

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia



mgr inż. Andrzej Kwaśnica

**Opracowanie procedur określania pochodzenia
materiału roślinnego metodami
chromatograficznymi i genetycznymi**

Development of procedures for determining the origin of plant
material by chromatographic and genetic methods

Rozprawa doktorska

promotor:

prof. dr hab. inż. Antoni Szumny

opiekun pomocniczy:

dr n. med. Agnieszka Pilecka

Praca doktorska zrealizowana w ramach II edycji programu „*Doktorat Wdrożeniowy*”
finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

This study is supported by Ministry of Education and Science
Implementation Doctorates Project II edition

Wrocław 2023

PODZIĘKOWANIA

*Chciałbym serdecznie podziękować moim promotorom
prof. dr hab. inż. Antoniemu Szumnemu oraz dr n. med. Agnieszce Pileckiej
za ich ogromne wsparcie i życzliwość.*

*Całemu zespołowi Katedry Chemii Żywności i Biokatalizy a w szczególności
mgr inż. Natalii Pachura i dr Jackowi Łyczko,
za współpracę i nieocenioną pomoc w badaniach.*

*Pracownikom firmy Lab4Tox sp. z o.o. a w szczególności
mgr inż. Monice Haczekiewicz za wsparcie i pomoc
w realizacji prac w ramach projektu Doktorat Wdrożeniowy.*

*Na koniec chciałbym podziękować najważniejszym osobom,
bez których wsparcia i pomocy powstanie tej pracy nie byłoby możliwe – moim bliskim*

Pracę tę dedykuję mojemu ojcu – Henrykowi Kwaśnica.

Dziękuję!

Spis Treści

ABSTRAKT	4
STRESZCZENIE	5
I. WSTĘP	6
II. PRZEGLĄD LITERATURY	8
II.1 STAN PRAWNY W POLSCE W KONTEKŚCIE ROŚLIN	8
II.2 CHEMIZM NAJWAŻNIEJSZYCH ROŚLIN	11
II.3 SPOSOBY OKREŚLANIA POCHODZENIA ROŚLIN	16
II.4 SUSZENIE ROŚLIN A PROFIL METABOLITÓW WTÓRNYCH	18
II.5 PRZEGLĄD METOD STOSOWANYCH W ANALIZIE MATERIAŁÓW ROŚLINNYCH	20
II.5.1 CHROMATOGRAFIA GAZOWA	20
II.5.2 CHROMATOGRAFIA CIECZOWA	21
II.5.3 CHROMATOGRFAIA CIENKOWARSTWOWA	22
II.5.4 SPEKTROSKOPIA MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO NMR	23
II.5.5. INNE TECHNIKI ANALITYCZNE	24
III. CEL PRACY	26
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	28
IV.1 ANALIZY GC-MS	28
IV.2 ANALIZY LC-MS	29
IV.3 ANALIZY NMR	30
IV.4 ANALIZY GENETYCZNE	31
V. WYNIKI	34
V.1 WYNIKI OPUBLIKOWANE	34
V.1.1 PUBLIKACJA 1	36
V.1.2 PUBLIKACJA 2	55
V.1.3 PUBLIKACJA 3	77
V.2 WYNIKI CZĘŚCI DOŚWIADCZALNEJ NIEOPUBLIKOWANE	99
V.2.1 ANALIZA PROFILU KANNABINOIDÓW KONOPI W PRÓBKACH Z LAT 2018-2022	99
V.2.2 ANALIZA WPLYWU ROZPUSZCZALNIKA NA SKŁAD WYCIĄGU Z KONOPI WŁÓKNISTYCH	105
V.2.3 ANALIZA PROFILU FRAKCJI LOTNYCH	116
V.2.4 WYNIKI ANALIZ GENETYCZNYCH	126
VI. DYSKUSJA	131
VII. WNIOSKI	134
VIII. DOROBEK NAUKOWY I WDROŻENIE	136
IX. OŚWIADCZENIA	158
X. LITERATURA	181

ABSTRACT

As part of the work carried out, research was conducted on the profile of secondary metabolites of hemp - a plant whose cultivation and marketing are strictly controlled by law. Therefore, all related problems are of interest to Lab4Tox Ltd. as a forensic research entity.

As a result of the study, it was shown that the profile of secondary metabolites of hemp is strongly dependent not only on biological factors such as, for example, the variety, but also on purely physical factors such as drying or storage conditions. On the one hand, this makes it difficult and even impossible to indicate the origin of the sample, but at the same time it is a circumstance that makes comparative studies possible. Hemp biomass, once harvested, is subject to constant changes. These changes concern not only the content of volatile components (terpene fraction) but also the content of phytocannabinoids, which also undergo cycles of mutual transformation. This is determined by a huge number of combinations of many factors and their intensity. These processes, on the one hand, make it impossible to indicate specifically the variety or geographic source of origin, however, on the other hand, by imprinting their unique individual mark, they make it possible to establish the identity of the materials and compare them among themselves. The results of the work carried out have been implemented into the routine practice of Lab4Tox. sp. z o.o.

The possibility of using hemp phytosterols was equally tested. However, the sterol profile has not been shown to be able to differentiate samples of hemp-derived materials.

Work was also undertaken on genotyping hemp to individualize it. Twenty STRs were selected and tested, which were assumed to give the ability to differentiate materials from different varieties. Positive results have not been obtained. The reasons for the failure are not entirely clear. Obtaining an answer to this question would require significantly more extensive comparative studies, which is well beyond the capabilities of Lab4Tox. Ltd.

STRESZCZENIE

W ramach zrealizowanej pracy przeprowadzono badania nad profilem metabolitów wtórnych konopi - rośliny, której uprawa i obrót są ściśle kontrolowane przepisami prawa. Z tego też względu, wszystkie związane z nimi problemy pozostają w zainteresowaniu firmy Lab4Tox sp. z o.o. jako podmiotu zajmującego się badaniami kryminalistycznymi.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że profil metabolitów wtórnych konopi jest silnie zależny nie tylko od czynników biologicznych takich jak. np. odmiana, ale również od czynników czysto fizycznych takich jak warunki suszenia czy przechowywania. Wykazano, że tego w jaki sposób rośliny były suszone czy przechowywane. Z jednej strony utrudnia to a wręcz uniemożliwia wskazanie pochodzenia próbek, jednak równocześnie stanowi okoliczność umożliwiającą badania porównawcze. Biomasa konopna, po zebraniu podlega ciągłym zmianom. Zmiany te dotyczą nie tylko zawartości lotnych składników (frakcji terpenowej) ale również zawartości fitokannabinoidów, które również ulegają cyklom wzajemnych przemian. Decyduje o tym ogromna liczba kombinacji wielu czynników oraz ich nasilenia. Procesy te z jednej strony uniemożliwiają wskazanie konkretnie odmiany czy geograficznego źródła pochodzenia, jednakże z drugiej, odciskając swoje unikalne, indywidualne piętno umożliwiają ustalenie tożsamości materiałów i porównania ich pomiędzy sobą. Wyniki przeprowadzonych prac zostały zaimplementowane do rutynowej praktyki Lab4Tox. sp. z o.o.

Przetestowano również możliwość wykorzystania fitosteroli konopnych. Nie wykazano jednak by profil sterolowy mógł być podstawą różnicowania próbek materiałów pochodzących z konopi.

Podjęto również prace nad analizą konopi metodami genetycznymi w celu ich zindywidualizowania. Wytypowano i przetestowano dwadzieścia układów STR, które w założeniu powinny dać możliwość rozróżniania materiałów pochodzących z różnych odmian. Nie uzyskano pozytywnych wyników. Nie do końca jasne są przyczyny niepowodzenia. Uzyskanie odpowiedzi na to pytanie wymagałoby przeprowadzenia znacznie szerszej zakrojonych badań porównawczych, co znacznie przekracza możliwości firmy Lab4Tox. Sp. z o.o.

I. Wstęp

Badania identyfikacyjne substancji, mimo całego spektrum możliwych do zastosowania metod i technik, niejednokrotnie stanowią spore wyzwanie dla analityków. Szczególnych trudności przysparzają badania identyfikacyjne materiałów pochodzenia roślinnego. Najczęściej kwestią do rozwiązania jest identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie substancji czynnych występujących w roślinach, jednakże czasem analityk musi zmierzyć się z koniecznością identyfikacji samego materiału roślinnego czy to w celu jego identyfikacji czy też określenia zawartości domieszek / zanieczyszczeń. Problem ten pojawia się w kontekście wielu obszarów poczynając od przemysłu spożywczego i farmaceutycznego a na badaniach kryminalistycznych kończąc. W przypadku firmy Lab4Tox sp. z o. o. właśnie kryminalistyka jest obszarem, na którym skupia się aktywność naukowo-badawcza firmy. Profil działalności przedsiębiorstwa nakierowany jest na działalność usługową adresowaną do organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości. Lab4tox pełni tutaj rolę instytucji specjalistycznej – biegłego instytucjonalnego, którego zadaniem jest identyfikacja zabezpieczanych w postępowaniach karnych materiałów stosowanie do regulacji prawnych. Najważniejszym aktem prawnym dotyczącym tej materii jest Ustawa z dnia 29 lipca 2005r. o przeciwdziałaniu narkomanii¹ wraz ze stanowiącym akt wykonawczy do niej rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie wykazu środków odurzających, substancji psychotropowych oraz nowych substancji psychoaktywnych² ale także Ustawa o wyrobach akcyzowych³ czy ustawa Prawo Farmaceutyczne⁴. Wszystkie te akty prawne zawierają przepisy karne, których stosowanie uwarunkowane jest koniecznością identyfikacji substancji zawartych w kwestionowanych materiałach dowodowych. Mówiąc o materiałach dowodowych należy mieć na uwadze bardzo szerokie rozumienie tego pojęcia – od pojedynczych substancji chemicznych i ich mieszanin zaczynając a na materiałach pochodzenia roślinnego w różnym stanie fizycznym kończąc. Sporych problemów badawczych nastęrczają właśnie materiały roślinne, szczególnie, że w świetle przytoczonych wyżej aktów prawnych istotna w niektórych przypadkach jest nie tylko identyfikacja zawartych w nich metabolitów wtórnych, ale ich identyfikacja gatunkowa. W przypadku materiałów w stanie fizycznym uniemożliwiającym identyfikacje klasycznymi metodami biologicznymi (np. silne rozdrobnienie) lub w przypadku mieszanin zadanie to staje się wyjątkowo skomplikowane.

Istotnym problemem jest również kwestia pochodzenia badanego materiału roślinnego rozumiana jako wskazanie czy może pochodzić z określonej partii lub czy został wydzielony z innej porcji materiału zabezpieczonej w innym miejscu. W wielu przypadkach jest to kwestia

o kluczowym znaczeniu. W przypadku postępowań prowadzonych np. w sprawach o udzielenie środka odurzającego małoletniemu – jednemu z poważniejszych czynów penalizowanych przez Ustawę o przeciwdziałaniu narkomanii czy też w sprawach dotyczących nielegalnego obrotu środkami odurzającymi, gdzie wykazanie, że materiały dowodowe zabezpieczone u sprawców jest tożsamy ma kluczowe znaczenie.

II PRZEGLĄD LITERATURY.

II.1 Stan prawny w Polsce w kontekście roślin.

Kwestie obrotu oraz posiadania a także przetwarzania materiałów roślinnych, jak już wspomniano reguluje w Polsce kilka aktów prawnych, z których najważniejszym jest Ustawa o Przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29 lipca 2005r.¹ Ustawa ta z jednej strony zawiera odwołanie do Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie wykazu środków odurzających, substancji psychotropowych oraz nowych substancji psychoaktywnych z dnia 17 sierpnia 2018r., które to rozporządzenie wymienia enumeratywnie substancje, których posiadanie jest zabronione, a z drugiej strony definiuje co należy rozumieć pod pojęciem przetwarzania, wytwarzania i przerobu środków odurzających. W odniesieniu do roślin konopi definiuje nie tylko samo pojęcie ziela konopi czy żywicy konopi, ale również podaje kryterium klasyfikacji ziela konopi do jednej z dwóch grup: ziela konopi włóknistych oraz ziela konopi innych niż włókniste. Wspomnianym kryterium w przypadku ziela konopi jest łączna zawartość Δ -9-tetrahydrokannabinolu oraz kwasu Δ -9-THC-2-karboksyłowego w suchej masie ziela, natomiast w przypadku żywicy konopi istotna jest sama obecność Δ -9-tetrahydrokannabinolu lub kwasu Δ -9-THC-2-karboksyłowego.

Ponadto, w/w rozporządzenie wymienia w swoich załącznikach wiele substancji chemicznych będących metabolitami wtórnymi produkowanymi przez liczne gatunki roślin. Przykładem takich substancji są psylocyna i psylocybina wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Psilocybe* czy dimetylotryptamina (DMT) wytwarzana przez *Mimosa Hostilis*, *Diplopterys Cabrerana*, i *Psychotria Viridis*.

Poza tym w/w rozporządzenie, w grupie I-N wymienia cały szereg roślin:

- *Argyreia nervosa*
- *Banisteriopsis caapi*
- *Calea zacatechichi*
- *Catha edulis*
- *Echinopsis pachanoi*
- Konopi ziele innych niż włókniste
- *Leonotis leonurus*
- *Mimosa tenuiflora*
- *Mitragyna speciosa*
- *Nymphaea caerulea*
- *Papaver somniferum*

- *Peganum harmala*
- *Psychotria viridis*
- *Rivea corymbosa*
- *Salvia divinorum*
- *Tabernanthe iboga*
- *Trichocereus peruvianus*

których posiadanie w postaci roślin żywych oraz suszu jest zabronione. Co istotne, w grupie I-N wymienione są również wyciągi i ekstrakty z tych roślin, które są traktowane na równi z roślinami żywymi i suszem. Zapis ten w istotny sposób komplikuje badania identyfikacyjne. Aby zadośćuczynić tak postawionym wymaganiom należy dysponować wiedzą na temat nie tylko głównych metabolitów wtórnych, ale i charakterystyki wyciągów i ekstraktów. Ma to istotne znaczenie dla oceny prawnej danego materiału. Dla wymiaru sprawiedliwości ważna jest ilość – zupełnie inaczej przedstawia się np. posiadanie określonej ilości mieszaniny zawierającej stosunkowo niewielką ilość substancji kontrolowanej a czym innym, jeśli tą samą mieszaninę zakwalifikuje się jako wyciąg z rośliny kontrolowanej. Tylko z pozoru problem ten wydaje się być marginalny. Najlepszą ilustracją niech będzie przypadek tak popularnych w ostatnich latach wyciągów z konopi włóknistych. Ustawa o Przeciwdziałaniu narkomanii penalizuje jedynie wyciągi z konopi innych niż włókniste. Te z konopi włóknistych, pomimo obecności Δ -9-THC – substancji sklasyfikowanej jako substancja psychotropowa z grupy II P, są produktem legalnym. Brak wiedzy umożliwiającej zaklasyfikowanie wyciągu jako legalnego wyciągu z konopi włóknistych może skutkować zaklasyfikowaniem go jako produktu zawierającego substancję psychoaktywną w postaci Δ -9-THC lub jako żywicy konopi w postaci innych produktów konopi. W obu przypadkach samo posiadanie takich substancji wiąże się z odpowiedzialnością karną, natomiast prawidłowa klasyfikacja (jako wyciąg z konopi włóknistych) nie rodzi skutków prawno-karnych. Różnica jest taka jak różnica pomiędzy uniewinnieniem a wyrokiem skazującym.

Należy podkreślić, że sprawy związane z zieleń konopi, to ponad 99% wszystkich postępowań przygotowawczych dotyczących materiałów pochodzenia roślinnego, w których Lab4tox sp. z o.o. występował w roli biegłego. Należy w tym miejscu również zaznaczyć, że w ostatnich latach dużą popularność na rynku zdobyły wyroby wytwarzane z roślin konopi stanowiących konopie włókniste w rozumieniu Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii. Posiadanie oraz przetwarzanie (np. w celu pozyskania wyciągów) tego rodzaju materiałów jest legalne w Polsce i nie wymaga specjalnych zezwoleń. Sprawa pozyskiwania wyciągów z konopi włóknistych oraz wyrobów z nich wytwarzanych budzi spore kontrowersje – głównie

ze względu na obecność w tych wyrobach Δ -9-tetrahydrokannabinolu, substancji sklasyfikowanej jako substancja psychotropowa z grupy II P. Istnieje spore zapotrzebowanie wśród producentów tego rodzaju wyrobów jak również plantatorów uprawiających rośliny konopi na usługi analityczne związane z oznaczaniem zawartości kannabinoidów (w tym głównie Δ -9-THC, CBD i CBG). Tego rodzaju działalność do niedawna stanowiła domenę laboratoriów kryminalistycznych. Lab4tox sp. z o.o. jako podmiot zajmujący się badaniami kryminalistycznymi od 2011r. posiada kompetencje i możliwości badawcze, jednakże oczekiwania rynku związane z produktami wytwarzanymi z konopi włóknistych postawiły przed firmą zupełnie nowe wymagania i problemy. Siłą rzeczy tego rodzaju wyroby pozostają w zainteresowaniu organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości – szczególnie, że związane z nimi kwestie prawne wiążą się ze sporymi problemami interpretacyjnymi. Ma to swoje odzwierciedlenie w zakresie badań kryminalistycznych zlecanych przez Prokuraturę, Policję i Sądy.

Kwestie dotyczące wyrobów zawierających tytoń zostały uregulowane w dwóch aktach prawnych:

- Ustawie o podatku akcyzowym⁵
- Ustawa o ochronie zdrowia przed następstwami palenia tytoniu i wyrobów tytoniowych⁶

To co najważniejsze z punktu widzenia analityka / biegłego to fakt, że:

- zgodnie z zapisami w/w aktów prawnych za nikotynę uważa się nie tylko nikotynę, ale również alkaloidy nikotynowe (nie sprecyzowane zostało co należy rozumieć pod pojęciem alkaloidy nikotynowe, ani to jaka powinna być ich zawartość w materiale roślinnym);
- jedynym atrybutem wyrobu koniecznym do uznania go za któryś z rodzajów wyrobu tytoniowego jest sama obecność tytoniu.

Nie zawsze tytoń występuje w formie łatwych do identyfikacji liści. Najczęściej będzie to w różnym stopniu rozdrobniony materiał roślinny lub mieszanki ziołowe. W takich przypadkach badania chemiczne polegające na identyfikacji metabolitów wtórnych są niezastąpionym a czasami jedynym dostępnym narzędziem badawczym.

Kreśląc obraz stanu prawnego roślin w Polsce nie sposób nie wspomnieć o Ustawie Prawo Farmaceutyczne⁴. Ustawa ta zawiera przepisy karne penalizujące wprowadzanie do obrotu poza system aptek lub bez wymaganego dopuszczenia do obrotu produktów leczniczych. Warto w tym miejscu przytoczyć definicję produktu leczniczego zawartą w w/w ustawie:

„produktem leczniczym – jest substancja lub mieszanina substancji, przedstawiana jako posiadająca właściwości zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi lub zwierząt lub podawana w celu postawienia diagnozy lub w celu przywrócenia, poprawienia lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu poprzez działanie farmakologiczne, immunologiczne lub metaboliczne”

Jak łatwo zauważyć definicja ta jest dość szeroka. Jeśli dodamy do tego liczne monografie dotyczące tylko produktów leczniczych pozyskiwanych z ziół otrzymamy skomplikowany obraz dziesiątek możliwych produktów w różnorodnej postaci fizycznej – od spreparowanego suszu roślinnego po wyciągi, nalewki, tinktury itp. Na przestrzeni lat farmakognozja wypracowała szeroki wachlarz metod pozyskiwania produktów leczniczych z surowców pochodzenia naturalnego. Problemy z jakimi borykać się są zmuszeni biegli są w tym przypadku takie same jak i w przypadku w/w Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii¹ – z tym, że dotyczą znacznie szerszej grupy potencjalnych surowców roślinnych. Jest w tym przypadku kilka punktów stycznych – niektóre surowce roślinne są zarówno wykorzystywane w farmacji jak i znajdują się na liście substancji kontrolowanych Ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii. Przykładem takiej rośliny są np. szałwia wieszcza czy konopie. Poza najczęściej kojarzonym z konopiami zastosowaniem rekreacyjnym jest to roślina wymieniana w Farmakopei Niemieckiej (DAB) jako surowiec farmaceutyczny służący do sporządzania wyciągów lub do bezpośredniego użycia na drodze tzw. waporyzacji – tj. inhalacji parami powstałymi w wyniku oddziaływania wysokiej temperatury na materiał roślinny.

II.2 Chemizm najważniejszych roślin.

