03\\ 4.17\ ^{\rm BCi}\pm\\ 0.04\\ 4.20\ ^{\rm BCh}\pm\\ 0.05\\ 4.24\ ^{\rm Bgh}\pm\\ 0.05\end{array}$			
	Milk UHT 3.8% 6.60 ^a ± 0.05	$\begin{array}{c c} \mbox{Milk with} \\ \mbox{Hemp} \\ \mbox{Additive} \\ \mbox{3.8\%} \\ \mbox{additive} \\ addi$	$\begin{array}{c c c c c c c } & \begin{tabular}{ c c c } \hline Milk & \mbox{with} & \mbox{Hemp} & \mbox{1} \\ \hline Milk & \mbox{Hemp} & \mbox{Additive} & \mbox{1} \\ \hline \mbox{3.8\%} & \mbox{Additive} & \mbox{1} \\ \hline \mbox{Additive} & \mbox{1} \\ \hline \mbox{3.8\%} & \mbox{Additive} & \mbox{3.8\%} & \mbox{5.92 } \mbox{Bb} \pm \\ 0.03 & 0.04 & & \\ 0.03 & 0.02 & & \\ 6.66 & \mbox{Aba} \pm & 6.00 & \mbox{Bb} \pm \\ 0.03 & 0.02 & & \\ 6.68 & \mbox{Aba} \pm & 6.02 & \mbox{Bb} \pm \\ 0.03 & 0.02 & & \\ 6.68 & \mbox{Aba} \pm & 6.12 & \mbox{Ab} \pm & \\ 0.03 & 0.02 & & \\ 6.64 & \mbox{Aa} \pm & 5.52 & \mbox{Eb} \pm & \\ 0.01 & 0.04 & & \\ 0.04 & 6.64 & \mbox{Aa} \pm & 5.52 & \mbox{Eb} \pm & \\ 0.01 & 0.04 & & \\ 6.60 & \mbox{Aa} \pm & 5.89 & \mbox{Cb} \pm & \\ 0.02 & 0.02 & & \\ 6.67 & \mbox{Aba} \pm & 5.89 & \mbox{Cb} \pm & \\ 0.02 & 0.02 & & \\ 6.67 & \mbox{Aba} \pm & 5.98 & \mbox{Bb} \pm & \\ 0.04 & 0.05 & & \\ \end{array}$	$\begin{array}{c c c c c c } \mbox{Changes During} \\ \hline Milk UHT \\ UHT \\ 3.8\% & \begin{array}{c} Milk with \\ Hemp \\ Additive \end{array} & 1 & 2 \\ \hline & & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & \\$	Changes During Fermentation Milk UHT 3.8% Milk with Hemp Additive 1 2 3 3.8% Additive 1 2 3 $6.60^{a} \pm$ 0.05 $5.88^{Cb} \pm$ 0.03 $4.87^{Dc} \pm$ 0.03 $4.58^{Dd*} \pm$ 0.02 0.02 $6.66^{Aba} \pm$ 0.03 $5.92^{Bb} \pm$ 0.04 $4.95^{BCc} \pm$ 0.02 $4.65^{Cd*} \pm$ 0.01 0.02 $6.68^{Aba} \pm$ 0.03 $6.00^{Bb} \pm$ 0.02 $5.00^{Bc} \pm$ 0.04 $4.71^{Bd} \pm$ 0.02 0.04 $6.61^{Aa} \pm$ 0.03 $6.12^{Ab} \pm$ 0.04 $5.19^{Ac} \pm$ 4.75^{Ec} \pm 4.55^{Dd*} \pm 0.04 $4.81^{Ad} \pm$ 0.03 0.02 $6.64^{Aa} \pm$ 0.03 $5.52^{Eb} \pm$ 4.77^{Ec} \pm 4.55^{Dd*} \pm 0.04 $4.57^{Dd*} \pm$ 0.03 0.01 $6.64^{Aa} \pm$ 0.02 $5.52^{Eb} \pm$ 4.94^{BCc} \pm 4.75^{Ed} \pm 0.03 0.01 0.03 $6.66^{Aa} \pm$ 0.02 0.05 0.05 0.05 0.05 $6.60^{Aa} \pm$ 0.02 0.02 0.01 0.03 0.05 $6.67^{Aba} \pm$ $5.89^{Cb} \pm$ 4.92^{Cc} \pm 4.71^{BCd} \pm $4.71^{BCd} \pm$ 0.02 0.02 0.04 0.05	$\begin{array}{ c c c c } \hline Changes During Fermentation (h) \\ \hline Milk With Hemp Additive 1 2 3 4 \\ \hline Milk With Hemp Additive 1 2 3 4 \\ \hline 1 2 38\% 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ \hline 1 2 38\% 1 \\ 1 2 38\% 1 \\ 1$	$\begin{array}{ $	$\begin{array}{ c c c c c } \hline Changes During Fermentation (h) \\ \hline Milk With Hemp Additive 1 1 2 3 4 24 (h) \\ \hline Hemp Additive 1 2 8 4.87 \ Dc \pm 0.03 0.02 \\ \hline 0.01 & 0.02 0.01 \\ \hline 0.02 & 0.01 \\ \hline 0.02 & 0.01 \\ \hline 0.04 & 0.02 \\ \hline 0.03 & 0.02 \\ \hline 0.04 & 0.02 \\ \hline 0.01 & 0.04 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.01 \\ \hline 0.05 \\ \hline 0.05 \\ \hline 0.05 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.01 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.01 \\ \hline 0.04 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.01 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.01 \\ \hline 0.04 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.01 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0.02 \\ \hline 0.03 \\ \hline 0$	Changes During Fermentation (h)Changes During StoragMilk UHT 3.8%Milk with Hemp Additive123424 (h)125.88 $^{Cb} \pm$ 4.87 $^{Dc} \pm$ 4.58 $^{Dd*} \pm$ 4.50 $^{Abe} \pm$ 4.22 $^{Df} \pm$ 4.19 $^{Eg} \pm$ 6.66 $^{Aba} \pm$ 5.92 $^{Bb} \pm$ 4.95 $^{BCc} \pm$ 4.65 $^{Cd*} \pm$ 4.53 $^{Abe} \pm$ 4.22 $^{Df} \pm$ 4.22 $^{Df} \pm$ 6.66 $^{Aba} \pm$ 5.92 $^{Bb} \pm$ 4.95 $^{BCc} \pm$ 4.65 $^{Cd*} \pm$ 4.63 $^{Abe} \pm$ 4.23 $^{Df} \pm$ 4.22 $^{Df} \pm$ 6.68 $^{Aba} \pm$ 6.00 $^{Bb} \pm$ 5.00 $^{Bc} \pm$ 4.71 $^{Bd} \pm$ 4.63 $^{Abe*} \pm$ 4.27 $^{Cg} \pm$ 4.22 $^{Cp} \pm$ 0.03 0.02 0.04 0.02 ± 0.02 0.04 0.02 ± 0.02 6.68 $^{Aba} \pm$ 6.12 $^{Ab} \pm$ 5.19 $^{Ac} \pm$ 4.81 $^{Ad} \pm$ 4.65 $^{Ae*} \pm$ 4.52 $^{Af} \pm$ 4.32 $^{Bg} \pm$ 4.27 $^{Cg} \pm$ 0.03 0.02 0.01 0.04 0.01 0.02 0.01 0.02 6.64 $^{Aa} \pm$ 5.52 $^{Eb} \pm$ 4.75 $^{Ec} \pm$ 4.55 $^{Dd*} \pm$ 4.65 $^{Ae*} \pm$ 4.32 $^{Bf} \pm$ 4.22 $^{Dg} \pm$ 0.03 0.04 0.04 0.03 0.01 0.02 0.01 0.02 0.04 0.04 0.02 0.01 0.02 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.05 0.02 0.01 0.02 0.04 0.02 <td>$\begin{array}{ c c c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c } \hline \begin{tabuar}{ c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c }$</td>	$ \begin{array}{ c c c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c } \hline \begin{tabuar}{ c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c } \hline \begin{tabular}{ c c c }$			

*—end of fermentation. Data are presented as mean \pm standard deviation (n = 3). Means with different letters within rows (^{a–j}) and within columns (^{A–E}) differ significantly ($\alpha < 0.05$).

During the fermentation process, the changes in pH decreased more in control samples containing ethanolic hemp extract (0.5%) and dried hemp (0.5 and 1%). This indicates differences in starter culture activity in the presence of the hemp inputs used. The initial pH of the milk was 6.6, and the addition of the different types of feedstock alone increased the pH of the milk with the hemp feedstock. The fermentation process was carried out until the pH was close to 4.6. The pH value chosen is optimal for adequate growth of both Lactobacillus delbruecki ssp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus [24]. The length of fermentation depended on the amount and type of feedstock used. The fermentation process was shorter (3 h) for the control samples and those containing 0.5% hemp as extract and 0.5% and 1% dried hemp compared to the others, where it took 4 h. After the fermented milk beverage was produced, the pH of all samples ranged from 4.55 to 4.65, while after 24 h, the pH decreased and ranged from 4.40 to 4.55. During 28 days of refrigerated storage, a decrease in pH was found in all samples analysed. The control sample and the sample containing 0.5% hemp extract had the lowest pH (4.13) after storage. In contrast, the sample containing 2% dried hemp was found to have the highest pH value. It was found that the addition of hemp oil (in any quantity) and a higher proportion (1 and 2%) of the other feedstocks in the fermented milk drinks significantly prolonged the fermentation process.

This is the first study to analyse pH changes during fermentation and storage of fermented dairy drinks containing a hemp-based input. Samples containing dried hemp are most easily compared to those containing, for example, dried fruit pomace or herbs. Znamirowska et al. [24] prepared samples containing powdered dried apple pomace at 1.5% and 3%. The starter culture used by the authors was the same as in our work (YC-X11). The authors showed no pH difference between the control and dried apple pomace samples.

Ziarno et al. [25] compared the effect of the amount of addition (0.2–5 wt%) of extract of selected herbs on fermentation efficiency. The herbs used were valerian (*Valeriana officinalis* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), chaste (*Cistus* L.), lime blossom (*Tilia* L.), plantain (*Plantago lanceolata* L.) and valerian (*Althaea* L.). The observed pH changes during fermentation confirmed that the extracts used did not inhibit the activity of the lactic fermentation bacteria. It was found that a higher addition of herbal extracts resulted in a fermented beverage with a higher pH. The results obtained in the cited work are similar to those obtained in our work, suggesting that a hemp input is possible but requires more detailed research.

2.4. Sensory Quality of Fermented Milk Drinks with Hemp Inputs

The characteristics of the sensory quality attributes and the results of the QDA sensory evaluation of fresh fermented dairy beverages are shown in Figures 5–7.







Figure 6. Flavour determinants of control fermented milk beverages and with hemp inputs (scale: 0—undetectable, 10—very intense).



Figure 7. Density, consistency and overall quality of prepared fermented milk beverage control and with hemp inputs (scale 0–10; density: very thin—very thick; consistency: smooth—perceptible elements; overall quality: bad—very good).

Among the attributes assessed were green colour and typical yoghurt colour, yoghurt aroma, sour, sweet, foreign 'grassy' aroma, sour taste, sour taste, bitter taste, consistency, density and overall quality of the prepared fermented dairy drinks. The prepared samples' overall quality was negatively affected by the addition of dried hemp (all variants). The best overall quality (9.50) was obtained for the control sample due to it having the most suitable consistency density, the most noticeable aroma of fermented milk and the colour typical of traditional yoghurt. Of the fermented beverages containing hemp inputs, the best overall quality was characterised by samples containing 0.5% hemp extract and slightly lower scores were obtained for samples with the addition of hemp oil (all variants). The lowest overall quality was characterised by samples with 2% dried hemp added. This variant was rated lowest because it was characterised by a green colour, the least sweet smell, a significant extraneous 'grassy' taste and a bitter taste.

On the other hand, it should be mentioned that the perceived bitter taste and the inadequate texture containing lumps were due to the use of the dried product, which may have affected the sensory perception in the mouth of the panellists. The fermented dairy drinks containing the hemp oil inputs were rated very good in terms of texture, which was smooth and creamy in the mouth. Increasing the amount of fat in the samples resulted in improved viscosity and texture, which was positively received by the sensory panel. The samples with hemp extract added (all variants) had the colour most similar to typical yoghurt. These samples had the least acidic and extraneous 'grassy' smell. The sample variant containing 0.5% hemp extract was the least acidic of all samples containing hemp inputs.

This is the first study on the sensory analysis of fermented dairy drinks with hemp inputs in different forms and contents. Previous studies have focused on preparing samples with extracts of herbs or plants more common than *Cannabis sativa* L. and include cinnamon, cardamom, garlic and lemongrass, among others [22,26]. Illupapalayam et al. [22] conducted a sensory evaluation of yoghurts with spice oleoresins extracted from cardamom, cinnamon and nutmeg. The prepared yoghurts achieved a sensory acceptance higher than 7 IU (conventional units) in all cases. In our study, only yoghurts containing hemp extracts (each variant of additive quantity) were rated lower than 7 IU.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Freeze-dried hemp was prepared by freeze-drying the inflorescences of the *Cannabis sativa* L. *var. sativa* plant of the 'Białobrzeskie' variety. The plants were obtained from the Institute of Natural Fibers and Herbaceous Plants (Poznań-Pętkowo, Poland). The plants were harvested at the peak of flowering (between the twentieth day after the start of flowering and the tenth day after the end of flowering) [27]. Ethanolic hemp extract was obtained by cannabinoid extraction with ethanol using the method of Kanabus et al. [15]. Commercially available hemp oil (18% CBD + CBDA) as a dietary supplement was purchased from SM Mlekpol (Grajewo, Poland). Yoghurt culture YC-X11 Yo-Flex containing *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bularicus* and *Streptococsspcus thermophilus* was obtained from Chr. Hansen (Cząstków Mazowiecki, Poland).

3.2. Preparation of Fermented Milk Drinks

A control sample of fermented milk drinks without hemp was prepared, as well as experimental samples with 0.5, 1.0 and 2.0% (w/v) hemp inputs (hemp extract after extraction with ethanol, dried hemp and hemp oil). Due to the intense odour, colour and differences in consistency of the selected batches, it was decided to add smaller amounts to these batches in order to be able to develop this topic in the future. The hemp additives were weighed in test tubes, then added and mixed into milk. The samples were pasteurised at 93 \pm 2 °C for 5 min, cooled to 42 \pm 2 °C and inoculated by the addition of yoghurt starter culture YC-X11 at a concentration of 0.1 g/L of milk. After mixing thoroughly, the inoculated milk was incubated at 42 ± 2 °C until the pH reached 4.60 ± 0.05 . The fermentation was stopped at this pH by cooling the products in an icewater bath. Afterwards, set yoghurts were placed in the fridge at 4 °C for 28 days. Each batch of yoghurt was prepared in triplicate. The storage time and conditions adopted for the model products were intended to simulate the time (21–28 days on average) and conditions of shelf storage (4-6 °C). This study was designed to test the survival rate of lactic fermentation bacteria in fermented dairy beverages with the addition of different hemp inputs. Also, the aim was to check whether the different forms of the additives affect the quality and safety of the prepared product.

3.3. Chemicals and Reagents

The certified reference materials of cannabidiol (CBD), cannabidiolic acid (CBDA), cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), cannabinol (CBN), cannabidiolic acid (CBNA), cannabidivarinic acid (CBDVA), cannabicyclol (CBL) and cannabicyclic acid (CBLA) were provided in 1.0 mg/mL solutions in methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN) by Restek GmbH (Bad Homburg, Germany). Cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromenic acid (CBCA), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A), Δ^9 -tetrahydrocannabivarinic acid (Δ^9 -THCVA) and cannabidivarin (CBDV) were purchased from LGC Standards (Teddington, UK). Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV) was provided in 1.0 mg/mL solutions in MeOH or ACN by Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). The certified purity value for all the CRMs was > 98.00%. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)-grade water, ACN and MeOH were purchased from Witko (Łódź, Poland). Formic acid and ammonium formate (LC-MS grade) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.4. Preparation of Standard Solutions and Calibration Curves

Standard 100 μ g/mL solutions for all 17 cannabinoids were prepared by dissolving 1.0 mL of the compound reference standard in ACN or MeOH using 10 mL volumetric flasks separately. This step was repeated as it was necessary to prepare higher dilutions for most compounds except CBD and CBDA. All solutions were stored at <-80 °C. Eightpoint curves were prepared for 17 cannabinoids in different ranges, which were generated

using Thermo TraceFinderTM software, version 5.1 (Thermo Fisher Scientific, Pleasanton, CA, USA).

3.5. Extraction of Cannabinoids from Fermented Milk Samples

The samples were mixed thoroughly before analysis. For each sample, 1 g of fermented milk was weighed in a 50 mL Falcon vial and extracted with 9 mL ACN. The samples were shaken for 15 min and then centrifuged (2 min 10,000 rpm) using an MPW-380R centrifuge from MPW Med. Instruments (Warsaw, Poland). For analysis, 1 mL of extract was filtered through a 0.22 μ m 13 mm syringe filter (LLG Labware, Meckenheim, Germany).

3.6. Analysis of Cannabinoids by UHPLC-HESI-MS

Cannabinoids were analysed using an ultra-high-performance liquid chromatography-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry setup operating with a heated electrospray interface (UHPLC-HESI-MS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Detailed information on the determination of cannabinoids is described by Kanabus et al. [15].

3.7. Method Validation

The results obtained for the development and validation of the cannabinoid determination method used in this article are shown in Table S1. To confirm and maintain the validity of the method used, control yoghurt samples were fortified at three levels for each cannabinoid. The recoveries achieved were within the target range of 80–120% and fulfilled the guidelines in ICH 2005 (https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analyticalprocedures-scientific-guideline, accessed on 1 July 2024) and AOAC 2002 (https://aoac.org, accessed on 1 July 2024) [15].

3.8. Microbiological Analyses

The enumeration of yoghurt characteristic microorganisms was conducted after 1,7,14,21 and 28 days of storage at 4 °C in duplicates using plate techniques as reported in the ISO Standard (ISO 7889:2003) [28]. For S. thermophilus enumeration, M17 agar (Merck, Warsaw, Poland) was used, and the incubation was done aerobically at 37 °C for 48 h. Lactobacillus was enumerated using MRS agar (Merck) at pH 5.2 by anaerobic incubation (Biomeriux, Marcy-l'Étoile, France, GENbag anaer) at 37 °C for 72 h.

3.9. pH

The changes in pH of yoghurts were measured during fermentation and after 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage at 4 °C in triplicate using a SevenExcellence pH meter S400 (Mettler-Toledo, Warsaw, Poland).

3.10. Sensory Analysis

Quantitative descriptive analysis (QDA) was carried out according to an ISO procedure (ISO 13299:2016) to evaluate the sensory properties of fermented dairy drink samples the day after manufacture [29]. QDA is a method recognised as a good tool for measuring the sensory attributes of different dairy products [30,31]. Sensory testing was carried out after obtaining approval from the University Ethical Committee (UEC) for Research with Human Participation Resolution No. UEC/14/2023 (UEC University of Life Sciences in Lublin). Sensory evaluation was carried out by a 6-member trained sensory panel. Approximately 5 g of each prepared fermented dairy drink variant was submitted for assessment. The panel selected and defined the attributes that most consistently described the yoghurt products. The following attributes were selected: colour green, typical of yoghurt, yoghurt aroma, sour, sweet, extraneous 'grassy', taste sweet, sour, sour, bitter, extraneous 'grassy', texture and density. The intensity of these attributes was measured using a 10-centimetre linear unstructured graphical scale, anchored from 0 (none) to 10 (very intense). In addition, based on the aforementioned distinguishing attributes, the overall sensory quality of the

samples was further determined using a separate scale from 0 (low) to 10 (high). The results were expressed in IU (conventional units).

3.11. Statistical Analysis

All experiments and analyses performed were carried out in triplicate. The results are presented as mean measurement values. Statistical analyses were carried out using Statistica 13 software. The effects of hemp feed addition and storage time on the pH value, viable bacteria count and sensory evaluation of the prepared yoghurts were analysed by one-way ANOVA. Differences between the results were tested for significance (p < 0.05). The homogeneity of the groups was determined using the Tukey HSD test.