Identyfikacja metabolitów wtórnych dostarcza cennych wskazówek co do rodzaju / pochodzenia badanego materiału. W przypadku materiałów silnie zmienionych mechanicznie czy biologicznie jest to często jedyne narzędzie. W tabeli poniżej (Tabela 1) zestawiono najważniejsze metabolity wtórne roślin podlegających prawnej kontroli. Dodano nieujęte wprost w Ustawie o przeciwdziałaniu narkomanii tzw. grzyby halucynogenne – tj. grzyby z rodzaju *Psilocybe*, których głównym, psychoaktywnym metabolitem wtórnym są psylocybina i psylocyna – substancje psychotropowe z grupy I P w rozumieniu Rozporządzenia Ministra Zdrowia²

Roślina	Charakterystyczne metabolity wtórne
<i>Argyreia nervosa</i>	Ergina (LSA), izoergina lizergol, izolizergol, chanoklawina, elymoklawina, peniklawina, glikozydy cyjanogenne (nasiona),
<i>Banisteriopsis caapi</i>	Harmina, harmalina
<i>Calea zacatechichi</i>	Flawony (acacetina), laktony sesquiterpenoidowe (w tym germakranolidy)
<i>Catha edulis</i>	Katynon, pochodne fenetyloaminy
<i>Echinopsis pachanoi</i>	Mescalina, 3,4-dimethoksyfenetyloamina, 3-metoksytyramina, 4-hydrokso-3-metoksyfenetyloamina, 4-hydrokso-3,5-dimetoksyfenetyloamina, anhalonidyna, anhalinina, hordenina, tyramina.
Konopi ziele innych niż włókniste	Delta-9-tetrahydrokannabinol (THC), kannabinodiol (CBD), kannabinol (CBN), kannabigerol (CBG), kannabinochromen CBC)
<i>Leonotis leonurus</i>	Dokosatetraenoiloetanoloamid (DEA) oraz liczne diterpenenoidy (hispanolon, leonurun, leoleorins)
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Dimetylotryptamina (DMT)
<i>Mitragyna speciosa</i>	Mitragynina, 7-hydroksymitragynina
<i>Nymphaea caerulea</i>	Apomorfinina, nuciferyna
<i>Papaver somniferum</i>	Morfina, kodeina
<i>Peganum harmala</i>	Harmina, harmalina, Vasicina (peganina)
<i>Psychotria viridis</i>	Dimetylotryptamina (DMT), N-metylotryptamina
<i>Rivea corymbosa</i>	Ergina oraz inne ergot-alkaloidy
<i>Salvia divinorum</i>	Salwinoryna A, Salwinoryna B
<i>Tabernanthe iboga</i>	Ibogaina, Catharanthina Ibogamine, Yohimbina, Hydroxyibogamina oraz liczne inne alkaloidy indolowe
<i>Trichocereus peruvianus</i>	Meskalina
Grzyby z rodzaju <i>Psilocybe</i>	Psylocyna, psylocybina

Tabela 1 Lista roślin wraz z metabolitami wtórnymi kontrolowana Ustawą

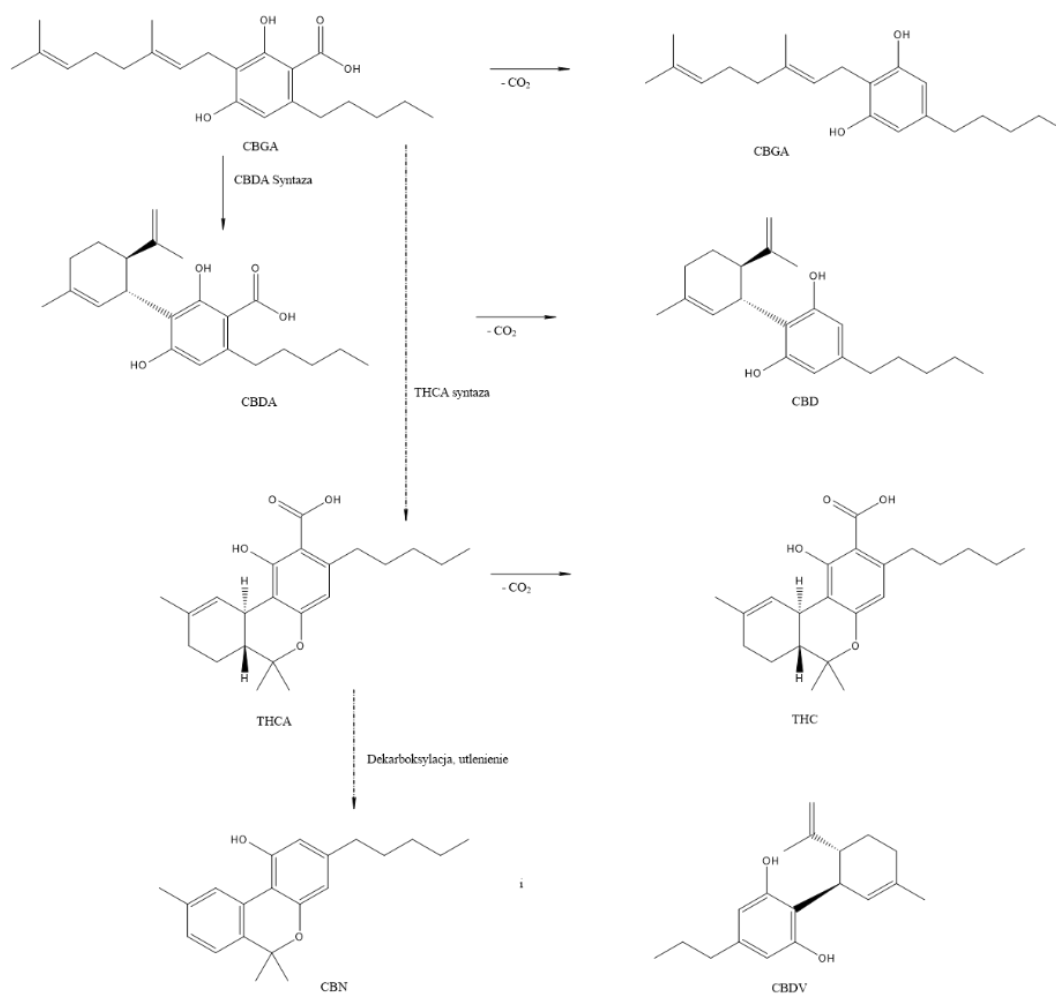
Osobnego potraktowania wymaga tytoń. Tytoń to roślina należąca do rodzaju *Nicotiana* z rodziny psiankowatych. W przeciwieństwie do wielu innych roślin z tej rodziny tytoń nie zawiera szkodliwych dla człowieka alkaloidów tropanowych, natomiast zawiera nikotynę i jej pochodne. Nikotyna jest najważniejszym metabolitem wtórnym tytoniu, stanowi swego rodzaju marker wskazujący na jego obecność.

Jak już wspomniano, najważniejszą rośliną, z punktu widzenia praktyki Lab4tox sp. z o.o. są konopie. Konopie to roślina jednoroczna, dwupienna, pochodząca z Azji Wschodniej. Rodzina *Cannabis* obejmuje tylko jeden gatunek *Cannabis sativa* Przyjmuje się, że roślina ma dwa podgatunki: *Cannabis sativa* subsp. *sativa* i *Cannabis sativa* subsp. *indica*.

Zidentyfikowano również trzeci podgatunek, *Cannabis sativa* subsp. *ruderalis* jednakże jego systematyczna przynależność botaniczna jest sporna⁷.

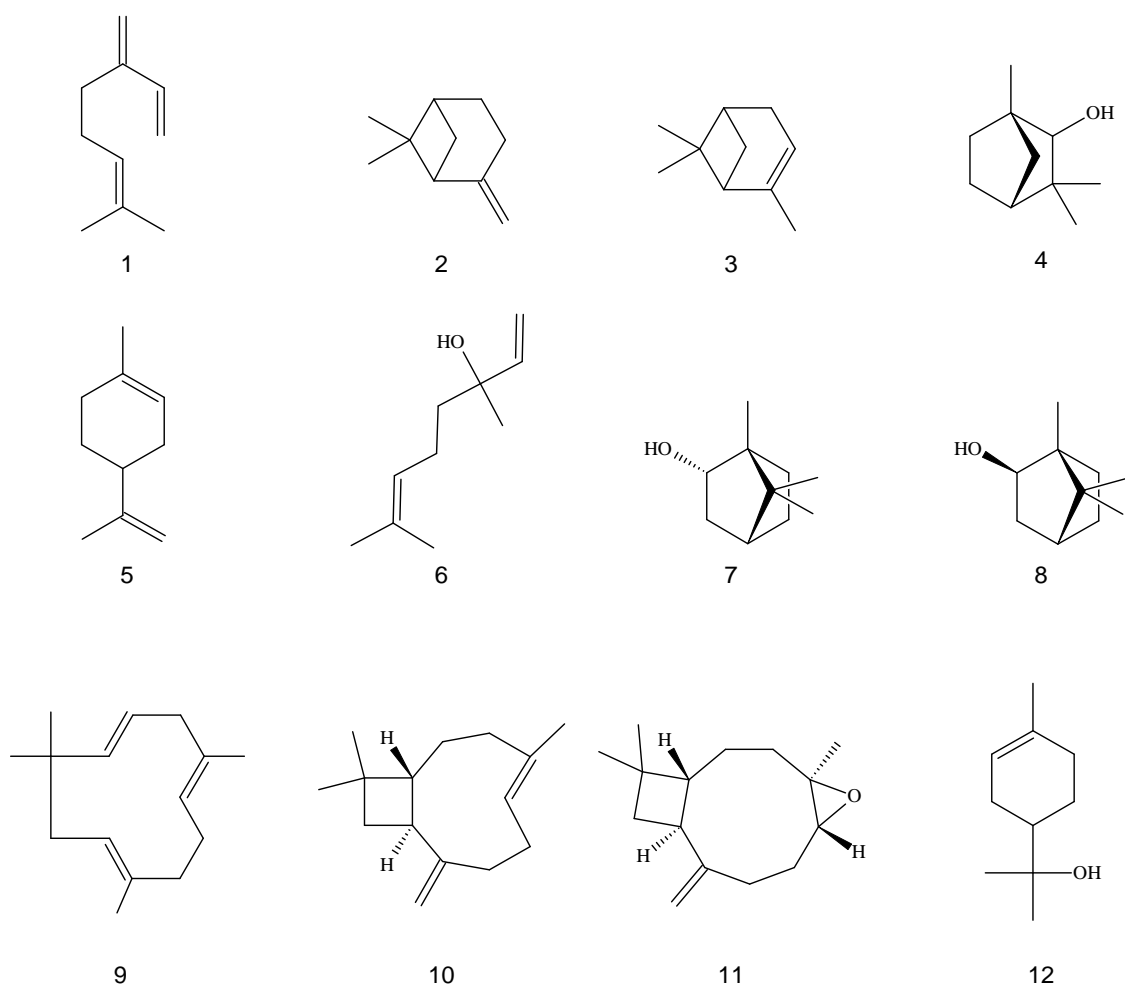
Konopie były wykorzystywane w celach terapeutycznych od tysięcy lat i zostały wprowadzone w medycynie zachodniej XIX wieku aż do zakazu ich stosowania w USA od połowy lat trzydziestych XX wieku.

Większość aktywnych biologicznie substancji jest wytwarzanych w kwiatostanach – przede wszystkim żeńskich osobników. Są one skoncentrowane w wydzielanej przez roślinę żywicy. Konopie zawierają szereg terpenoidów i kannabinoidów, z których najważniejsze to tetrahydrokannabinol (THC), kannabidiol (CBD), kannabigerol (CBG), kannabinol (CBN) i kannabinochromen (CBC). Kannabinoidy są związkami terpenofenolowymi unikalnymi dla konopi. Zidentyfikowano ponad 140 kannabinoidów pochodzących z konopi⁸. Jak już wspomniano, substancje te obecne są w żywicy wydzielanej przez rosnącą roślinę konopi, gdzie występują w formie kwasów kannabinolowych. Kwasy te pod wpływem promieniowania UV oraz temperatury ulegają szybkiej dekarboksylacji. Kannabinoidy podlegają również cyklowi wzajemnych przemian^{9,62} (Rysunek 1).



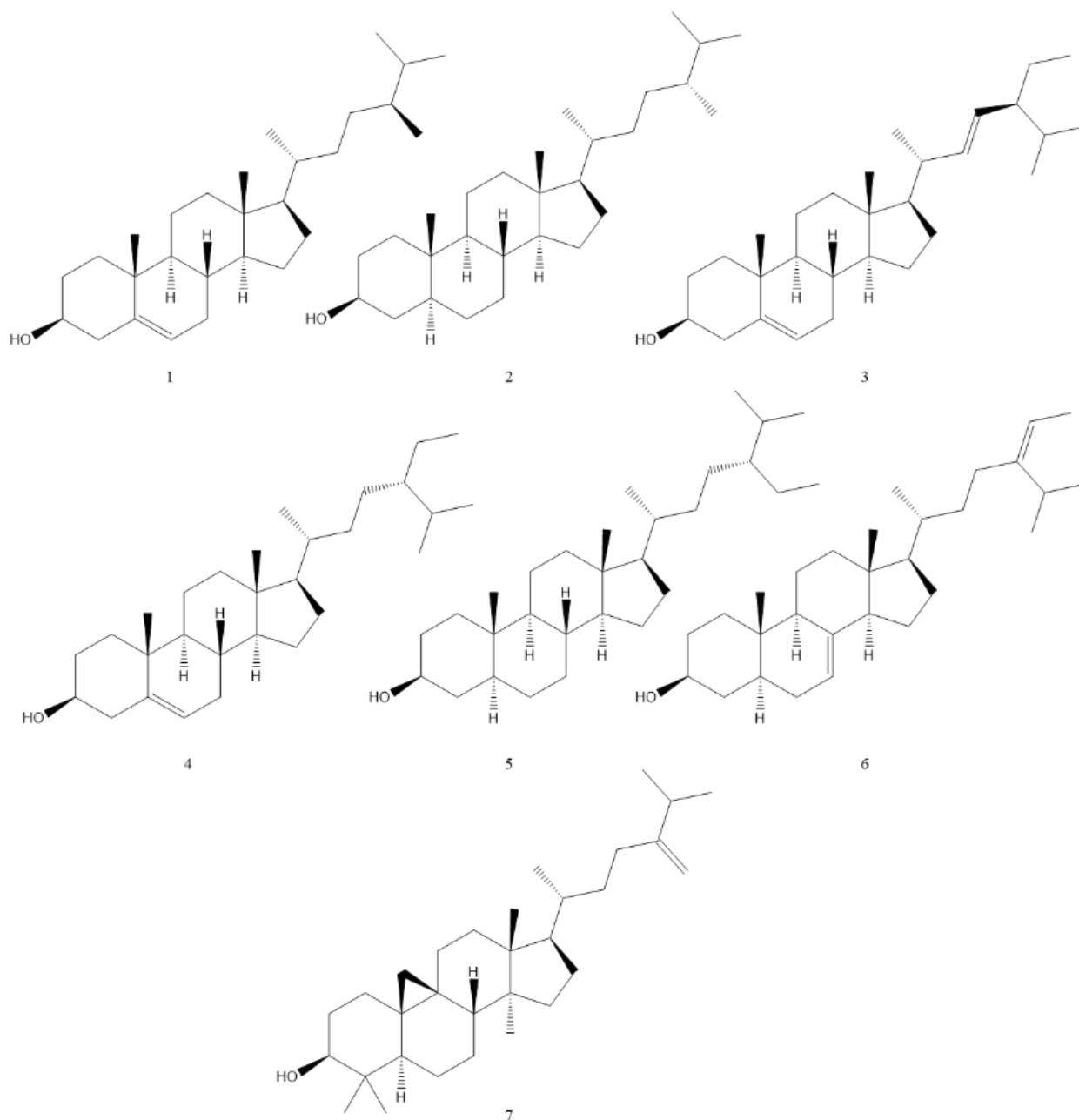
Rysunek 1. Najważniejsze kannabinoidy i ścieżki ich konwersji

Inną ważną klasą metabolitów wtórnych konopi są terpeny. Są to związki o strukturze będącej kombinacją podjednostek izoprenowych C₅. Można je podzielić na dwie różne klasy w zależności od liczby atomów węgla w ich strukturze: na monotereny (C₁₀) i sekwiaterpeny (C₁₅).¹⁰ Zidentyfikowano również większe terpeny jak woski i żywice, a także utlenione terpenoidy, jednakże pod pojęciem „terpeny” rozumie się przede wszystkim związki lotne¹¹. Terpeny są odpowiedzialne za charakterystyczny aromat konopi. Profil terpenowy zależy jest m.in. od warunków wzrostu rośliny i jej otoczenia. Terpeny wykazują różnorodne właściwości lecznicze¹². Znanych jest ponad 100 różnych terpenów i terpenoidów konopnych⁴⁹. Największy udział stanowią najczęściej: myrcen, kariofilen i jego tlenek a także mniej specyficzne α-pinen i β-pinen, limonen czy szereg innych, głównie alkoholi monoterenoidowych. Struktury w/w oraz innych terpenów zidentyfikowanych w konopiach przedstawiono na rysunku poniżej (Rysunek 2).



Rysunek 2. Wybrane terpeny zidentyfikowane w konopiach: 1: Myrcen, 2: β-Pinen, 3: α-Pinen, 4: kamfol, 5: Limonen, 6: Linalol, 7: izoborneol, 8: borneol, 9: humulen, 10: kariofilen, 11: tlenek kariofilenu, 12: α-Terpineol

Kolejną grupą związków obecnych w konopiach są fitosterole. Fitosterole to związki podobne do cholesterolu, stanowiące składniki strukturalne błon biologicznych. Zidentyfikowano ponad 250 steroli i związków pokrewnych⁴⁹¹³. Wolne fitosterole są związkami o polarności do kannabinoidów. Są to substancje nierozpuszczalne w wodzie, stosunkowo słabo rozpuszczalne w oleju i dobrze rozpuszczalne w alkoholach. Najważniejsze fitosterole obecne w konopiach to kampesterol, stigmasterol i β -sitosterol (Rysunek 3).



Rysunek 3 Wybrane fitosterole konopi: 1 – kampesterol; 2 – kampestanol; 3 – stigmasterol; 4 – β -sitosterol; 5 – sitostanol; 6 – Δ -7-awenasterol; 7 – 24-metylenocykloartenol

II.3. Sposoby określania pochodzenia roślin.

Na wstępie, należy zauważyć, że identyfikacja materiałów roślinnych w kryminalistyce jest problemem niezwykle złożonym. Poczynając od identyfikacji roślin w skali makro a na analizie mikrośladów pochodzenia roślinnego kończąc (pyłek kwiatowy, przetrwalniki, zanieczyszczenia pochodzące od materiału roślinnego) kończąc. W związku z powyższym, również pytania, na które należy znaleźć odpowiedź będą mocno zróżnicowane. W niektórych sytuacjach problemem będzie ustalenie przynależności rodzajowej czy gatunkowej materiałów roślinnych (w skali makro) a w niektórych będzie to identyfikacja zanieczyszczeń (np. na odzieży), czy analiza zawartości żołądka. Generalnie mamy do czynienia z dwoma rodzajami analiz – badaniami identyfikacyjnymi zmierzającymi do udzielenia odpowiedzi na pytanie: co to jest lub jaki to rodzaj materiału (odmiana, mieszanina itp.) a także skąd może pochodzić? W praktyce mamy również do czynienia z badaniami porównawczymi, gdzie pytaniem jest czy dwa ślady są tego samego rodzaju, ewentualnie czy pochodzą z tego samego źródła (określenie tożsamości prób).

W chwili obecnej jedynym, pozostającym w powszechnym użyciu, sposobem identyfikacji materiałów roślinnych wykorzystywanym w kryminalistyce jest identyfikacja na podstawie makro i mikroskopowych cech budowy morfologicznej^{14,15}. Oczywistym jest, że jest to zadanie wykonalne, pod warunkiem, że dysponuje się roślinami całymi lub ich częściami naziemnymi. W obszarze badań kryminalistycznych, najlepiej zbadane i opisane pod tym kątem są oczywiście rośliny konopi i krasnodrzewu pospolitego *Erythroxylum coca* (tzw. koka)¹⁶. Nie trzeba dodawać, że te dwie rośliny pokrywają przytłaczającą większość przypadków konfiskaty materiałów roślinnych wykorzystywanych w celach przestępczych. W przypadku obiektów w skali mikro takich jak pyłki, zarodniki czy mikroślady pozostawione na innych przedmiotach (np. na odzieży) sprawa jest dużo bardziej skomplikowana. W znakomitej większości przypadków możliwe będą jedynie badania porównawcze dające, siłą rzeczy, podstawę do opinii grupowej. Identyfikacja indywidualna w takich przypadkach nie jest możliwa. Podobnie sprawa wygląda w przypadku materiałów roślinnych silnie rozdrobnionych lub zmienionych w wyniku oddziaływania czynników chemicznych lub mikrobiologicznych. Głównie chodzi tu o materiały poddane procesom ekstrakcyjnym, maceracji itp. lub zmienionych w wyniku przebiegających w nich procesów gnilnych. Pomocnym narzędziem, w takich przypadkach jest analiza metabolitów wtórnych, które stanowią wskazanie co do rodzaju materiału¹⁷. Wyniki tego rodzaju badań w połączeniu np. z obrazem makro i mikroskopowym pozwalają wypowiedzieć się czym jest badany materiał lub mogą stanowić mocną podstawę do konkluzji

w przypadku badań porównawczych. Ten sam sposób postępowania stosuje się w przypadku wyciągów, ekstraktów itp., gdzie poza analizą metabolitów wtórnych istotnym elementem badań jest analiza makro i mikroskopowa obecnych w nich osadów czy pozostałości po filtracji.

Zupełnie nowe możliwości stwarza analiza genomu. W ten sposób możliwe staje się rozwiązanie problemów niemożliwych do rozwiązania tradycyjnymi metodami. Niestety i tutaj stosunkowo prosta jest identyfikacja grupowa umożliwiająca odpowiedź na pytanie czy mamy do czynienia z materiałem pochodzenia roślinnego, ale już porównanie dwóch próbek ze sobą czy identyfikacja gatunkowa są zdecydowanie trudniejsze. W kryminalistyce, badania DNA niepochodzącego od ludzi doczekały się jedynie bardzo ogólnych rekomendacji opracowanych przez ENFSI (The European Network of Forensic Science Institutes)¹⁸, instytucję zajmującą się wypracowywaniem standardów badań w obszarze kryminalistyki na poziomie Unii Europejskiej. Nie opracowano ustandaryzowanych metod identyfikacji materiału roślinnego nawet w przypadku najbardziej popularnej rośliny – konopi siewnych.

W literaturze można znaleźć wiele opracowań dotyczących identyfikacji roślin metodami biologii molekularnej. W ustaleniu, czy mamy do czynienia z materiałem pochodzenia roślinnego można wykorzystać uniwersalne sekwencje w niekodujących regionach DNA roślinnego – jak np. fragmenty DNA pochodzącego z chloroplastów (cpDNA) uważane za specyficzne dla roślin eukariotycznych¹⁹ *Tabela 2*.

Kod Loci	Sekwencja 5 ‘—3 ‘
B48557	CATTACAAATGCGATGCTCT
A49291	TCTACCGATTTCGCCATATC
B49317	CGAAATCGGTAGACGCTACG
A49855	GGGATAGAGGGACTTGAAC
B49873	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
A50272	AITTGAACTGGTGACACGAG

Tabela 2 Uniwersalne startery dla cpDNA

Biologia molekularna wypracowała cały szereg metod analizy DNA. Najbardziej użytecznym narzędziem wydaje się być analiza sekwencji mikrosatelitarnych (STR)²⁰²¹²². Sekwencje STR są regionami silnie polimorficznymi, a co za tym idzie ich analiza może być rozwiązaniem problemów badawczych związanych z identyfikacją. Generalnie, podstawowym problemem jest znalezienie regionów w roślinnym DNA charakteryzujących się największym polimorfizmem, najlepiej takich, które umożliwiłyby indywidualną identyfikację roślin nawet w obrębie jednej odmiany.

W przeciwieństwie do zwierząt, przy rozmnażaniu roślin nagminnie stosuje się klonowanie. Uzyskane w ten sposób egzemplarze są wierną genetyczną kopią rośliny-„matki”. Taka praktyka znacznie komplikuje wnioskowanie na podstawie zgodności profilu genetycznego dwóch próbek. Nie mniej, w chwili obecnej nauka nie dysponuje lepszym narzędziem badawczym. W przypadku roślin pozostających w zainteresowaniu czy to naukowców czy przedsiębiorców prace nad poszukiwaniem najbardziej użytecznych sekwencji STR są w różnym stopniu zawansowane^{23,24}.

II.4 Suszenie roślin a profil metabolitów wtórnych

Nie jest rozpoznany efekt procesu przechowywania, w tym suszenia na skład frakcji zarówno lotnych, jak i kannabinoidowych. W literaturze pojawiają się niejednoznaczne doniesienia czy przechowywanie (w tym również suszenie) może mieć wpływ na ich profil. Jest to szczególnie istotne, gdy porównujemy próbki przechowywane w różnych warunkach (okres przechowywania, temperatura, wilgotności etc.)^{65-68,71,72}.

Pozyskiwanie materiałów roślinnych nieuchronnie wiąże się z ich suszeniem. Ma ono na celu przede wszystkim zapobieganie niekorzystnym przemianom materiału roślinnego – w tym przede wszystkim rozwojowi procesów rozkładu gnilnego, ale również w wielu wypadkach nadaje surowcom roślinnym pożądane właściwości. W przypadku niemożności pozbycia się wody z materiału roślinnego zaraz po zbiorze, można uciec się do mrożenia. Niestety, w wielu przypadkach zabieg taki wiąże się z nieodwracalną utratą niektórych właściwości czy degradacją struktury. W każdym przypadku suszenie wywiera znaczny wpływ na materiał roślinny zmieniając jego cechy fizyczne oraz profil metabolitów wtórnych. Dlatego też, w ramach przeprowadzonych badań, suszeniu poświęcono specjalną uwagę. Wypracowano wiele różnych metod na pozbycie się wody z surowca roślinnego. Najważniejsze to:

- suszenie konwekcyjne (statyczne, rozpyłowe, z wykorzystaniem energii słonecznej itp.)
- suszenie mikrofalowe
- liofilizacja

Każda z tych technik ma swoje ograniczenia a także wpływa na suszony materiał. Fizycznie, zarówno suszenie konwekcyjne jak i mikrofalowe polega na dostarczeniu do materiału roślinnego energii w postaci czy to energii cieplnej czy energii mikrofal co ma na celu przeprowadzenie w stan pary stosunkowo łatwo lotnego składnika suszonego materiału jakim jest woda.

Zupełnie innym sposobem suszenia jest liofilizacja polegająca na wykorzystaniu przejścia fazowego pomiędzy lodem a parą wodną w niskich temperaturach i pod niskim ciśnieniem.

Każda z w/w technik, ze względu na uwarunkowania fizyczne wywiera różny wpływ na suszony materiał. Z jednej strony zmianie ulegać będą cechy fizyczne – w tym aspekcie różnice pomiędzy różnymi technikami suszenia będą znaczące²⁵. Liofilizacja wymaga głębokiego mrożenia, natomiast suszenie konwekcyjne a w mniejszym stopniu suszenie mikrofalowe wiąże się ze wzrostem temperatury. Jeśli chodzi o profil metabolitów wtórnych najbardziej inwazyjnymi technikami są metody suszenia konwekcyjnego i mikrofalowego. Są to dwie powszechnie stosowane, najłatwiej dostępne i stosunkowo takie metody suszenia. Dlatego też to na nich skupiono się w ramach przeprowadzonych prac. Grupą metabolitów wtórnych najbardziej wrażliwą na takie suszenie są oczywiście lotne substancje - tzw. olejki eteryczne. W zależności od temperatury suszenia, znakomita większość monoterpenu wchodzących w ich skład zostaje bezpowrotnie stracona. Dzieje się tak przede wszystkim ze względu na ich wysoką lotność, ale również na efekt obniżenia temperatury wrzenia ze względu na obecność pary wodnej, która nieuchronnie towarzyszy procesowi suszenia. Poza tym, w wyniku oddziaływania podwyższonej temperatury w materiałach roślinnych przebiegają procesy termicznego rozkładu niektórych związków, ale przede wszystkim przebiegają procesy katalizowane przez obecne w suszonym materiale enzymy. W wyniku tych przemian istotnym zmianom ulegają polifenole, flawonoidy (i ich glikozydy) oraz związki wykazujące właściwości antyutleniające^{26,27}. Jak pokazują badania, w temperaturach wyższych niż 60°C procesy te gwałtownie przyspieszają. W przypadku wielu surowców roślinnych, prowadzi to do bezpowrotnej utraty ich cennych właściwości.

W odniesieniu do konopi, których głównymi metabolitami wtórnymi wykorzystywanymi komercyjnie są olejki eteryczne oraz kannabinoidy. Utrata olejków w wyniku ich odparowania dotyczy w równym stopniu konopi jak i innych roślin. Dodatkowo, należy zaznaczyć, że w efekcie suszenia oksydacji może ulec jeden z głównych terpenoidów obecnych w konopiach a mianowicie kariofilen. Suszenie istotnie wpływa również na profil kannabinoidowy^{71,72}. Przede wszystkim rozkładowi ulegają wrażliwe na temperaturę kwasy kannabinolowe. Wszystkie kannabinoidy, w roślinie syntezowane są w formie kwasowych pochodnych. Pochodne te, bardzo łatwo, pod wpływem promieniowania UV ale także pod wpływem temperatury czy dłuższego przechowywania ulegają dekarboksylacji. Jednocześnie, kannabinoidy w cyklu przemian zachodzących w materiale roślinnym ulegają przemianom, które prowadzą do powstania CBDA i THCA z CBGA czy CBN z THC²⁸. W związku z tym, profil kannabinoidowy konopi w wyniku suszenia będzie ulegał zmianom.

II.5 Przegląd metod analitycznych stosowanych w analizie materiałów roślinnych

Materiały roślinne można analizować za pomocą różnych technik, wśród których najczęściej wykorzystywane to techniki podziałowe takie jak chromatografia gazowa (GC) i chromatografia cieczowa (LC) oraz sprzężenia tych technik ze spektrometrią mas (MS). Obie techniki mają swoje zalety i wady. Niewątpliwie zaletą obu tych technik jest rozdział, jaki następuje przed etapem detekcji. W przypadku wieloskładnikowych, skomplikowanych mieszanin, jakimi zwykle są produkty pochodzenia roślinnego jest to wręcz konieczne^{28,29}. Daje to tym metodom zdecydowaną przewagę nad technikami spektroskopowymi.

II.5.1 Chromatografia gazowa (GC)

Technika GC ograniczona jest przede wszystkim lotnością analitów. Wiele substancji albo nie przechodzi w stan pary w temperaturach leżących w zakresie możliwości sprzętowych aparatury albo ulega termicznej dekompozycji. Technika GC w sprzężeniu z MS daje jednak unikalną możliwość identyfikacji substancji z wykorzystaniem baz danych na podstawie czasu (indeksu) retencji i widma fragmentacyjnego. Częściowym rozwiązaniem problemu ograniczonej stosowalności metody GC jest derywatywacja. Tworzenie derywatów, w przypadku wielu analitów zmienia na tyle ich właściwości, że stają się one stabilne termicznie a co za tym idzie możliwe do oznaczenia. W przypadku kannabinoidów można w ten sposób oznaczyć niestabilne termicznie kwasowe formy kannabinoidów^{30,31}. W wielu przypadkach niekoniecznie trzeba stosować techniki sprzężone. Dobre efekty daje np. zastosowanie klasycznego detektora FID, szczególnie kiedy dysponujemy wzorcem fizycznym danej substancji. Wzorec fizyczny jest również niezbędny w przypadku analizy ilościowej. W przypadku kannabinoidów rozdział prowadzi się na kolumnach z niepolarną fazą stacjonarną. Przede wszystkim jest to czysty metylopolisiloksan lub domieszkowany 5% pochodnymi fenyłowymi, natomiast piec programuje się najczęściej z gradientem temperatury w zakresie od 50°C / 100°C do 250°C / 300°C. Widma masowe w przypadku techniki GC/MS zbiera się standardowo od 40 do 600 m/z²⁹.

Niektóre małowczątkowe, lotne substancje – jak np. terpeny są prawie wyłącznie analizowane techniką GC^{32,33}. W takich przypadkach doskonałym, unikalnym dla techniki GC narzędziem stosowanym na etapie przygotowania próby do analizy jest mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME). Technika ta pozwala w prosty sposób wyizolować lotne anality nawet z bardzo skomplikowanych matryc oraz jednocześnie je zatężyć, co znacznie podnosi czułość metody. Warto również wspomnieć o możliwościach jakie stwarza szeroka gama różnego typu detektorów stosowanych w GC. Jednym z najciekawszych, stosowanych w analizie związków

lotnych jest dozownik typu *head-space*. Technika ta, wykorzystując wysoką lotność niektórych analitów, podobnie jak SPME, pozwala na wstępną izolację analitów z matrycy a następnie ich rozdział i detekcję eliminując w ten sposób wpływ matrycy oraz skomplikowany proces przygotowania próby³⁴.

II.5.2 Chromatografia cieczowa (LC)

Technika LC nie posiada ograniczeń co do lotności analitów, jak GC, w związku z czym jej zakres stosowalności jest znacznie większy^{35,36}. Ograniczeniem w tym przypadku jest rozpuszczalność danej substancji w zastosowanej fazie ruchomej. Niestety możliwości identyfikacji substancji na podstawie danych z analizatora mas w przypadku techniki sprzężonej są w porównaniu do GC/MS znacznie mniejsze. Źródła jonizacji stosowane w LC (najczęściej ESI i APCI) mogą generować nie tylko jony jednonaładowane (jak w GC/MS) ale również jony wielonaładowane. Częsteczką nie ulega fragmentacji jak w przypadku EI. Fragmentacja może zostać wymuszona w wyniku kolizji z cząsteczkami gazu, ale wymaga to zastosowania tandemowego detektora mas³⁷ a wyniki silnie zależą od warunków analizy (energia kolizji, napięcie stożka) co w znacznym stopniu ogranicza (w przeciwieństwie do GC/MS) możliwość tworzenia uniwersalnych baz danych. Ponadto podatność na jonizację, a co za tym idzie możliwość detekcji w przypadku wielu związków może być bardzo różna. Należy zaznaczyć, że w znakomitej większości przypadków czułość sprzężonej techniki LC/MS znacznie przewyższa GC/MS, a znacznie szerszy wachlarz możliwych do oznaczenia substancji z nawiązką rekompensuje ograniczenia tej techniki³⁸.

W przypadku analizy kannabinoidów nie ma konieczności stosowania derywatyzacji. Możliwe jest jednoczesne oznaczenie form wolnych i kwasowych. Znakomitą większość analiz techniką LC prowadzi się w układzie faz odwróconych na kolumnach krzemionowych modyfikowanych oktadecylem (C18). Można śmiało stwierdzić, że jest to w chwili obecnej standard. Czynnikiem, który ulega największym modyfikacjom jest skład fazy ruchomej. Modyfikacje składu fazy ruchomej to najważniejsze narzędzie (analogicznie jak w GC temperatura pieca) pozwalające zoptymalizować rozdział. Najczęściej stosuje się układy dwóch faz: jednej fazy kwaśnej (roztwory kwasu mrówkowego czy fosforowe w metanolu, wodzie lub acetonitrylu) i czystej wody, metanolu czy acetonitrylu. Przytłaczająca większość opisanych w literaturze metody bazowały na gradiencie dwóch w/w rodzajów faz ruchomych.

W tabeli poniżej (Tabela 3) zestawiono porównawczo literaturowe przykłady granic oznaczalności i wykrywalności technik LC i GC przy zastosowaniu klasycznych detektorów FID (dla GC) i UV (dla LC)²⁸.

Analit	HPLC		GC	
	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
CBD ^a	0.20	0.60	0.17	0.56
THC ^a	0.15	0.47	0.16	0.54
CBG ^a	0.18	0.54	N/A	N/A
CBN ^a	0.10	0.31	0.12	0.39
CBC ^a	0.18	0.53	N/A	N/A

Tabela 3. Literaturowe przykłady granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) dla wybranych kannabinoidów.

Technika LC/MS z zastosowaniem tandemowego detektora mas, pracującego w trybie monitorowania par jonów (MRM) charakteryzuje się najwyższą czułością i selektywnością z wszystkich stosowanych standardowo technik analitycznych. Tą drogą oznacza się ksenobiotyki (w tym i kannabinoidy) w próbkach biologicznych takich jak krew, mocz czy tkanki. W przypadku krwi czy moczu czułość obecnie stosowanej aparatury pozwala bez trudu oznaczyć np. kannabinoidy na poziomie ułamków ng/mL ³⁹.

II.5.3 Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

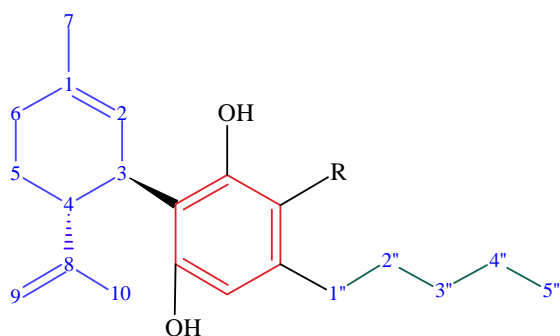
Historycznie TLC jest jedną z najstarszych metod chromatograficznych. Jest to w zasadzie uproszczona wersja chromatografii cieczowej, gdzie rolę pompy dozującej fazę ruchomą pełnią siły kapilarne a detekcja odbywa się z użycie światła UV i/lub na drodze chemicznej. Mimo swej prostoty, technika jest ciągle stosowana^{40,41,42}. Wszędzie tam, gdzie nie ma potrzeby używania bardzo czułych metod oraz gdzie celem analizy jest ilościowe, proste, szybkie i przede wszystkim tanie określenie tożsamości (na drodze porównania z wzorcem) czy wychwycenie zmian w składzie próby, technika ta okazuje się być dobrym rozwiązaniem. Dość powiedzieć, że właśnie TLC jest techniką stosowaną do potwierdzenia tożsamości ziela konopi zgodnie z monografią dot. wytwarzania produktów leczniczych z ziela konopi zamieszczoną w Farmakopei Niemieckiej (DAB).

W przypadku kannabinoidów analizę można prowadzić zarówno w układzie faz normalnych (najbardziej popularna technika) jak i odwróconych. Do detekcji najczęściej używa się soli Fast-Blue B (soli podwójnej chlorku 4-benzoilamino-2,5-dietoksybenzenodiazoniowego). Spotykane są również sprzężenia metody TLC z technikami spektroskopowymi – jak np. ze spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).

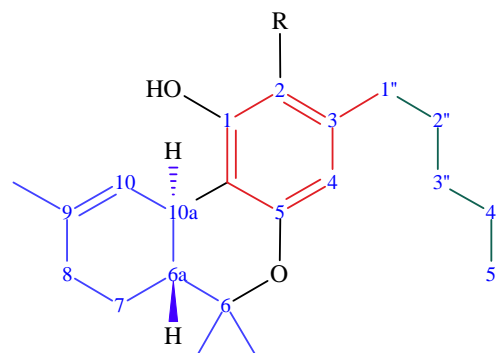
II.5.4 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

NMR nie jest techniką podziałową, nie wymaga skomplikowanego procesu przygotowania próby, co za tym, pomiar tą techniką jest szybki^{43,44,45}. Niestety technika ta charakteryzuje się stosunkowo niską czułością. Przy stężeniu analitów na poziomie poniżej 1% (w analizowanej próbce) analiza zazwyczaj jest już niemożliwa ze względu na wysoki udział tła i co za tym idzie obciążoną dużym błędem integrację protonów. Szczególnie jeśli dodatkowo matrycę stanowi skomplikowana mieszanina substancji o podobnej budowie – jak np. ekstrakt roślinny. Ogromną wadą tej techniki jest również wysoki koszt aparatury oraz jej utrzymania. Zaletą natomiast jest jej szybkość, prostota przygotowania próby oraz możliwość uzyskania ilościowego wyniku bez konieczności stosowania wzorca fizycznego. Jest to absolutnie wyjątkowa zaleta tej techniki.

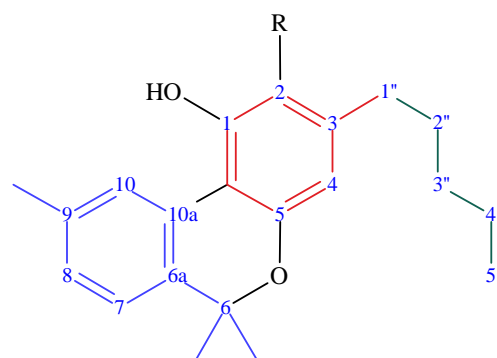
W literaturze można znaleźć doniesienia nt. ilościowego oznaczania kannabinoidów tą techniką^{43,46}. Możliwe jest oznaczenie obok siebie zarówno form kwaśnych jak i obojętnych. W rysunku (Rysunek 4) i tabeli (Tabela 4) poniżej pokazano numerację węgli w strukturze kannabinoidów oraz przesunięcia chemiczne związanych z nimi protonów, charakterystycznych dla najważniejszych kannabinoidów.



CBD, R = H
CBDA, R = CO₂H



delta-9-THC, R = H
delta-9-THCA, R = CO₂H



kannabidiol

Rysunek 4 Struktury wybranych kannabinoidów wraz z numeracją węgli

ANALIT	PROTON	δ (ppm)
CBN	H-4	6,44
	H-10	8,16
THCA-A	H-4	6,39
	H-10	6,24
THC	H-2	6,14
	H-4/H-10	6,27 / 6,29
CBDA	H-4	6,26
	H-10	5,55
	H-9 <i>trans</i>	4,54
	H-9 <i>cis</i>	4,4
CBD	H-10	5,57
	H-9 <i>trans</i>	4,66
	H-9 <i>cis</i>	4,56

Tabela 4. Przesunięcia chemiczne protonów charakterystycznych dla wybranych kannabinoidów.

II.5.5 Inne techniki analityczne

Do innych technik niewątpliwie zaliczyć należy testy barwne. Umożliwiają szybką analizę materiałów pod kątem obecności pewnych klas związków organicznych. Jest to technika powszechnie stosowana do szybkiej, możliwej do przeprowadzenia nawet w warunkach polowych, identyfikacji - np. popularnych narkotyków (amfetamina, kokaina, heroina) czy materiałów pochodzących z konopi. Wykorzystuje się w tym przypadku reakcje z odczynnikami Corinth V, Fast Blue i Duquenois¹⁶. Testy są niespecyficzne i jedynie potwierdzają potencjalną obecność niektórych substancji (np. kannabinoidów), bez określenia ich stężeń.

Techniką znacznie bardziej specyficzną a jednocześnie szybką i bardzo selektywną jest spektrometria ruchliwości jonów (IMS)^{47,48}. Jest to szybka technika, którą można zastosować do wykrywania śladów substancji organicznych. Technikę tę stosuje się do wykrywania śladów narkotyków (w tym i kannabinoidów) w warunkach polowych – np. na lotniskach. Wadą tej metody jest możliwość nasycenia detektora co skutkuje wyłączeniem urządzenia z ruchu. Zważywszy, że aparaty reagują na bardzo niewielkie stężenia, dłuższy kontakt ze stężonymi próbkami, lub analiza dużej liczby prób jest bardzo problematyczna. Jednakże w chwili obecnej

nie opracowano lepszej metody jednoczesnego rozdziału i identyfikacji składników mieszanin, tak szybkiej, czułej i możliwej do zastosowania poza warunkami laboratoryjnymi.

III. Cel pracy

Celem prac podjętych w ramach realizowanego doktoratu wdrożeniowego jest opracowanie metod analizy materiałów roślinnych oraz produktów pochodzenia roślinnego umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację. Wysiłki skupiono na przede wszystkim na konopiach jako na roślinie pokrywającej ponad 99% wszystkich tego rodzaju analiz w praktyce Lab4Tox sp. z o.o., jednakże wypracowane w ramach prowadzonego projektu narzędzia i metody planuje się wykorzystać również w przypadku innych, pozostających w zainteresowaniu roślin.

Przeprowadzone w ramach realizowanej pracy doktorskiej prace mają posłużyć rozszerzeniu możliwości badawczych i opiniodawczych. Prowadzone do tej pory badania nie umożliwiły określenia podobieństwa badanych próbek konopi czy wskazanie na źródło ich pochodzenia – a takie oczekiwania zlecniodawców pojawiały się coraz częściej. Należy podkreślić, że żadne znane laboratorium prowadzi rutynowo takich badań. Wobec tak zidentyfikowanej potrzeby rynkowej postanowiono uzupełnić możliwości badawcze Lab4Tox. Sp. z o.o. w ramach realizowanej pracy doktorskiej.

Jako kluczowy problem badawczy wytypowano identyfikację zmian jakościowych i ilościowych wybranych metabolitów wtórnych zachodzących w trakcie procesu suszenia i przechowywania materiału konopnego. Oznaczenie zmian markerowych metabolitów, tj. związków lotnych, fitosteroli oraz kannabinoidów mogłoby dostarczyć informacji na temat ich stabilności w czasie, a w konsekwencji umożliwić w przyszłości stworzenie tzw. „fingerprintu” próbkowanych materiałów. Prace te prowadzono pod kątem optymalizacji wykorzystania dostępnego w firmie Lab4Tox chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym.

W prowadzonych pracach skupiono się nie tylko na metodach z obszaru chemii analitycznej. Celem prac było również opracowanie metody analizy konopi z wykorzystaniem narzędzi analizy materiału genetycznego. Wytypowano technikę analizy sekwencji mikrosatelitarnych (STR) jako potencjalnie dającą największe szanse na realizację celu. Na podstawie publikacji ustalono sekwencje STR, które w założeniu dawały możliwość zróżnicowania roślin w obrębie tej samej odmiany.

Kolejnym celem prowadzonych prac było opracowanie metody umożliwiającej porównanie prób materiału roślinnego z sobą czy wskazanie źródła pochodzenia danej próbki. Możliwość wykonania tego rodzaju analiz dawałaby szansę rozstrzygnięcia kwestii tożsamości materiałów roślinnych, co z punktu widzenia prawa ma w niektórych sytuacjach kluczowe znaczenie.

Dotyczy to np. przestępstw udzielenia czy wprowadzania do obrotu środka odurzającego w postaci ziela konopi, kiedy wykazanie tożsamości dwóch prób ma kluczowe znaczenie. Możliwość wykazania podobieństwa dwóch prób jest dowodem, który łączy dwie strony: sprawcę z ofiarą czy dwie strony nielegalnej transakcji i stanowi istotną okoliczność w formalno-prawnej ocenie czynu.

IV Część doświadczalna

Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanych technik i użytych aparatów w oznaczeniu związków lotnych, kannabinoidów czy fitosteroli znajdują się w części Materiały i Metody publikacji: *Foods* 2020, *Molecules* 2022 i *Molecules* 2023, stanowiących **opublikowany** w czasopismach fragment pracy doktorskiej.

Poniżej przedstawiono materiały i metody dla części doświadczalnej, która **nie weszła** do niniejszej dysertacji jako materiały opublikowane, a stanowią integralną część przeprowadzonych badań.