4. Conclusions

This study showed that the choice of hemp input form for producing a fermented dairy beverage influences the amount of cannabinoids in the final product. The type of hemp input also influences the sensory acceptance of the resulting fermented products. Samples containing hemp oil had the highest overall quality among the analysed variants. It was also shown that the cold storage time of the fermented dairy beverages did not significantly affect the reduction of lactic fermentation bacteria. Also, no pH value increase suggesting product spoilage was observed. Based on the results, the possibility of using hemp-based batches based on *Cannabis sativa* L. *var. sativa* for the production of fermented milk drinks was confirmed.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https:// www.mdpi.com/article/10.3390/molecules29215056/s1, Table S1: Correlation coefficient, analytical ranges, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ); Table S2: Recovery rate (R%) and method repeatability (expressed as relative standard deviation, RSD%) for individual analytes at three different fortification levels (n = 5); Table S3: Cannabinoids determined in fermented milk drink with hemp extract input (0.5%, 1% and 2% (w/v)); Table S4: Cannabinoids determined in fermented milk drink with dried hemp input (0.5%, 1% and 2% (w/v)); Table S5: Cannabinoids determined in fermented milk drink with dried hemp input (0.5%, 1% and 2% (w/v)); Table S5: Sensory quality determinants used in the profile evaluation of samples with hemp input; Table S7: Results of the profile analysis of hemp-infused fermented milk drinks (0–10 scale).

Author Contributions: Conceptualization, J.K. and M.B.; methodology, J.K., M.B., J.M. and K.K.; validation, J.K. and M.B.; formal analysis, M.R. and M.B.; investigation, J.K., K.K. and J.M.; resources, K.K. and M.B.; data curation, J.K. and M.B.; writing—original draft preparation, J.K.; writing—review and editing, J.K., M.B., K.K. and J.M.; visualization, J.K.; supervision, M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Life Science in Lublin, Poland (UEC/14/2023, 13.12.2023).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials; further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

 FAO/WHO Food Standard. Codex Alimentarius Commission. 2003. Codex Standard for Fermented Milks: Codex STAN 243. Available online: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%25 2Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS+243-2003%252FCXS_243e.pdf (accessed on 2 September 2024).

- Hill, B.C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, B.C.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, *11*, 506–514. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Lee, W.J.; Lucey, J.A. Formation and Physical Properties of Yoghurt. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 2010, 23, 9. [CrossRef]
- Kycia, K.; Chlebowska-Śmigiel, A.; Szydłowska, A.; Sokół, E.; Ziarno, M.; Gniewosz, M. Pullulan as a potential enhancer of Lactobacillus and Bifidobacterium viability in symbiotic low fat yoghurt and its sensory quality. *LWT Food Sci. Technol.* 2020, 128, 109414. [CrossRef]
- 5. Zare, F.; Boye, J.; Orst, V.; Champagne, C.; Simpson, B. Microbial, physical and sensory properties of yoghurt supplemented with lentil flour. *Food Res. Int.* 2011, 44, 2482–2488. [CrossRef]
- 6. Świderski, F.; Waszkiewicz-Robak, B. Processed Food Commodities with Elements of Technology, 1st ed.; SGGW: Warsaw, Poland, 2010.
- Cisło, K.; Szostak, K.; Wołanciuk, A.; Kędzierska-Matysek, M.; Dopieralska, P. Characteristics of fermented milk drinks using yoghurt as an example. In *Bioeconomy and the Environment*, 1st ed.; University of Life Sciences Publishing House: Lublin, Poland, 2018.
- 8. Świderski, F.; Kolanowski, W. New food product containing polyunsaturated fatty acids omega-3 epa, dha—sensory quality and possibility of diet supplementation. *Ann. Natl. Inst. Hyg.* **1999**, *50*, 427–434.
- 9. Kanabus, J.; Bryła, M.; Roszko, M.; Modrzewska, M.; Pirzegalski, A. Cannabinoids—Characteristics and potential for use in food production. *Molecules* **2021**, *26*, 6723. [CrossRef]
- Markowska, J.; Polak, E.; Drabent, A.; Żak, A. Cannabis sativa L.—Varieties, properties. Food Sci. Technol. Qual. 2021, 28, 90–105. [CrossRef]
- 11. Granato, D.; Santos, J.S.; Salem, R.D.S.; Mortazavian, A.M.; Rocha, R.S.; Cruz, A.G. Effects of herbal extracts and quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: A technological perspective. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *19*, 1–7. [CrossRef]
- 12. Citti, C.; Pacchetti, B.; Vandelli, M.A.; Forni, F.; Cannazza, G. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *149*, 532–540. [CrossRef]
- Garrett, E.R.C.; Hunt, A. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharm. Sci.* 1974, 63, 1056–1064. [CrossRef]
- Gonçalves, J.; Rosado, T.; Soares, S.; Simão, A.Y.; Caramelo, D.; Luís, Â.; Fernández, N.; Barroso, M.; Gallardo, E.; Duarte, A.P. Cannabis and its secondary metabolites: Their use as therapeutic drugs, toxicological aspects, and analytical determination. *Medicines* 2019, *6*, 31. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Kanabus, J.; Bryła, M.; Roszko, M. The Development, Validation, and Application of a UHPLC-HESI-MS Method for the Determination of 17 Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *var. sativa Plant Material. Molecules* **2023**, *28*, 8008. [CrossRef]
- 16. Garcia-Valverde, M.T.; Snachez-Carnerero Callado, C.; Diaz-Linan, M.C.; Sanchez de Medina, V.; Hidalgo-Garcia, J.; Nadal, X.; Hanus, L.; Ferreiro-Vera, C. Effect of temperature in the degradation of cannabinoids: From a brief residence in the gas chromatography inlet port to a longer period in thermal treatments. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 1038729. [CrossRef] [PubMed]
- 17. Scientific Opinion on the Risks for Human Health Related to the Presence of Tetrahydrocannabinol (THC) in Milk and Other Food of Animal Origin. *EFSA J.* **2015**, *13*, 4141. [CrossRef]
- 18. EIHA Contribution on Maximum Levels for THC in Food. 2020. Available online: https://eiha.org/wp-content/uploads/2020 /12/EIHA-contribution-on-THC-maximum-levels-in-food.pdf (accessed on 2 September 2024).
- 19. Commission Regulation (EU) 2023/915 of 23 April 2023. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj (accessed on 2 September 2024).
- Scientific Opinion on the Substantiation of Health Claims Related to Live Yoghurt Cultures and Improved Lactose Digestion (ID 1143, 2976) Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Panel Diet. Prod. Nutr. Allerg. (NDA) 2010, 8, 1763. [CrossRef]
- Łopusiewicz, Ł.; Waszkowiak, K.; Polanowska, K.; Mikołajczak, B.; Śmietana, N.; Hrebień-Flisińska, A.; Sadowska, J.; Mazurkiewicz-Zapałowicz, K.; Drozłowska, E. The effect of yogurt and kefir starter cultures on bioactivity of fermented industrial by-product from Cannabis sativa production—hemp press cake. *Fermentation* 2022, *8*, 490. [CrossRef]
- 22. Illupapalayam, V.V.; Smith, S.C.; Gamlath, S. Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yogurt with spices. *LWT-Food Sci. Technol.* **2014**, *55*, 255–262. [CrossRef]
- Cruz, A.G.; Cadena, R.S.; Faria, J.A.F.; Bolini, H.M.A.; Dantas, C.; Ferreira, M.M.C.; Deliza, R. PARAFAC: Adjustment for modelling consumer study covering probiotic and conventional yogurt. *Food Res. Int.* 2012, 45, 211–215. [CrossRef]
- 24. Znamirowska, A.; Kalicka, D.; Buniowska, M.; Rożek, P. Effect of the addition of dried apple pomace on the physicochemical and sensory properties og yoghurts. *Food. Science. Technology. Quality.* **2018**, 25, 71–80. [CrossRef]
- 25. Ziarno, M.; Kozłowska, M.; Ścibisz, I.; Kowalczyk, M.; Pawelec, S.; Stochmal, A.; Szleszyński, B. The effect of selected herbal extracts on lactic acid bacteria activity. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3898. [CrossRef]
- 26. Helal, A.; Tagliazucchi, D. Impact of in-vitro gastro-panceatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. *LWT-Food Sci. Technol.* **2018**, *89*, 164–170. [CrossRef]
- Commission Delegated Regulation (EU) 2017/1155 of 15 February 2017. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2017/1155/oj (accessed on 2 September 2024).
- ISO 7889:2003; Yoghurt–Enumeration of Characteristic Microorganisms–Colony-Count Technique at 37 Degrees C. ISO: Geneva, Switzerland, 2003.

- 29. *ISO 13299:2016;* Sensory Analysis–Methodology–General Guidance for Stablishing a Sensory Profile. ISO: Geneva, Switzerland, 2016.
- Silva, H.L.A.; Balthazar, C.F.; Silva, R.; Vieira, A.H.; Costa, R.G.B.; Esmerino, E.A.; Freitas, M.Q.; Cruz, A.G. Sodium reduction and flavour enhancer addition in probiotic prato cheese: Contributions of quantitative descriptive analysis and temporal dominance of sensations for sensory profiling. J. Dairy Sci. 2018, 101, 8837–8846. [CrossRef] [PubMed]
- Ramírez-Rivera, E.; Díaz-Rivera, P.; Ramón-Canul, L.G.; Juárez-Barrientos, J.M.; Rodríguez-Miranda, J.; Herman-Lara, E.; Prinyawiwatkul, W.; Herrera-Corredor, J.A. Comparison of performance and quantitative descriptive analysis sensory profiling and its relationship to consumer liking between the artisanal cheese producers panel and the descriptive trained panel. *J. Dairy Sci.* 2018, *101*, 5851–5864. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

SUPPLEMENTARY MATERIALS Exploring the Presence of Cannabinoids in Hemp-Infused Fermented Milk Drinks: An Analysis of Pre- and Post-Fermentation Levels

Joanna Kanabus*, Marcin Bryła, Katarzyna Kycia, Joanna Markowska, Marek Roszko

A	Correlation coefficient	Analytical ranges	IOD(u e/mI)	IOO(ma/mI)
Analyte	(R ²)	(µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
CBD	0.9993	0.2-25.6	0.001	0.003
CBDA	0.9999	0.4-51.2	0.0003	0.0009
Δ^9 -THC	0.9999	0.08-10.24	0.0011	0.0036
∆9-THCA-A	0.9999	0.08-10.24	0.0004	0.0013
CBC	0.9997	0.02-2.56	0.005	0.02
CBCA	0.9992	0.08-10.24	0.0008	0.003
CBG	0.9994	0.008-1.024	0.0003	0.0009
CBGA	0.9992	0.02-2.56	0.00003	0.0001
CBDV	0.9998	0.008-1.024	0.001	0.002
CBDVA	0.9999	0.02-2.56	0.00003	0.0001
Δ^9 -THCV	0.9999	0.008-1.024	0.0006	0.002
Δ^9 -THCVA	0.9996	0.02-2.56	0.0001	0.0002
Δ^{8} -THC	0.9998	0.008-1.024	0.002	0.006
CBN	0.9998	0.008-1.024	0.002	0.007
CBNA	0.9996	0.002-0.256	0.0001	0.0002
CBL	0.9999	0.02-2.56	0.002	0.007
CBLA	0.9997	0.02-2.56	0.0004	0.0012

Table S1. Correlation coefficient , analytical ranges, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ)

Nominal concentration	Measured concentration	R (%)	RSD (%)
(µg/mL)	(μζ/1112)		
	CBD		
0.2	0.205	103	2
1.6	1.56	98	3
8.0	7.75	97	1
	CBDA	102	
1.0	1.02	102	2
2.0	2.11	105	2
4.0	3.98	100	2
0.2	Δ³-1ΗC	07	
0.2	0.194	97	2
0.6	0.38	97	1
1.2	1.153	96	1
0.1	Δ'-1HCA 0.007	-71	<u></u> ົ
0.1	0.59	97	2
1.2	1 18	98	2
1.2		<i>)</i> 0	5
0.1	0.088	88	6
0.1	0.269	90	3
0.9	0.871	97	3
	CBCA		
0.1	0.102	102	2
1.0	0.948	95	2
2.0	1.982	99	1
	CBG		
0.005	0.0048	96	6
0.01	0.098	98	3
0.02	0.019	97	8
	CBGA		
0.1	0.1	100	3
0.3	0.3	100	1
0.6	0.57	95	5
	CBDV		
0.1	0.097	97	1
0.3	0.296	99	2
0.6	0.592	99	1
	CBDVA	1	
0.1	0.099	99	2
0.3	0.301	100	1
0.6	0.595	99	1
	Δ^{9} -THC	V	
0.05	0.049	99	3
0.1	0.100	100	3
0.2	0.197	98	3
	Δ^9 -THCV	'A	

Table S2. Recovery rate (R%) and method repeatability (expressed as relative standard deviation, RSD%) for individual analytes at three different fortification levels (n=5).

0.05	0.049	98	2
0.1	0.098	98	3
0.2	0.195	97	2
	Δ^{8-7}	THC	
0.05	0.048	96	6
0.1	0.10	100	6
0.2	0.200	100	2
	CI	3N	
0.1	0.098	98	1
0.3	0.299	100	2
0.6	0.608	101	2
	CB	NA	
0.005	0.005	100	2
0.01	0.0099	99	2
0.02	0.019	98	3
	C	BL	
0.05	0.049	99	9
0.1	0.098	98	1
0.2	0.19	97	2
	CB	LA	
0.05	0.05	100	2
0.1	0.099	99	2
0.2	0.198	99	1

Table S3. Cannabinoids determined in fermented milk drink with hemp extract input (0.5%, 1% and 2% (*w*/*v*)).

$ \frac{2\%}{^{c} 0.021^{Ca}} $ ^a 0.17 ^{Ca} ± 0.01 ^a 0.02 ^{Ca} ± 0.01
$ \frac{2\%}{a^{c} 0.021^{Ca}} $ $ \frac{2 \pm 0.001}{a 0.17^{Ca} \pm 0.01} $ $ a 0.02^{Ca} \pm 0.01 $
$\frac{2\%}{1000} \frac{2\%}{1000} \frac{2\%}{1000} \frac{2\%}{1000} \frac{2\%}{1000} \frac{2\%}{10000} \frac{2\%}{1000000000000000000000000000000000000$
 a 0.021^{Ca} a 0.001 a 0.17^{Ca} ± 0.01 a 0.02^{Ca} ± 0.01
2 ± 0.001 a 0.17 ^{Ca} ± 0.01 a 0.02 ^{Ca} ± 0.01
$a 0.17^{Ca} \pm 0.01^{a} 0.02^{Ca} \pm 0.01^{ca} \pm 0.01^$
0.01 a $0.02^{Ca} \pm$
$a 0.02^{Ca} \pm 0.01$
0.01
0.01
$a 0.03^{Ba} \pm$
0.01
ND ^{Aa}
$\pm 0.03^{BCa}$
± 0.01
NDAa
^{3a} 0.006 ^{BCa}
1 ± 0.001
ND ^{Aa}
^{3a} 0.004 ^{BCa}
1 ± 0.001
ND ^{Aa}
ND ^{Aa}
ND ^{Aa}
ND ^{Aa}
'1 .Bi '1 \a \a Ai

0.01 0.01

CBNA	$0.01^{\text{Ab}} \pm$	$0.02^{ABb} \pm$	$0.03^{Bb} \pm$	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND ^{Aa}	ND ^{Aa}
	0.01	0.01	0.01															
CBL	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}
CBLA	$0.01^{\rm Ab}$ ±	$0.02^{ABb} \pm$	$0.04^{\rm Cb}$ ±	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}
	0.01	0.01	0.01															
Sum of 17	$4.07^{\text{Ad}} \pm$	$8.14^{\text{Bd}} \pm$	$16.26^{Cd} \pm$	$0.18^{Ac} \pm$	$0.30^{Bc} \pm$	$0.58^{Cc} \pm$	$0.14^{Ab} \pm$	0.26 ^{Bb} ±	0.54 ^{сь} ±	:0.13 ^{Ab} ±	:0.27 ^{Bb} ±	0.56 ^{Cbc}	0.11^{Aab}	0.26 ^{Bb} ±	0.49 ^{cb} ±	: 0.10 ^{Aa}	$0.17^{Ba} \pm$	$0.28^{Ca} \pm$
cannabinoids	0.16	0.33	0.65	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	± 0.02	± 0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.01

a-f – the different small letters within the same row (in one amount of the input used, for example, 0.5%) indicate a significant differences (α <0.05) influenced by storage time; A-C – the different capital letters within the same row indicate significant differences (α <0.05) influenced by the differences between the content of the analyzed substance in each week of storage
Table S4. Cannabinoids determined in fermented milk drink with dried hemp input (0.5%, 1% and 2% (w/v)).