IV.1 Analizy GC-MS

Analizę kannabinoidów obecnych w ekstraktach i materiałach roślinnych oparto o poniższą procedurę. Opracowana metoda pomiaru wykorzystuje chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (aparat Shimadzu GCMS QP 2020 Plus wyposażony w kolumnę kapilarną SH-Rxi XLB 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Materiał roślinny (dla próbek do 10g około 30 % masy, powyżej 10 g próbkę) dzielimy zgodnie z opracowaną Instrukcją Próbkowania (**Instrukcja IB 01/23**). Następnie próba doprowadzana jest do uzyskania suchej masy (temperatura do 35 °C przy zastosowaniu wagosuszarki) i rozdrabniana. Ze zhomogenizowanej próbki pobieramy tzw. próbki analityczne. Wielkość w/w próbek analitycznej (naważki) wynosi w zależności od spodziewanej zawartości kannabinoidów od 10 do 200 mg. Dla jednej próby pobiera się dwie próbki analityczne. Tak przygotowane naważki ekstrahuje się 3 razy chloroformem (1,5-4 mL). Połączone frakcje organiczne odparowujemy na wyparce próżniowej (lub w strumieniu gazu obojętnego) i uzupełniamy objętość do 2 mL. Następnie pobieramy 0,5 mL i uzupełniamy z 0,5 mL roztworu wzorca wewnętrznego - IS (difenyloamina - DPA, 1 mg/mL). Dobór DPA został opracowany na podstawie wcześniejszych doświadczeń analitycznych w firmie Lab4Tox. Jeśli występuje konieczność oznaczenia form kwasowych dodaje się do przygotowanej mieszaniny uzyskanego ekstraktu oraz roztworu IS odczynnik derywatyzujący tj. MSTFA (N-metylo-N-trimetylsilylo-trifluoroacetamid) (Rysunek 5).

Analizę frakcji lotnych techniką SPME prowadzono z użyciem trójskładnikowego włókna SPME CAR/DVB/PDMS. Próbę (20 mg suszu lub 60 mg materiału świeżego) inkubowano z dodatkiem wzorca wewnętrznego (zwykle 25 μg 2-undekanonu) w naczynku do pracy z autosamplerem Head-Space w temperaturze 45 °C przez 10 minut na łaźni wodnej.

spadł powrotnie do wartości 2%. Roztwór zwilżający składał się z izopropanolu (LC-MS grade - Molekula Ltd.), metanolu, i acetonitrylu (LC-MS grade – Carl Roth®) zmieszanych w stosunku v/v 1:1:1. Analizę LC-MS prowadzono przez 30 minut, w temperaturze 45°C, pod ciśnieniem 650 mbar, przy przepływie 0.5 mL/min, wstrzykując 10 µL próbki. Próbę do analizy przygotowano ekstrahując ją metanolem, wytrząsając mechanicznie przez 15 min, po czym filtrując i rozcieńczając metanolem (LC-MS grade). Automatycznie zbierano widma fragmentacyjne dla sygnałów o intensywności większej niż 5-krotność szumu. Identyfikacja analitów następowała na podstawie porównania ich widm fragmentacyjnych z bazami dedykowanymi do aparatury SCIEX: NIST E&L HR MS/MS 1.0, NIST 2017, Pesticide HR MS/MS 1.0), Metabolite HR MS/MS 1.0, Natural Products HR MS/MS 1.0, Mycotoxin HR MS/MS 1.0 raz Antibiotic HR MS/MS 1.0. Do identyfikacji wykorzystano również bazę danych Reaxys. Szczegóły metodyki dotyczące nastaw aparatu umieszczono w materiałach dodatkowych.

Ze względu na bardzo wysokie koszty i dość niewielką liczbę sytuacji, w których tego rodzaju analiza jest konieczna jest to metoda stosowana praktyce w wyjątkowych przypadkach.

IV.3 Analizy NMR

Profilowanie kannabinoidów obecnych w ekstraktach konopnych wykonano również w technice spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) spektrometrze Bruker Avance II 600 MHz sporządzając widma protonowe (¹H NMR) oraz widma węglowe (¹³C NMR). W tym celu rozpuszczono około 30 mg ekstraktu w 650 µL deuterowanego chloroformu (czystość deuteru wzbogaceniowego 99.8% - Spectrosol®). Widma protonowe zostały oznaczane przy częstotliwości rezonansowej protonu 600.58 MHz, a widma węglowe przy częstotliwości rezonansowej węgla 151.03 MHz. Pomiaru zostały wykonane w temperaturze 298K. W przypadku pomiaru ilościowego zawartości kannabinoidów do próby dodaje się *p*-ksylen jako wzorzec (ok. 1 mg/próbę). Dobór wzorca wewnętrznego był spowodowany faktem, iż związek ten był widoczny na widmie ¹H w postaci dobrze odseparowany sygnałów grup metylowych. Pomiar techniką NMR umożliwił wykonanie analizy ilościowej zarówno form kwaśnych jako i obojętnych. Dużą wadę tej techniki jest jej relatywnie niska czułość. W przypadku analitów występujących w stężeniach poniżej 1% wykonanie oznaczeń ilościowych jest obciążone dużym błędem spowodowanym niskim poziomem wartości sygnału do szumu. Również ze względu na wysokie koszty, w standardowych typach analiz ten sam efekt można uzyskać innymi, tańszymi metodami. Technika jest natomiast nie do zastąpienia w przypadku analiz typu *fingerprint* – i w tym celu była wykorzystana w badaniach.

IV.4 Analiza genetyczne

Celem naszych badań było wykorzystanie analiz metodami genetycznymi ziela konopi do identyfikacji roślin, tak by możliwe było z jednej strony stwierdzenie, że mamy do czynienia z konopiami, ale również porównywania prób pochodzących z różnych odmian czy śledzenia drogi od nasiona do rośliny. Na podstawie literatury⁴⁹ i całej palety używanych w analizie genomu metod i technik wybraliśmy analizę sekwencji mikrosatelitarnych (STR) jako dającą największą szansę na zróżnicowanie nawet blisko spokrewnionych osobników a jednocześnie prostą i powszechnie stosowaną w analizie cech indywidualnych genomu (np. ludzi). Wybraliśmy, w naszej ocenie, zestaw starterów dający największe szanse na powodzenie. Wybrano 20 par starterów bazują na analizie literatury. Do testów wytypowaliśmy pięć odmian konopi włóknistych pochodzących z certyfikowanych materiałów siewnych, tj. *Tibor Slallasi Carmagnola Henola Finola Dioica Kompolti* oraz cztery próbki o nieznanym pochodzeniu oznaczone w eksperymencie jako 1, 1A, 1B oraz 13.

Badania genetyczne konopi zostały wykonane w laboratoriach firmy *Pracownia Analiz Profili Genetycznych PAPGEN* (Wrocław). Sekwencjonowanie wykonano z kolei w laboratoriach firmy *Genomed* (Warszawa).

Genomowe DNA wyekstrahowano z próbek roślin przy użyciu zestawu Fast DNA Plant Screen PCR A&A BIOTECHNOLOGY zgodnie z instrukcjami producenta. Wydajność izolacji oceniono przy użyciu fluorometru *Quantus* z wykorzystaniem dedykowanych odczynników QuantiFluor® dsDNA System. Amplifikację (reakcję PCR) przygotowano korzystając z protokołu producenta Invitrogen Platinum Hot Start PCR 2X Master Mix (Tabela 6). Reakcja PCR we wszystkich badanych przypadkach była prowadzona na termocyklerze VeritiPro™ 96-well Thermal Cycler (applied biosystems by Thermo Fisher Scientific) w warunkach podanych tabeli poniżej (Tabela 5).

Krok		Temperatura	Czas
Initial denaturation		95	5min
35 PCR cycles	Denature	95	30s
	Anneal	55 (lub 57)	45s
	Extend	72	45s
Final extension		60	30min
Hold		4	nieskończoność

Tabela 5. Warunki Reakcji PCR.

Składniki	25 mL reak.
Woda, Nuclease-free	3,5 mL
Platinum Hot Start PCR 2X Master Mix	12,5 mL
0,25uM Forward primer	0,5 mL
0,75uM Reverse primer	0,5 mL
Matryca DNA	3-6 mL
Platinum GC Enhancer	5 mL

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Wstępne sekwencjonowanie w celu oszacowania obecności oraz jakości otrzymanego produktu jak również sekwencjonowanie finalne produktów odbyło się na sekwenatorze ABI 3130XL Genetic Analyzer (applied biosystems by Thermo Fisher Scientific).

Sekwencje starterów wybrano na podstawie analizy literatury kierując możliwością maksymalnego zindywidualizowania badanych materiałów roślinnych. Wybrano dość dużą liczbę - 20 starterów (Tabela 7) bazując na pracy Borin i wsp. *Plants* 2021.⁵⁰

Locus	Start	End	Przewidywana masa produktu (kD)	Typ markera	Ta (°C)	Motyw	Forward primer	Reverse primer
SSR_6-3	35,062,092	35,062,261	180-200	M13	55	(AAT)10	ATCTCATTTTCCGTACCTGTT	CTAATT CTCAACTTAACCGCG
SSR_2-2	27,019,093	27,019,345	250-270	M13	55	(TGA)12	TAGTAGTAGTAGTGCCTGAGG	ACCTTAACAACACCACAATA
SSR_X-1	12,090,959	12,091,352	390-450	M13	55	(TC)40	TTGTCAAGGGAGCTTAGTTAG	ATGTGTATTTCTCGCCTGTTA
SSR_4-2	38,738,240	38,738,472	230-260	PAN1	55	(AT)17	CAGAGTTTGGTCCTTTTCAA	CACGGATTTTAAGCATTGGAT
SSR_2-3	49,240,375	49,240,744	350-410	PAN1	55	(GA)22	CTCCCTGCCATTAGACAAATA	CCAGGAGGTAATTTTCTGCTA
SSR_7-3	51,776,452	51,776,692	230-280	PAN2	55	(CT)22	ACTGTGAAGTGTCTTTTACA	AACAACCTGAAATCCGAAAAG
SSR_3-3	59,258,629	59,258,880	250-300	PAN3	55	(AG)21	CAAAGAAAGCAGGCATTAGTT	CTCTCTGTGAATGTGATCTGT
SSR_2-1	15,695,145	15,695,388	240-260	M13	55	(AAT)11	GGCAGGAAAAATCTCAAACAT	ACATTGGAATTAGACAGAGCA
SSR_4-1	3,414,697	3,414,947	230-270	PAN1	55	(ATA)21	GTTGGTTATGTGTTAGGGTCT	GTTATGGACAAAACAATGCATG
SSR_8-2	13,924,026	13,924,199	180-220	PAN2	55	(CT)21	CATCACACCAGGTACCAATAT	CATGAAACAACGTTGGGTTAT
SSR_5-2	34,558,385	34,558,643	250-300	PAN2	55	(CT)32	TGGCTGAAAGTAAGAAAAGAC	TTATCGCTCAAAAACACTCAAC

SSR_6-1	3,764,859	3,765,058	200–270	PAN3	55	(AT)17	ACTTCACATGAGATTGAGAACA	TCCTTTGGATTCATTAAGTTGT
SSR_X-3	71,305,129	71,305,410	280–350	PAN3	55	(TC)41	ACAGTAGTTTTTCAGGGTTGAA	TCACACCAATATCTATCAGCC
SSR_1-4	86,039,144	86,039,328	180–220	M13	55	(TTA)17	TCAAGTTACGTAATCCCCAAA	CCTAAGCACAAGGTTAAATCAT
SSR_3-1	12,247,530	12,247,829	300–340	M13	55	(TC)32	TGATTTTGCAGCCCTTTTATG	CTTTTGCAGGTACATCCAAAA
SSR_8-4	50,925,135	50,925,396	280–330	PAN1	55	(TC)22	TATGCATCCATTGTACCTGTT	TAATGTTTGTGTGTGTGCAAA
SSR_9-4	58,895,568	58,895,670	110–150	PAN1	57	(CT)16	TTTCTGCTCACCTTAAACC	AACCTATATTGAGACGAACCG
SSR_1-1	12,756,851	12,757,030	180–220	PAN1	57	(TC)33	AAACTGACAGCTTAAGCATT	TGGGCATGTACTCTATCACTA
SSR_5-5	82,565,436	82,565,719	270–290	PAN2	57	(GA)18	AGAGGAAGGAAAGAGAGCTAT	CACGAGGGAGCCTTATTAATA
SSR_6-4	63,517,285	63,517,456	170–180	PAN3	57	(CT)30	ACGAGACTTACAGAGAACAA	AGATAGGGAAGAACAACAC

Tabela 7. Wybrany zestaw starterów wraz z ich charakterystyką.

V Wyniki.

W ramach prezentowanej pracy wykonano szereg eksperymentów które miały na celu ocenę wpływu czynników zewnętrznych na konopie tj. na ich profil metabolitów wtórnych. Jak wiadomo profil ten może zmienić się znacząco w zależności od całego szeregu czynników. Postawiono tezę, że może to prowadzić do generowania w materiale roślinnym cech „indywidualnych” – wielka różnorodność jakościowa i ilościowa zewnętrznych czynników, którym siłą rzeczy podlega materiał roślinny powinna pozostawić swój unikalny ślad w profilu metabolitów wtórnych. Z punktu widzenia celu realizowanej pracy jest to okoliczność, którą można i należałoby wykorzystać. Umożliwia to bowiem analizę porównawczą dwóch prób z zmierzającą do określenia ich tożsamości – tj. czy są do siebie podobne, a co za tym idzie, czy mogą pochodzić z jednego źródła.

Pod uwagę wzięto również wyciągi z konopi – tj. wpływ różnorodnych technik ekstrakcyjnych na ich skład. Jest to również element zakreślonego problemu badawczego.

V.1 Wyniki opublikowane

Prace rozpoczęto od suszenia, które jest nieodłącznym elementem pozyskiwania biomasy konopnej. Zbadano jej wpływ na profil związków lotnych (głównie terpenowy i terpenoidowy) kannabinoidowy, steroidowy. Wyniki przedstawiono w dwóch opublikowanych pracach: Kwaśnica et al. *Foods* (2020) oraz Kwaśnica et al. *Molecules* (2023).

W obu przytoczonych pracach opracowano szczegółowo metody analityczne, tj. otrzymanie olejku eterycznego, analiza frakcji lotnych metodą mikroekstrakcji do fazy stałej) która umożliwiła oznaczenie jakościowe i ilościowe. Dopracowano również technikę derywatywacji pochodnych ciężkich, nielotnych w klasycznej technice nastrojku ciekłego.

Dla kwiatostanów konopi zidentyfikowano 93 związki lotne, w tym jako dominujące β -myrcen, limonen, β -E-kariofilen i humulen. Wyniki te są zbliżone do prac innych autorów^{51,52,53}. Udowodniono zróżnicowanie ilościowe i jakościowe frakcji lotnych pomiędzy poszczególnymi wariantami suszenia. Wytypowano najmniej oraz najbardziej destrukcyjne metody dla suszenia kwiatostanów *C. sativa*. Uzupełnieniem badań chromatograficznych było wyznaczenie krzywych suszenia i profilu sensorycznego tak uzyskanego materiału. Publikacja ta uzupełnia lukę metodologiczną badań frakcji lotnych konopi metodami SPME, które nie były dotychczas prowadzone w firmie Lab4Tox. Udowodniono również, że charakterystyka sensoryczna kwiatostanów jest najbardziej zbliżona do wyjściowego surowca dla wariantu mikrofalowego suszenia przy 240 W mocy.

W publikacji *Molecules* (2023) przedstawiono analizy chromatograficzne, obejmujące zarówno frakcje olejkowe (EO) jak i lotne (VOCs). Oznaczono również ilościowo i jakościowo związki cięższe, tj. o strukturze steroidowej czy, co najistotniejsze, kannabinoidowej. Liście jako materiał uboższy (w ujęciu ilościowym EO) od kwiatostanów konopi pozwoliły na identyfikację jedynie 64 substancji w technice nastrzyku ciekłego i 41 w technice mikroekstrakcji do fazy stałej. Przedstawiona została jednocześnie optymalizacja analiz fitokannabinoidów metodą derywatywacji z BSTFA. Zidentyfikowano CBD i jego kwasową formę – CBDA, CBC, THC i THCA, CBG, CBGA jak również CBN. Dominującymi sterolami obecnym w liściach konopi były β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol. Zidentyfikowano również triterpenoidową α i β -amyrynę oraz lupeol. Za najistotniejsze uważam potwierdzenie braku zmian ilościowych i jakościowych frakcji kannabinoidowych w procesie suszenia. Najmniejsze zmiany we frakcji lotnych zaobserwowano dla wariantu suszenia konwekcyjnego połączonego z mikrofalowo-próżniowym dosuszeniem w temp. 60 °C. Udowodniono po raz pierwszy, że zastosowane temperatury (tj. 50, 60 i 70 °C) nie zmieniają ilościowo i jakościowo frakcji terpenowej i kannabinoidowej. Jednocześnie nie zaobserwowano potencjalnego procesu dekarboksylacji, który wg innych autorów może zachodzić w trakcie działania wymienionych temperatur^{54, 55, 56}. Zawartość fitosteroli wahała się od 534 $\mu\text{g/g}$ (β -sitosterol) do 44 $\mu\text{g/g}$ (izofukosterol).

Fitosterole były ponadto przedmiotem osobnych badań zmierzających do określenia, czy ich profil może stanowić potencjalny czynnik różnicujący. Rezultaty przedstawiono w opublikowanej pracy: Kwaśnica A. i wsp. *Molecules* 2022

V.1.1 Publikacja 1

TYTUŁ:

Volatile composition and sensory properties as quality attributes of fresh and dried hemp flowers (*Cannabis sativa* L.).

AUTORZY:

Kwaśnica, A., Pachura, N., Masztalerz, K., Figiel, A., Zimmer, A., Kupczyński, R., Wujcikowska K., Angel A. Carbonell-Barrachina, Szumny A. i Róžański, H.

CZASOPISMO:

Foods 2020, 9(8), 1118; <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

Article

Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.)

Andrzej Kwaśnica ^{1,2,*}, Natalia Pachura ^{1,*}, Klaudia Masztalerz ³, Adam Figiel ³, Aleksandra Zimmer ³, Robert Kupczyński ⁴, Katarzyna Wujcikowska ⁴, Angel A. Carbonell-Barrachina ⁵, Antoni Szumny ¹ and Henryk Różański ⁶

¹ Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland; antoni.szumny@upwr.edu.pl

² Laboratorium Badań Toksykologicznych Lab4Tox Sp. z o.o., ul. Kruszwicka 24/66, 53-652 Wrocław, Poland

³ Institute of Agricultural Engineering, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chełmońskiego 37-41, 51-630 Wrocław, Poland; klaudia.masztalerz@upwr.edu.pl (K.M.); adam.figiel@upwr.edu.pl (A.F.); zimmer.ola@gmail.com (A.Z.)

⁴ Department of Environment, Animal Hygiene and Welfare, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chełmońskiego 38C, 51-630 Wrocław, Poland; robert.kupczynski@upwr.edu.pl (R.K.); k.wujcikowska@gmail.com (K.W.)

⁵ Departamento Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, 03312-Orihuela, Alicante, Spain; angel.carbonell@umh.es

⁶ Institute of Health and Economy, Carpathian State College in Krosno, Rynek 1, 38-400 Krosno, Poland; rozanski@rozanski.ch

* Correspondence: andrzej.kwasnica@upwr.edu.pl (A.K.); natalia.pachura@upwr.edu.pl (N.P.)

Received: 21 June 2020; Accepted: 10 August 2020; Published: 13 August 2020



Abstract: Flowers of hemp (*Cannabis sativa* L.) are widely used in cosmetics, food, and in the pharmaceutical industry. The drying process plays a key role in retention of aroma and also in the quality of products. Seven variants of hemp flower drying, including convection drying (CD), vacuum–microwave drying (VMD), and combined drying consisting of convective pre-drying followed by vacuum–microwave finishing drying (CPD-VMFD) were checked in this study. For each process, we applied the two-term model. Dried material was submitted to color and chromatographical assessments. Analyses of obtained essential oil showed the presence of 93 volatile compounds, predominantly β -myrcene, limonene, and β -(E)-caryophyllene, as well as α -humulene. Application of 240 W during VMD and 50 °C during CD gave the highest retention of aroma compounds, amounting to 85 and 76%, respectively, but with huge color changes. Additionally, sensory analysis proved that drying with a microwave power of 240 W provides a product most similar to fresh material.

Keywords: *Cannabis sativa* L.; drying methods; essential oils; sensory evaluation

1. Introduction

Cannabis sativa L. is an annual herbal plant of the cannabis species (*Cannabaceae*) that has been known and cultivated especially in Asia since ancient times [1]. Nowadays, it is already cultivated all over the world and has a wide range of applications, including food, dietary supplements, medicines, body care products, fuel, paper, and as a building material, as well as a role in textiles [2]. Hemp contains around 750 natural chemical compounds, which can be classified into different classes [3]. The abundance of chemicals in cannabis flowers stems from the biosynthesis, particularly of terpenes and cannabinoids in the extracellular secretory cavity, known as the trichome. The active substances are secreted into

the trichomes to prevent damage to plant cells and are the first line of defense against the external environment [4].

The most common and basic technique for conserving herbs and retaining bioactive compounds is drying. The research shows that, depending on the choice of drying method and parameters, different chemical and biological activity of herbs is obtained, due to different content of chemical compounds in their composition [5]. The selection of the drying method has a major influence on the content of volatile essential oils present in herbs, as shown in earlier studies [6–10]. During the drying process, the following changes in the composition of the essential oil may occur—an increase or decrease in the concentration of volatile substances, or the formation of new chemical compounds [5]. The most commonly used drying method is convection drying (CD), a process using a continuous flow of hot air to remove moisture from the biological material [11]. With the development of technology, alternatives for better drying performance have emerged, such as vacuum–microwave drying (VMD) and combined methods consisting of convectional pre-drying followed by vacuum–microwave finishing drying (CPD-VMFD). The VMD method allows faster drying of the material while avoiding high temperatures [12]. Due to the high cost of production, an alternative drying method, CPD-VMFD, has been proposed due to the requirement of high vacuum during drying. This multi-stage drying process coupling the two CD and VMD methods together allows a satisfactory degree of drying of the material as it offers the advantages of the VMD method with the high performance that the CD method provides [11].

Recently, there has been a focus on the use of secondary metabolites from hemp flowers, which are characterized by low tetrahydrocannabinol (THC) content, which are known as nonpsychotropic cannabinoids, terpenoids, and flavonoids [13–15]. Essential oils extracted from hemp flowers are widely used in cosmetology as ingredients used in the production of creams, soaps, and shampoos, as well as in the food industry as aromas for alcoholic and non-alcoholic beverages and additives in baking [16]. Hemp essential oils have shown an interesting antimicrobial effect and can constitute an economic, effective antiseptic. They are therefore used to treat wounds and infections such as food poisoning and nosocomial infections, and can be used against antibiotic-resistant bacterial strains [17]. In addition, they are commonly used as insecticides [18,19], fungicides [20], and growth inhibitors for unwanted plants [21], and can be used in plant protection as a means of stopping plant diseases and pest attacks [19]. Cannabinoids contained in hemp also play a special role. They are responsible for the modulation of hunger/satiety and participate in peripheral metabolic reactions of the liver, fat, muscles, and anti-inflammatory reactions in blood cells [22]. Despite this, they can also cause side effects such as imbalance, hallucinations, nausea, and drowsiness [23].