					Amou	nt in feri	nented n	nilk drin	k (mg/1	00g of p	roduct)							
Analyte	Assum co	ied amo mpoun	unt of d	After	r fermen	tation		1 week			2 weeks	5		3 weeks			4 week	S
	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%
CBD	$0.40^{Aa} \pm$	$0.80^{\text{Bab}} \pm$: 1.62 ^{Cc}	$0.40^{Aa} \pm$	0.83 ^{Bb} ±	$1.59^{\text{Cb}} \pm$	$0.40^{Aa} \pm$	$0.83^{\text{Bb}} \pm$	$1.50^{Ca} \pm$	$0.40^{Aa} \pm$	0.82 ^{Bb} ±	: 1.55 ^{Cab} ±	: 0.44 ^{Ab} ±	: 0.80 ^{Bab} ±	: 1.62 ^{Cc}	0.44^{Ab}	0.78 ^{Ba} =	± 1.65 ^{Cd}
	0.03	0.04	± 0.07	0.03	0.01	0.03	0.02	0.04	0.09	0.02	0.04	0.05	0.01	0.05	± 0.07	± 0.03	0.03	± 0.01
CBDA	2.66 ^{Aab} ±	5.32 ^{Bd} ±	10.64 ^{Ci}	2.86 ^{Ac} ±	5.38 ^{Bd} ±	$9.50^{\text{Ce}} \pm$	2.80 ^{Abc} ±	5.21 ^{Bd} ±	9.25 ^{Cd} ±	: 2.71 ^{Ab} ±	4,91 ^{Bbc} ±	± 9.00 ^{Cc} ±	2.64 ^{Aab} =	± 4.87 ^{Bb} ±	8.50 ^{Cb}	2.55 ^{Aa}	4.68 ^{Ba} :	± 8.14 ^{Ca}
	0.19	0.37	± 0.75	0.05	0.12	0.05	0.11	0.14	0.10	0.13	0.11	0.15	0.11	0.12	± 0.15	± 0.06	0.12	± 0.17
Δ^9 -THC	$0.34^{\text{Ab}} \pm$	$0.68^{\text{Bb}} \pm$	1.36 ^{Cb}	$0.01^{Aa} \pm$	$0.02^{Ba} \pm$	$0.05^{Ca} \pm$	$0.01^{Aa} \pm$	$0.02^{Ba} \pm$	$0.05^{Ca} \pm$: 0.01 ^{Aa} ±	$0.02^{Ba} \pm$	$0.05^{Ca} \pm$	0.01 ^{Aa} ±	$0.02^{Ba} \pm$	0.05 ^{Ca}	0.01 ^{Aa}	0.02 ^{Ba} =	± 0.05 ^{Ca}
	0.03	0.05	± 0.10	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	± 0.01	± 0.01	0.01	± 0.01
∆9-THCA-A	$0.74^{Ab} \pm$	$1.48^{\text{Bbd}} \pm$	2.95 ^{Cb}	$0.02^{Aa} \pm$: 0.03 ^{ABa} ±	$0.02^{Aa} \pm$	$0.02^{Aa} \pm$	0.03 ^{ABa} ±	: 0.02 ^{Aa} ±	: 0.02 ^{Aa} ±	0.03 ^{ABa}	± 0.02 ^{Aa} ±	0.02 ^{Aa} ±	: 0.03 ^{ABa} ±	= 0.02 ^{Aa}	0.02 ^{Aa}	0.03 ^{AB}	^a 0.02 ^{Aa}
	0.05	0.10	± 0.20	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	± 0.02	± 0.01	± 0.02	± 0.02
CBC	$0.07^{Acd} \pm$	0.13 ^{Bbc} ±	0.26 ^{Cd}	0.06 ^{Abc} ±	$\pm 0.12^{Bab} \pm$	$0.19^{Ca} \pm$	$0.04^{Aa} \pm$	0.12^{Bab} ±	:0.21 ^{Cab} ±	±0.05 ^{Aab} ±	: 0.11 ^{Ba} ±	: 0.22 ^{Cb} ±	0.06 ^{Abc} ±	±0.12 ^{Bab} ±	: 0.24 ^{Cc}	0.08 ^{Ad}	0.13 ^{Bbc}	0.26 ^{Cd}
	0.01	0.01	± 0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	± 0.02	± 0.01	± 0.01	± 0.01
CBCA	$0.72^{Acd} \pm$	$1.45^{\text{Bd}} \pm$	2.89 ^{Cb}	$0.67^{Ac} \pm$	1.36 ^{Bc} ±	$2.61^{Ca} \pm$	$0.67^{Ac} \pm$	$1.34^{Bc} \pm$	2.60 ^{Ca} ±	: 0.58 ^{Aa} ±	1.30 ^{Bbc} ±	± 2.63 ^{Ca} ±	0.60 ^{Aab} =	±1.26 ^{Bab} ±	:2.60 ^{Ba} ±	: 0.60 ^{Aab}	1.24 ^{Ba} =	± 2.63 ^{Ca}
	0.05	0.07	± 0.20	0.07	0.08	0.05	0.05	0.08	0.05	0.02	0.08	0.04	0.07	0.07	0.04	± 0.02	0.02	± 0.01
CBG	$0.38^{\text{Ad}} \pm$	$0.76^{\text{Be}} \pm$	1.51 ^{Ce}	$0.45^{Ae} \pm$	$0.97^{Bf} \pm$	$1.92^{Cf} \pm$	$0.33^{Ac} \pm$	$0.56^{\text{Bd}} \pm$	1.29 ^{Cd} ±	: 0.30 ^{Abc} ±	$0.48^{Bc} \pm$	$0.99^{Cc} \pm$	0.24 ^{Ab} ±	: 0.36 ^{Bb} ±	0.75сь	0.15 ^{Aa}	0.31 ^{Ba} :	± 0.63 ^{Ca}
	0.03	0.06	± 0.10	0.04	0.04	0.04	0.05	0.08	0.04	0.03	0.06	0.04	0.07	0.05	± 0.11	± 0.02	0.02	± 0.01
CBGA	$0.10^{\text{Ab}} \pm$	0.20^{Bc} ±	0.40^{Ccd}	0.11 ^{Abc} ±	$\pm 0.22^{Bd} \pm$	$0.41^{Ccd} \pm$	$0.10^{Ab} \pm$	0.18^{Bb} ±	0.39 ^{Cc} ±	: 0.09 ^{Aab} ±	: 0.16 ^{Ba} ±	: 0.35 ^{Cb} ±	0.08 ^{Aa} ±	$0.16^{Ba} \pm$	0.32 ^{Ca}	0.08 ^{Aa}	0.16 ^{Ba} :	± 0.32 ^{Ca}
	0.01	0.02	± 0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.04	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	± 0.02	± 0.01	0.01	± 0.01
CBDV	0.005 ^{Aab}	$0.01^{\text{Ba}} \pm$	0.02 ^{Ca}	0.01 ^{ABcd}	$0.02^{\text{Bab}} \pm$	0.03 ^{BCab}	$0.01^{Acd} \pm$	$0.01^{Aa} \pm$	0.02 ^{ABa}	0.009 ^{Ac}	0.01 ^{Aa} ±	$= 0.02^{Ba} \pm$	0.005 ^{Ab}	$0.01^{\text{Ba}} \pm$	0.02 ^{BCa}	0.004 ^{Aa}	^a 0.01 ^{Ba} :	± 0.02 ^{Ca}
	± 0.001	0.01	± 0.01	± 0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	± 0.01	± 0.001	0.01	0.01	± 0.001	0.01	± 0.01	± 0.001	0.01	± 0.01
CBDVA	$0.05^{Aa} \pm$	$0.09^{\text{Ba}} \pm$	0.18 ^{Ca}	0.06 ^{Aab} ±	$\pm 0.12^{Bbc} \pm$	$0.21^{\text{Cb}} \pm$	$0.05^{Aa} \pm$	0.10^{Bab} ±	:0.20 ^{Cab} ±	± 0.05 ^{Aa} ±	0.10 ^{Bab} =	±0.20 ^{Cab} ±	: 0.05 ^{Aa} ±	$\pm 0.10^{Bab} \pm$: 0.20 ^{Cab}	0.05 ^{Aa}	0.10^{Bab}	0.20 ^{Cab}
	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01
Δ^9 -THCV	0.004^{Aab}	0.007^{Bab}	0.014 ^{Ca}	0.006 ^{Ac}	± 0.009 ^{Bbc}	0.016 ^{Cd}	0.004^{Aaba}	0.006 ^{ABa}	0.009 ^{Ca}	0.004^{Aab}	0.006 ^{ABa}	a 0.009 ^{Ca}	0.004^{Aab}	⁹ 0.006 ^{АВа}	0.009 ^{Ca}	0.003 ^{Aa}	1 0.006 ^B	a 0.01 ^{Cab}
	± 0.001	± 0.001	± 0.001	0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001
Δ^9 -THCVA	$0.02^{Aa} \pm$	$0.05^{\text{Ba}} \pm$	0.10 ^{Cb}	$0.02^{Aa} \pm$	$0.05^{Ba} \pm$	$0.09^{Ca} \pm$	$0.02^{Aa} \pm$	$0.04^{\text{Ba}} \pm$	0.08 ^{Ca} ±	$0.02^{Aa} \pm$	$0.04^{Ba} \pm$	$0.08^{Ca} \pm$	0.02 ^{Aa} ±	$0.04^{Ba} \pm$	0.08 ^{Ca}	0.02 ^{Aa}	0.04 ^{Ba} =	± 0.08 ^{Ca}
	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	± 0.01	± 0.01	0.01	± 0.01
Δ^{8} -THC	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND ^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	NDAa	ND ^{Aa}	ND^{Aa}
CBN	0.007 ^{Ab}	0.013 ^{Bb}	0.026 ^{Cb}	$0.02^{Ac} \pm$	$0.02^{Ac} \pm$	$0.03^{Bc} \pm$	0.007 ^{Ab} ±	: 0.013 ^{Bb}	0.026 ^{Cb}	0.007 ^{Ab}	0.013 ^{Bb}	0.026 ^{Cb} ±	ND ^{Aa}	0.013 ^{Bb}	0.026 ^{Cb}	ND ^{Aa}	0.012 ^{Ba}	a 0.024 ^{Ca}
	± 0.001	± 0.001	± 0.001	0.01	0.01	0.01	0.001	± 0.001	± 0.002	± 0.001	± 0.001	0.002		± 0.001	± 0.003		± 0.001	± 0.001

CBNA	$0.02^{Aa} \pm$	$0.03^{ABa} \pm$	0.06 ^{Ca}	$0.02^{Aa} \pm$	0.03 ^{ABa} ±	± 0.06 ^{Ca} ±	0.02^{Aa} :	$\pm 0.03^{ABa} \pm$	$\pm 0.06^{Ca} \pm$	$0.02^{Aa} \pm$	$\pm 0.03^{ABa} \pm$	$0.06^{Ca} \pm$	$0.02^{Aa} \pm$	$0.03^{ABa} \pm$	0.06 ^{Ca}	0.02 ^{Aa}	0.03 ^{ABa}	0.06 ^{Ca}
	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01
CBL	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	0.01^{Bb} ±	$0.01^{\text{Bb}} \pm$	$0.02^{BCb} \pm$	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}
				0.01	0.01	0.01												
CBLA	0.013 ^{Aa} ±	$0.03^{\text{Bb}} \pm$	0.05 ^{Cc}	$0.01^{Aa} \pm$	0.02 ^{ABab}	$0.04^{Cc} \pm$	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}
	0.001	0.01	± 0.01	0.01	± 0.01	0.01												
Sum of 17	$5.53^{\text{Ad}} \pm$	11.05^{Bd}	22.08 ^{Cb}	4.73 ^{Abc} ±	9.21 ^{Bbc} ±	= 16.81 ^{Cb}	4.48^{Aab}	$\pm 8.48^{Bab} \pm$: 15.73 ^{Cab}	4.27 ^{Aa} ±	$\pm 8.03^{Ba} \pm$	15.22 ^{Ca}	$4.19^{Aa} \pm$	$7.81^{\text{Ba}} \pm$	14.52 ^{Ca}	4.03 ^{Aa}	$7.55^{Ba} \pm$:14.11 ^{Ca}
cannabinoids	0.44	± 0.88	± 1.76	0.46	0.90	± 1.67	0.44	0.84	± 1.58	0.42	0.80	± 1.54	0.41	0.78	± 1.48	± 0.40	0.76	± 1.45
a-f – the differe	nt small l	etters wi	thin the	same row	v (in one a	amount of	the inpu	it used, for	example,	0.5%) in	dicate a sig	gnificant	differenc	es (α <0.05	5) influe	nced by	storage	time; A-
C the difference	4	1	·			: : 6:			05) : (1		1				6 1.1	. 1		

C – the different capital letters within the same row indicate significant differences (α <0.05) influenced by the differences between the content of the analyzed substance in each week of storage

Table S5. Cannabinoids determined in fermented milk drink with hemp oil input (0.5%, 1% and 2% (*w*/*v*)).

	Amount in fermented milk drink (mg/100g of product)																	
Analyte	Assum	ned amo	ount of	Afte	r fermen	tation		1 wee	k		2 week	re.		3 weeks	2		4 week	c
	СС	ompoun	ıd	7110	.i ieimen	tation		1 wee			2 week			5 WEEKS	,		4 WCCK	3
	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%
CBD	21.29 ^{Aa}	42.57^{Ba}	85.14^{Ca}	42.22 ^{Ad}	46.22 ^{ABab}	111.78 ^{Cb}	27.32 ^{Ab}	⁹ 57.35 ^{вс}	118.18 ^{Cc}	42.74 ^{Ad}	61.95 ^{Bcd}	120.14 ^{Ccd}	45.69 ^{Ac}	74.12 ^{Be}	121.88 ^{Cd}	¹ 49.29 ^{Acd}	ⁱ 85.69 ^{Bf}	122.48^{Cd}
	± 1.50	± 2.98	± 5.96	± 0.39	± 0.50	± 2.55	± 1.70	± 2.30	± 3.22	± 3.12	± 3.99	± 3.21	± 4.13	± 8.12	± 4.47	± 1.78	± 2.85	± 3.56
CBDA	$3.93^{Ac} \pm$	$7.86^{Bc} \pm$	15.72 ^{Cb}	0.86 ^{Aa}	$1.26^{\text{Ba}} \pm$	13.44^{Ca}	2.33 ^{Ab}	4.16^{Bb} ±	: 16.16 ^{Cb} c	5.13 ^{Ad}	11.74^{Bd}	$27.41^{Cd} \pm$	8.60 ^{Ae} ±	= 17.11 ^{Be}	28.96 ^{Cd}	$9.03^{Af} \pm$	18.11 ^{Bef}	$30.38^{Cd} \pm$
	0.28	0.55	± 1.10	± 0.02	0.03	± 2.17	± 0.72	0.51	± 1.99	± 0.87	± 1.15	2.19	1.54	± 0.99	± 4.74	0.02	± 0.12	0.89
Δ^9 -THC	$0.09^{Ab} \pm$	$0.17^{Bb} \pm$	0.35 ^{Cb} ±	= 0.03 ^{Aa}	$0.04^{\rm Ab}$ ±	$0.05^{Ba} \pm$	0.03 ^{Aa}	0.04^{Ab}	$0.05^{\text{Ba}} \pm$	0.03 ^{Aa}	$0.04^{Ab} \pm$	$0.05^{Ba} \pm$	0.03 ^{Aa} ±	$\pm 0.04^{Ab} \pm$	$0.05^{Ba} \pm$	0.03 ^{Aa} ±	$0.04^{Ab} \pm$	$\pm 0.05^{Ba} \pm$
	0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.03	± 0.01	± 0.01	0.03	± 0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.03
∆9-THCA-A	$0.14^{\text{Ab}} \pm$	0.28 ^{Bb} ±	0.55 ^{Cb} ±	= 0.01 ^{Aa}	0.01^{Aa} ±	0.02 ^{ABa}	0.01 ^{Aa}	0.01 ^{Aa} ±	$0.02^{ABa} \pm$	0.01 ^{Aa}	$0.01^{Aa} \pm$	$0.02^{ABa} \pm$	0.01 ^{Aa} ±	$\pm 0.01^{Aa} \pm$	0.02 ^{ABa}	$0.01^{Aa} \pm$: 0.01 ^{Aa} ±	$\pm 0.02^{ABa} \pm$
	0.01	0.02	0.03	± 0.01	0.01	± 0.02	± 0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	± 0.02	0.01	0.01	0.02
CBC	$0.08^{Aa} \pm$	$0.16^{Ba} \pm$	0.33 ^{Cb} ±	= 0.18 ^{Ab}	$0.20^{\text{Bb}} \pm$	0.89 ^{Cd} ±	0.19 ^{Ab}	0.20 ^{ABb}	$0.25^{Ca} \pm$	0.06 ^{Aa}	$0.31^{Bc} \pm$	$0.31^{\text{Bb}} \pm$	0.18 ^{Ab} ±	± 0.39 ^{Bd} ±	$0.49^{Cc} \pm$	$0.34^{Ac} \pm$: 0.61 ^{Be} ±	$1.00^{Cd} \pm$
	0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.10	± 0.02	± 0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.01	0.03	0.05
CBCA	$0.15^{Aa} \pm$	$0.30^{Ba} \pm$	0.60 ^{Ca} ±	= 0.28 ^{Ab}	$0.37^{Bc} \pm$	1.26 ^{Cb} ±	0.37 ^{Bd}	0.33 ^{Ab}	$1.18^{\text{Cb}} \pm$	0.31 ^{Ac}	$0.43^{Bd} \pm$	1.21 ^{Cb} ±	0.28 ^{Ab} ±	± 0.49 ^{Bd} e	1.22 ^{Cb} ±	0.25 ^{Ab} ±	: 0.59 ^{Bf} ±	$1.27^{Cb} \pm$
	0.01	0.02	0.04	± 0.01	0.02	0.03	± 0.02	± 0.01	0.22	± 0.03	0.07	0.11	0.02	± 0.04	0.14	0.02	0.02	0.02
CBG	25.56^{Af}	51.11 ^{Be}	102.22 ^c	^{ff} 5.20 ^{Aa}	$5.71^{\text{Ba}} \pm$	14.04 ^{Ca}	9.04 ^{Ab}	19.01 ^{bb}	24.31 ^{Cb} ±	: 12.20 ^{Ad}	27.34 ^{Bc}	39.56 ^{Cc} ±	18.78 ^{Ad}	¹ 33.79 ^{Bd}	44.44^{Cd}	20.08 ^{Ae}	34.53 ^{Bd}	$50.48^{\text{Ce}} \pm$
	± 1.78	± 3.57	± 7.16	± 0.42	0.07	± 0.17	± 0.22	± 0.31	1.27	± 0.74	± 0.74	2.12	± 0.53	± 1.33	± 4.20	± 0.38	± 1.52	0.50
CBGA	$0.06^{Aa} \pm$	$0.12^{Ba} \pm$	0.30 ^{Ca} ±	= 0.14 ^{Ad}	$0.20^{\text{Bb}} \pm$	$0.67^{Cd} \pm$	0.13 ^{Ad}	0.20 ^{Bb} ±	$0.64^{Cc} \pm$	0.11 ^{Ac}	0.21 ^{Bbb}	$0.60^{Cc} \pm$	0.11 ^{Ac} ±	± 0.20 ^{Bb} ±	$0.53^{Cb} \pm$	0.09 ^{Ab} ±	$: 0.23^{Bc} \pm$	0.52 ^{Cb} ±
	0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.02	0.02	± 0.02	± 0.03	0.04	0.03	0.04	0.05	0.01	0.01	0.02
CBDV	$0.07^{Aa} \pm$	$0.14^{\text{Ba}} \pm$	0.28 ^{Ca} ±	= 0.15 ^{Ab}	0.19^{Bb} ±	$0.70^{Cb} \pm$	0.16 ^{Ab}	$0.25^{Bc} \pm$	$0.70^{Cb} \pm$	0.16 ^{Ab}	0.29^{Bcd}	$0.70^{\text{Cb}} \pm$	0.16 ^{Ab} ±	± 0.30 ^{Bd} ±	$0.70^{\text{Cb}} \pm$	$0.16^{Ab} \pm$: 0.35 ^{Be} ±	$0.70^{\text{Cb}} \pm$
	0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.02	± 0.02	0.04	0.03	± 0.02	± 0.03	0.02	0.02	0.05	0.04	0.02	0.02	0.03
CBDVA	$0.07^{Aa} \pm$	$0.14^{Bb} \pm$	0.27 ^{Ca} ±	= 0.17 ^{Ab}	$0.30^{\text{Bb}} \pm$	$0.75^{Cb} \pm$	0.17 ^{Ab}	0.30 ^{Bb} ±	$0.75^{Cb} \pm$	0.17^{Ab}	0.32 ^{Bbc} ±	: 0.75 ^{Cb} ±	0.17 ^{Ab} ±	± 0.36 ^{Bb} c	0.78 ^{Cbc} ±	: 0.15 ^{Ab} ±	: 0.36 ^{Bbc}	$0.78^{\rm Cbc}$ ±
	0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.02	± 0.02	0.04	0.03	± 0.02	0.03	0.04	0.03	± 0.04	0.02	0.02	± 0.02	0.03
Δ^9 -THCV	0.003 ^{Ab}	0.006 ^{Ba}	0.012 ^{Ca}	0.005 ^{Ad}	$\pm 0.006^{Aa} \pm$	0.022 ^{Bc}	0.005 ^{Ad}	0.01 ^{Bb} ±	$0.02^{Cb} \pm$	0.005 ^{Ad}	$0.01^{Bb} \pm$	$0.02^{BCb} \pm$	ND^{Aa}	0.01^{Bb} ±	0.02 ^{BCb}	ND^{Aa}	0.01^{Bb} ±	$0.02^{BCb} \pm$
	± 0.01	± 0.002	± 0.02	± 0.001	0.001	± 0.001	± 0.001	0.01	0.01	± 0.001	0.01	0.01		0.01	± 0.01		0.01	0.01
Δ^9 -THCVA	0.007^{Aa}	$0.01^{\text{Ba}} \pm$	0.03 ^{Ca} ±	: 0.015 ^{Ad}	• 0.022 ^{Bb} ±	$0.06^{Cb} \pm$	0.02 ^{Ad}	$0.03^{Bc} \pm$	$0.07^{Cc} \pm$	0.02 ^{Ad}	$0.03^{Bc} \pm$	$0.07^{Cc} \pm$	0.01 ^{Ab} ±	$\pm 0.03^{Bc} \pm$	$0.07^{Cc} \pm$	$0.01^{\text{Ab}} \pm$	$\pm 0.03^{Bc} \pm$	$0.07^{Cc} \pm$
	± 0.001	0.01	0.0.1	± 0.001	0.001	0.012	± 0.01	0.01	0.010	± 0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.012	0.01	0.01	0.01
Δ^{8} -THC	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND ^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}	ND^{Aa}
CBN	$0.5^{\rm Ac}$ ±	$1.0^{Bc} \pm$	$2.0^{Cc} \pm$	0.03 ^{Ab}	$0.04^{ABa} \pm$	$0.11^{Ca} \pm$	0.02 ^{Aa}	$0.06^{\text{Bb}} \pm$	$0.11^{Ca} \pm$	0.02 ^{Aa}	$0.06^{\text{Bb}} \pm$	$0.11^{Ca} \pm$	0.02 ^{Aa} ±	$\pm 0.06^{Bb} \pm$	$0.11^{Ca} \pm$	$0.02^{Aa} \pm$	$0.06^{Bb} \pm$	0.12 ^{Cb} ±
	0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

CBNA	0.004 ^{Aa}	0.007^{Ba}	0.014^{Ca}	0.01^{Ae}	$0.01^{\text{Ab}} \pm$	$0.03^{Bb} \pm$	0.007 ^{Ab}	0.015 ^{Bc}	$0.03^{Cb} \pm$	0.008Ac	0.019 ^{Bd}	$0.03^{Cb} \pm$	0.009^{Acd}	$0.02^{Bd} \pm$	$0.03^{Cb} \pm$	$0.01^{Ae} \pm$	0.02 ^{ABd}	$0.03^{Bb} \pm$
	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.01	0.01	0.01	± 0.001	± 0.001	0.01	± 0.001	± 0.002	0.01	± 0.002	0.001	0.01	0.01	$\pm 0.0.1$	0.0.1
CBL	$0.02^{Aa} \pm$	$0.03^{Ba} \pm$	$0.06^{Ca} \pm$: 0.03 ^{Ab}	$0.03^{Aa} \pm$	$0.11^{Bb} \pm$	0.06 ^{Ac}	$0.09^{\text{Bb}} \pm$	$0.14^{Cc} \pm$	0.07^{Ad}	0.10^{Bc} ±	$0.14^{Cc} \pm$	$0.07^{\text{Ad}} \pm$	$0.10^{Bc} \pm$	$0.14^{Cc} \pm$	$0.07^{\text{Ad}} \pm$	$0.10^{Bc} \pm$	$0.20^{Cd} \pm$
	0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.02	0.03	± 0.01	0.01	0.03	0.01	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01
CBLA	0.03 ^{Aa}	$0.05^{\text{Ba}} \pm$	$0.10^{Ca} \pm$: 0.05 ^{Ab}	$0.06^{\text{Bb}} \pm$	$0.25^{Cb} \pm$	0.05 ^{Ab}	$0.10^{Bc} \pm$	$0.25^{\text{Cb}} \pm$	0.05 ^{Ab}	0.10^{Bc} ±	$0.25^{\text{Cb}} \pm$	$0.05^{\text{Ab}} \pm$	$0.10^{Bc} \pm$	$0.25^{\text{Cb}} \pm$	$0.05^{\text{Ab}} \pm$	$0.11^{\text{Bd}} \pm$	$0.26^{\text{Cb}} \pm$
	±0.01	0.01	0.01	± 0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.02	± 0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02
Sum of 17	52.00 ^{Abc}	103.95 ^B	208.10 ^c	°49.38 ^{Ab}	54.67 ^{ABa} ±	±144.27 ^{Ca}	^a 39.91 ^{Aa}	82.16 ^{Bb}	162.86 ^{Cab}	61.10 ^{Ad}	102.96вс	191.37 ^{Cbd}	² 74.17 ^{Ae}	127.13 ^{Bd}	199.69 ^{Cc}	79.59 ^{Aef}	140.85 ^{Be}	208.38 ^{Ccd}
cannabinoids	± 4.68	± 9.36	± 18.72	± 4.48	4.97	±13.19	± 3.63	± 7.46	± 14.86	± 5.54	± 9.35	± 17.44	± 6.72	± 11.54	± 18.20	± 7.21	± 12.78	± 18.99
a-f – the differe	nt small	letters w	ithin the	same ro	w (in one	amount o	of the inp	out used,	for exam	ple, 0.5%) indicate	e a signifio	cant diffe	rences (α	<0.05) int	fluenced	by storag	e time; A-

C – the different capital letters within the same row indicate significant differences ($\alpha < 0.05$) influenced by the differences between the content of the analyzed substance in each week of storage

No.	Determinants	Definition of sensory quality determinants	Scale markings
1.	Green colour	Green colour intensity	Light green - dark green
2.	Colour typical for yoghurt	Typical of a fermented milk baverage	typical - non-typical
3.	Yoghurt aroma	Characteristic of natural yoghurt	Undetectable - very intense
4.	Sour aroma	Characteristic of natural yoghurt	Undetectable - very intense
5.	Sweet aroma	Characteristic of natural yoghurt	Undetectable - very intense
6.	Aroma foreign characteristic 'grassy"	Foreign aroma, unusual for yoghurt	Undetectable - very intense
7.	Sweet flavour	Basic taste, no need for explanation	Undetectable - very intense
8.	Flavour foreign characteristic "grassy"	Foreign flavour, unusual for yoghurt	Undetectable - very intense
9.	Sour flavour	Acidic aftertaste, persists in the mouth	Undetectable - very intense
10.	Acidic flavour	Characteristic of natural yoghurt	Undetectable - very intense
11.	Bitter flavour	Basic taste, no need for explanation	Undetectable - very intense
12.	Consistency	Sensory sensation perceived upon ingestion of the sample	Smooth - perceptible elements
13.	Density	Sensory impression received when taking and consuming a sample	Very thin-very thick
14.	Overall quality	General sensory impression, including distinguishing marks of	Bad - very good
		smell, colour, texture, taste	· -

Table S6. Sensory quality determinants used in the profile evaluation of samples with hemp input

No.	Determinants of	Control	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample with	Sample with	Sample	Sample	Sample with
	aroma, colour, texture,		with hemp	with hemp	with hemp	with dried	dried hemp	dried hemp	with hemp	with hemp	hemp oil 2%
	taste and overall		extract 0.5%	extract 1%	extract 2%	hemp 0.5%	1%	2%	oil 0.5%	oil 1%	
	assessment					-					
1.	Green colour	$0.01^{a} \pm 0.01$	$0.50^{b} \pm 0.09$	$1.33^{\circ} \pm 0.15$	$1.59^{cd} \pm 0.11$	$4.48^{\rm e} \pm 0.54$	6.74 ^f ±0.22	$8.51^{g} \pm 0.45$	$0.01^{a} \pm 0.01$	$0.01^{a} \pm 0.01$	$0.01^{a} \pm 0.01$
2.	Colour typical for	$0.01^{a} \pm 0.01$	$1.11^{b} \pm 0.12$	$2.25^{\rm c}\pm0.16$	$3.13^d \pm 0.40$	$8.24^{\text{gh}} \pm$	$8.85^{h} \pm 0.87$	$9.35i \pm 0.55$	$5.54e \pm 0.19$	$6.66^{\rm f}\pm0.45$	$7.42^{g} \pm 0.78$
	yoghurt					0.42					
3.	Yoghurt aroma	$9.59^{\rm de}\pm0.54$	$7.14^{\mathrm{b}} \pm 0.41$	$7.22^{\mathrm{b}}\pm0.19$	$7.87^{bc}\pm0.53$	$6.52^{a} \pm 0.47$	$6.89^{ab} \pm 0.69$	$7.12^{b} \pm 0.45$	$8.11^{\circ} \pm 0.24$	$8.58^{cd} \pm 0.45$	$8.98^{\rm d}\pm0.74$
4.	Sour aroma	$1.10^{a} \pm 0.14$	$2.16^{b} \pm 0.13$	$3.03^{\circ} \pm 0.20$	$3.89^{d} \pm 0.11$	$4.02^{\rm e}\pm0.14$	$5.37^{\text{f}} \pm 0.45$	$6.05^{\rm h}\pm0.24$	$5.23^{\rm f}\pm0.35$	$5.54^{\rm fg}\pm0.13$	$5.77^{\text{gh}} \pm 0.23$
5.	Sweet aroma	$5.74^{d} \pm 0.22$	$6.56^{e} \pm 0.20$	$4.44^{\rm c}\pm0.11$	$3.01^{\text{b}} \pm 0.01$	$2.06^{a} \pm 0.10$	$2.08^{a} \pm 0.12$	$2.19^{a} \pm 0.12$	$4.34^{\circ} \pm 0.21$	$4.38^{\circ} \pm 0.12$	$4.39^{\circ} \pm 0.14$
6.	Aroma foreign	$0.01^{a} \pm 0.01$	$0.03^{b} \pm 0.01$	$0.06^{\circ} \pm 0.01$	$0.09^{\rm d}\pm0.01$	$3.58^{\rm f}\pm0.14$	$5.74^{h} \pm 0.34$	$9.64^{j} \pm 0.45$	$3.04^{e} \pm 0.11$	$5.12^{\rm g}\pm0.14$	$7.85^{\rm i}\pm0.16$
	characteristic 'grassy"										
7.	Sweet flavour	$5.58^{\circ} \pm 0.45$	$5.63^{\circ} \pm 0.12$	$5.54^{\rm c}\pm0.18$	$4.07^{\mathrm{b}} \pm 0.13$	$2.03^{a} \pm 0.12$	$2.10^{a} \pm 0.18$	$1.99^{a} \pm 0.12$	$2.05^{a} \pm 0.14$	$2.09^a \pm 0.20$	$2.17^{a} \pm 0.16$
8.	Flavour foreign	$0.01^{a} \pm 0.01$	$0.02^{a} \pm 0.01$	$0.07^{\mathrm{b}} \pm 0.01$	$0.12^{\circ} \pm 0.02$	$3.31^{de} \pm$	$6.41^{g} \pm 0.15$	$9.48^{\rm i}\pm0.32$	$3.13^{d} \pm 0.09$	$5.35^{\rm f}\pm0.14$	$7.21^{h} \pm 0.17$
	characteristic "grassy"					0.14					
9.	Sour flavour	$0.01^{a} \pm 0.01$	$0.04^{\mathrm{b}} \pm 0.01$	$1.41^{\circ} \pm 0.11$	$2.86^{\rm de}\pm0.45$	$4.14^{\rm g}\pm0.15$	$5.18^{h} \pm 0.21$	$6.36^{\rm i}\pm0.24$	$2.41^d \pm 0.12$	$2.58^{\rm d}\pm0.41$	$3.65^{\text{f}} \pm 0.11$
10.	Acidic flavour	$3.15^a \pm 0.67$	$4.51^{\circ} \pm 0.21$	$5.36^{\rm d}\pm0.14$	$6.06^{\rm f}\pm0.12$	$4.68^{\circ} \pm 0.22$	$5.45^{\rm de}\pm0.17$	$6.16^{\rm f}\pm0.41$	$4.12^{b} \pm 0.13$	$4.15^{\rm b}\pm0.11$	$5.14^{d} \pm 0.17$
11.	Bitter flavour	$0.01^{a} \pm 0.01$	$0.01^{\text{a}} \pm 0.01$	$0.05^{\rm b}\pm0.01$	$0.09^{\mathrm{b}} \pm 0.01$	$2.58^{cd} \pm$	$5.35^{e} \pm 0.25$	$8.78^{\rm f}\pm0.11$	$1.99^{\circ} \pm 0.12$	$2.12^{c} \pm 0.17$	$2.22^{c} \pm 0.24$
						0.19					
12.	Consistency	$0.01^{a} \pm 0.01$	$1.00^{b} \pm 0.19$	$1.05^{\rm b}\pm0.01$	$1.40^{d} \pm 0.12$	3.22 ^e ±0.07	$7.13^{\rm f} \pm 0.19$	$9.41^{g} \pm 0.52$	$1.01^{\circ} \pm 0.01$	$1.12^{c} \pm 0.14$	$1.18^{c} \pm 0.14$
13.	Density	$9.87^{\rm f}\pm0.21$	$5.47^{a} \pm 0.33$	$7.45^{bc} \pm 0.30$	$7.11^{\text{b}} \pm 0.11$	8.01 ^d ±0.11	$8.25^{\rm de}\pm0.41$	$9.65^{\rm f}\pm0.13$	$7.02^{b} \pm 0.14$	$8.14^{de} \pm 0.45$	$8.22^{\rm de}\pm0.16$
14.	Overall quality	$9.50^{i} \pm 0.11$	$8.88^{gh} \pm 0.17$	$7.57^{e} \pm 0.14$	$7.04^{d} \pm 0.20$	5.12°±0.22	4.78 ^b ±0.18	3.36°±0.40	$8.12^{f} \pm 0.14$	8.14 ^f ±0.26	$8.35^{fg} \pm 0.40$

Table S7. Results of the profile analysis of hemp-infused fermented milk drinks (0-10 scale).

a-i - the different small letters within the same row indicate a significant differences ($\alpha < 0.05$) influenced by amount and type of hemp input.

Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów w opracowaniu publikacji ^{s/}

Joanna Kanabus Imię i nazwisko

Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności / Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Exploring the Presence of Cannabinoids in Hemp-Infused Fermented Milk Drinks: An Analysis of Pre- and Post-Fermentation Levels

Tytuł artykulu

Molecules, 2024, 29(21):5056

https://doi.org/10.31883/pjfns/195594 Nazwa czasopisma. rok, numer, strony, DOI

Joanna Kanabus *, Marcin Bryła, Katarzyna Kycia, Joanna Markowska, Marek Roszko Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko; Imię i nazwisko; Imię i nazwisko; (*)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy	Afiliacja	Podpis Autora
1	Kanabus Joanna */**	Koncepcja badania, metodologia, analiza formalna i statystyczna, przeprowadzenie badań, zasoby, wizualizacja, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i edycja	72%	Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno- Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut	Kunchis
2	Bryla Marcin	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	6%	Badawczy	n
3	Kycia Katarzyna	Przeprowadzenie badań, zasoby, recenzja i edycja	8%	l	Kelyne kpi
	Markowska Joanna	Przeprowadzenie badań, zasoby, recenzja i edycja	8%		Montrailes
-	Roszko Marek	Koncepcja badania, metodologia, nadzór, recenzja	6%%		A

⁸ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

⁹ Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

5. STWIERDZENIA I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań wykazano, że dodatek konopi do żywności wpływa istotnie na jej cechy sensoryczne a procesy przetwórcze decydują o końcowej zawartości substancji bioaktywnych. Realizacja celu pracy i weryfikacja postawionych hipotez wymagała realizacji szeregu zadań badawczych z obszaru opracowania metod badawczych, metrologii pomiarów i innych. W pracy postawiono cztery hipotezy badawcze:

Hipoteza 1: Dobór układu ekstrakcyjnego ma wpływ na wydajność ekstrakcji kannabinoidów i terpenów z materiału roślinnego.

Hipoteza 2: Warunki suszenia wybranych elementów rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* wpływają na zawartość kannabinoidów oraz terpenów w trakcie i po zakończeniu suszenia.

Hipoteza 3: Proces pieczenia i czas przechowywania pieczywa cukierniczego z dodatkiem wsadu konopnego na bazie liofilizowanego suszu konopnego z *Cannabis sativa* L. *var. sativa* wpływa na stabilność, skład i profil kannabinoidów oraz terpenów.

Hipoteza 4: Proces fermentacji mlekowej zachodzącej podczas produkcji fermentowanego napoju mlecznego zawierającego wsad konopny na bazie rośliny *Cannabis sativa* L. *var. sativa* oraz czas przechowywania wpływa na stabilność, skład i profil kannabinoidów oraz terpenów.

W wyniku zaplanowanych i przeprowadzonych sześciu zadań badawczych <u>potwierdzono</u> wszystkie postawione hipotezy.

Ponadto dokonano następujących stwierdzeń i obserwacji:

- 1. Najbardziej odpowiednią cieczą ekstrakcyjną dla kwiatostanów i liści, a także nasion konopnych jest metanol. W przypadku terpenów jest to octan etylu.
- Zawartość kannabinoidów w materiale roślinnym zależna jest od elementu rośliny. Najwięcej kannabinoidów zawierają kwiatostany, następnie liście i najmniej oczyszczone nasiona konopne.
- Dobór metody i warunków suszenia rośliny *Cannabis sativa* L. var. sativa ma wpływ na końcową zawartość substancji bioaktywnych (kannabinoidów i terpenów). Wyższa temperatura procesu suszenia powoduje większe zmiany (w tym degradację) tych związków.

- 4. Rodzaj i ilość wsadu konopnego do produktów na bazie konopi wpływa na końcową zawartość analizowanych związków w gotowym produkcie.
- Wsad konopny do fermentowanego napoju mlecznego zapewniający obecność kannabinoidów w gotowym produkcie po zakończeniu 28 dniowego przechowywania chłodniczego to susz konopny oraz olej konopny.
- 6. Forma wsadu konopnego do fermentowanych napojów mlecznych nie wpływa istotnie na skuteczność procesu fermentacji, nie wpływa negatywnie na żywotność bakterii fermentacji mlekowej oraz na wartość pH.
- 7. Procesy przetwórstwa żywności tj. fermentacja mlekowa i obróbka termiczna istotnie wpływają na zmianę profilu substancji bioaktywnych w gotowym produkcie.
- Dobór temperatury podczas wypieku pieczywa cukierniczego wpływa istotnie na profil kannabinoidów. Zastosowanie wyższej temperatury (tj. 200°C) powoduje zwiększenie stężeń neutralnych kannabinoidów (np. CBD i Δ⁹-THC) w porównaniu do zawartości przed wypiekiem.
- Istotnie większe zmiany w profilu kannabinoidów i terpenów w produkcie powoduje obróbka termiczna ze względu na zastosowanie wyższej temperatury niż podczas fermentacji mlekowej.
- 10. Najlepszą jakością ogólną spośród ciastek kruchych zawierających liofilizowany susz konopny charakteryzują się ciastka z zawartością 1% wsadu konopnego.
- 11. Najlepszą jakością ogólną pośród próbek fermentowanych napojów mlecznych zawierających wsad konopny charakteryzują się próbki zawierające 0,5% ekstraktu konopnego, a nieco niższe wyniki uzyskano dla próbek z dodatkiem oleju konopnego (wszystkie warianty).

6. SPIS LITERATURY

- 1. Addo P.W., Chouvin-Bosse T., Taylor N., Macpherson S., Paris M., Lefsrud M. (2023). Freeze-drying *Cannabis sativa* L. using real-time relative humidity monitoring and mathematical modeling for the cannabis industry. *Industrial Crops Products*, 199,1.
- Aizpurua-Olaizola O., Omar J., Navarro P., Olivares M., Etxebarria N., Usoblaga A. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406,7549-7560.
- Alonso-Esteban J.I., González-Fernández M.J., Fabrikov D., Torija-Isasa E., De Cortes Sánchez-Mata M., Guill-Guerrero J.L. (2020). Hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties: Fatty acid profiles and upgrading of γ-linolenic acid–containing hemp seed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122, 7, 1900445.
- 4. André A., Leupin M., Kneubühl M., Pedan M., Chetschik I. (2020). Evolution of the polyphenol and terpene content, antioxidant activity and plant morphology of eight different fiber-type cultivars of *Cannabis sativa* L. cultivated at three sowing densities. *Plants*, 9 (12), 1740.
- 5. Adro Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, 24,238-242.
- Bartkiene E., Schleining G., Krungleviviute V., Zadeike D., Zavistanaviciute P., Dimaite I., Kuzmaite L., Riskeviciene V., Juodeikiene G. (2016). Development and quality evaluation of lacto-fermented product based on hulled and not hulled hempseed (*Cannabis sativa* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 72, 544-551.
- 7. Berghofer, E.; Pollmann, K.; Traby, M.; Frenkenberger, C. Method for Producing Hemp Milk. CA Patent 2,505,350 C, 15 May 2012.
- Berman P., Futoran K., Lewitus G.M., Mukha D., Benami M., Shlomi T., Meiri D. (2018). A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in *Cannabis*. *Scientific reports*, 8, 14280.
- 9. Beshkova D., Simova E., Frengova G., Simov Z. (1998). Production of falovour compounds by yoghurt starter cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20,180-186.
- 10. Bisterfeld von Merr, G. Method of Obtaining Hemp Plant Juice and Use of Same for the Production of Beverages. U.S. Patent 8,778,418 B2, 15 July 2014.
- Bonn-Miller M.O., Loflin M.J.E., Thomas B.F., Marcu J.P., Hyke T., Vandrey R. (2017). Labelling accuracy of cannabidiol extracts sold online. *Jama*, 318, 17, 1708-1709.
- 12. Bueno J., Leuer E., Kearney M., Green E.H., Greenbaum E.A. (2020). The preservation and augmentation of volatile terpenes in cannabis inflorescence. *Journal of Cannabis Research*, 2 (1), 1-11.
- 13. Casano S., Grassi G., Martini V., Michelozzi M. (2011). Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa* L. *Acta Horticulturae*, 925, 115-121.

- Cerino P., Buonerba C., Cannazza G., D'Auria J., Ottoni E., Fulgione A., Di Stasio A., Pierri B., Gallo A. (2021). A Review of Hemp as Food and Nutritional Supplement. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6,1.
- 15. Chanda D., Neumann D., Glatz J.F.C. (2019). The endocannabinoid system: Overview of an emerging multifaceted therapeutic target. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 140, 51-56.
- Charoen R., Jangchud A., Jangchud K., Harnsilwat T., Naivikul O., McClements D.J. (2011). Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: Whey protein, gum arabic, and modified starch. *Journal of food science*, 76,(1), E165-E172.
- 17. Chen P. Rogers M.A. (2019). Opportunities and challenges in developing orallyadministered Cannabis edibles. *Current Opinion in Food Science*, 28, 7-13.
- Chen C., Wongso I., Putnam D., Khir R., Pan Z. (2021). Effect of hot air and infrared drying on the retention of cannabidiol and terpenes in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 172, 114051.
- Christinat N., Savoy M.C., Mottier P. (2020). Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification od 15 cannabinoids in food. *Food Chemistry*, 318, 126469
- 20. Ciolino L.A., Ranieri T.L., Taylor A.M. (2018). Commercial *Cannabis* consumer products part 1: GC-MS quantitative analysis of *Cannabis* cannabinoids. *Forensic science international*, 289, 429-437.
- 21. Citti C., Breghiroli D., Vandelli M.A., Cannazza G. (2018a). Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 147,565-579.
- 22. Citti C., Pacchetti B., Vandelli M.A., Forni F., Cannazza G. (2018b). Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149, 532-540.
- 23. Danish Veterinary and Food Administration (DVFA). Guidance Levels for Tetrahydrocannabinol Content in Foodstuffs from Industrial Hemp. 2018.
- 24. Das P.C., Vista A.R., Tabil L.G., Baik O. (2022). Postharvest operations of *Cannabis* and their effect of cannabinoid content: a review. *Bioengineering*, 9,8,364.
- 25. Das P.C., Bail O.D., Tabil L.G. (2024). Microwave-infrared drying of cannabis (*Cannabis sativa* L.): Effect on drying characteristics, energy consumption and quality. *Industrial Crops and Products*, 211, 118215.
- 26. De Backer B., Debrus B., Lebrun P., Theunis L., Dubois N., Decock L., Verstraete A., Hubert P., Charlier C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in *Cannabis* plant material. *Journal of Chromatography B*, 877, 4115-4124.
- 27. Di Cesare L.F., Forni E., Viscardi D., Nani R.C. (2003). Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51,12, 3575–81.