Hemp can also be used as a source of food because of its health-promoting properties. Hemp seed oil is characterized by high levels of exogenous fatty acids (EFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) [24]. The oil contains linoleic acid and L-linolenic acid, as omega-6 and omega-3 acids, which are optimal for nutrition because of their proportions (3:1, LA:LNA). Hemp seed oil is additionally enriched with gamma-linolenic acid (GLA), which makes the nutritional value ultimately higher than most seed oils. A properly balanced oil prevents excessive accumulation of certain metabolic products and also provides the necessary intermediaries for the body to work efficiently. The benefits of hemp seed oil as a food product and food supplement are that it can enrich the diet of the potential consumer [25].

The leading theme of the research was to define the composition of the volatile profile of hemp flowers and to verify how selected drying methods influence the profile of volatile compounds and the contribution of cannabinoids. For this purpose, we distilled the essential oil from the material under study and then analyzed it using gas chromatography in combination with the mass spectrometry technique (GC–MS).

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Approximately 20 kg of hemp flowers var. Henola were harvested on 15 October 2019 from commercial field in Oborniki Śląskie (16°55' E, 51°18' N) Poland. The whole flowers, after being manually detached from the stem, were mixed and immediately subjected to drying, the distillation processes, as well as subsequent chemical analyses. The initial moisture content of the material was 68%_{wb} (wet basis), assessed by a vacuum dryer SPT-200 ZEAMIL (Horyzont, Krakow, Poland). Plant material was subjected to various drying processes, which were suspended when no changes in weight were observed. The voucher specimen of investigated flowers were deposited in local herbarium at the Department of Chemistry.

2.2. Drying Methods

In the study, three different drying methods were applied: convective drying (CD), vacuum-microwave drying (VMD), and combined drying consisting of convective pre-drying and vacuum-microwave finishing drying (CPD-VMFD). Approximately 60 g of hemp flowers were used in each case, and the process was carried out until the final moisture content of the sample was below 10%_{wb}. This initial loading mass of sample allowed for thin layer drying without of the raw material compacting, which was necessary to meet the requirements for modeling the drying kinetics and to provide a sufficient amount of dry material for quality tests.

2.2.1. Convective Drying (CD)

The CD was conducted on an apparatus located at the Institute of Agricultural Engineering (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland). The hemp flowers were placed in a special container ($d = 100$ mm) and dried in 50 °C, 60 °C, and 70 °C with an airflow of 0.5 ms⁻¹. The preliminary tests revealed that that drying at temperatures below 50 °C takes too long to be applicable in industrial conditions in terms of energy consumption and thus operating costs, while temperatures above 70 °C lead to a drastic degradation of the chemical composition of the dried product. Due to difficulties in low temperature drying of hemp flowers, the temperatures used in this study were slightly elevated compared to the temperatures used for drying of some other herbal products such as thyme [6], sweet basil [8], or marjoram [7].

2.2.2. Vacuum-Microwave Drying (VMD)

The VMD was performed using the SM 200 dryer (Plazmatronika, Wrocław, Poland). The samples were placed in a glass cylindrical drum that rotated at 6 rpm. The dryer was equipped with a BL 30P vacuum pump (Tepro, Koszalin, Poland), MP 211 vacuum manometer (Elvac, Bobolice, Poland), and a 0.15 m³ compensation tank. During the drying process, we used three power levels (240, 360, and 480 W) and pressure in the range of 4–6 kPa. Microwave powers were selected on the basis of the results from previous studies where similar materials were successfully dried in these conditions [6]. The maximum temperature of the dried hemp flowers was measured after removal from the dryer using an i50 infrared camera (Flir Systems AB, Stockholm, Sweden).

2.2.3. Combined Drying Consisting of Convective Pre-Drying Followed by Vacuum-Microwave Finishing Drying (CPD-VMFD)

During combined drying, the samples were initially placed in drying baskets at the convective dryer for 60 min at 60 °C; then, the samples were moved to a vacuum-microwave dryer where finishing of drying at 360 W occurred until its final moisture content was below 10%_{wb}. The time of convective pre-drying was proposed on the basis of preliminary studies, which showed that by that time water was effectively removed from the raw material at a satisfactory drying rate.

2.2.4. Modelling of Drying Kinetics

Drying kinetics of hemp flowers were presented using a moisture ratio MR defined by relationship (1):

$$MR = \frac{M_{(t)} - M_e}{M_0 - M_e} \quad (1)$$

where $M_{(t)}$ is the moisture content of the sample at given time, M_0 is the initial moisture content, and M_e is an equilibrium moisture content that is usually omitted as the values of M_e are relatively small (compared to $M_{(t)}$ and M_0), and therefore the simplified relationship (2) was used in the study without any significant influence on the drying kinetics modeling [26]:

$$MR = \frac{M_{(t)}}{M_0} \quad (2)$$

On the basis of obtained experimental data, we fitted several empirical drying models, including Newton, Midelli et al., logarithmic, two-term, and Page's models, performed using TableCurve 2D software. The results of preliminary tests revealed that only the two-term equation (Equation (3)) can be considered, as it takes into account the best fit determined according to the highest values of R^2 and the lowest values of root mean square error (RMSE).

$$MR = a \cdot e^{-k_1 t} + b \cdot e^{-k_2 t} \quad (3)$$

where k_1 and k_2 , and a and b denote drying constants and model coefficients, respectively.

2.3. Color Analysis

Color of the samples was measured in five repetitions using a Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan). The results were obtained in reference to International Commission on Illumination (CIE) $L^*a^*b^*$ color space, where L^* stands for lightness, a^* values vary between negative (green) and positive (red), and b^* values vary between negative values indicated as blue and positive values indicated as yellow hues. The total change in color of dried material was expressed as ΔE^* according to the following formula:

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

where L_0^* , a_0^* , and b_0^* denote the values of fresh material.

2.4. Distillation of Essential Oil (EO)

In the process of extraction of essential oils (EOs), we used the Deryng apparatus. A suitable quantity of weighed fresh or dried material was transferred to a 250 mL round-bottomed flask. The hemp flowers were poured with 100 mL of distilled water. The flask was placed in a heating mantel and the mixture was brought to boiling point and kept at this temperature for 45 min. When the boiling point was reached, we added 1 mL of cyclohexane to collect the essential oil, which contained 1 mg of 2-undecanone as internal standard (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After the extraction process, organic phase with the essential oil was collected and stored at -18°C until chromatographical analysis.

2.5. GC-MS Analyses

The profile of volatile compounds was analyzed using a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (Shimadzu GCMS QP 2020, Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation was obtained by a capillary column Zebron ZB-5 (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The GC-MS analysis was carried out according to the following parameters: scanning in the range from 35 to 320 m/z in electron ionization mode at 70 eV, in the option of 3 scans s^{-1} . Analyses were performed

using helium as a carrier gas at a flow rate of 1.11 mL min^{-1} in a split ratio of 1:20. The GC oven temperature was programmed from $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ as initial temperature to $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $2 \text{ }^{\circ}\text{C/min}$, then to $270 \text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and kept for 5 min.

Identification of compounds were based on 3 independent methods: (a) comparison of obtained spectra with databases NIST 17 (National Institute of Standards and Technology) [27] and FFNSC (Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds) [28], (b) comparison of calculated retention indices (RI) using a retention indices calculator [29] with values presented in NIST 17 and FFNSC, and (c) comparison of retention times of unknown compounds with authentic standards. For comparison of mass spectra, we used the AMDIS (v. 2.73) and GCMS solution (v. 4.20) programs. Additionally, all experimental RI were compared with those published in Adams [30].

2.6. Sensory Evaluation

The intensity of the main sensory attributes of dried hemp flowers were evaluated by a trained sensory panel. The panel consisted of 7 panelists (4 males and 3 females), aged between 34 and 53 years old. Panelists belonged to the research group "Food Quality and Safety" of the Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) and had over 1000 h of evaluation experience. The panel was selected and trained following the International Organization for Standardization ISO standard 8586-1 (1993), and it is specialized in descriptive sensory evaluation of fruits and vegetables and has a wide expertise in studying the effects of drying on different matrixes, such herbs, fruits, vegetables, and mushrooms [31].

Descriptive sensory analysis (DSA) was used to describe the dried hemp flowers. During 1 orientation session of 90 min, panelists discussed about the main odor (perception of volatile compounds with the product outside the mouth) and agreed on their use of key attributes/descriptors. Panelists agreed that the sensory profile of these dried samples could be described using 11 attributes: (i) fresh material: hemp flower ID, fresh vegetables, citrus, balsamic, spicy, and anise odor; and (ii) dried material: cooked, hay-woody, camomile, earthy, and burnt. Reference products of these attributes, with intensity similar to those of the samples under evaluation were prepared and provided to the panel.

The evaluation was performed in normalized individual booths with controlled illumination and temperature, $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples coded with 3-digit random numbers were randomly presented to each panelist in odor-free plastic beakers of 100 mL with lids; samples were left for 15 min at room temperature prior to analysis. The 9 samples under analyses were analyzed in 3 sessions in which 3 samples per session were randomly presented to the panel; this design was selected to avoid sensory fatigue. The intensity of the sensory attributes was scored using a scale from 0 to 10, where 0 = none or not perceptible intensity and 10 = extremely high intensity.

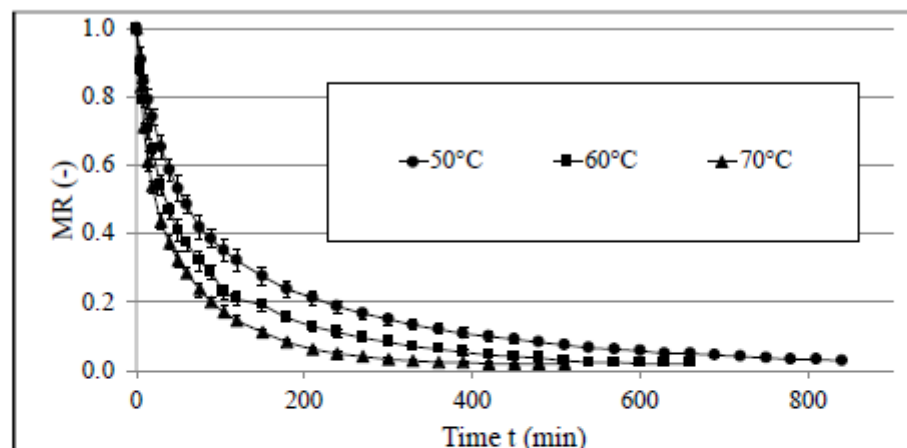
2.7. Statistical Analysis

All analyses were performed using the STATISTICA 13.3 software (StatSoft, Krakow, Poland). Data are expressed as means values \pm standard deviation. Before analyses, all data were screened for normality using the Shapiro–Wilk test. The results from drying kinetics were subjected to the analysis of variance using Tukey's test ($p < 0.05$) and the results from analyses of essential oils were subjected to the analysis of variance using Duncan's test ($p < 0.05$). The data from the sensory analysis were also subjected to the Honest Significance Difference (HSD) Tukey's test ($p < 0.05$).

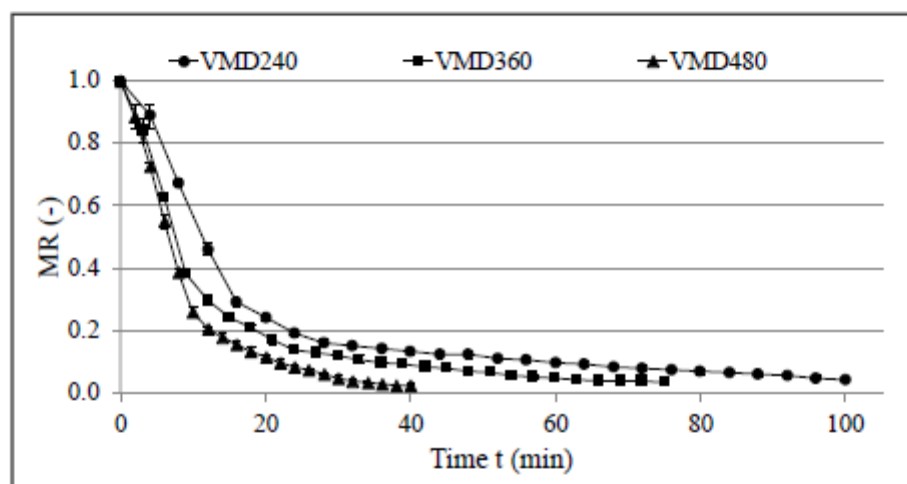
3. Results and Discussion

3.1. Drying Methods

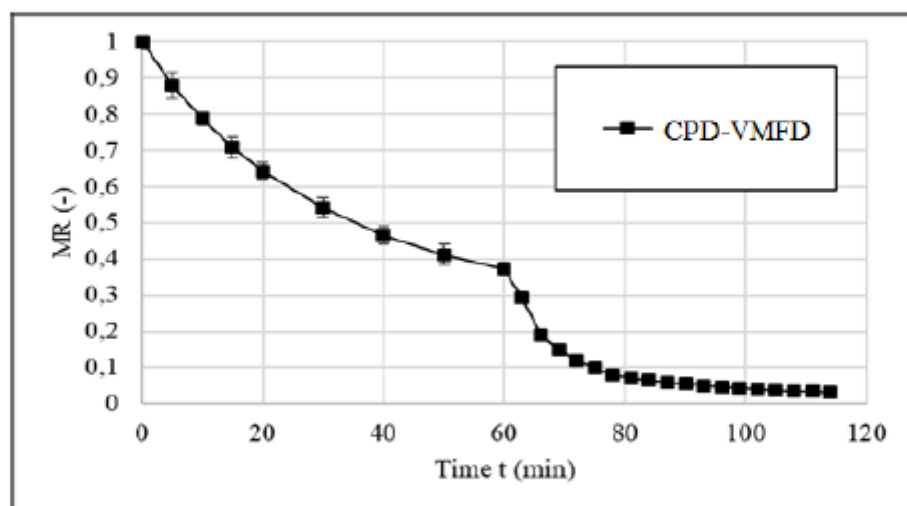
Figure 1 shows the drying kinetics of hemp flowers treated by convective drying (CD) (a), vacuum–microwave drying (VMD) (b), and combined drying (CPD-VMFD) (c), whereas Table 1 presents model constants with drying times and maximum temperature during drying using different methods.



(a)



(b)



(c)

Figure 1. Drying kinetics of hemp flowers treated by convective drying (CD) at 50, 60, and 70 °C (a); vacuum-microwave drying (VMD) at 240, 360, and 480 W (b); and combined drying consisting of convective pre-drying (CPD) at 60 °C for 1 h and following vacuum-microwave finishing drying (VMFD) at 360 W (c).

Table 1. Model parameters (a , k_1 , b , k_2); maximum temperature of the hemp flowers during drying (T_{Max}); and drying times t_{CD} and t_{VMD} of CD and VMD, respectively.

Drying Methods	Parameters				Statistics		Drying Time (min)		T_{Max} (°C)
	a	k_1 , (min^{-1})	b	k_2 , (min^{-1})	RMSE	R^2	t_{CD}	t_{VMD}	
CD50	0.54412	0.02469	0.44193	0.00350	0.00537	0.9997	840	-	50
CD60	0.58617	0.03623	0.40373	0.00521	0.00692	0.9995	660	-	60
CD70	0.53544	0.06093	0.46011	0.00912	0.00810	0.9993	510	-	70
VMD240	0.95054	0.08296	0.11951	0.00742	0.03445	0.9827	-	112	59
VMD360	0.91787	0.11572	0.12779	0.01484	0.02596	0.9903	-	78	54
VMD480	1.04449	0.12333	0.01818	0.00014	0.03465	0.9883	-	40	61
CPD-VMFD	0.29965	0.12680	0.06519	0.01216	0.00785	0.9938	60	54	55

The two-term model was used to describe the drying kinetics of hemp flowers. The good fit of this model was confirmed by high values of coefficient of determination ($R^2 > 0.98$ for all the drying methods) and low values of RMSE (Table 1). The model was previously successfully used in studies on pomegranate rind and arils [32] and ginger slices [33]. This was due to the model structure that specifically describes two stages of drying, with coefficient a referring to the breadth of the first stage of drying where intensive evaporation occurs, illustrated by high values of drying constant k_1 , and the second stage (coefficient b), with decreasing drying rate characterized by low values of drying constant k_2 . On the other hand, $1/k_1$ and $1/k_2$ are time constants that express the time required for 37% decrease of a and b values, respectively [34]. Therefore, it can be stated that the higher the value of the drying constant k_1 or k_2 , the lower the value of the time constant $1/k_1$ or $1/k_2$ and thus the shorter the time of the relevant stage of drying.

It is worth mentioning that during the first stage of drying, the mass transfer mainly consists of water evaporation from the surface of the material at a high drying rate assured by sufficient water diffusion at a relatively high external moisture content, whereas during the second stage of drying, the mass transfer occurs at a lower drying rate limited by internal water diffusion hindered by decreasing moisture content [5]. The drying kinetics of CD might be affected to some extent by shrinkage of the dried material manifested by curling of the whole flower at the end of the first stage of drying, leading to a decrease of surface evaporation and thus hindering the mass transfer, which results in the reduction of drying rate. It can be seen that the change of temperature of hot air during convective drying (from 50 to 70 °C) results in an increase of drying rate followed by higher values of k_1 and k_2 constants (increase from $k_1 = 0.02469 \text{ min}^{-1}$ in case of CD50 to $k_1 = 0.06093 \text{ min}^{-1}$ in the case of CD70 during first stage of drying). Similar behavior was previously reported in studies on orange slices [35] and red pepper [36].

As for VMD, it should be noted that values of coefficient a were very high (over 0.9), which means that most of the drying occurred in the first stage, while coefficient b was over nine times lower than coefficient a , which marks shorter period of the second stage of drying. Moreover, with higher microwave power, k_1 constant increased, which shows that the drying rate was greatly influenced by the power of magnetrons in the first stage of drying. However, in the second stage of drying, the drying rate decreased with an increase of microwave power. It was due to the extended first phase of the process (defined by coefficient a) with high k_1 values that mostly contributed to the water evaporation and reduction of moisture content and thus moisture ratio (MR). Still, the second stage greatly affected the drying kinetics and the time of the process, even though it had little impact on MR values, which decreased at low rate. The course of drying curves showed that application of 480 W instead of 360 W did not contribute to an increase of the drying rate at the initial phase of drying, which was confirmed by similar values of k_1 amounting to 0.1157 and 0.1233, respectively. This means that from a practical point of view, starting with a microwave power higher than 360 W is not reasonable during VMD of hemp flowers. However, the elevation of microwave power from 360 to 480 W is reasonable after the initial phase of VMD lasting around 8 min (Figure 1b). It can be presumed that during the initial phase of VMD at high microwave power, the water removal rate was

restricted by the increased resistance of mass transfer caused by the thickening of the water molecules in the outer layer of the material as a result of a transport mechanism of the Darcy type [37] that had too much intense pressure at the limited possibility of water evaporation from the surface of the dried material. From this perspective, shrinkage of the dried material described above additionally hindered water evaporation from the decreased surface area and promoted the thickening of the water molecules in the outer layer of the material.

In case of CPD-VMFD, convective pre-drying can be easily described by the model parameters fitted and adjusted for CD at 60 °C; thus, only vacuum-microwave finishing drying is provided in Table 1. During combined drying, the most intensive evaporation occurred throughout the pre-drying period, and therefore the joint contribution of finishing drying (defined as the sum of a and b coefficients) was quite low. However, the drying constant k_1 reached the highest value (0.12680 min^{-1}) among all applied drying methods, which was almost 10% more than in the case of the sole use of VMD360, while k_2 was also very high and was only lower than in the case of VMD360. The relatively high values of k_1 and k_2 may be somewhat surprising, taking into account the fact that VMFD started when the surface of plant material had been already reduced due to the shrinkage formed during CPD. This can be explained by the recovery of the water molecule distribution within the entire volume of the pre-dried material during the time necessary to reload the sample.

Obtained data show that an increase of drying temperature resulted in shorter drying times during CD. An increase by 20 °C (from 50 to 70 °C) resulted in 39% time reduction (from 840 to 510 min), which is consistent with previous studies on true lavender leaves [38], carrot slices [39], and cornelian cherry fruit [40]. Moreover, VMD was much shorter than CD. This was due to the volumetric heating occurring during VMD that sped up the process by increasing the temperature inside of the sample [41,42]. As a result, samples treated by VMD at 480 W were dried 21 times faster when compared to CD at 50 °C. Furthermore, the power of magnetrons during VMD influenced water removal and resulted in shorter processing times when higher powers were applied [43]; namely, an increase from 240 W to 480 W decreased the time of drying by 72 min (reduction from 112 to 40 min for VMD at 240 W and VMD at 480 W, respectively).

On the other hand, combined methods (CPD-VMFD) resulted in a much shorter time of drying compared to CD, yet were still longer than VMD, which is consistent with previous studies on pomegranate arils [32] and quinces [44]. This method proved to be beneficial in other studies, i.e., on sweet basil [8] and thyme [6], where high quality products were obtained in a significantly shorter time period (compared to CD).

It is worth noting that the duration of VMD did not depend on the maximal temperature (T_{Max}) of the samples treated by microwaves. Usually the maximal temperature is achieved by VMD samples at the end of drying when the heat energy generated by water dipoles in the microwave field are in excess the energy necessary for water evaporation [45]. In the case of VMD of hemp flowers, the highest values of T_{Max} , amounting to 61 and 59 °C, were obtained at 480 and 240 W, respectively. The relatively high value of T_{Max} for samples dried at 240 W can be explained by the longer exposition to microwave radiation and thus the accumulation of the heat energy delivered at low microwave power [9]. The lowest values of T_{Max} , amounting to 61 and 59 °C, were found for VMD360 and CPD-VMFD, respectively. During both the drying protocols, the same microwave power of 360 W was applied, which suggests that the mean value of microwave wattage maintained the thermal energy balance at the lowest temperature of VMD material. Generally, the temperature of VMD herbal products is relatively low due to their specific morphological structure, preventing the excessive increase of inner pressure caused by microwave heating [6].

It can be seen that all the applied drying protocols differed in terms of the form of heat energy delivery, duration, and dried material temperature. Therefore, it is crucial to evaluate these drying protocols also in terms of their impact on the color, chemical composition, and sensory attributes of hemp flowers.