- 28. Dubrow G.A., Pawar R.S., Srigley C., Fong Sam J., Talavera C., Parker C.H., Noonan G.O. (2021). A survey of cannabinoids in hemp-derived products from the United States marketplace. *Journal of food composition and analysis*, 97, 103800.
- 29. Dussy F.E., Hamberg C., Luginbühl M., Shwerzmann T., Briellman T.A. (2005). Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in Cannabis products. *Forensic science international*, 149, 1, 3-10.
- 30. EFSA (2015). Scientific Opinion on the risks for human health related to the presence of tetrahydrocannabinol (THC) in milk and other food of animal origin.
- 31. EIHA (2020). EIHA contribution on maximum levels for THC in food.
- 32. ElSohly M.A., Radwan M.M., Gul W., Chandra S., Galal A. (2017). Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. In Phytocannabinoids: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Kinghorn, A., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Eds.; *Springer*: Cham, Switzerland, 103.
- Eržen M., Košir I.J., Ocvirk M., Kreft S., Čerenak, A. (2021). Metabolomic analysis of cannabinoids and essential oil profiles in different hemp (*Cannabis sativa* L.). Phenotypes. *Plants*, 10, 966.
- Esfandi A., Mehrafarin A., Jari S.K., Badi H.N., Larijani K. (2022). Variability in color and phytochemical properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) upon drying techniques; an opportunity for industrial products. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1:79-86.
- 35. Fairbarin J.W., Liebmann J.A., Rowan M.G. (1976). The stability of *Cannabis* and its preparations on storage. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 28, (1), 1-7.
- 36. Farinon B., Molinari R., Constantini L., Merendino N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12 (7), 1935.
- Fischedick J.T., Hazekamp A., Erkelens T., Choi Y.H., Verpoorte R. (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71, 2058-2073.
- 38. Flores-Sanchez I.J., Verpoorte R. (2008). Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochemistry reviews*, 7, 615-639.
- 39. Gallo-Molina A.C., Castro-Vargas H.I., Garzón-Méndez W.F., Martinez Ramirez J.A., Rivera Monroy Z.J., King J.W., Parada-Alfonso F. (2019). Extraction, isolation, and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 208-216.
- 40. Garret E.R.C., Hunt A. (1974). Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ 9-tetrahydrocannabinol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63,7, 1056-1064.
- 41. Giarnetti M., Paradiso V.M., Caponio F., Summo C., Pasqualone A. (2015). Fat replacement in shortbread cookies using an emulsion filled gel based on inulin and extra virgin olive oil. *LWT Food Science and Technology*, 63, 339–345.

- 42. Golombek P., Müller M., Bartlott I., Sproll C., Lachenmeier D.W. (2020). Conversion of Cannabidiol (CBD) into Psychotropic Cannabinoids Including Tetrahydrocannabinol (THC): A Controversy in the Scientific Literature. *Toxins*, 8, (2), 41.
- 43. Gonçalves J., Rosado T., Soares S., Simão A.Y., Caramelo D., Luís Â., Fernandez N., Barroso M., Gallardo E., Duarte A.P. (2019).). Cannabis and its secondary metabolites: their use as therapeutic drugs, toxicological aspects, and analytical determination. *Medicines*, 6, 1, 31.
- 44. Guang H., Wenwei C. Application of powder of whole *Cannabis sativa* seeds for preparing functional food with adjuvant therapy of lowering blood fat. China Patent 100,998,414B, 30 December 2006.
- 45. Gul W., Gul S.W., Radwan M.M., Wanas A.S., Khan I.I., Sharaf M.H., ElSohly M.A. (2015). Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of *Cannabis* using high-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 98, (6), 1523-1528.
- 46. Gülck T., Møller B.L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25, 985–1004.
- 47. Hartsel J.A., Eades J., Hickory B., Makriyannis A. (2016). *Cannabis sativa* and hemp. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*; Guptam, C.R., Ed.; Academis Press: Cambridge, MA, USA, 735–754.
- 48. Hazekamp A., Fischedick J.T. (2012). *Cannabis* From cultivar to chemovar. *Drug testing and analysis*, 4 (7-8), 660-667.
- 49. Helal A., Tagliazucchi D. (2018). Impact of in-vitro gastro-panceatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. *LWT Food Science and Technology*, 89,164-170.
- 50. Horanin A., Bryndal I. (2017). Hemp-Active ingredients, medicinal properties and using. *Research Papers of Wrocław University of Economics*,494, 76-84.
- 51. Ibrahim E.A., Gul W., Gul S.W., Stamper B.J., Hadad G.M., Abdel Salam R.A., Ibrahim A.K., Ahmed S.A., Chandra S., Lata H., Radwan M.M., ElSohly M.A. (2018). Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of *Cannabis sativa* Using GC-FID. *Planta Medica*, 84, (4), 250-259.
- 52. Illupapalayam V.V., Smith S.C., Gamlatch S. (2014). Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yoghurt with spices. *LWT Food Science and Technology*, 55,1,255-262.
- 53. Jang E., Kim H., Jang S., Lee J., Baeck S., In S., Kim E., Kim Y., Han E. (2020). Concentrations of THC, CBD, and CBN in commercial hemp seeds and hempseed oil sold in Korea. *Forensic Science International*, 306,110064.
- Kalinová J.P., Vrchotová N., Tříska J., Hellerová Š. (2021). Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) as a possible source of cannabidiol. *Journal of Central European Agriculture*, 22, 1, 110-118.
- 55. Kanabus J., Bryła M., Roszko M., Modrzewska M., Pierzgalski A. (2021). Cannabinoids – Characteristics and potential for use in food production. *Molecules*, 26(21), 6723.

- 56. Karas J.A., Wong L.J.M., Paulin O.K.A., Mazeh A.C., Hussein M.H., Li J., Velkov T. (2020). The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics*, 9, 406.
- Kladar N., Srdenoić Čonić B., Božin, B.; Torović, L. (2021). European hemp-based food products—Health concerning cannabinoids exposure assessment. *Food Control*, 129, 108233.
- Kleinhenz M.D., Magnin G., Ensley S.M., Griffin J.J., Goeser J., Pas L.E., Coetzee J.F. (2020). Nutrient concentrations, digestibility and cannabinoid concentrations of industrial hemp plant components. *Applied Animal Science*, 36, (4), 489-494.
- 59. Knezevic F., Nikolai A., Marchar R., Sosa S., Tubaro A., Novak J. (2021). Residues of herbal leaf teas. How much of the cannabinoids remain? *Food Control*, 127,108146.
- 60. Kwaśnica A., Pachura N., Masztalerz K., Figiel A., Zimmer A., Kupczyński R., Wujcikowska K., Carbonell-Barrachina A.A., Szumny A., Różański H. (2020). Volatile composition and sensory properties as quality attributes of fresh and dried hemp flowers (*Cannabis sativa* L.) *Foods*, 9 (8), 1118.
- Kwaśnica A., Pachura N., Carbonell-Barrachina Á.A., Issa-Issa H., Szumny D., Figiel A., Masztalerz K., Klemens M., Szumny A. (2023). Effect of drying methods on chemical and sensory properties of *Cannabis sativa* leaves. *Molecules*, 28, 24, 8089.
- 62. Kycia K., Chlebowska-Śmigiel A., Szydłowska A., Sokół E., Ziarno M., Gniewosz M. (2020). Pullulan as a potential enhancer of Lactobacillus and Bifidobacterium viability in symbiotic low fat yoghurt and its sensory quality. LWT Food Science and Technology, 128,109414.
- 63. Lachenmeier D.W., Habel S., Fischer B., Herbi F., Zerbe T., Bock V., Rajcic de Rezende T., Walch S.G., Sproll C. (2020). Are side effects of cannabidiol (CBD) products caused by tetrahydrocannabinol (THC) contamination? *F1000Research*, 8, 1394.
- 64. Lazarjani M.P., Torres S., Hooker T., Fowlie C., Young O., Seyfoddin A. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review. *Journal of Cannabis Research*, 2, 35.
- 65. Leonard W., Zhang P., Ying D., Fang Z. (2020). Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*,19 (1), 282-308.
- 66. Łopusiewicz Ł., Waszkowiak K., Polanowska K., Mikołajczak B., Śmietana N., Hrebień-Flisińska A., Sadowska J., Mazurkiewicz-Zapałowicz K., Drozłowska E. (2022). The effect of yogurt and kefir starter cultures on bioactivity of fermented industrial by-product from *Cannabis sativa* production – hemp press cake. *Fermentation*, 8,10,490.
- 67. Marchetti L., Brighenti V., Rossi M.C., Sperlea J., Pellati F., Bertelli D. (2019). Use of 13C-qNMR Spectroscopy for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules*, 24, 1138.
- 68. McRae G., Melanson J.E. (2020). Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in *Cannabis* and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 7381-7393.

- 69. Meija J., McRae G., Miles C.O., Melanson J.E. (2021). Thermal stability of cannabinoids in dried *Cannabis*: Kinetic study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-8.
- Merlino M., Arena E., Cincotta F., Condurso C., Brighina S., Grasso A., Fallico B., Verzera. (2022). Fat type and baking conditions for cookies recipe: a sensomic approach. *International Journal of Food Science & Technology*, 57, 9, 5943-5953.
- Micalizzi G., Vento D., Alibrando F., Donnarumma D., Dugo P., Mondello L. (2021). *Cannabis sativa* L.: A comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461864.
- 72. Morales P., Hurst D.P. Reggio P.H. (2017). Molecular targets of the phytocannabinoids—A complex picture. Phytocannabinoids: Unraveling the complex Chemistry and Pharmacology of *Cannabis sativa*, 103-131.
- 73. Nemś A., Miedzianka J., Kita A. (2022). Quality and nutritional value of cookies enriched with plant-based protein preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102, 11, 4629-4639.
- 74. Ozturk B.c Argin S., Ozilgen M., McClements D.J. (2014). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaia saponin and lecithin. *Journal of Food Engineering*, 142,57-63.
- 75. Pacifici R., Marchel E., Salvatore F., Guandalini L., Busardo F.P., Pichini S. (2017). Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55, 10, 1555-1563.
- 76. Park S.H., Pauli C.S., Gostin E.L., Staples S.K., Seifried D., Kinney C., Vanden Heuvel B.D. (2022). Effects of short-term environmental stresses on the onset of cannabinoid production in young immature flowers of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Cannabis Research*, 4,1-13.
- 77. Pavlovic R., Nenna G., Calvi L., Panseri S., Borgonovo G., Giupponi L., Cannazza G., Giorgi A. (2018). Quality traits of "cannabidiol oils": Cannabinoids content, terpene fingerprint and oxidation stability of European commercially available preparations. *Molecules*, 23,1230.
- 78. Pellati F., Borgonetii V., Brighenti V., Biagi M., Benvenuti S., Corsi L. (2018a). *Cannabis sativa* L. and non-psychoactive cannabinoids: Their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. *BioMed Research International*, 1, 1691428.
- 79. Pellati F., Brighenti V., Sperlea J., Marchetti L., Bertelli D., Benvenuti S. (2018b). New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp) *Molecules*, 23 (10), 2639.
- 80. PN-ISO 7889:2007. Jogurt. Oznaczanie liczby charakterystycznych drobnoustrojów metoda liczenia kolonii w temperaturze 37C.

- 81. PN-EN ISO 13299:2010. Analiza sensoryczna Metodologia Ogólne wytyczne ustalania profilu sensorycznego.
- Pojić M., Dapčević Hadnađev T., Hadnađev M., Rakita S., Brlek T. (2015). Bread supplementation with hemp seed cake: A by-product of hemp oil processing. *Journal of Food Quality*, 38, 431-440.
- 83. Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2017/1155 z dnia 15 lutego 2017 r.
- 84. Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006
- 85. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. w sprawie nowej żywności, zmieniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie Komisji (WE) nr 1852/2001.
- 86. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2021/2115 z dnia 2 grudnia 2021 r. ustanawiające przepisy dotyczące wsparcia planów strategicznych sporządzanych przez państwa członkowskie w ramach wspólnej polityki rolnej (planów strategicznych WPR) i finansowanych z Europejskiego Funduszu Rolniczego Gwarancji (EFRG) i z Europejskiego Funduszu Rolnego na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich (EFRROW) oraz uchylające rozporządzenia (UE) nr 1305/2013 i (UE) nr 1307/2013.
- 87. Ruiz Ruiz J.C., Ortiz Vazques E.D.L.L., Segura Campos M.R. (2017). Encapsulation of vegetable oils as source of omega-3 fatty acids for enriched functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1423-1434.
- 88. Rutkowska J., Baranowski D., Antoniewska-Krzeska A., Kostyra E. (2023). Comparison of Storage-Related Volatile Profiles and Sensory Properties of Cookies Containing Xylitol or Sucrose. *Foods*, 12,(23), 4270.
- 89. Sadowska A., Świderski F., Rakowska R., Kostyra E., Piotrowska A. (2015). Przydatność metody ilościowej analizy opisowej (QDA) i analizy składowych głównych (PCA) na przykładzie oceny sensorycznej grillowanych steków wołowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 4, 101, 099-112.
- 90. Salami S.A., Martinelli F., Glovino A., Bachari A., Arad N., Mantri N. (2020). It is our turn to get *Cannabis* high: Put cannabinoids in food and health baskets. *Molecules*, 25 (18), 4036.
- 91. Shim, J.S. Manufacturing Method of Bread Containing Blue Ginseng Seed. KR Patent 100,927,544 B1, 19 November 2019.
- 92. Sokołowska B. Połaska M., Dekowska A., Woźniak Ł., Roszko M. (2020). Degradation of Preservatives with the Formation of Off-Odor Volatile Compounds – The Case of Strawberry-Flavored Bottled Water. *Beverage*, 6 (4), 67.
- 93. Soorni A., Fatahu R., Haak D.C., Salami S.A., Bombarely A. (2017). Assessment of Genetic Diversity and Population Structure in Iranian *Cannabis* Germplasm. *Scientific Reports*, 7,15668.

- 94. Spadafora N.D., Felletti S., Chenet T., Sirangelo T.M., Cescon M., Catani M., De Luca C., Stevanin C., Cavazzini A., Pasti L. (2024). The influence of drying and storage conditions on the volatilome and cannabinoid content of *Cannabis sativa* L. inflorescences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416, 3797-3809.
- 95. Spano M., Di Matteo G., Rapa M., Ciano C., Ingallina C., Cesa S., Menghini L., Carradori S., Giusti A.M., Di Sotto A., Di Giacamo S., Sobolev A.P., Vinci G., Mannina L. (2020). Commercial Hemp Seed Oils: A Multimethodological Characterization. *Applied Sciences*, 10(19), 6933.
- 96. Steinbach, W. Hemp Pralines. DE Patent 19746830C1, 12 August 1999.
- Sun-Waterhouse D., Penin-Peyta L., Wdhwa S.S., Waterhouse G.I.N. (2012). Storage stability of phenolic-fortified avocado oil encapsulated using different polymer formulations and co-extrusion technology. *Food and Bioprocess Technology*, 5,3090-3102.
- 98. Tahir N.M., Shahbazi F., Rondeau-Gangné S., Trant J.F. (2021). The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of Cannabis Research*, 3, 1-12.
- 99. Talens C., Lago M., Simó-Boyle L., Odriozola-Serrano I., Ibargüen M. (2022). Desirability-based optimization of bakery products containing pea, hemp and insect flours using mixture design methodology. *LWT*, 168, 1, 113878.
- 100. Teo A., Dimartino S., Lee S.J., Goh K.K.T., Wen J., Oey I., Ko S., Kwakm H.S. (2016). Interfacial structures of whey protein isolate (WPI) and lactoferrin on hydrophobic surfaces in a model system monitored by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and their formation on nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 56, 150-160.
- 101. Thamkaew G., Sjoholm I., Galindo F.G. (2021). A review of drying methods for improving the quality of dried herbs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61,11.
- 102. Tomko A.M., Whynot E.G., Ellis L.D., Dupré D.J. (2020), Anti-cancer potential of cannabinoids, terpenes and flavonoids present in *Cannabis. Cancers*, 12.
- 103. Trofin I.G., Dabija G., Vaireanu D.I., Filipescu L. (2012). Effects of long term storage on secondary metabolite profiles of *Cannabis* resin. *Forensic Science International*, 301,331-340.
- 104. Turek C., Florian C.S. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive* reviews in food science and food safety, 12,1,40-53.
- 105. Turner J.C., Mahlberg P.G. (1984). Effects of Sample Treatment on Chromatographic Analysis of Cannabinoids in *Cannabis sativa* L.(Cannabaceae). *Journal of Chromatography A*, 283, 165–171.
- 106. Ujváry I., Hanuš L. (2016). Human metabolites of cannabidiol: A review on their formation, biological activity, and relevance in therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1, 90-101.
- 107. Uziel A., Milay L., Procaccia S., Cohen R., Burstein A., Sulimani L., Shreiber-Livne I., Lewitus D., Meiri D. (2024). Solid-State Microwave Drying for Medical Cannabis

Inflorescences: A Rapid and Controlled Alternative to Traditional Drying. *Cannabis and Cannabinoid Research.*, 9,1.

- 108. Wen W., Alseekh S., Fernie A.R. (2020). Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. *Current opinion in plant biology*, 55, 100-108.
- 109. Wierzbicka A., Biller E., Plewicki T. (2000). Wybrane aspekty inżynierii żywności w tworzeniu produktów spożywczych. Wyd. SGG, Warszawa.
- 110. Wu J. (2019). Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: yesterday, today, and tomorrow. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40,297-299.
- 111. Wyrwisz J., Kurek M., Karp S., Moczkowska M., Stelmasiak A., Wierzbicka A. (2016). Optimization of modified atmosphere gases composition used for storage of high-fiber muffins. *Journal of Food Process Engineering*, 40 (3).
- 112. Zamengo L., Bettin C., Badocco D., Marco V.D., Milo G., Frison G. (2019). The role of time and storage conditions on the composition of hashish and marijuana samples: A four-year study. *Forensic Science International*, 298,131-137.
- 113. Zaręba D., Ziarno M., Obiedziński M., Bzducha A. (2008). Profil lotnych związków modeli mleka niefermentowanego i fermentowanego przez bakterie jogurtowe. Żywność. Nauka, Technologia. Jakość, 2, 57,60-73.
- 114. Znamirowska A., Kalicka D., Buniowska M., Rożek P. (2018). Wpływ dodatku suszu z wytłoków jabłkowych na właściwości fizykochemiczne i sensoryczne jogurtów. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 25,2,115,71-80.

ANEKS

Tabela S1. Współczynnik korelacji $[R^2]$, zakres analityczny oznaczania kannabinoidów, LOD oraz LOQ [µg/mL] dla świeżych i suszonych elementów rośliny, a także dla ciastek kruchych oraz fermentowanych napojów mlecznych zawierających wsad konopny.

Analit	Współczynnik korelacji [R ²]	Zakres analityczny [µg/mL]	LOD [µg/mL]	LOQ [µg/mL]
CBD	0,9993	0,2-25,6	0,001	0,003
CBDA	0,9999	0,4-51,2	0,0003	0,0009
Δ^9 -THC	0,9999	0,08-10,24	0,0011	0,0036
Δ^9 -THCA-A	0,9999	0,08-10,24	0,0004	0,0013
CBC	0,9997	0,02-2,56	0,005	0,020
CBCA	0,9992	0,08-10,24	0,0008	0,003
CBG	0,9994	0,008-1,024	0,0003	0,0009
CBGA	0,9992	0,02-2,56	0,00003	0,0001
CBDV	0,9998	0,008-1,024	0,001	0,002
CBDVA	0,9999	0,02-2,56	0,00003	0,0001
Δ^9 -THCV	0,9999	0,008-1,024	0,0006	0,002
Δ^9 -THCVA	0,9996	0,02-2,56	0,0001	0,0002
Δ^{8} -THC	0,9998	0,008-1,024	0,002	0,006
CBN	0,9998	0,008-1,024	0,002	0,007
CBNA	0,9996	0,002-0,256	0,0001	0,0002
CBL	0,9999	0,02-2,56	0,002	0,007
CBLA	0,9997	0,02-2,56	0,0004	0,0012

Tabela S2.	Poziom	wzmocnienia,	odzysk	[%]	oraz	RSD	[%]	dla	nasion	konopnych	(n=6) –
kannabinoid	lv.										

	Poziom		
Związek	wzmocnienia	Odzysk [%]	RSD [%]
	[µg/mL]		
	0,2	99	9
CBD	3,2	97	6
	25,6	103	4
	0,008	98	2
CBN	0,128	100	4
	1,024	101	7
	0,008	97	4
CBG	0,128	98	4
	1,024	99	4
	0,08	98	3
Δ^9 -THC	1,28	99	2
	10,240	100	1
	0,008	100	4
Δ^8 -THC	0,128	100	5
	1,024	100	4

	0,02	99	9
CBC	0,32	99	5
	2,56	98	6
	0,02	98	6
CBL	0,32	100	3
	2,56	100	1
	0,008	92	7
CBDV	0,128	96	8
	1,024	97	3
	0,008	99	5
Δ^9 -THCV	0,128	99	9
	1,024	100	11
	0,4	98	8
CBDA	6,4	101	6
	51,2	101	7
	0,02	98	10
CBNA	0,32	100	9
	2,56	100	11
	0,02	102	9
CBGA	0,32	100	3
	2,56	100	2
	0,08	100	5
Δ^9 -THCA-A	1,28	98	5
	10,24	102	5
	0,08	100	11
CBCA	1,28	101	7
	10,24	101	11
	0,02	100	6
CBLA	0,32	102	7
	2,56	95	4
	0,02	101	9
CBDVA	0,32	103	6
	2,56	101	7
	0,02	99	8
Δ^9 -THCVA	0,32	98	10
-	2,56	99	4

Zwiazek	Stężenie
Związek	[mg/kg]
CBD	$1,09^{\rm h} \pm 0,006$
CBN	<loq<sup>a</loq<sup>
CBG	$0,354^{\rm f} \pm 0,010$
Δ^9 -THC	$0,106^{d} \pm 0,005$
Δ^{8} -THC	<loq<sup>a</loq<sup>
CBC	<loq<sup>a</loq<sup>
CBL	<loq<sup>a</loq<sup>
CBDV	$0,013^{b} \pm 0,001$
Δ^9 -THCV	<loq<sup>a</loq<sup>
CBDA	$21,038^{i} \pm 0,988$
CBNA	$0,061^{\circ} \pm 0,005$
CBGA	$0,192^{e} \pm 0,014$
Δ ⁹ -THCA-A	$0,\!494^{\text{g}}\pm0,\!089$
CBCA	<loq<sup>a</loq<sup>
CBLA	$0,192^{e} \pm 0,007$
CBDVA	<loq<sup>a</loq<sup>
Δ^9 -THCVA	<loq<sup>a</loq<sup>

Tabela S3. Zawartość wybranych kannabinoidów w próbce komercyjnie dostępnych nasion konopnych [mg/kg] (n=3).

a-h - wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05

Tabela S4. Równanie krzywej wzorcowej, współczynnik determinacji [R²], LOD oraz LOQ [mg/kg] dla terpenów.

Nazwa związku	Równanie krzywej [µg/mL]	Współczynnik determinacji [R ²]	LOD [mg/kg]	LOQ [mg/kg]
α-pinen	y=60671x	0,9972	0,217	0,723
kamfen	y=56975x	0,9993	0,279	0,932
β-pinen	y=56051x	0,9973	0,191	0,637
Δ -3-karen	y=65912x	0,9995	0,169	0,563
β-myrcen	y=50752x	0,9992	0,458	1,528
α-terpinen	y=85571x	0,9987	0,138	0,458
d-limonen	y=69434x	0,9996	0,158	0,526
ocimen	y=17903x	0,9950	0,740	2,466
y-terpinen	y=75577x	0,9990	0,897	2,990
p-cymen	y=92576x	0,9994	0,446	1,488
terpinolen	y=70225x	0,9988	0,277	0,924

linalool	y=70450x	0,9951	0,126	0,420
isopulegol	y=77843x	0,9952	0,149	0,498
β-kariofilen	y=105735x	0,9975	0,105	0,355
α-humulen	y=808713x	0,9960	0,172	0,576
geraniol	y=60871x	0,9918	0,692	2,306
neoridol	y=113170x	0,9976	0,826	2,753
guaiol	y=104546x	0,9979	0,949	3,165
α-bisabolol	y=95086x	0,9969	1,179	3,931

Tabela S5. Poziom wzmocnienia [mg/kg], odzysk [%] oraz RSD [%] dla świeżych elementów rośliny (kwiatostany, liście) – terpeny.

	Kwiatosta	ny		Liście		
Nazwa	Poziom wzmocnienia	R	RSD	Poziom wzmocnienia	R	RSD
związku	[mg/kg]	[%]	[%]	[mg/kg]	[%]	[%}
	10	98	3	2	96	10
α-pinen	100	95	3	10	99	1
	200	91	4	20	100	1
	2,5	100	3	2,5	95	1
kamfen	5	101	1	5	97	2
	10	101	1	10	97	1
	5	102	7	1	97	1
β-pinen	50	96	3	5	100	2
	100	103	2	10	102	1
	5	96	3	2,5	99	4
Δ -3-karen	50	100	3	5	98	1
	200	95	3	10	101	3
	10	98	2	2,5	98	2
β-myrcen	100	100	2	5	97	1
	200	98	1	10	99	1
	0,5	0,5 95 4 0,5		0,5	94	4
a-terpinen	5	94	3	5	97	1
	10	97	1	10	96	6
	5	93	3	5	100	2
d-limonen	10	100	1	10	99	1
	100	94	2	100	97	3
	2,5	98	5	2,5	96	5
ocimen	5	96	5	5	99	1
	10	95	3	10	93	3
	5	91	2	5	100	1
γ-terpinen	10	100	1	10	91	1
y-terpmen	100	100	2	50	92	2
	2,5	95	2	2,5	98	3
p-cymen	5	99	1	5	96	1
	10	97	1	10	97	1

	5	95	1	1	96	1
terpinolen	50	97	7	5	95	1
	100	100	4	10	99	1
	0,5	99	1	0,5	92	4
linalool	5	93	1	5	91	5
	10	96	2	10	94	1
	0,5	96	9	0,5	92	10
isopulegol	5	98	2	5	94	4
	10	95	1	10	98	1
	50	101	6	10	97	1
β-kariofilen	100	97	3	100	97	2
	400	99	5	200	98	3
	10	99	2	50	97	1
α-humulen	100	100	4	100	95	5
	200	95	6	200	97	3
	5	100	2	5	94	1
geraniol	50	97	2	50	92	2
	100	103	1	100	100	2
	5	98	4	5	97	4
neoridol	50	91	3	50	94	1
	100	99	4	100	99	2
	5	98	2	5	99	2
guaiol	50	94	4	50	94	1
	100	99	1	100	100	1
	5	98	4	5	98	5
α-bisabolol	50	94	1	50	90	1
	100	100	1	100	101	1

Tabela S6. Poziom wzmocnienia [mg/kg], odzysk [%] oraz RSD [%] dla suszonych elementów rośliny (kwiatostany, liście) – terpeny.

	Kwiatosta	ny		Liście		
Nazwa	Poziom wzmocnienia	R	RSD	Poziom wzmocnienia	R	RSD
związku	[mg/kg]	[%]	[%]	[mg/kg]	[%]	[%]
	10	93	8	2	97	4
α-pinen	100	102	3	10	94	10
_	200	94	4	20	100	1
	2,5	100	3	2,5	91	9
kamfen	5	101	1	5	98	1
	10	102	2	10	99	5
	5	97	5	1	95	5
β-pinen	50	99	3	5	100	1
	100	100	2	10	100	4
	5	93	3	2,5	95	3
Δ -3-karen	50	98	7	5	98	1
	200	92	8	10	101	2

	10	99	6	2.5	101	2
β-mvrcen	100	95	3	5	98	1
	200	97	1	10	99	1
	0,5	96	4	0,5	97	4
α-terpinen	5	95	3	5	98	1
	10	97	1	10	97	6
	5	95	2	5	100	2
d-limonen	10	101	1	10	99	1
	100	95	2	100	97	2
	2,5	92	5	2,5	90	6
ocimen	5	93	5	5	96	1
	10	94	3	10	91	3
	5	98	5	5	98	5
y-terpinen	10	95	6	10	92	1
U	100	94	7	50	93	2
	2,5	99	2	2,5	98	3
p-cymen	5	101	1	5	96	1
	10	98	1	10	97	1
	5	100	1	1	96	1
terpinolen	50	100	7	5	95	1
	100	101	3	10	98	1
	0,5	97	1	0,5	90	4
linalool	5	92	1	5	90	5
	10	95	2	10	93	1
	0,5	103	7	0,5	91	6
isopulegol	5	106	1	5	91	2
1 0	10	99	1	10	94	4
	50	90	10	10	93	5
β-kariofilen	100	97	9	100	92	5
	400	100	10	200	100	1
	10	102	1	50	92	2
α-humulen	100	91	2	100	93	2
	200	94	6	200	92	2
	5	91	3	5	95	1
geraniol	50	98	5	50	93	2
-	100	96	1	100	100	2
	5	93	3	5	97	4
neoridol	50	98	3	50	94	2
	100	97	6	100	99	1
	5	96	6	5	99	2
guaiol	50	96	8	50	94	1
	100	98	1	100	100	1
	5	99	7	5	98	5
α-bisabolol	50	97	2	50	90	1
	100	96	4	100	101	1

Tabela S7. Zawartość terpenów [mg/kg \pm odchylenie standardowe] w kwiatostanach (S- małe kwiatostany, M- średnie kwiatostany, B – duże kwiatostany) oraz liściach świeżych oraz elementach suszonych różnymi metodami (metoda 1 – temperatura pokojowa, 2 – liofilizacja, 3a – suszenie konwekcyjne 50°C, 3b – suszenie konwekcyjne 60°C oraz 3c – suszenie konwekcyjne - 70°C) (n=3).

Nazwa	Część	Zawartość w świeżym	Spodziewana zawartość w wysuszonym materiale przy	Stę	żenie terpenów po	o suszeniu wybran	ą metodą [mg/k	g]
związku	rośliny	materiale roślinnym	zawartości wody (MC) ok, 10%	1	2	3a	3b	3c
	S	217,58 ^{Df} ±0,85	31,08	41,09 ^{Cd} ±0,39	25,80 ^{Cc} ±0,22	49,80 ^{Ce} ±0,51	11,94 ^{Bb} ±0,36	1,25 ^{Aa} ±0,07
a-pinen	Μ	168,68 ^{Cf} ±2,29	24,10	39,43 ^{Cd} ±0,45	23,80 ^{Bc} ±0,26	63,39 ^{De} ±1,63	13,55 ^{Cb} ±0,93	10,12 ^{Da} ±0,44
	В	98,30 ^{Bf} ±0,41	14,04	21,18 ^{Bc} ±0,22	33,38 ^{De} ±0,72	23,69 ^{Bd} ±0,32	16,86 ^{Db} ±1,01	3,19 ^{Ca} ±0,04
	L	$8,06^{\text{Ad}}\pm0,18$	1,15	11,45 ^{Ae} ±0,23	11,45 ^{Ae} ±0,23	6,40 ^{Ac} ±0,07	2,58 ^{Ab} ±0,034	$1,60^{Ba}\pm 0,11$
	S	$3,19^{\text{Dd}}\pm0,05$	<loq< th=""><th>2,08^{Dc}±0,13</th><th>0,94^{Bb}±0,02</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	2,08 ^{Dc} ±0,13	0,94 ^{Bb} ±0,02	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
kamfen	Μ	$2,14^{Bd}\pm0,05$	<loq< th=""><th>1,34^{Cc}±0,03</th><th>0,99^{Cb}±0,03</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,34 ^{Cc} ±0,03	0,99 ^{Cb} ±0,03	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	$2,55^{Cd}\pm0,08$	<loq< th=""><th>1,06^{Bb}±0,05</th><th>1,28^{Dc}±0,04</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,06 ^{Bb} ±0,05	1,28 ^{Dc} ±0,04	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	$1,44^{Ab}\pm 0,05$	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}				
	S	48,30 ^{Df} ±2,07	6,90	$10,48^{Cd}\pm 0,05$	8,73 ^{Dc} ±0,27	16,01 ^{Ce} ±0,87	3,91 ^{Bb} ±0,13	3,59 ^{Ba} ±0,04
β-pinen	Μ	45,39 ^{Cf} ±0,35	6,48	11,29 ^{Dd} ±0,05	7,60 ^{Bc} ±0,20	24,33 ^{De} ±0,72	4,36 ^{Cb} ±0,11	3,76 ^{Ca} ±0,03
	В	42,63 ^{Be} ±0,96	6,09	6,16 ^{Bb} ±0,16	7,98 ^{Cc} ±0,02	8,67 ^{Bd} ±0,12	6,12 ^{Db} ±0,05	3,74 ^{Ca} ±0,09
	L	3,25 ^{Ac} ±0,03	<loq< th=""><th>2,70^{Ab}±0,25</th><th>2,70^{Ab}±0,24</th><th>4,23^{Ad}±0,06</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	2,70 ^{Ab} ±0,25	2,70 ^{Ab} ±0,24	4,23 ^{Ad} ±0,06	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	S	194,40 ^{Cb} ±5,42	27,77	< LOQ ^{Aa}	<LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
\$ 2 konon	Μ	196,28 ^{Cb} ±0,77	28,04	< LOQ ^{Aa}				
o-5-karen	В	143,43 ^{Bb} ±4,77	20,49	< LOQ ^{Aa}				
	L	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}				
	S	272,52 ^{De} ±9,74	38,93	4,76 ^{Da} ±0,06	12,22 ^{Dc} ±0,26	18,97 ^{Dd} ±0,65	9,25 ^{Db} ±0,53	4,69 ^{Ca} ±0,07
β-myrcen	Μ	$208,84^{\text{Ce}}\pm 0,50$	29,83	3,23 ^{Ca} ±0,16	8,39 ^{Cc} ±0,20	16,76 ^{Cd} ±0,14	4,63 ^{Bb} ±0,09	4,79 ^{Cb} ±0,06
	В	$179,18^{Bf}\pm1,05$	25,59	2,06 ^{Ba} ±0,05	4,99 ^{Bc} ±0,16	8,40 ^{Be} ±0,17	6,62 ^{Cd} ±0,05	3,14 ^{Bb} ±0,07
	L	$3,39^{\rm Ab} \pm 0,03$	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}				
	S	$3,74^{\text{Dd}}\pm0,05$	0,53	1,25 ^{Dc} ±0,02	0,74 ^{Bb} ±0,01	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
a-terpinen	М	$2,59^{Bd}\pm0,11$	<loq< th=""><th>1,09^{Cb}±0,05</th><th>1,47^{Dc}±0,02</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,09 ^{Cb} ±0,05	1,47 ^{Dc} ±0,02	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	$1,50^{\rm Ad}\pm0,05$	<loq< th=""><th>0,72^{Bb}±0,02</th><th>1,21^{Cc}±0,02</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	0,72 ^{Bb} ±0,02	1,21 ^{Cc} ±0,02	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	$2,75^{\text{Cb}}\pm0,08$	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th><LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	<LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
d limonon	S	8,57 ^{Df} ±0,30	1,22	1,49 ^{Ac} ±0,02	2,34 ^{Cd} ±0,06	6,17 ^{Ce} ±0,03	0,83 ^{Bb} ±0,05	< LOQ ^{Aa}
a-minomen	М	3,52 ^{Be} ±0,26	<loq< th=""><th>$2,04^{\text{Dd}}\pm0,02$</th><th>1,75^{Bc}±0,22</th><th>6,01^{Bf}±0,09</th><th>1,20^{Cb}±0,09</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	$2,04^{\text{Dd}}\pm0,02$	1,75 ^{Bc} ±0,22	6,01 ^{Bf} ±0,09	1,20 ^{Cb} ±0,09	< LOQ ^{Aa}
	В	$5,97^{Ce} \pm 0,68$	0,85	1,91 ^{Cd} ±0,14	$0,86^{Ab}\pm 0,02$	6,06 ^{Cf} ±0,14	1,11 ^{Cc} ±0,08	< LOQ ^{Aa}
	L	$1,83^{Abc}\pm 0,05$	<loq< th=""><th>1,74^{Bb}±0,09</th><th>$1,74^{\text{Bb}}\pm0,10$</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,74 ^{Bb} ±0,09	$1,74^{\text{Bb}}\pm0,10$	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
aaiman	S	$8,38^{\text{Db}}\pm0,14$	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th><LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	<LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
ocimen	M	7,77 ^{Cb} ±0,25	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}				
	В	7,23 ^{Bb} ±0,19	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}				
	L	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQv</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQv	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	S	71,82 ^{Cb} ±1,32	10,26	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	3,37 ^{Bb} ±0,14	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
w torninon	М	76,60 ^{Db} ±0,23	10,94	< LOQ ^{Aa}	<LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
y-ter pineli	В	53,89 ^{Bb} ±0,95	7,70	< LOQ ^{Aa}	<LOQ ^{Aa}	$< LOQ^{Aa}$	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th><LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	<LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
p-cymen	S	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}				
	Μ	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th><LOQ^{Aa}</th><th><LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	<LOQ ^{Aa}	<LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}

	В	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
4	S	22,28 ^{Bd} ±0,37	3,18	< LOQ ^{Aa}	1,11 ^{Bb} ±0,03	3,99 ^{Bc} ±0,19	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
terpinoien	Μ	23,69 ^{Cd} ±0,28	3,38	< LOQ ^{Aa}	$1,13^{BCb}\pm0,07$	4,13 ^{BCc} ±0,09	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	23,44 ^{Cd} ±0,35	3,35	< LOQ ^{Aa}	1,52 ^{Db} ±0,02	4,75 ^{Dc} ±0,11	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
l'anala al	S	$1,40^{Cb}\pm 0,04$	<loq< th=""><th>1,49^{Dc}±0,03</th><th>$2,47^{\text{Dd}}\pm0,17$</th><th>$4,78^{\text{De}}\pm0,08$</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,49 ^{Dc} ±0,03	$2,47^{\text{Dd}}\pm0,17$	$4,78^{\text{De}}\pm0,08$	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
Inalool	Μ	1,34 ^{Bc} ±0,03	<loq< th=""><th>1,18^{Ab}±0,03</th><th>1,85^{Be}±0,04</th><th>1,54^{Cd}±0,09</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,18 ^{Ab} ±0,03	1,85 ^{Be} ±0,04	1,54 ^{Cd} ±0,09	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	$2,50^{\text{Dd}}\pm0,10$	<loq< th=""><th>1,30^{Bb}±0,02</th><th>1,97^{Cc}±0,03</th><th>1,34^{Bb}±0,09</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,30 ^{Bb} ±0,02	1,97 ^{Cc} ±0,03	1,34 ^{Bb} ±0,09	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq< th=""><th>1,37^{Cb}±0,03</th><th>1,38^{Ab}±0,03</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	1,37 ^{Cb} ±0,03	1,38 ^{Ab} ±0,03	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	S	5,84 ^{Bb} ±0,33	0,83	18,58 ^{CDc} ±1,05	42,01 ^{Dd} ±0,52	60,45 ^{De} ±2,36	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
isopulegol	Μ	$14,10^{\text{Dd}}\pm0,02$	2,01	17,50 ^{Ce} ±0,21	5,16 ^{Cb} ±0,44	7,45 ^{Cc} ±0,34	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	$6,14^{\text{BCd}}\pm0,16$	0,88	13,73 ^{Be} ±0,28	3,58 ^{Bb} ±0,06	5,12 ^{Bc} ±0,09	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	0,67 ^{Ab} ±0,04	<loq< th=""><th>2,28^{Ac}±0,11</th><th>2,29^{Ac}±0,11</th><th>3,98^{Ad}±0,06</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	2,28 ^{Ac} ±0,11	2,29 ^{Ac} ±0,11	3,98 ^{Ad} ±0,06	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	S	490,67 ^{De} ±3,76	70,09	213,63 ^{Dc} ±1,96	394,83 ^{Dd} ±7,53	512,61 ^{Df} ±10,49	35,29 ^{Db} ±1,85	20,66 ^{Da} ±0,98
β-kariofilen	Μ	407,74 ^{Cf} ±3,30	58,25	163,35 ^{Cc} ±3,95	309,46 ^{Cd} ±2,24	354,36 ^{Ce} ±26,25	19,15 ^{Bb} ±0,17	3,57 ^{Aa} ±0,11
	В	310,78 ^{Bf} ±14,91	44,86	126,47 ^{Bc} ±1,74	219,42 ^{Bd} ±11,19	255,76 ^{Be} ±7,63	32,96 ^{Cb} ±1,19	12,96 ^{Ca} ±0,37
	L	32,76 ^{Ad} ±0,89	4,68	23,11 ^{Ac} ±1,29	23,00 ^{Ac} ±1,29	14,17 ^{Ab} ±1,43	14,73 ^{Ab} ±0,31	7,39 ^{Ba} ±0,37
	S	116,94 ^{Ce} ±2,19	16,70	52,14 ^{Dc} ±1,07	106,03 ^{Dd} ±0,75	128,91 ^{Df} ±4,34	9,47 ^{Cb} ±0,27	6,99 ^{Ba} ±0,29
a humulan	Μ	127,20 ^{De} ±0,31	18,17	45,84 ^{Cc} ±0,14	80,43 ^{Cd} ±0,07	121,68 ^c ±5,36	1,71 ^{Ba} ±0,05	6,82 ^{Bb} ±0,22
u-numulen	В	102,66 ^{Bf} ±0,43	14,67	34,11 ^{Bb} ±1,78	59,75 ^{Bd} ±0,64	70,99 ^{Be} ±0,96	51,80 ^{Dc} ±6,62	< LOQ ^{Aa}
	L	7,25 ^{Ab} ±0,12	1,04	29,79 ^{Ac} ±0,26	29,79 ^{Ac} ±0,26	39,38 ^{Ad} ±4,62	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	S	<LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>$2,62^{BCb}\pm 0,02$</th><th>12,21^{Bc}±0,77</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	$2,62^{BCb}\pm 0,02$	12,21 ^{Bc} ±0,77	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
geramor	Μ	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>2,54^{Bb}±0,13</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	2,54 ^{Bb} ±0,13	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>4,63^{Db}±0,82</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	4,63 ^{Db} ±0,82	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
nonolidal	S	14,54 ^{Bb} ±2,01	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>69,04^{Dc}±2,90</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	69,04 ^{Dc} ±2,90	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
neronaoi	Μ	18,45 ^{Cb} ±0,39	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>65,64^{Cc}±0,75</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	65,64 ^{Cc} ±0,75	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	24,99 ^{Db} ±0,53	3,57	< LOQ ^{Aa}	57,14 ^{Bc} ±0,38	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
quoial	S	$6,60^{\text{Db}}\pm0,09$	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>30,73^{Cc}±0,38</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	30,73 ^{Cc} ±0,38	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
gualor	Μ	3,17 ^{Bb} ±0,16	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>34,35^{Dc}±0,12</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	34,35 ^{Dc} ±0,12	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	$5,10^{Cb}\pm0,20$	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>22,83^{Bc}±0,36</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	22,83 ^{Bc} ±0,36	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	S	9,09 ^{Cb} ±0,06	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>$11,52^{Bc}\pm 0,22$</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	$11,52^{Bc}\pm 0,22$	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
α-bisabolol	Μ	9,26 ^{CDb} ±0,16	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>15,75^{Dc}±0,16</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	15,75 ^{Dc} ±0,16	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	В	7,52 ^{Bb} ±0,41	<loq< th=""><th>< LOQ^{Aa}</th><th>12,45^{Cc}±0,14</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	< LOQ ^{Aa}	12,45 ^{Cc} ±0,14	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}
	L	< LOQ ^{Aa}	<loq< th=""><th><loq<sup>Aa</loq<sup></th><th>$< LOQ^{Aa}$</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th><th>< LOQ^{Aa}</th></loq<>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	$< LOQ^{Aa}$	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}	< LOQ ^{Aa}