3.2. Color Analysis

Color of the samples is presented in the Table 2. The drying process increased lightness, yellowness, and greenness of the samples, which was confirmed by higher values of parameters L^* and b^* and lower values of a^* parameter. The lightest samples (highest L^* values) with yellowest hues (one of the lowest values of a^* parameter) were obtained after being subjected to VMD at 480 W. On the other hand, samples of VMD at 240 W were significantly darker (lowest L^*) than the samples obtained by other drying methods. Moreover, VMD at 360 W resulted in the greenest samples (highest values of a^*) and lowest values of b^* parameter, which had yellow hues. Generally, an increase of temperature during CD resulted in the obtaining of darker samples with a higher share of green and yellow hues, despite a slight decrease in a^* and b^* values. Although a similar effect on greenness and yellowness was observed when increasing the microwave power during VMD, these color alterations were associated with lightening of the samples. It is worth noting that the values of the color parameters determined for CPD-VMFD samples were between the relevant values obtained for samples dried by CD at 60 °C and VMD at 360 W. The significance of the color changes can be estimated by the values of total color change ΔE^* . According to Sumic et al. [46], if ΔE^* is less than 1.0, it is assumed that the difference in color would not be perceptible by the human eye. The total color change of the dried samples was much higher than 1.0 for all cases. However, the lowest change of 19.2 was stated for the VMD240 sample, whereas the highest change of 24.20 was found for the VMD480 sample. This indicates that microwave power during VMD had a higher impact on the color change of the dried material than hot air temperature during CD.

Table 2. Color parameters of hemp flowers subjected to drying using different methods.

Drying Method	Color			
	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
Fresh	20.61 ± 5.37	−1.98 ± 0.61	8.41 ± 2.87	-
CD50	42.48 ± 1.59 ^{a,b,1}	−4.49 ± 0.83 ^{a,b}	12.06 ± 1.01 ^{a,b}	22.31
CD60	41.88 ± 0.7 ^{a,c}	−4.99 ± 0.6 ^a	10.77 ± 0.4 ^{a,c}	21.61
CD70	41.72 ± 1.26 ^{a,c}	−4.82 ± 0.25 ^a	11.25 ± 0.72 ^{a,b}	21.49
VMD240	39.78 ± 0.43 ^c	−3.57 ± 0.66 ^b	9.6 ± 0.34 ^c	19.27
VMD360	43.56 ± 1.28 ^{a,b}	−3.5 ± 0.62 ^b	11.34 ± 0.61 ^{a,b}	23.19
VMD480	44.27 ± 0.93 ^b	−4.83 ± 0.37 ^a	12.62 ± 0.57 ^b	24.20
CPD-VMFD	42.09 ± 1.09 ^{a,b}	−4.59 ± 0.52 ^{a,b}	10.99 ± 1.14 ^{a,c}	21.79

¹ Mean values followed by the same letter were not significantly different ($p < 0.05$) according to the HSD Tukey's least significance difference test.

3.3. Volatile Constituents of Fresh *Cannabis sativa* Flowers

Analysis of GC–MS of the distilled essential oils from the hemp flower revealed 93 peaks, which were considered to be volatile substances (chromatograms from the GC–MS analysis of volatile compounds content of hemp flowers are available in supplementary data; Figures S1 and S2). These compounds are collected in Table 3. Of all the volatile components identified in the tested samples of hemp flowers, we could distinguish the following main substances: β -myrcene (26.66%), β -(*E*)-caryophyllene (17.50%), limonene (10.45%), α -humulene (7.26%), caryophyllene oxide (3.79%), β -pinene (2.51%), terpinolene (2.50%), and α -pinene (2.16%). In smaller quantities, (*E,E*)- α -farnesene (1.80%), α -selinene (1.65%), β -chamigrene (1.41%), humulene epoxide II (1.25%), pseudowiddrene (1.24%), and β -trans-ocimene (1.12%) were identified. The substances above have a considerable influence on the fragrance quality of the hemp flowers.

In previous studies, similar results were found, where the identified compounds were as follows: β -(*E*)-caryophyllene (23.8%), α -pinene (16.4%), and β -myrcene (14.2%). The remaining compounds worth showing had the following percentages: terpinolene (9.6%), α -humulene (8.3%), β -pinene (5.2%), β -(*E*)-ocimene (5.1%), and β -(*E*)-farnesene (3.0%) [47]. Benelli in other studies also showed a

similar profile of volatile components to those mentioned above, where β -(E)-caryophyllene (21.4%), β -myrcene (11.3%), α -pinene (7.8%), terpinolene (7.6%), α -humulene (7.1%), β -(E)-ocimene (3.9%), and β -pinene (2.9%) were identified as the most representative compounds [48].

Considering the analysis of the obtained fractions, we observed a similarity with the paper published by Nissen. Depending on the cannabis cultivar, the following substances can be distinguished, β -myrcene (12.46–29.22%), α -pinene (10.9–16.99%), β -(E)-caryophyllene (10.56–13.90%), β -pinene (6.38–9.33%), α -humulene (4.84–6.71%), terpinolene (3.42–10.73%), limonene (3.11–4.99%), and β -(E)-ocimene (2.03–9.34%) as those occurring in the highest amount [17]. Mediavilla and Steinemann also studied the profile of volatile compounds on different cannabis strains. The main compounds isolated were β -myrcene (29.4–65.8%), β -(E)-caryophyllene (3.8–37.5%), α -pinene (2.3–31.0%), terpinolene (0.4–23.8%), β -(E)-ocimene (0.3–10.2%), α -humulene (0.7–7.9%), β -pinene (0.6–7.8%), and limonene (0.2–6.9%) [49]. Iseppi et al. reported β -myrcene (4.5–39.2%), β -(E)-caryophyllene (8.5–29.8%), β -pinene (4.8–25.4%), terpinolene (1.9–9.6%), α -pinene (3.4–8.2%), β -(E)-ocimene (2.2–7.1%), α -humulene (2.2–6.6%), and limonene (0.1–5.7%) as the main volatile components of hemp flower essential oils. These discrepancies may result from the use of different cultivars for research and from the condition of raw material [50].

Table 3. Complete volatile constituents of fresh *Cannabis sativa* flowers.

Compound	RT (min)	Retention Indices (RI)				Content (%) ⁵
		RI _{lit} ¹	RI _{lit} ²	RI _{lit} ³	RI _{exp} ⁴	
Octane	4.585	800	800	800	800	0.08 ± 0.01
(2E)-2-Hexenal	6.130	855	851	850	855	tr ⁶
(3Z)-3-Hexen-1-ol	6.240	859	857	853	857	0.06 ± 0.02
1-Hexanol	6.705	870	868	867	869	tr
2-Heptanone	7.485	892	891	892	890	0.05 ± 0.01
Heptanal	7.900	902	901	906	900	0.51 ± 0.12
(2E,4E)-2,4-Hexadienal	8.395	909	911	914	909	tr
Artemisia triene	8.620	929	929	922	926	0.50 ± 0.21
α -Thujene	9.035	930	929	927	928	0.06 ± 0.08
α -Pinene	9.310	939	937	933	932	2.16 ± 0.82
Fenchene	9.985	952	952	948	953	0.25 ± 0.05
Benzaldehyde	10.585	960	962	960	960	tr
(2E)-2-Hepten-1-ol	11.025	965	978	964	970	tr
Sabinene	11.290	975	974	972	976	tr
β -Pinene	11.400	979	979	978	976	2.51 ± 0.32
trans-Isolimonene	11.815	984	983	984	983	tr
6-Methyl-5-hepten-2-one	12.115	985	985	986	987	tr
β -Myrcene	12.455	990	991	991	994	26.66 ± 1.79
α -Phellandrene	12.970	1002	1005	1007	1004	0.13 ± 0.06
3-Carene	13.280	1011	1011	1009	1007	0.12 ± 0.09
α -Terpinene	13.665	1017	1017	1018	1017	0.12 ± 0.03
<i>o</i> -Cymene	13.910	1026	1022	1024	1021	tr
<i>p</i> -Cymene	14.115	1024	1030	1025	1025	tr
Limonene	14.415	1029	1030	1030	1030	10.45 ± 1.21
Sylvestrene	14.745	1030	1027	1031	1035	tr
β -cis-Ocimene	15.055	1037	1038	1035	1041	0.09 ± 0.03
β -trans-Ocimene	15.660	1050	1049	1046	1051	1.12 ± 0.14
Prenyl isobutyrate	15.930	1052	1052	1050	1052	tr
Oct-(3Z)-enol	16.025	1054	1059	1059	1054	tr
γ -Terpinene	16.205	1059	1060	1058	1062	0.14 ± 0.07
cis-Sabinene hydrate	16.695	1070	1070	1069	1071	0.14 ± 0.09
2-trans-Octenol	17.285	1074	1072	1073	1075	0.05 ± 0.01
Terpinolene	18.030	1088	1088	1086	1087	2.50 ± 0.43
6,7-Epoxy-myrcene	18.445	1092	1090	1096	1091	0.06 ± 0.02
trans-Sabinene hydrate	18.650	1094	1093	1099	1096	tr
Linalool	18.895	1096	1099	1101	1099	0.09 ± 0.11
Nonanal	19.150	1100	1104	1107	1105	0.32 ± 0.14
Fenchol	19.565	1116	1113	1119	1116	0.82 ± 0.03
trans-Pinene hydrate	20.025	1122	1120	1121	1118	0.82 ± 0.21
cis-Pinene hydrate	21.340	1143	1143	1144	1139	0.11 ± 0.07
β -Terpineol	21.720	1144	1144	1149	1145	0.06 ± 0.01
Ipsdienol	21.875	1145	1147	1146	1147	0.1 ± 0.02
Myrcenone	22.000	1149	1145	1149	1150	0.09 ± 0.10

Table 3. Cont.

Compound	RT (min)	Retention Indices (RI)				Content (%) ⁵
		RI _{lit} ¹	RI _{lit} ²	RI _{lit} ³	RI _{exp} ⁴	
α -Pinene oxide	22.635	1159	1157	1156	1158	0.09 ± 0.05
3-Thujanol	23.005	1168	1167	1169	1165	0.09 ± 0.03
Terpinen-4-ol	23.740	1177	1177	1177	1177	0.12 ± 0.09
Isogeraniol	23.880	1180	1182	1179	1177	tr
α -Terpineol	24.670	1188	1189	1195	1189	0.43 ± 0.12
Hexyl butanoate	25.035	1192	1192	1195	1194	0.14 ± 0.07
<i>trans</i> -4-Caranone	25.530	1196	1197	1200	1196	tr
Bornyl acetate	30.975	1285	1285	1285	1282	tr
α -Cubebene	35.095	1351	1351	1349	1345	tr
α -Ylangene	36.410	1375	1372	1371	1368	0.12 ± 0.01
α -Copaene	36.700	1376	1376	1375	1373	tr
Hexyl hexanoate	37.405	1383	1384	1387	1383	tr
7- <i>epi</i> -Sesquithujene	37.705	1391	1402	1389	1387	0.07 ± 0.03
Isocaryophyllene	38.610	1408	1406	1405	1402	0.54 ± 0.12
α -Gurjunene	38.800	1409	1409	1406	1404	tr
β -(<i>E</i>)-Caryophyllene	39.480	1419	1419	1424	1415	17.50 ± 1.75
β -Duprezianene	39.735	1422	1422	1427	1420	0.09 ± 0.03
α - <i>trans</i> -Bergamotene	40.560	1434	1435	1432	1435	0.17 ± 0.09
β -Humulene	40.660	1438	1440	1440	1435	0.11 ± 0.05
Guaia-6,9-diene	40.925	1444	1443	1444	1440	0.17 ± 0.11
α -Humulene	41.485	1454	1454	1454	1453	7.26 ± 1.48
Khusimene	41.650	1455	1451	1451	1455	0.21 ± 0.14
β -(<i>E</i>)-Farnesene	41.870	1456	1457	1452	1457	0.33 ± 0.21
9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-Caryophyllene	41.985	1464	1466	1464	1459	0.39 ± 0.18
Dodec-(2 <i>E</i>)-enal	42.380	1466	1468	1469	1464	0.15 ± 0.08
γ -Gurjunene	42.865	1474	1475	1476	1473	0.10 ± 0.01
β -Chamigrene	43.290	1477	1476	1479	1479	1.41 ± 0.56
γ -Selinene	43.425	1479	1479	1480	1481	0.62 ± 0.19
α -Selinene	43.990	1496	1494	1495	1490	1.65 ± 0.77
α -Zingiberene	44.330	1498	1495	1496	1495	0.31 ± 0.16
δ -Amorphene	44.785	1504	1505	1506	1499	0.38 ± 0.09
(<i>E,E</i>)- α -Farnesene	45.100	1505	1508	1504	1509	1.80 ± 0.64
Pseudowiddrene	45.385	1509	1510	1510	1512	1.24 ± 0.57
δ -Cadinene	45.755	1523	1524	1518	1514	0.21 ± 0.03
γ -Cuprenene	46.320	1533	1532	1530	1532	0.56 ± 0.12
Selina-4(15),7(11)-diene	46.575	1546	1542	1540	1533	2.13 ± 0.86
α -Cadinene	46.705	1538	1538	1538	1538	0.82 ± 0.31
(<i>E</i>)- α -Bisabolene	47.025	-	1512	1540	1538	0.28 ± 0.16
<i>cis</i> -Muurool-5-en-4- β -ol	47.300	1551	1549	1548	1548	0.07 ± 0.03
Germacrene B	47.555	1561	1557	1557	1551	0.16 ± 0.05
Lippifoli-1(6)-en-5-one	47.995	1552	1553	1551	1557	0.69 ± 0.32
<i>epi</i> -Longipinanol	48.310	1563	1566	1558	1564	0.44 ± 0.11
Caryophyllene oxide	49.055	1583	1581	1581	1576	3.79 ± 0.44
Humulene epoxide I	49.965	-	1604	1604	1590	0.18 ± 0.05
Humulene epoxide II	50.540	1608	1606	1613	1607	1.25 ± 0.14
1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	51.115	1619	1615	1614	1612	0.62 ± 0.23
<i>epi</i> - γ -Eudesmol	51.455	1623	1622	1624	1623	0.64 ± 0.45
α -Acorenol	51.935	1633	1631	1632	1633	0.14 ± 0.04
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	52.350	1640	1637	1642	1646	0.80 ± 0.23
α -Bisabolol	54.140	1685	1684	1688	1686	0.44 ± 0.13

Retention indices according to ¹ Adams [30], ² NIST 17 database [27], ³ FFNSC [28]; ⁴ % calculated from TIC data; ⁵ experimental retention indices calculated against n-alkanes; 6 tr < 0.05%.

3.4. Effects of Different Drying Methods on the Volatile Compound Content in *Cannabis sativa*

In the conducted studies of the biological material consisting of fresh hemp flowers, we found that the content of essential oil was 0.21 g/100 g⁻¹ of dry weight (DW). Considering the yield of essential oils in cannabis flowers, we can conclude that it was high, as 0.1–0.25% [17] and 0.25% [51] of essential oils were reported in previous studies. Furthermore, Liang et al. [52] and Chalchat and Özcan [53] reported the yield of essential oils in the inflorescences of sage and basil as 0.2% and 0.5%, respectively. A comparison of changes in the content of 11 main volatile components in hemp with reference to different drying methods is shown in Table 4. As far as the total content of essential oils is concerned, it is not analogous to the 11 main compounds, as they represent 77.88% of the total.

Table 4. Comparison of changes in volatile composition of fresh and dried hemp flowers.

Compound	Drying Method							
	Fresh ¹	CD 50 °C	CD 60 °C	CD 70 °C	VMD 240 W	VMD 360 W	VMD 480 W	CPD-VMFD
	Content (%)							
α -Pinene	2.16 ^{a,3}	10.79 ^g	7.16 ^e	8.27 ^e	3.67 ^b	5.86 ^d	9.58 ^f	11.13 ^g
β -Pinene	2.51 ^a	4.47 ^a	3.49 ^c	4.43 ^d	2.17 ^a	2.89 ^b	4.96 ^e	5.12 ^e
β -Myrcene	26.66 ^a	9.95 ^f	10.34 ^e	19.27 ^b	10.78 ^e	7.54 ^g	13.03 ^d	16.88 ^c
Limonene	10.45 ^a	2.17 ^e	2.16 ^e	4.13 ^b	3.55 ^c	1.58 ^g	2.02 ^f	2.77 ^d
β -trans-Ocimene	1.12 ^a	0.80 ^d	0.62 ^e	0.99 ^b	0.50 ^f	0.78 ^d	0.68 ^e	0.92 ^c
Terpinolene	2.50 ^a	0.97 ^e	1.60 ^b	1.66 ^b	0.69 ^f	0.29 ^g	1.25 ^c	1.29 ^c
β -(E)-Caryophyllene	17.50 ^a	25.35 ^e	23.41 ^c	17.91 ^a	24.26 ^d	22.62 ^b	16.92 ^a	24.24 ^d
α -Humulene	7.26 ^a	11.51 ^e	9.62 ^c	7.22 ^a	9.23 ^c	8.90 ^b	8.41 ^b	10.32 ^d
(E,E)- α -Farnesene	1.80 ^a	1.82 ^a	0.58 ^e	1.05 ^d	1.14 ^c	1.44 ^b	1.48 ^b	1.03 ^d
Selina-4(15),7(11)-diene	2.13 ^a	1.21 ^f	1.20 ^f	1.35 ^c	1.96 ^b	1.43 ^d	1.52 ^c	1.47 ^d
Caryophyllene oxide	3.79 ^a	4.96 ^b	7.82 ^c	10.71 ^c	11.04 ^e	8.65 ^d	12.16 ^f	5.84 ^b
EO yield ²	0.21 ^a	0.16 ^c	0.14 ^d	0.12 ^e	0.18 ^b	0.15 ^d	0.15 ^d	0.11 ^e
% recovery of EO	100	76.19	66.67	57.14	85.71	71.42	71.42	52.38

¹ Dry mass calculated; ² mL/100 g⁻¹ according to distillation on Deryng apparatus; ³ values followed by the same letter within a row are not significantly different ($p > 0.05$, Duncan's test).

By analyzing the content of essential oils in relation to different drying processes, we observed that each of them had an impact on its final yield. VMD at 240 W (0.18 g/100 g⁻¹) turned out to be the most effective drying method, followed by CD at 50 °C (0.16 g/100 g⁻¹), while VMD at 360 W and VMD at 480 were the next methods with the same oil yield (0.15 g/100 g⁻¹). The least effective method was CPD-VMFD, with an essential oil yield of only 0.11 g/100 g. The above data are also presented as percentage oil recovery, which is included in Table 3. Other works describing the drying of marjoram [7] and thyme [6] also prove that the VMD at 240 W is the best solution to stop volatile compounds. Vacuum-microwave drying has also proven to be the most effective method for oregano drying [9]. However, this is in contradiction with the paper by Łyczko's et al. [54] that described the drying of lavender flowers, where this method was proven to be the least effective. However, the separate systematics of hemp and lavender flowers must be taken into consideration.

In addition, the study also showed the relationship between the intensity of the treatment and the losses that occur. It was observed that with increasing intensity of drying conditions, the level of losses of volatile compounds in CD increased in comparison to VMD. In CD, the loss of volatile compounds was recorded from 0.16 to 0.12 (decrease by 19.01%), with an increase in drying temperature from 50 °C to 70 °C, and with an increase in power from 240 W to 480 W in VMD, the concentration decreased from 0.18 to 0.15 (decrease by 14.29%). Sanchez et al. [8] in research on sweet basil also reported this dependence. As far as the CPD-VMFD method is concerned, the losses of volatile compounds compared to other drying methods were highest, as a 48% decrease in the volatile compounds in essential oil was observed. Consequently, this method is not a recommended drying method because it does not improve the aroma quality of dried hemp flowers. A similar situation was documented during research into drying shiitake mushrooms [55], where the combined drying method proved to be the least effective. This shows that VMD is a better method for drying cannabis flowers if the aim is to preserve as much essential oil as possible.

It is also worth noting the individual compounds of the 11 main ingredients. For example, to preserve the main fragrance compounds in the cannabis flower such as β -myrcene and β -(E)-caryophyllene, CD at 70 °C (for β -myrcene) and CD at 50 °C (for β -(E)-caryophyllene) proved to be the best drying methods.

It is also important to note the increase of α -pinene from 2.16% to 11.13% (CPD-VMFD) and caryophyllene oxide from 3.79% to 12.16% (VMD at 480 W), as well as the decrease of β -myrcene from 26.66% to 7.54% (VMD at 240 W). The direction of percentage changes of individual compounds resulted from their different susceptibility to the thermal degradation as an effect to an irreversible oxidation process and volatilization enhanced by water evaporation, leading to a decrease of the dry matter content. This shows that all drying protocols had a considerable impact on the final ratio of the

mass of individual components with different retention ability to the reduced mass of the dry matter in the hemp flower.

3.5. Sensory Value of Cannabis sativa Flowers According to Various Drying Methods

Only odor descriptors (perception of volatile compounds with the product outside the mouth) were evaluated, and the protocol followed was similar to that described previously to other dried herbs [7] and mushrooms [31]. Six descriptors related to fresh plant material (hemp ID: aromatics associated with fresh hemp flowers, and fresh vegetables: aromatics associated with fresh but non-identified vegetables) were assayed together with five that were mostly related to the drying process (e.g., hay-woody and burnt). The nine samples of hemp dried flowers were analyzed in three sessions in which three samples per session were randomly presented to the panel. The results presented in Table 5 clearly showed that the sample that kept most of the intensity of the fresh material was that obtained using VMD at 240 W, followed by that prepared using the combined method at 50 °C.

Table 5. Sensory profile of dried hemp flowers.

Aroma Description	Drying Method						
	CD 50 °C	CD 60 °C	CD 70 °C	VMD 240 W	VMD 360 W	VMD 480 W	CPD-VMFD
Hemp ID	3.0 ^{c†}	2.0 ^{c,d}	1.0 ^d	7.0 ^a	2.0 ^{c,d}	2.5 ^{c,d}	3.0 ^c
Fresh vegetable	4.5 ^c	3.5 ^c	1.0 ^{d,e}	7.5 ^a	2.0 ^d	4.0 ^c	3.5 ^c
Citrus	3.5 ^{b,c}	2.0 ^d	1.0 ^e	5.5 ^a	2.0 ^d	3.0 ^c	2.5 ^{c,d}
Balsamic (rosemary)	2.5 ^c	2.0 ^{c,d}	1.5 ^{d,e}	5.5 ^a	1.5 ^{d,e}	2.5 ^c	2.0 ^{c,d}
Spicy (black pepper)	2.0 ^{b,c}	1.5 ^{c,d}	1.0 ^d	3.5 ^a	1.5 ^{c,d}	1.5 ^c	1.5 ^{c,d}
Anise	2.5 ^b	2.5 ^b	1.5 ^c	4.5 ^a	1.5 ^c	2.0 ^{b,c}	1.0 ^{c,d}
Cooked	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0.5 ^b
Hay-woody	1.0 ^c	2.5 ^b	2.5 ^b	1.0 ^c	3.0 ^b	2.0 ^{b,c}	2.0 ^{b,c}
Camomile	1.0 ^c	2.5 ^{a,b}	2.5 ^{a,b}	1.0 ^c	2.5 ^{a,b}	2.0 ^b	2.0 ^b
Earthy	0	0	0	0	0	0	0
Burnt	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b

[†] Mean values followed by the same letter within the same row were not significantly different ($p > 0.05$) according to the HSD Tukey's least significance difference test.