a-f – wartości w wierszach (dla jednego rodzaju próbki np, liści) oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05; A-D – wartości w kolumnach (dla zawartości poszczególnych substancji w materiale świeżym lub suszonym wybraną metodą) oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05

7 · 1	Poziom wzmocnienia		
Związek	[µg/mL]	Odzysk [%]	RSD [%]
	0,2	95	3
CBD	3,2	96	6
	25,6	90	7
	0,008	93	4
CBN	0,128	94	5
	1,024	96	7
	0,008	95	9
CBG	0,128	95	4
	1,024	94	3
	0,08	95	2
Δ^9 -THC	1,28	96	9
	10,240	97	8
	0,008	97	7
Δ^8 -THC	0,128	97	6
	1,024	97	9
	0,02	90	9
CBC	0,32	91	9
	2,56	90	10
	0,02	92	4
CBL	0,32	93	4
	2,56	92	5
	0,008	98	3
CBDV	0,128	94	5
	1,024	96	7
	0,008	97	7
Δ^9 -THCV	0,128	97	7
	1,024	90	7
	0,4	90	6
CBDA	6,4	95	4
	51,2	94	8
CBNA	0,02	92	4

Tabela S8. Odzysk [R%], powtarzalność [RSD%] dla poszczególnych analitów na trzech różnych poziomach wzmocnień (n=5) dla ciastek kruchych.

	0,32	93	2
	2,56	92	3
	0,02	94	5
CBGA	0,32	93	5
	2,56	94	9
	0,08	90	7
Δ^9 -THCA-A	1,28	92	7
	10,24	90	6
	0,08	91	4
CBCA	1,28	91	4
	10,24	91	3
	0,02	98	8
CBLA	0,32	94	4
	2,56	96	4
	0,02	95	2
CBDVA	0,32	95	4
	2,56	94	5
	0,02	93	4
Δ^9 -THCVA	0,32	94	4
	2,56	93	4
L	L	1	

				-			Stęże	nie kannabii	noidów w go	otowym pro	dukcie [mg/	100g]	-			-		
Analit	Stęż	enie początł	towe	Po w	ypieku w 1	60°C		Po 7 dniach]	Po 14 dniacl	1]	Po 21 dniacl	1	1	Po 28 dniach	1
	1%	2%	3%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%
CBD	0,320 ^{Ab}	0,640 ^{Bb}	0,960 ^{cb}	0,128 ^{Aa}	0,211 ^{Ba}	0,326 ^{Ca}	0,134 ^{Aa}	0,256 ^{Ba}	0,374 ^{Ca}	0,128 ^{Aa}	$0,249^{Ba}$	0,355 ^{Ca}	0,134 ^{Aa}	0,249 ^{Ba}	0,364 ^{Ca}	0,134 ^{Aa}	0,249 ^{Ba}	0,384 ^{Ca}
СБД	$\pm 0,012$	$\pm 0,041$	$\pm 0,097$	$\pm 0,022$	$\pm 0,041$	$\pm 0,045$	$\pm 0,012$	$\pm 0,022$	$\pm 0,074$	$\pm 0,012$	$\pm 0,045$	$\pm 0,074$	$\pm 0,011$	$\pm 0,045$	$\pm 0,045$	$\pm 0,011$	$\pm 0,022$	$\pm 0,033$
CBDA	3,040 ^{Ab}	6,080 ^{Bb}	9,120 ^{Cc}	1,216 ^{Aa}	$2,006^{Ba}$	3,101 ^{Ca}	1,277 ^{Aa}	2,432 ^{Ba}	3,557 ^{сь}	1,216 ^{Aa}	2,371 ^{Ba}	3,374 ^{сь}	1,277 ^{Aa}	2,371 ^{Ba}	3,465 ^{сь}	1,277 ^{Aa}	2,371 ^{Ba}	3,648 ^{сь}
CBDA	$\pm 0,145$	$\pm 0,540$	$\pm 0,875$	$\pm 0,098$	$\pm 0,125$	$\pm 0,111$	$\pm 0,098$	$\pm 0,198$	$\pm 0,111$	$\pm 0,085$	$\pm 0,084$	$\pm 0,099$	$\pm 0,074$	± 0,125	$\pm 0,099$	$\pm 0,087$	$\pm 0,145$	$\pm 0,152$
19 THC	0,075 ^{Ab}	0,150 ^{Bc}	0,225 ^{Cc}	0,030 ^{Aa}	$0,049^{Ba}$	0,076 ^{Ca}	0,031 ^{Aa}	$0,060^{\text{Bab}}$	0,087 ^{сь}	0,030 ^{Aa}	0,058 ^{Bab}	0,083 ^{Cb}	0,031 ^{Aa}	0,058 ^{Bab}	0,085 ^{Cb}	0,031 ^{Aa}	0,058 ^{Bab}	0,090 ^{Cb}
Δ-1110	$\pm 0,014$	$\pm 0,030$	$\pm 0,054$	$\pm 0,004$	$\pm 0,009$	$\pm 0,013$	$\pm 0,004$	$\pm 0,010$	$\pm 0,010$	$\pm 0,012$	$\pm 0,010$	$\pm 0,012$	$\pm 0,003$	$\pm 0,010$	$\pm 0,011$	$\pm 0,008$	$\pm 0,004$	$\pm 0,010$
A ⁹ THCA A	0,030 ^{Ab}	0,060 ^{Bb}	0,090 ^{cb}	0,012 ^{Aa}	0,019 ^{Ba}	0,031 ^{Ca}	0,012 ^{Aa}	0,023 ^{Ba}	0,035 ^{Ca}	0,012 ^{Aa}	0,023 ^{Ba}	0,033 ^{Ca}	0,012 ^{Aa}	0,023 ^{Ba}	0,034 ^{Ca}	0,012 ^{Aa}	0,023 ^{Ba}	0,036 ^{Ca}
Δ-IIICA-A	$\pm 0,005$	$\pm 0,012$	$\pm 0,017$	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,012$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,008$	$\pm 0,001$	$\pm 0,006$	$\pm 0,003$	$\pm 0,001$	$\pm 0,006$	$\pm 0,009$	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,008$
CPC	0,081 ^{Ab}	0,162 ^{Bb}	0,243 ^{Ce}	0,032 ^{Aa}	0,053 ^{Ba}	0,083 ^{Ca}	0,034 ^{Aa}	0,065 ^{Ba}	0,095 ^{Cab}	0,032 ^{Aa}	0,063 ^{Ba}	0,089 ^{Cab}	0,034 ^{Aa}	0,063 ^{Ba}	0,092 ^{Cab}	0,034 ^{Aa}	0,063 ^{Ba}	0,097 ^{сь}
СВС	$\pm 0,007$	$\pm 0,022$	$\pm 0,074$	$\pm 0,002$	$\pm 0,013$	$\pm 0,004$	$\pm 0,007$	$\pm 0,009$	$\pm 0,012$	$\pm 0,003$	$\pm 0,008$	$\pm 0,007$	$\pm 0,007$	$\pm 0,008$	$\pm 0,008$	$\pm 0,005$	$\pm 0,006$	$\pm 0,009$
CDCA	0,495 ^{Ab}	0,990 ^{Bb}	1,485 ^{Cb}	0,198 ^{Aa}	0,327 ^{Ba}	0,505 ^{Ca}	0,208 ^{Aa}	0,396 ^{Ba}	0,579 ^{Ca}	0,198 ^{Aa}	0,386 ^{Ba}	0,549 ^{Ca}	0,208 ^{Aa}	0,386 ^{Ba}	0,564 ^{Ca}	0,208 ^{Aa}	0,386 ^{Ba}	0,594 ^{Ca}
CBCA	$\pm 0,033$	$\pm 0,078$	$\pm 0,174$	$\pm 0,012$	$\pm 0,022$	$\pm 0,012$	$\pm 0,041$	$\pm 0,087$	$\pm 0,098$	$\pm 0,022$	$\pm 0,041$	$\pm 0,038$	$\pm 0,025$	$\pm 0,056$	$\pm 0,087$	$\pm 0,22$	$\pm 0,084$	$\pm 0,022$
CDC	0,011 ^{Ab}	0,022 ^{Bb}	0,033 ^{Cb}	0,004 ^{Aa}	$0,007^{Ba}$	0,011 ^{Ca}	0,005 ^{Aa}	0,009 ^{Ba}	0,013 ^{Ca}	0,004 ^{Aa}	0,008 ^{Ba}	0,012 ^{Ca}	0,005 ^{Aa}	0,008 ^{Ba}	0,012 ^{Ca}	0,005 ^{Aa}	$0,008^{Ba}$	0,013 ^{Ca}
CBG	$\pm 0,001$	$\pm 0,004$	$\pm 0,002$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,001$										
CDCA	0,051 ^{Ab}	0,102 ^{Bc}	0,153 ^{Cb}	0,020 ^{Aa}	0,034 ^{Ba}	0,052 ^{Ca}	0,021 ^{Aa}	0,041 ^{Bab}	0,059 ^{BCa}	0,020 ^{Aa}	0,040 ^{Bab}	0,056 ^{Ca}	0,021 ^{Aa}	0,040 ^{Bab}	0,058 ^{Ca}	0,021 ^{Aa}	0,040 ^{Bab}	0,061 ^{Ca}
CDUA	$\pm 0,008$	$\pm 0,011$	$\pm 0,022$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,08$	$\pm 0,004$	$\pm 0,007$	$\pm 0,012$	$\pm 0,002$	$\pm 0,007$	$\pm 0,008$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,007$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,012$
CDDV	0,006 ^{Ab}	0,012 ^{Bb}	0,018 ^{Cb}	0,002 ^{Aa}	$0,004^{Ba}$	0,006 ^{Ca}	0,003 ^{Aa}	0,005 ^{Ba}	0,007 ^{Ca}	0,003 ^{Aa}	0,005 ^{Ba}	0,007 ^{Ca}	0,003 ^{Aa}	0,005 ^{Ba}	0,007 ^{Ca}	0,003 ^{Aa}	$0,005^{Ba}$	0,007 ^{Ca}
CBDV	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,001$														
CDDVA	0,052 ^{Ab}	0,104 ^{Bc}	0,156 ^{Cb}	0,021 ^{Aa}	0,034 ^{Ba}	0,053 ^{Ca}	0,051 ^{Ab}	0,086 ^{Bb}	0,153 ^{Cb}	0,048 ^{Ab}	0,089 ^{Bb}	0,160 ^{Cb}	0,134 ^{Ac}	0,191 ^{Bc}	0,351 ^{Ce}	0,183 ^{Ad}	0,275 ^{Bd}	0,499 ^{Cd}
CBDVA	$\pm 0,004$	$\pm 0,012$	$\pm 0,012$	$\pm 0,003$	$\pm 0,003$	$\pm 0,010$	\pm 0,008	$\pm 0,009$	$\pm 0,014$	$\pm 0,010$	$\pm 0,015$	$\pm 0,021$	$\pm 0,014$	$\pm 0,022$	$\pm 0,041$	$\pm 0,022$	$\pm 0,088$	$\pm 0,118$
A ⁹ THOM	0,002 ^{Aab}	$0,004^{ABb}$	0,006 ^{Cb}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	$0,002^{ABa}$
Δ -THC V	$\pm 0,001$																	
A9 THOMA	0,011 ^{Ab}	0,022 ^{Bc}	0,033 ^{Cc}	0,004 ^{Aa}	$0,007^{Ba}$	0,011 ^{Ca}	0,005 ^{Aa}	0,009 ^{Bb}	0,013 ^{Cb}	$0,004^{Aa}$	0,009 ^{Bb}	0,012 ^{Cab}	0,005 ^{Aa}	0,009 ^{Bb}	0,012 ^{Cab}	0,005 ^{Aa}	0,009 ^{Bb}	0,013 ^{Cb}
Δ -THC VA	$\pm 0,001$	$\pm 0,004$	$\pm 0,007$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,001$												
Δ^{8} -THC	<loq<sup>Aa</loq<sup>																	
CBN	<loq<sup>Aa</loq<sup>																	
CDNIA	0,002 ^{Aab}	$0,004^{ABb}$	0,006 ^{Cb}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	0,002 ^{ABa}	0,001 ^{Aa}	0,002 ^{ABa}	$0,002^{ABa}$
CBNA	$\pm 0,001$																	
CBL	<loq<sup>Aa</loq<sup>																	
CDLA	0,024 ^{Ab}	0,048 ^{Bc}	0,072 ^{Cb}	0,009 ^{Aa}	0,015 ^{Ba}	0,025 ^{Ca}	0,010 ^{Aa}	0,019 ^{Bb}	0,028 ^{Ca}	0,009 ^{Aa}	0,018 ^{Bb}	0,026 ^{Ca}	0,010 ^{Aa}	0,018 ^{Bb}	0,027 ^{Ca}	0,010 ^{Aa}	0,018 ^{Bb}	0,028 ^{Ca}
CBLA	$\pm 0,004$	$\pm 0,004$	$\pm 0,08$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,004$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,05$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$
Suma 17	4,200 ^{Ab}	8,400 ^{Bc}	12,600 ^{Cc}	1,678 ^{Aa}	2,770 ^{Ba}	4,284 ^{Ca}	1,793 ^{Aa}	3,405 ^{Bb}	5,004 ^{Cb}	1,706 ^{Aa}	3,323 ^{Bb}	4,776 ^{Ca}	1,876 ^{Aa}	3,425 ^{Bb}	5,075 ^{Cb}	1,925 ^{Aa}	3,509 ^{Bb}	5,474 ^{Cb}
kannabinoidów	$\pm 0,198$	$\pm 0,247$	$\pm 0,874$	± 0,145	$\pm 0,285$	$\pm 0,478$	$\pm 0,198$	± 0,124	± 0,189	$\pm 0,241$	± 0,165	± 0,412	$\pm 0,147$	± 0,199	$\pm 0,245$	± 0,123	$\pm 0,350$	$\pm 0,485$

Tabela S9. Zawartość kannabinoidów w ciastkach kruchych zawierających wsad konopny na bazie liofilizowanego suszu konopnego (1%, 2% i

3% (w/v)) [mg/100g gotowego produktu] przed i po wypieku w 160°C oraz podczas 28 dni przechowywania.

a-d – wartości w wierszach (dla ilości dodanego wsadu konopnego np, 1% podczas przechowywania) oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05; A-C – wartości w wierszach (dla zawartości poszczególnych substancji podczas przechowywania) oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym α =0,05;