In general, with the increasing strength of the drying process, i.e., the temperature in the CD and the power in the VMD, the sensory quality of the dried samples deteriorates due to significant losses of key odor compounds related to the fresh plant material. The sensory results agreed with previously discussed trends for the total content of volatile compounds.

4. Conclusions

The results of the study revealed that the drying kinetics of hemp flowers treated by convective drying (CD), vacuum-microwave drying (VMD), and combined drying composed of convective pre-drying followed by vacuum-microwave finish drying (CPD-VMFD) can be satisfactorily described using a two-term empirical model. During the drying process, we found losses in 93 analyzed volatiles from 48% for CPD-VMFD to 15% for VMD at 240 W, which was finally chosen as optimal for retention of aroma-active compounds. In that variant, a significant decrease of β -myrcene was observed. Taking drying time into consideration, the shortest dehydration operation was VMD at 480 W (40 min) in contrast to CD at 50 °C (840 min), although the losses of compounds were around 30%. From a sensory point of view, the best drying treatment was VMD at 240 W, because it produced dried samples most resembling the fresh material, with high intensities of key sensory descriptors such as hemp flower ID, fresh vegetables, citrus, balsamic, and anise. Unfortunately, that process produced the most changes in flower color. Although combined drying (CPD-VMFD) could be advantageous from a practical point of view, too much degradation of the chemical composition identified in the raw material prevents this method to be applied to a greater extent. Taking into account the influence of individual drying conditions on the drying time and quality parameters of the dried product, VMD at 240 W can be recommended by the industry as the best option for hemp flower drying.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2304-8158/9/8/1118/s1>, the Supplementary Materials contain chromatograms from the GC–MS analysis of volatile compounds content of hemp flowers, Figure S1: Fresh hemp flower—GC-MS volatile profile analysis; Figure S2: Dried hemp flower at 240W—GC-MS volatile profile analysis.

Author Contributions: Conceptualization, A.K., N.P., and A.S.; methodology, A.K., N.P., K.M., A.F., A.S., and A.A.C.-B.; validation, A.K., N.P., K.M., A.F., A.Z., R.K., K.W., A.S., H.R., and A.A.C.-B.; formal analysis, A.K., N.P., K.M., A.F., A.Z., R.K., K.W., A.S., and A.A.C.-B.; investigation, A.K., N.P., K.M., A.Z., K.W., and A.A.C.-B.; resources, A.K., A.S., and A.A.C.-B.; data curation, A.K., N.P., and K.M.; writing—original draft preparation, A.K. and N.P.; writing—review and editing, A.K., N.P., and K.M.; visualization, A.K., N.P., K.M., and A.A.C.-B.; supervision, A.S., A.F., R.K., H.R., and A.A.C.-B.; project administration, A.K.; funding acquisition, A.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

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

References

- Bonini, S.A.; 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]
- Russo, E.B.; Jiang, H.; Li, X.; Sutton, A.; Carboni, A.; del Bianco, F.; Mandolino, G.; Potter, D.J.; Zhao, Y.; Bera, S.; et al. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 4171–4182. [CrossRef] [PubMed]
- Upton, R.; ElSohly, M.; Pharmacopoeia, A.H. *Cannabis Inflorescence: Cannabis Spp.; Standards of Identity, Analysis, and Quality Control*; American Herbal Pharmacopoeia: Scotts Valley, CA, USA, 2014.
- Taura, F.; Sirikantaramas, S.; Shoyama, Y.; Yukihiro, S.; Morimoto, S. Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent studies on biosynthetic enzymes. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1649–1663. [CrossRef]
- Chua, L.Y.W.; Chong, C.H.; Chua, B.L.; Figiel, A. Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: A review. *Food Bioprocess Technol.* **2019**, *12*, 450–476. [CrossRef]
- Calín-Sánchez, Á.; Figiel, A.; Lech, K.; Szumny, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Effects of drying methods on the composition of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil. *Dry. Technol.* **2013**, *31*, 224–235. [CrossRef]
- Calín-Sánchez, Á.; Figiel, A.; Lech, K.; Szumny, A.; Martínez-Tomé, J.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Drying methods affect the aroma of *Origanum majorana* L. analyzed by GC–MS and descriptive sensory analysis. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *74*, 218–227. [CrossRef]
- Calín-Sánchez, Á.; Lech, K.; Szumny, A.; Figiel, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Volatile composition of sweet basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by drying method. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 217–225. [CrossRef]
- Figiel, A.; Szumny, A.; Gutiérrez-Ortizac, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *J. Food Eng.* **2010**, *98*, 240–270. [CrossRef]
- Xing, Y.; Lei, H.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, J.; Xu, H. Effects of different drying methods on the total phenolic, rosmarinic acid and essential oil of purple perilla leaves. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2017**, *20*, 1594–1606. [CrossRef]
- Figiel, A.; Michalska, A. Overall quality of fruits and vegetables products affected by the drying processes with the assistance of vacuum-microwaves. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 71. [CrossRef]
- Chua, K.J.; Chou, S.K. Chapter 24: Recent advances in hybrid drying technologies. In *Emerging Technologies for Food Processing*, 2nd ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014.
- Calzolari, D.; Magagnini, G.; Lucini, L.; Grassi, G.; Appendino, G.B.; Amaducci, S. High added-value compounds from Cannabis threshing residues. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *108*, 558–563. [CrossRef]
- Tang, K.; Struik, P.C.; Yin, X.; Calzolari, D.; Musio, S.; Thouminot, C.; Bjelková, M.; Stramkale, V.; Magagnini, G.; Amaducci, S. A comprehensive study of planting density and nitrogen fertilization effect on dual-purpose hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivation. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *107*, 427–438. [CrossRef]
- Welling, M.T.; Liu, L.; Shapter, T.; Raymond, C.A.; King, G.J. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. *Euphytica* **2017**, *208*, 463–475. [CrossRef]
- Meier, C.; Mediavilla, V. Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *J. Int. Hemp Assoc.* **1998**, *5*, 16–20.

17. Nissen, L.; Zatta, A.; Stefanini, I.; Grandi, S.; Sgorbati, B.; Biavati, B.; Monti, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia* **2010**, *81*, 413–419. [CrossRef]
18. Bedini, S.; Flamini, G.; Cosci, F.; Ascrizzi, R.; Benelli, G.; Conti, B. *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* essential oils as novel control tools against the invasive mosquito *Aedes albopictus* and fresh water snail *Physella acuta*. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *85*, 318–323. [CrossRef]
19. Górski, R.; Sobieralski, K.; Siwulski, M. The effect of hemp essential oil on mortality *Aulacorthum Solani* Kalt. And *Tetranychus Urticae* Koch. *Ecol. Chem. Eng.* **2016**, *23*, 505–511. [CrossRef]
20. Wielgusz, K.; Heller, K.; Byczyńska, M. The assessment of fungistatic effect of hemp essential oil as seed dressing, depending on the composition. *J. Res. Appl. Agric. Eng.* **2012**, *57*, 183–187.
21. Synowiec, A.; Rys, M.; Bocianowski, J.; Wielgusz, K.; Byczyńska, M.; Heller, K.; Kalemba, D. Phytotoxic effect of fiber hemp essential oil on germination of some weeds and crops. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2016**, *19*, 262–276. [CrossRef]
22. Mastinu, A.; Premoli, M.; Ferrari-Toninelli, G.; Tambaro, S.; Maccarinelli, G.; Memo, M.; Bonini, S.A. Cannabinoids in health and disease: Pharmacological potential in metabolic syndrome and neuroinflammation. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2018**, *227*, 300–315. [CrossRef]
23. Lim, K.; See, Y.M.; Lee, J. A systematic review of the effectiveness of medical cannabis for psychiatric, movement and neurodegenerative disorders. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **2017**, *15*, 301–312. [CrossRef]
24. Callaway, J.C. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* **2004**, *140*, 65–72. [CrossRef]
25. Leizer, C.; Ribnicky, D.; Poulev, A.; Dushenkov, S.; Raskin, I. The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods* **2000**, *2*, 35–53. [CrossRef]
26. Calín-Sánchez, Á.; Figiel, A.; Wojdyło, A.; Szarycz, M.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Drying of garlic slices using convective pre-drying and vacuum-microwave finishing drying: Kinetics, energy consumption, and quality studies. *Food Bioprocess Technol.* **2014**, *7*, 398–408. [CrossRef]
27. *The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH EI and NIST Tandem Spectral Library*; Standard Reference Data Program of the National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, USA, 2017.
28. Mondello, L. *Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*, 3rd ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2015.
29. Lucero, M.; Estell, R.; Tellez, M.; Fredrickson, E. A retention index calculator simplifies identification of plant volatile organic compounds. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 378–384. [CrossRef]
30. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Pub Corp: Carol Stream, IL, USA, 2017.
31. Politowicz, J.; Lech, K.; Sánchez-Rodríguez, L.; Figiel, A.; Szumny, A.; Grubor, M.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Volatile composition and sensory profile of oyster mushroom as affected by drying method. *Dry. Technol.* **2018**, *36*, 685–696. [CrossRef]
32. Calín-Sánchez, Á.; Figiel, A.; Szarycz, M.; Lech, K.; Nuncio-Jáuregui, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Drying kinetics and energy consumption in the dehydration of pomegranate (*Punica Granatum* L.) arils and rind. *Food Bioprocess Technol.* **2014**, *7*, 2071–2083. [CrossRef]
33. Thorat, I.D.; Mohapatra, D.; Sutar, R.F.; Kapdi, S.S.; Jagtap, D.D. mathematical modeling and experimental study on thin-layer vacuum drying of ginger (*Zingiber Officinale* R.) slices. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 1379–1383. [CrossRef]
34. Sitkei, G. *Developments in Agricultural Engineering 8. Mechanics of Agricultural Materials*; Akadémiai Kiadó: Budapest, Hungary; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1986.
35. Rafiee, S.; Sharifi, M.; Keyhani, A.; Omid, M.; Jafari, A.; Mohtasebi, S.S.; Mobli, H. Modeling effective moisture diffusivity of orange slice (Thompson Cv.). *Int. J. Food Prop.* **2010**, *13*, 32–40. [CrossRef]
36. Akpınar, E.K.; Bicer, Y.; Yıldız, C. Thin layer drying of red pepper. *J. Food Eng.* **2003**, *59*, 99–104. [CrossRef]
37. Lech, K.; Figiel, A.; Wojdyło, A.; Korzeniowska, M.; Serowik, M.; Szarycz, M. Drying kinetics and bioactivity of beetroot slices pretreated in concentrated chokeberry juice and dried with vacuum microwaves. *Dry. Technol.* **2015**, *33*, 1644–1653. [CrossRef]
38. Łyczko, J.; Jałoszyński, K.; Surma, M.; Masztalerz, K.; Szumny, A. HS-SPME analysis of true lavender (*Lavandula Angustifolia* Mill.) leaves treated by various drying methods. *Molecules* **2019**, *24*, 764. [CrossRef]
39. Doymaz, I. Drying kinetics, rehydration and colour characteristics of convective hot-air drying of carrot slices. *Heat Mass Transf.* **2017**, *53*, 25–35. [CrossRef]

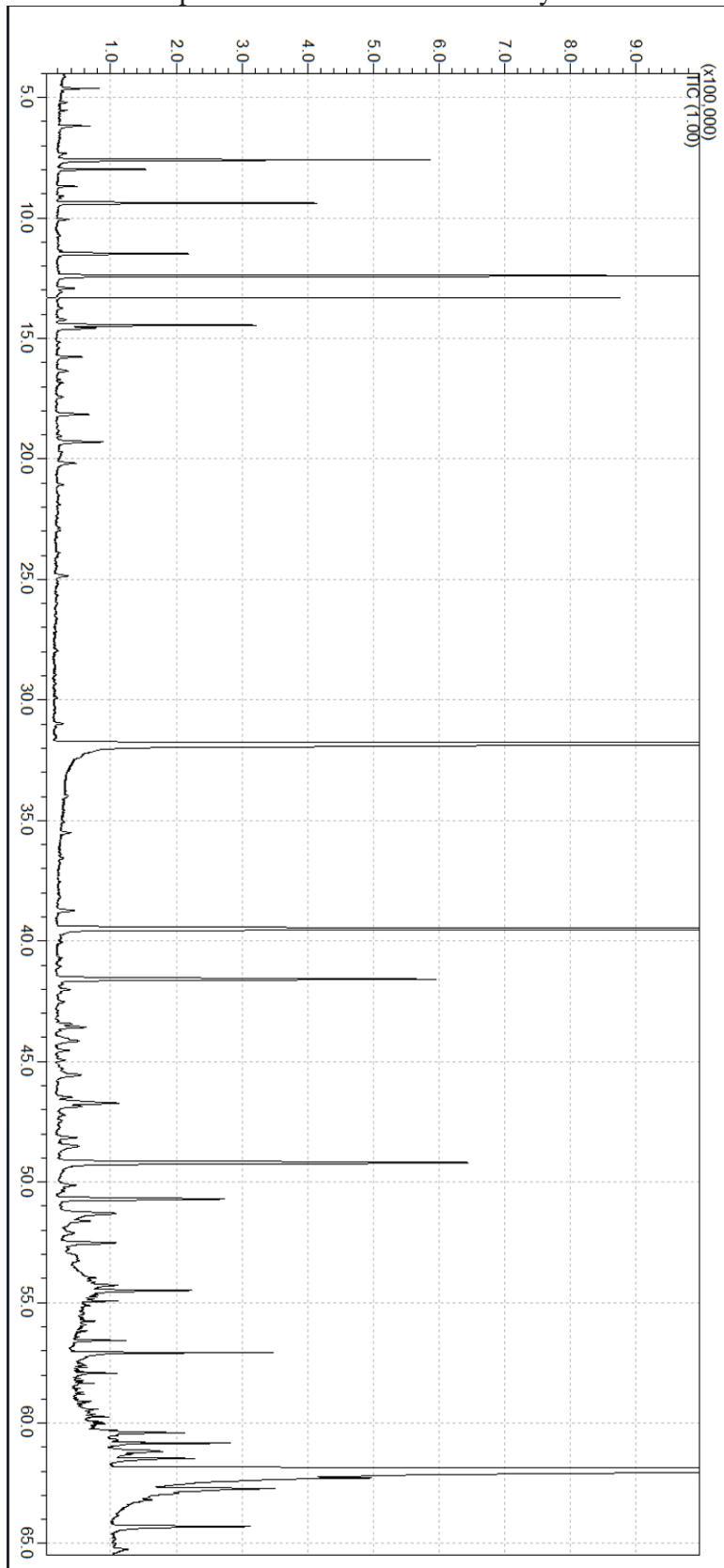
40. Ozgen, F. Experimental investigation of drying characteristics of cornelian cherry fruits (*Cornus Mas* L.). *Heat Mass Transf.* **2015**, *51*, 343–352. [CrossRef]
41. Chua, L.Y.W.; Chua, B.L.; Figiel, A.; Chong, C.H.; Wojdyło, A.; Szumny, A.; Lech, K. Characterisation of the convective hot-air drying and vacuum microwave drying of *Cassia Alata*: Antioxidant activity, essential oil volatile composition and quality studies. *Molecules* **2019**, *24*, 1625. [CrossRef] [PubMed]
42. Nowicka, P.; Wojdyło, A.; Lech, K.; Figiel, A. Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of dried sour cherry fruits pre-dehydrated in fruit concentrates. *Food Bioprocess Technol.* **2015**, *8*, 2076–2095. [CrossRef]
43. Taskin, O.; Polat, A.; Izli, N.; Asik, B.B. Intermittent microwave-vacuum drying effects on pears. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2019**, *69*, 101–108. [CrossRef]
44. Szychowski, P.J.; Lech, K.; Sendra-Nadal, E.; Hernández, F.; Figiel, A.; Wojdyło, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Kinetics, biocompounds, antioxidant activity, and sensory attributes of quinces as affected by drying method. *Food Chem.* **2018**, *255*, 157–164. [CrossRef]
45. Figiel, A. Drying kinetics and quality of beetroots dehydrated by combination of convective and vacuum-microwave methods. *J. Food Eng.* **2010**, *98*, 461–470. [CrossRef]
46. Šumić, Z.; Tepić, A.; Vidović, S.; Jokić, S.; Malbaša, R. Optimization of frozen sour cherries vacuum drying process. *Food Chem.* **2013**, *136*, 55–63. [CrossRef]
47. Benelli, G.; Pavela, R.; Petrelli, R.; Cappellacci, L.; Santini, G.; Fiorini, D.; Sut, S.; Dall'Acqua, S.; Canale, A.; Maggi, F. The essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *122*, 308–315. [CrossRef]
48. Benelli, G.; Pavela, R.; Lupidi, G.; Nabissi, M.; Landry Stephane, N.; Cappellacci, L.; Fiorini, D.; Sut, S.; Dall'Acqua, S.; Maggi, F. The crop-residue of fiber hemp cv. Futura 75: From a waste product to a source of botanical insecticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *25*, 10515–10525. [CrossRef]
49. Mediavilla, V.; Steinemann, S. Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains. *J. Int. Hemp Assoc.* **1997**, *4*, 80–82.
50. Iseppi, R.; Brighenti, V.; Licata, M.; Lambertini, A.; Sabia, C.; Messi, P.; Pellati, F.; Benvenuti, S. Antibacterial activity of essential oils from fibre-type *Cannabis sativa* L. (Hemp). *Molecules* **2019**, *24*, 2302. [CrossRef]
51. Vuerich, M.; Ferfuaia, C.; Zuliani, F.; Piani, B.; Sepulcri, A.; Mario Baldini, M. Yield and quality of essential oils in hemp varieties in different environments. *Agronomy* **2019**, *9*, 356. [CrossRef]
52. Liang, Q.; Liang, Z.; Wang, J.; Xu, W. Essential oil composition of *Salvia miltiorrhiza* flower. *Food Chem.* **2009**, *113*, 592–594. [CrossRef]
53. Chalchat, J.; Ozcan, M.M. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chem.* **2008**, *110*, 501–503. [CrossRef]
54. Lyczko, J.; Jałoszyński, K.; Surma, M.; García-Garvía, J.M.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Szumny, A. Determination of various drying methods' impact on odour quality of true lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) flowers. *Molecules* **2019**, *24*, 2900. [CrossRef]
55. Politowicz, J.; Lech, K.; Lipan, L.; Figiel, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Volatile composition and sensory profile of shiitake mushrooms as affected by drying method. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *98*, 1511–1521. [CrossRef]



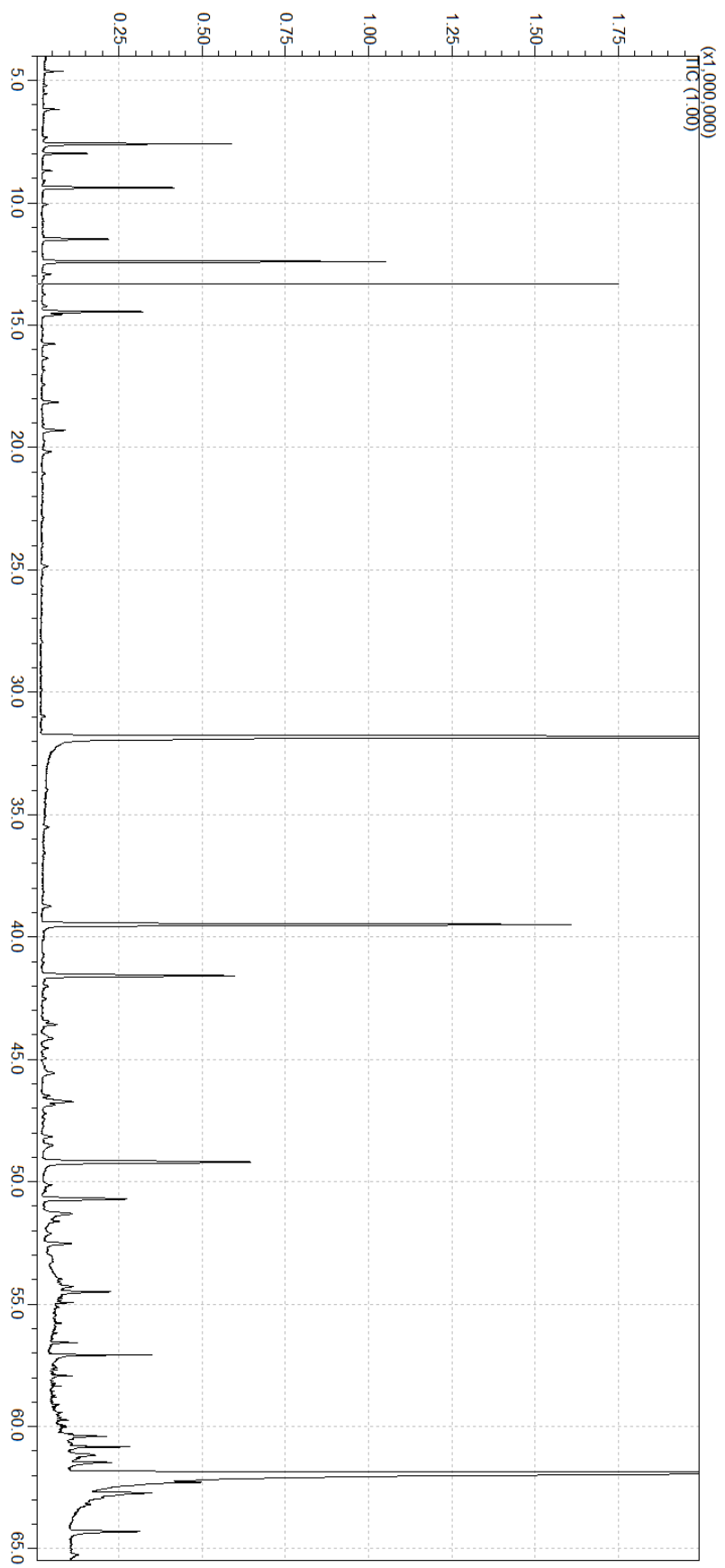
© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary materials

S1. Fresh hemp flower GC-MS volatile analysis



S1. Dried hemp 240 W flower GC-MS volatile analysis



V.1.2 Publikacja 2

TYTUŁ:

Kwaśnica, A., Teleszko, M., Marcinkowski, D., Kmiecik, D., Grygier, A., & Golimowski, W. (2022). Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils. *Molecules*, 27(21), 7196.