							Stężer	nie kannabii	noidów w go	otowym pro	dukcie [mg/	'100g]	-					
Analit	Stęże	enie początk	cowe	Po w	ypieku w 2	00°C		Po 7 dniach	1	I	Po 14 dniacl	1]	Po 21 dniach	ı	I	Po 28 dniach	1
	1%	2%	3%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%
	0,320 ^{Ab}	0,640 ^{Bb}	0,960 ^{Cb}	0,125 ^{Aa}	0,237 ^{Ba}	0,374 ^{Ca}	0,632 ^{Ac}	2,752 ^{Bc}	3,355 ^{Cc}	1,696 ^{Ad}	2,496 ^{Bc}	3,552 ^{Cc}	1,536 ^{Ad}	2,560 ^{Bc}	3,456 ^{Cc}	1,568 ^{Ad}	2,432 ^{Bc}	3,456 ^{Cc}
СВД	$\pm 0,012$	$\pm 0,041$	$\pm 0,097$	$\pm 0,012$	$\pm 0,053$	$\pm 0,014$	$\pm 0,034$	$\pm 0,147$	$\pm 0,174$	$\pm 0,129$	$\pm 0,134$	$\pm 0,145$	$\pm 0,98$	$\pm 0,158$	$\pm 0,179$	$\pm 0,140$	$\pm 0,188$	$\pm 0,210$
CBDA	3,040 ^{Ab}	6,080 ^{Bb}	9,120 ^{Cc}	1,216 ^{Aa}	2,006 ^{Ba}	3,101 ^{Ca}	1,277 ^{Aa}	2,432 ^{Ba}	3,557 ^{Ca}	1,216 ^{Aa}	2,371 ^{Ba}	3,374 ^{Ca}	1,277 ^{Aa}	2,371 ^{Ba}	3,283 ^{Ca}	1,277 ^{Aa}	2,371 ^{Ba}	3,283 ^{Ca}
CDDIT	$\pm 0,145$	$\pm 0,540$	$\pm 0,875$	$\pm 0,141$	± 0,199	$\pm 0,198$	$\pm 0,177$	$\pm 0,147$	$\pm 0,204$	$\pm 0,054$	$\pm 0,147$	$\pm 0,136$	$\pm 0,144$	± 0,099	$\pm 0,133$	$\pm 0,144$	$\pm 0,184$	$\pm 0,111$
Δ^9 -THC	0,075 ^{Ab}	0,150 ^{вс}	0,225 **	0,030 ^{Aa}	0,055 ^{ва}	$0,087^{Ca}$	0,038 ^{Aa}	0,065 ^{Ba}	0,083 ^{ca}	0,039 ^{Aab}	0,059 ^{ва}	0,083 ^{ca}	0,036 ^{Aab}	0,060 ^{ва}	0,081 ^{ca}	0,037 ^{Aab}	0,057 ^{ва}	0,081 ^{ca}
	$\pm 0,014$	$\pm 0,030$	$\pm 0,054$	$\pm 0,003$	$\pm 0,008$	$\pm 0,010$	$\pm 0,007$	$\pm 0,018$	$\pm 0,012$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,012$	$\pm 0,004$	$\pm 0,004$	$\pm 0,009$	$\pm 0,007$	$\pm 0,009$	$\pm 0,011$
∆ ⁹ -THCA-A	0,030	$0,060^{10}$	$0,090^{co}$	0,012	0,022 ^{ba}	$0,035^{ca}$	0,015	$0,026^{\text{ba}}$	0,035	0,016	$0,023^{\text{Ba}}$	0,033	0,014	0,023	$0,033^{ca}$	0,015	0,023	$0,032^{ca}$
	$\pm 0,005$	± 0.012	± 0.017	$\pm 0,001$	$\pm 0,004$	$\pm 0,007$	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,004$	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,004$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$
CBC	0,081	$0,162^{50}$	$0,243^{\circ\circ}$	0,032	0,060	0,095	0,041	0,069540	0,090	0,043	0,063	$0,090^{\circ}$	0,039****	0,065	$0,08/^{\circ}$	0,039.000	$0,062^{54}$	$0,08/^{\circ}$
	$\pm 0,007$	$\pm 0,022$	± 0,074	$\pm 0,004$ 0.102Aa	$\pm 0,005$ 0.266 ^{Ba}	$\pm 0,008$ 0.570 ^{Ca}	$\pm 0,000$	$\pm 0,004$ 0.425 ^{Bab}	$\pm 0,007$	$\pm 0,007$	$\pm 0,004$ 0.286 ^{Ba}	$\pm 0,014$ 0.504 ^{Ca}	$\pm 0,007$	$\pm 0,000$ 0.206 ^{Ba}	$\pm 0,011$ 0.525 ^{Ca}	$\pm 0,004$ 0.242Ab	$\pm 0,007$	$\pm 0,010$ 0.525 ^{Ca}
CBCA	0,495 ± 0.033	0,990 + 0.078	+ 0.174	+ 0.020	+ 0.045	$0,379^{+}$	0,232 + 0.022	+ 0.040	0,349 + 0.071	0,202 + 0.031	0,380 ± 0.047	0,394 ± 0.025	+0.018	0,390 + 0.014	0,333 ± 0.026	0,242 + 0.014	0,570 ± 0.036	0,333
	0.011 ^{Ab}	0.022 ^{Bb}	0.033 ^{Cb}	10,020	10,043	10,074	0.006 ^{Ab}	10,049	10,071	0.006 ^{Ab}	10,047	10,023 0.012 ^{Ca}	0.005 ^{Aab}	10,014	10,020	0.005^{Aab}	$10,008^{Ba}$	10,044
CBG	± 0.001	± 0.004	± 0.002	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.001	± 0.0012	± 0.001	± 0.001	± 0.0012	± 0.001	± 0.001	± 0.0012	± 0.001	± 0.001	± 0.002
~~~~	0.051 ^{Ac}	$0.102^{Bc}$	0.153 ^{Cb}	0.020 ^{Aa}	0.037 ^{Ba}	$0.060^{Ca}$	0.026 ^{Ab}	0.044 ^{Bb}	$0.056^{Ca}$	0.027 ^{Ab}	$0.040^{\text{Bab}}$	0.057 ^{Ca}	0.025 ^{Ab}	0.041 ^{Bab}	0.055 ^{Ca}	0.025 ^{Ab}	0.039 ^{Bab}	0.055 ^{Ca}
CBGA	$\pm 0.008$	$\pm 0.011$	$\pm 0.022$	$\pm 0.002$	$\pm 0.003$	$\pm 0.004$	$\pm 0.002$	± 0,004	$\pm 0.004$	$\pm 0.002$	$\pm 0.004$	$\pm 0.007$	$\pm 0.004$	± 0,004	± 0,006	$\pm 0.004$	$\pm 0.003$	± 0,004
CDDU	0,006 ^{Ab}	0,012 ^{Bb}	0,018 ^{Cb}	0,002 ^{Aa}	0,004 ^{Ba}	0,007 ^{Ca}	0,003 ^{Aa}	0,005 ^{Ba}	0,007 ^{Ca}	0,003 ^{Aa}	0,005 ^{Ba}	0,007 ^{Ca}	0,003 ^{Aa}	0,005 ^{Ba}	0,006 ^{Ba}	0,003 ^{Aa}	0,005 ^{Ba}	0,006 ^{Ba}
CBDV	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$
CPDVA	0,052 ^{Ac}	0,104 ^{Bc}	0,156 ^{Cb}	0,020 ^{Aa}	0,038 ^{Ba}	0,061 ^{Ca}	0,027 ^{Ab}	0,045 ^{Ba}	0,058 ^{Ca}	0,028 ^{Ab}	0,041 ^{Ba}	0,058 ^{Ca}	0,025 ^{Aab}	0,042 ^{Ba}	0,056 ^{Ca}	0,025 ^{Aab}	0,040 ^{Ba}	0,056 ^{Ca}
CBDVA	$\pm 0,004$	$\pm 0,012$	$\pm 0,012$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,010$	$\pm 0,003$	$\pm 0,005$	$\pm 0,007$	$\pm 0,003$	$\pm 0,004$	$\pm 0,007$	$\pm 0,003$	$\pm 0,003$	$\pm 0,008$	$\pm 0,003$	$\pm 0,007$	$\pm 0,009$
_	0.002 ^{Aab}	$0,004^{AB}$	0.006 ^{Cb}	0.001 ^{Aa}	0.001 ^{Aa}	$0,002^{AB}$	0.001 ^{Aa}	0.001 ^{Aa}	0,002 ^{AB}	0.001 ^{Aa}	0.001 ^{Aa}	0,002 ^{AB}	0.001 ^{Aa}	0.001 ^{Aa}	$0,002^{AB}$	0.001 ^{Aa}	0.001 ^{Aa}	$0,002^{AB}$
$\Delta^9$ -THCV	$\pm 0.001$	^b ±	$\pm 0.001$	$\pm 0.001$	$\pm 0.001$	^a ±	$\pm 0.001$	$\pm 0.001$	^a ±	$\pm 0.001$	$\pm 0.001$	^a ±	$\pm 0.001$	$\pm 0.001$	^a ±	$\pm 0.001$	$\pm 0.001$	^a ±
	_ 0,001	0,001	_ 0,001	- 0,001	_ 0,001	0,001	_ 0,001	_ 0,001	0,001	_ 0,001	_ 0,001	0,001	_ 0,001	- 0,001	0,001	_ 0,001	_ 0,001	0,001
	0,011 ^{Ab}	0,022 ^{Bb}	0,033 ^{Cc}	$0,004^{Aa}$	0,008 ^{Ba}	0,010 ^{Ca}	0,005 ^{Aa}	0,009 ^{Ba}	0,013 ^{Cab}	0,004 ^{Aa}	0,009 ^{Ba}	0,012 ^{cab}	0,005 ^{Aa}	0,009 ^{Ba}	0,013 ^{Cab}	0,005 ^{Aa}	0,009 ^{Ba}	0,013 ^{Cab}
$\Delta^{2}$ -THCVA	$\pm 0,001$	$\pm 0,004$	$\pm 0,007$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	"±	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$
. 8	7 9 9 4	A-	7 9 9 4		<b>1</b> -	7 0 0 Å	A-	<b>1</b> -	A.		A.	0,002	A-	7.0.04	7 0 0 Ås	A-	A.	7 0 0 Å
Δ°-THC	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>rta</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>24a</loq<sup>	<loq<sup>rta</loq<sup>
CBN	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>
	0 002 Aab	0,004 ^{AB}	0.006 ^{Cb}	0 001 Aa	0.001Aa	0,002 ^{AB}	0.001Aa	0.001Aa	0,002 ^{AB}	0 001 ^{Aa}	0 001 ^{Aa}	0,002 ^{AB}	0.001 ^{Aa}	0 001 Aa	0,002 ^{AB}	0 001 ^{Aa}	0 001 Aa	0,002 ^{AB}
CBNA	+ 0.002	^b ±	+ 0.001	+ 0.001	+0.001	$a \pm$	+ 0.001	+0.001	$^{a} \pm$	+ 0.001	+0.001	$^{a} \pm$	+0.001	+ 0.001	$^{a} \pm$	+0.001	+ 0.001	$^{a} \pm$
	± 0,001	0,001	± 0,001	± 0,001	± 0,001	0,001	± 0,001	± 0,001	0,001	± 0,001	± 0,001	0,001	± 0,001	± 0,001	0,001	± 0,001	± 0,001	0,001
CBL	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>	<loq<sup>Aa</loq<sup>
CBLA	0,024 ^{Ad}	0,048 ^{Bc}	0,072 ^{Cb}	0,001 ^{Aa}	0,018 ^{Ba}	0,028 ^{Ca}	0,012 ^{Ab}	0,021 ^{Bb}	0,027 ^{Ca}	0,013 ^{Ab}	0,019 ^{Ba}	0,027 ^{Ca}	0,012 ^{Ab}	0,019 ^{Ba}	0,026 ^{Ca}	0,018 ^{Ac}	0,018 ^{Aa}	0,026 ^{Ba}
CDLAY	$\pm 0,004$	$\pm 0,004$	$\pm 0,08$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$
Suma 17	4,200 ^{Ad}	8,400 ^{Bc}	12,600 ^C	1,661 ^{Aa}	2,861 ^{Ba}	4,455 ^{Ca}	2,336 ^{Ab}	5,904 ^{Bb}	7,811 ^{Cb}	3,355 ^{Ac}	5,523 ^{Bb}	7,903 ^{Cb}	3,215 ^{Ac}	5,602 ^{Bb}	7,647 ^{Cb}	3,261 ^{Ac}	5,442 ^{Bb}	7,646 ^{Cb}
kannabinoidów	$\pm 0,198$	± 0,247	°±	$\pm 0,116$	$\pm 0,200$	$\pm 0,311$	± 0,163	± 0,413	±0,546	$\pm 0,235$	$\pm 0,386$	$\pm 0,553$	± 0,225	± 0,392	$\pm 0,535$	$\pm 0,228$	$\pm 0,392$	± 0,535
			0,074															

**Tabela S10.** Zawartość kannabinoidów w ciastkach kruchych zawierających wsad konopny na bazie liofilizowanego suszu konopnego (1%, 2% i 3% (w/v)) [mg/100g gotowego produktu] przed i po wypieku w 200°C oraz podczas 28 dni przechowywania.

a-d – wartości w wierszach (dla ilości dodanego wsadu konopnego np, 1% podczas przechowywania) oznaczone tą samą literą różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym  $\alpha$ =0,05; A-C – wartości w wierszach (dla zawartości poszczególnych substancji podczas przechowywania) oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym  $\alpha$ =0,05

Rodzaj próbki ciastek kruchych Nazwa Wypiek w 160°C, 30 min. Wypiek w 200°C, 20 min. związku Ciastko Ciastko Ciastko Ciastko Ciastko Ciastko Kontrola Kontrola 1% 2% 3% 1% 2% 3% Terpeny α-pinen + + + + + + + + kamfen β-pinen  $\Delta$ -3-karen β-myrcen α-terpinen d-limonen + + + + + + + + ocimen γ-terpinen p-cymen terpinolen linalool isopulegol β-kariofilen + + + + + + + + α-humulen geraniol neoridol guaiol α-bisabolol Ketony 2-pentatnon + + + + + + + + 2-heptanon + + + + + + + + Acetoina + + + +++ ++ 2-butanon + + + + + + + + **Kwasy organiczne** Kwas octowy + + + + + + + + Związki furanowe Furfural Związki aromatyczne heterocykliczne 2-+ + + + + + + + metylopirazyna Aldehydy Heksanal + + + + + + + + Heptanal + + + + + + + + Oktanal + + + + + + + +

**Tabela S11.** Terpeny oraz wybrane związki lotne charakterystyczne dla ciastek kruchych zawierających wsad konopny (analizy wykonano w dniu wypieczenia) (n=3).

**Tabela S12.** Wyróżniki jakości sensorycznej zastosowane w ocenie profilowej ciastek kruchych z dodatkiem wsadu konopnego.

Lp.	Wyróżniki	Definicja wyróżników jakościowych	Oznaczenia brzegowe
	jakościowe		skali
1.	Barwa	Charakterystyczna dla ciastek kruchych	Typowa - nietypowa
	typowa dla	(beżowo-kremowa)	
	ciastek		
	kruchych		
2.	Barwa	Intensywność barwy zielonej	Jasno zielona –
	zielona		ciemno zielona
3.	Słodki smak	Smak podstawowy, nie wymaga wyjaśnień	Niewyczuwalny –
			bardzo intensywny
4.	Maślany	Charakterystyczny dla ciastek kruchych	Niewyczuwalny –
	smak		bardzo intensywny
5.	Gorzki smak	Smak podstawowy, nie wymaga wyjaśnień	Niewyczuwalny –
			bardzo intensywny
6.	Obcy smak	Smak obcy, nietypowy dla ciastek kruchych	Niewyczuwalny –
	"trawiasty"		bardzo intensywny
7.	Zapach	Charakterystyczna dla ciastek kruchych	Niewyczuwalny –
	typowy dla	(maślany)	bardzo intensywny
	ciastek		
	kruchych		
8.	Zapach obcy	Zapach obcy, nietypowy dla ciastek kruchych	Niewyczuwalny –
	"trawiasty"		bardzo intensywny
9.	Kruchość	Wrażenie czuciowe odbierane przy	Miękkie - kruche
		spożywaniu próbki	
10.	Konsystencja	Wrażenie czuciowe odbierane przy	Undetectable - very
		spożywaniu próbki, wyczuwalne grudki	intense
11.	Ogólna	Ogólne wrażenie sensoryczne, obejmujące	Zła – bardzo dobra
	iakość	wyróżniki zapachu, barwy, tekstury i smaku	

	Wyróżniki	Wypiek w temperaturze 160°C przez 30 min.					
Lp.	jakościowe smaku, zapachu, tekstury, barwy	Kontrola	Ciastko 1%	Ciastko 2%	Ciastko 3%		
1.	Kolor typowy dla	$9,80^{\rm c} \pm 0,20$	$0,50^{\rm b} \pm 0,05$	$0,01^{a} \pm 0,01$	$0,01^{a} \pm 0,01$		
	ciastek kruchych						
2.	Kolor zielony	$0,\!01^{\mathrm{a}}\pm0,\!01$	$3,52^{b} \pm 0,34$	$6,74^{c} \pm 0,12$	$9,02^{d} \pm 0,14$		
3.	Słodki smak	$9,99^{d} \pm 0,01$	$9,41^{c} \pm 0,41$	$8,04^{b} \pm 0,18$	$7,17^{a} \pm 0,10$		
4.	Maślany smak	$9,99^{d} \pm 0,01$	$9,01^{c} \pm 0,74$	$8,13^{b} \pm 0,13$	$7,77^{a} \pm 0,11$		
5.	Gorzki smak	$0,01^{a} \pm 0,01$	$1,12^{b} \pm 0,12$	$2,50^{\rm c} \pm 0,14$	$3,33^{d} \pm 0,14$		
6.	Obcy smak	$0,01^{a} \pm 0,01$	$2,04^{b} \pm 0,25$	$2,50^{\rm bc} \pm 0,22$	$5,79^{d} \pm 0,13$		
7.	Zapach typowy dla ciastek kruchych	$9,99^{d} \pm 0,01$	$9,50^{c} \pm 0,41$	$8,41^{b} \pm 0,08$	$7,10^{a} \pm 0,12$		
8.	Zapach obcy	$0,01^{a} \pm 0,01$	$0,01^{a} \pm 0,01$	$3,36^{b} \pm 0,14$	$6,85^{c} \pm 0,15$		
9.	Kruchość	$9,99^{c} \pm 0,01$	$9,00^{ab} \pm 0,20$	$9,00^{a} \pm 0,03$	$9,00^{ab} \pm 0,25$		
10.	Konsystencja	$8,89^{c} \pm 0,14$	$7,77^{b} \pm 0,24$	$6,12^{a} \pm 0,14$	$6,00^{a} \pm 0,36$		
11.	Ogólna jakość	$9,99^{d} \pm 0,01$	$7,12^{c} \pm 0,14$	$6,40^{b} \pm 0,25$	$5,02^{a} \pm 0,14$		

**Tabela S13.** Wyniki oceny profilowej ciastek kruchych z dodatkiem wsadu konopnego wypieczonych w temperaturze 160°C (n=6).

a-d – wartości w wierszach (dla jednego wyróżnika jakościowego) oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym  $\alpha$ =0,05;

**Tabela S14**. Wyniki oceny profilowej ciastek kruchych z dodatkiem wsadu konopnego wypieczonych w temperaturze 200°C (n=6).

Lp.	Wyróżniki	Wypiek w temperaturze 200°C przez 20 min				
	jakościowe smaku, zapachu, tekstury, barwy	Kontrola	Ciastko 1%	Ciastko 2%	Ciastko 3%	
1.	Kolor typowy dla ciastek kruchych	$8,88^{b} \pm 0,12$	$0,01^{a} \pm 0,01$	$0,01^{a} \pm 0,01$	$0,01^{a} \pm 0,01$	
2.	Kolor zielony	$0,01^{a} \pm 0,01$	$3,41^{b} \pm 0,12$	$6,41^{c} \pm 0,02$	$9,41^{d}\pm 0,41$	
3.	Słodki smak	$9,88^{d} \pm 0,02$	$8,45^{c} \pm 0,14$	$8,12^{b} \pm 0,15$	$7,04^{a} \pm 0,04$	
4.	Maślany smak	$9,89^{d} \pm 0,03$	$8,84^{bc} \pm 0,15$	$8,55^{ab} \pm 0,74$	$8,14^{a} \pm 0,09$	
5.	Gorzki smak	$2,01^{a} \pm 0,12$	$4,13^{b}\pm0,19$	$6,96^{\rm c} \pm 0,41$	$8,88^{d} \pm 0,12$	
6.	Obcy smak	$0,01^{a} \pm 0,01$	$2,54^{b} \pm 0,11$	$4,74^{c} \pm 0,14$	$6,98^{d} \pm 0,12$	
7.	Zapach typowy dla ciastek kruchych	$8,04^{d} \pm 0,18$	$5,66^{c} \pm 0,16$	$3,84^{b} \pm 0,15$	$2,22^{a} \pm 0,24$	
8.	Zapach obcy	$0,01^{a} \pm 0,01$	$3,36^{b} \pm 0,13$	$5,41^{c} \pm 0,19$	$8,13^{d} \pm 0,11$	
9.	Kruchość	$9,99^{c} \pm 0,01$	$9,54^{a} \pm 0,14$	$9,77^{ab} \pm 0,17$	$9,84^{bc} \pm 0,15$	
10.	Konsystencja	$8,74^{d} \pm 0,12$	$7,71^{c} \pm 0,09$	$6,74^{b} \pm 0,15$	$6,04^{a} \pm 0,14$	
11.	Ogólna jakość	$8,77^{c} \pm 0,12$	$7,88^{\circ} \pm 0,14$	$6,12^{b} \pm 0,16$	$5,11^{a} \pm 0,12$	

a-d – wartości w wierszach (dla jednego wyróżnika jakościowego) oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym  $\alpha$ =0,05;

**Tabela S15.** Terpeny oraz wybrane związki lotne charakterystyczne dla fermentowanych napojów mlecznych zawierających wsad konopny (24h po fermentacji).

Nazwa	Rodzaj próbki fermentowanego napoju mlecznego									
związku	Kontrola	Ekstrakt 0,5%	Ekstrakt 1%	Ekstrakt 2%	Susz 0,5%	Susz 1%	Susz 2%	Olej 0,5%	Olej 1%	Olej 2%
			Т	erpeny						
α-pinen + + +										
kamfen					+	+	+			
β-pinen					+	+	+			
$\Delta$ -3-karen					+	+	+			
β-myrcen								+	+	+
α-terpinen										
d-limonen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ocimen										
y-terpinen										
p-cymen										
terpinolen										
linalool										
isopulegol										
β-kariofilen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-humulen		+	+	+	+	+	+	+	+	+
geraniol										
neoridol		+	+	+	+	+	+	+	+	+
guaiol										
α-bisabolol										
			]	Kwasy						
Kwas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
octowy										
Kwas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
masłowy										
Kwas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
kaprylowy										
Kwas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
propionowy										
Ketony										
2-butanon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-pentanon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-heptanon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alkohole										
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alkohol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
laurylowy										


**Rycina S1.** Porównanie wydajności ekstrakcji 19 terpenów z wybranych elementów rośliny (Smałe kwiatostany, M – średnie kwiatostany, B – duże kwiatostany, L – liście) z wykorzystaniem trzech cieczy ekstrakcyjnych (octan etylu, n-heksan oraz metanol) (opracowanie własne) A-C - wartości w obrębie tej samej litery nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności wynoszącym  $\alpha$ =0,05