AUTORZY:







A Kwaśnica, M Teleszko, D Marcinkowski, D Kmiecik, A Grygier, W Golimowski

CZASOPISMO:

Molecules. 2022; 27(21):7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>

Article

Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils

 Andrzej Kwaśnica ¹, Mirosława Teleszko ², Damian Marcinkowski ³, Dominik Kmiecik ⁴, Anna Grygier ⁴ and Wojciech Golimowski ^{3,*}
¹ Department of Food Chemistry and Biocatalysis, Wrocław University of Life Sciences, C.K. Norwida Street 25, 50-375 Wrocław, Poland

² Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Production Engineering, Wrocław University of Economics and Business, Komandorska 118/120, 53-345 Wrocław, Poland

³ Department of Agroengineering and Quality Analysis, Faculty of Production Engineering, Wrocław University of Economics and Business, Komandorska 180/120, 53-345 Wrocław, Poland

⁴ Department of Food Technology of Plant Origin, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, Poland

* Correspondence: wojciech.golimowski@ue.wroc.pl

Abstract: Unrefined vegetable oils from niche oilseeds are now sought after by consumers because of their unique nutritional properties and taste qualities. The color and flavor intensity of niche oils is a big problem, and their refining is not industrially feasible due to the small production scale. The study undertaken aimed to analyze the effect of changing the amount of phytosterols (PSs) after the bleaching process of hemp oils of the ‘Finola’, ‘Earlina 8FC’ and ‘Secuieni Jubileu’ varieties. Cold-pressed (C) and hot-pressed (H) crude vegetable oils were bleached with selected bleaching earth (BE) at two concentrations. The post-process BE was extracted with methanol. The amount of PSs in the crude oils and the extract after washing the BE with methanol was analyzed by GC (gas chromatography). The study shows that the bleaching process did not significantly affect the depletion of PSs in the oils. Trace amounts of PSs remain on the BE and, due to methanol extraction, can be extracted from the oil. The conclusion of the performed research is that the bleaching of hemp oil does not cause depletion of the oil, and it significantly improves organoleptic properties. The oil bleaching process results in an oil loss of less than 2% by weight of the bleached oil, while the loss depends on the type of BE used. The study shows that the loss of phytosterols after the bleaching process averages $2.69 \pm 0.69\%$, and depends on the type of BE used and the oil extracted from different varieties of hemp seeds.

Keywords: *Cannabis sativa* L.; phytosterols; hemp oil; Finola; Earlina8FC; Secuieni Jubileu; bleaching earth



Citation: Kwaśnica, A.; Teleszko, M.; Marcinkowski, D.; Kmiecik, D.; Grygier, A.; Golimowski, W. Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils. *Molecules* **2022**, *27*, 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>

Academic Editors: Valeria Guarrasi and Amenta Margherita

Received: 27 September 2022

Accepted: 19 October 2022

Published: 24 October 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

1. Introduction

Vegetable oils are an essential component of human diet. On an industrial scale, rapeseed oil, sunflower oil and olive oil are produced in Europe [1]. Vegetable oil production is increasing due to its versatile uses, including biofuel production [2]. In addition to the large-scale production of refined vegetable oil, niche oils are being produced, with demand increasing due to their unique properties [3]. Niche vegetable oils are obtained from oilseeds, vegetable seeds and fruits which have a marginal amount of raw material in the oil market. The high oily content of the seeds prompts producers to press them. For example, almond oil is extracted from almond tree seeds with an oil content of 35–40% [4], argan oil is extracted from argan seeds with an oil content of about 50–55% [5], black seed oil from nigella seeds contains 28–36% oil [6], Ricinus oil from Ricinus seeds is extracted with an oil content of 40–50% and oil from flaxseed with an oil content of 30–40% [7], oil from grapeseed is extracted with an oil content of 7–20% [8], oil from thistle seeds with an oil content of 20–25% [9], oil from plum seed with an oil content of 23–30% [10], oil from

tomato seed with an oil content of 33–38% [11], and oil from hemp seed with an oil content of 28–35% [12].

Commercially produced vegetable oils undergo refining processes to remove desirable and undesirable components. The purification of crude vegetable oil from undesirable substances that negatively affect the quality and shelf life of the fat (phospholipids, free fatty acids (FFA), phytosterols (PS), waxes, oxidation products, water, aromatic compounds, pigments) is carried out through a refining process that consists of degumming, deacidification, bleaching and deodorization [13–15]. As a result of the degumming process, phospholipids are mainly removed [16]. The efficiency of this process is high, with up to 98% reduction in phospholipids contained in the oil [17]. The presence of FFA in the oil results in the degradation of fats. Their removal is performed by neutralization with alkaline solutions. The deodorization process is performed to remove light ether fractions neutralizing the characteristic odor of vegetable oil. All of the processes mentioned above require the use of a highly costly plant, the cost of which is impossible to amortize at a small scale of production. The bleaching process does not require using highly complex apparatus [18]. The process involves absorbing undesirable oil components due to BE [19]. As demonstrated by B. Laska et al. [18], the type of BE and the amount significantly affect the efficiency of phospholipid reduction. The efficiency is comparable to degumming and is a 99% reduction in phospholipids from oil [18]. The effectiveness of this process in removing other contaminants such as chlorophyll or carotenoids and solids has also been confirmed [20,21]. The effectiveness of BE depends on the mineral used, e.g., bentonites [22] or kaolinites [23], and the method of activation [24]. Membrane methods are an alternative for reducing oil phosphorus [25].

Bleaching earth (BE) is a natural mineral enriched with elements of various properties. Commonly used minerals are bentonites consisting mainly of montmorillonite, e.g., attapulgite clay, diatomaceous earths' natural mineral rock deposit. Enriched minerals with various elements, such as silicon, magnesium, or activated carbon increase their effectiveness [26–28]. The BE is widely used, for example, for wine clarification, water filtration, vegetable oil, and biodiesel [29]. Bentonite has been observed to affect the elemental composition of wine without changing its food qualities [30]. It also affects the structure of vegetable oils, depending on the parameters of the bleaching process [31].

Hemp oils, unrefined, are a valuable source of vitamins, mineral salts, PSs and carotenoids [32]. The ratio of n–3 to n–6 acids is 3:1, and beneficial for human health [33]. The PSs contained in the oil have a positive effect on human health [34]. The content of hemp oils depends on many factors, including both the variety of the plant and the process of obtaining the oil [12]. The regular consumption of PSs can result in a significant decrease in cardiovascular disease [34].

In this study, three varieties, 'Finola', 'Earlina 8 FC' and 'S. Jubileu', were selected from among 600 varieties of hempseed [35]. Based on a literature analysis of little-known varieties of hempseed, the products formed from the 'Fedora' variety have also been well described [36]. It was hypothesized that with the help of bleaching earth, it would be possible to isolate PS. Through the bleaching process, the organoleptic parameters of the oil are improved, and due to the high cost of the process, the possibility of isolating PSs from the BE after bleaching was analyzed. The results presented here are part of a large project in which the effects of the bleaching process on fatty acid profile, elemental composition, and the degree of color change and reduction in carotenoids and chlorophyll composition were analyzed.

2. Results and Discussion

2.1. Results of Statistical Descriptive Analysis of Mass Balance of Hemp Oil Bleaching Process

Raw vegetable oils, depending on the raw material, are characterized by their individual intense odor and taste. The refining process of industrially produced oils nullifies these characteristics. The bleaching positive performed in the study is one of the refining technology processes performed to change the color (Figure 1). The presented research

results are part of the research aimed at verifying the significance of the changes occurring in oils due to the bleaching process. The post-positive effect is a change in organoleptic properties with the preservation of valuable vitamins and components of vegetable oil.

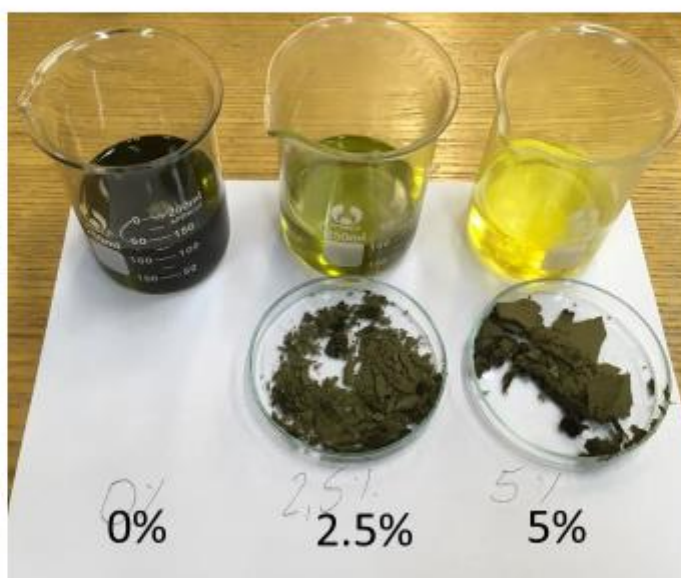


Figure 1. Change in the color of hemp oil as a result of the bleaching process using 2.5% and 5.0% bleaching earth m/m to oil.

Niche oils, which include hemp oil [3], are marketed in unrefined form. They are characterized by intense taste, color and texture properties. The use of BE, which is commonly used to clarify wine and juices [30], has been used to improve oil properties. The use of BE removes pigments in the form of chlorophyll, carotenoids and phospholipids from the oil [18]. Valuable components of vegetable oils are PS, which is desirable in oils; therefore, the purpose of the study was to verify whether the use of the bleaching method will reduce their share in the hemp oil and whether it is possible to extract them from BE. An important parameter for the producer is the loss of oil due to the separation of BE. A comparative analysis of oil weight loss after bleaching was performed and correlated with the amount of remaining extract after extraction from the land with methanol (Figure 2).

The type of BE used significantly affects oil losses after the bleaching process. From the analysis of the results, it can be concluded that the highest oil losses, at a level in proportion to the amount of earth used of about 1% and 2%, use P1 and P3 earth. P2 earth, attapulgitic clay pH-modified, had the lowest absorption and a high efficiency of absorption of compounds from oil. The almost 20-fold difference in the mass of compounds absorbed by the BE and extract was due to the use of methanol for extraction. This difference is due to the amount of fat that remained in the BE after extraction with methanol. In our experience, the complete opposite effect was with the use of hexane, which leached out oil while the carotenoids and chlorophyll were permanently bound to the BE.

2.2. Results of Statistical Analysis of Process Factors on Phytosterol Profile in Hemp Oils after Bleaching

After the bleaching process, the collected results of the analysis of the individual PS contents in the BE extract were given a statistical analysis by multivariate variance MANOVA. It turns out that the independent variables in the form of the type of oil, the temperature of the seeds subjected to pressing, and the type of earth in all cases had a significant effect on the individual PS contents in the extracts. Analogous to evaluating PSs in the oil, Table 1 analyzes the same composition. The results of the statistical analyses are shown in Table 1.

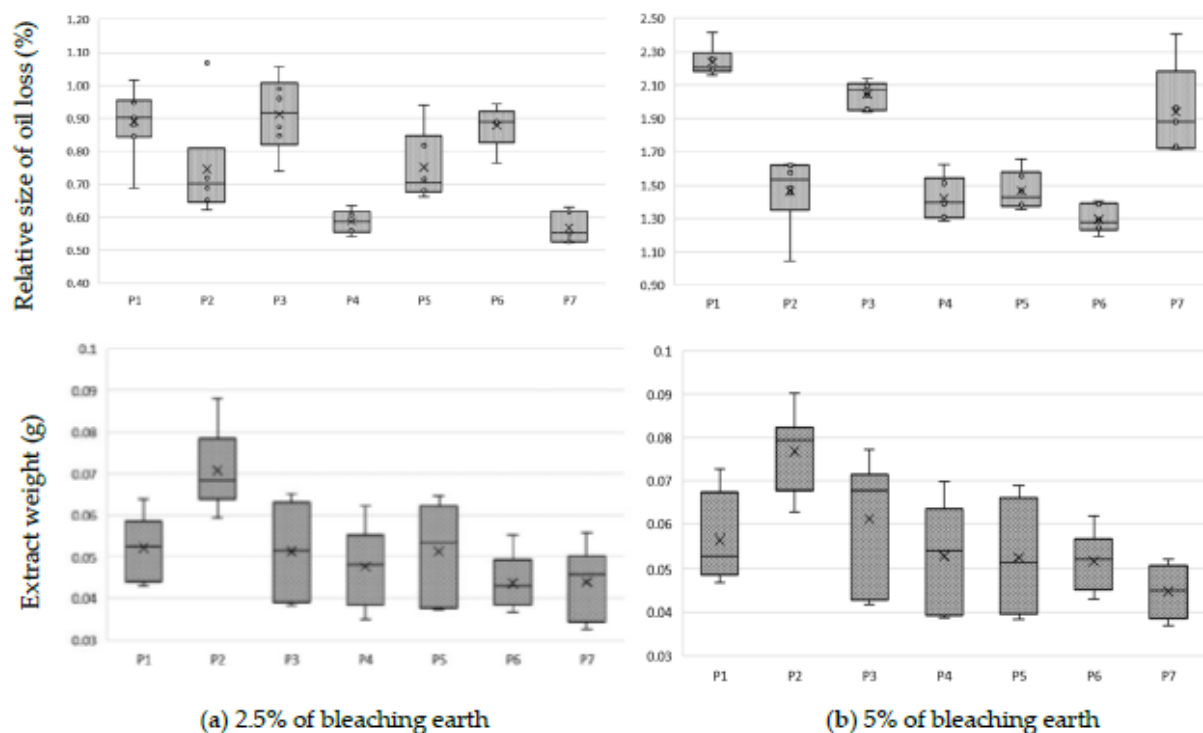


Figure 2. Loss of oil due to bleaching and the amount of extract extracted using earth at (a) 2.5% m/m; (b) 5% m/m; mean and standard deviation of $n = 6$.

Table 1. The results of the MANOVA multivariate analysis of variance test for phytosterols' analysis (Wilks test; $p < 0.05$).

Effect	Value	F	df Effect	df Error	p
Free parameter	0.000019	427,585.963	9	75.0000	0.00
Variety (1)	0.000001	7769.1	18	150.0000	0.00
Temperature (2)	0.001233	6752.6	9	75.0000	0.00
Dose of bleaching earth (3)	0.002809	2958.5	9	75.0000	0.00
Bleaching earth (4)	0.000000	1687.4	54	387.0206	0.00
Variety—Temperature	0.000021	1828.8	18	150.0000	0.00
Variety—Dose of bleaching earth	0.010590	72.6	18	150.0000	0.00
Variety—Bleaching earth	0.000000	350.8	108	558.5292	0.00
Temperature—Dose of bleaching earth	0.080871	94.7	9	75.0000	0.00
Temperature—Bleaching earth	0.000000	370.3	54	387.0206	0.00
1–2–3	0.003702	128.6	18	150.0000	0.00
1–2–4	0.000000	418.2	108	558.5292	0.00
1–3–4	0.000000	76.6	108	558.5292	0.00
2–3–4	0.000002	91.6	54	387.0206	0.00
1–2–3–4	0.000000	134.5	108	558.5292	0.00

In order to illustrate the individual PS contents extracted from the oil, the total amount of PSs in the weight of the extract is shown in Figure 3. Statistical analysis was performed using Duncan's method, which shows that all variables had a significant effect on the individual PS contents extracted from the oil.

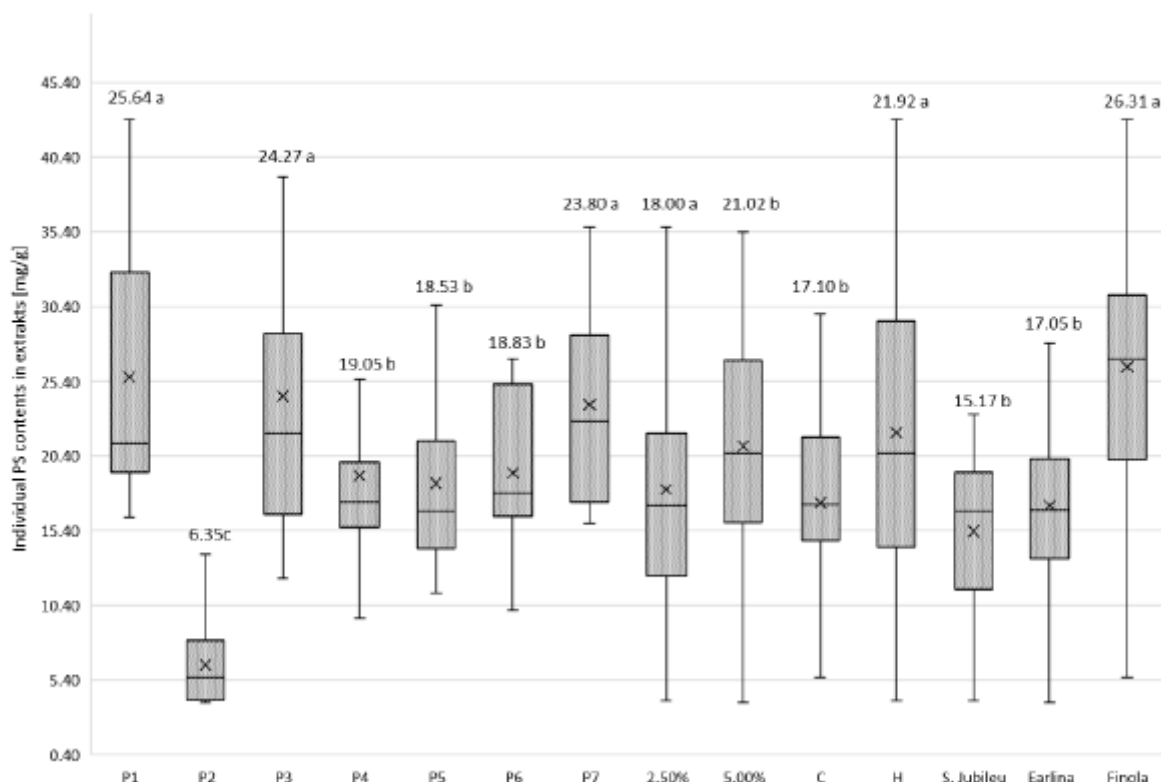


Figure 3. Mean values of phytosterol content (mg/g of dm) in post-bleaching methanolic extracts according to hemp variety, temperature of oil pressing, dose of bleaching earth and type of bleaching earth. a,b,c—homogeneous groups in Duncan's test ($p < 0.05$) determined separately for each independent variable.

The BE was characterized by varying PS adsorption strength (Figure 3). From the experiment, it is clear that regardless of the variety of hemp from which the oil was extracted, the method of pressing and the dosage of BE used, the extracts obtained after washing P2 BE with methanol contained the least PS. According to the specifications shown in Table 1, this BE is a pH-modified attapulgite clay, with the lowest value of this parameter among all BE used in the experiment. The acid activation of BE is considered a key factor in determining the efficiency of the adsorption of compounds, including PSs and their changing molecular structure, as suggested by the analysis of phytosterol content the in extracts obtained after the purification of BE P1 and P3. They belong to the same group of adsorbents as P2 (attapulgite clay; AC), with a slightly alkaline reaction (pH = 8). The extracts obtained after P2 earth bleaching contained a maximum of 5.59 mg PS/g dm ('S. Jubileu'/cold pressing/2.5% BE), 8.23 mg PS/g dm ('Finola'/hot pressing/5% BE) and 13.84 mg PS/g dm ('Earlina 8 FC'/hot pressing/2.5% BE). Compared with the PS content in samples leached from physically activated attapulgite clay (P1) and unmodified AC (P3), these values are 4–6 times lower (Tables A1–A3). The use of acid-activated BE in the refining of edible oils results in the formation of steradians (SDs) from PSs via a catalyzed dehydration reaction [37,38], particularly, 3,5-stigmastadiene (stigdien; a β -sitosterol derivative), 3,5-campestadiene (camdien) and 3,5,22-stigmastatrien (stigtrien) [15,39,40]. Verleyen et al. [41] noted that the formation of these structures is related to bleaching temperature (four-fold increase in steradian concentration in the temperature range of 90–110 °C), increasing the concentration of BE and the degree of its acid activation (linear increase in SD content). In our study, the steradian content was not determined. However, it is reasonable to assume that the low concentration of PSs in P2 extracts may have resulted not so much from their poor adsorption as from advanced dehydration and the formation of PS-steroidal

hydrocarbon derivatives. Moreover, as mentioned earlier (Figure 3), the use of this type of BE resulted in the lowest weight losses of hemp oils during the bleaching process, which from an economic point of view is an important advantage for industrial use. Acid-activated BE is preferred in the oil refining process because it has a higher adsorption capacity for substances considered ballast, and is more chemically active than neutral BE [42].

After the bleaching process of hemp oils, most PSs were adsorbed by physically activated attapulgite clays P1 and P3 and kerolite chemically modified diatomaceous earth (hydrated magnesium silicate; P7; Figure 3). Weaker adsorption properties were exhibited by bentonite BE, including acid-activated earth P6 (pH = 6.5). Due to its very good sorption properties, attapulgite is competitive with other clays used for the clarification of edible oils. Thermal treatment improves the cleansing capacity of AC and develops the acidity of its surface. As a result, the removal of contaminants from the oil is carried out under mild conditions with high efficiency. Kerolithic clay, on the other hand, even untreated by chemical or physical pretreatment, is considered a good adsorbent for separation purposes in many biotechnological processes [43]. Łaska-Zieja et al. [18] demonstrated the high efficiency of a 2% (m/m) addition of kerolith in reducing the phosphorus content of rapeseed oil subjected to low-temperature bleaching. Bentonite, on the other hand, is widely used in the production of bleaching earths due to its availability. In its acid-activated form, it is used by many palm oil refineries. However, the use of this form of bentonite causes the corrosion of process equipment [44] and catalyzes many chemical reactions (including isomerization, degradation and dehydration) that result in undesirable compounds in bleached oils [45].

The efficiency of edible oil refining refers to the ability of the process methods used, including bleaching, to remove undesirable substances. However, losses of vitamins, tocopherols and PS also occur at all stages of refining [46]. As our experiments showed, attapulgite clays that are not acid-activated adsorb PSs well, and their content in the extracts tested was about 25 mg/g (Figure 3). However, this was an average value for all hemp oil samples tested. Meanwhile, during the bleaching of hot-pressed 'Earlina' oil, the 5% addition of P3 BE resulted in the adsorption of 52.69 mg PS/g of extract (Table A2). After pressing and bleaching under identical conditions, the seed oil of the S. Jubileu variety (Table A1) had an extract of 22.13 mg PS/g, while that of the Finola variety had 21.70 mg PS/g (Table A3). In cold-pressed oils, the values were 29.69, 23.19 and 15.83 mg PS/g, respectively. This observation is significant because our previous studies show that in crude hemp oils extracted from the seeds of the aforementioned varieties of *Cannabis sativa*, the content of plant PSs was not statistically different and was about 2 mg/g of oil [35]. This suggests that the adsorption capacity of the BE tested against PS depends not only on the properties of BE and the BE dosage used (Tables A1–A3; Figure 2) but also on the presence of PS companion substances in oils tested, which may affect their loss during the bleaching process. This is because the competitive adsorption between PSs and dyes contained in oils is possible, as mentioned earlier [47].

In general, increasing the dose of BE in the bleaching process of hemp oils was accompanied by an increase in PSs in the extracts (Figure 3; $p < 0.05$), although from a practical point of view, these differences were not significant. On the other hand, when considering the effect of this factor on PS adsorption by BE at the varietal level, it can be observed that in the case of BEs such as attapulgite P3 and bentonite (P5, P6) with a higher dose of BE (5%), the proportion of PS in the extracts increased in all analyzed samples, regardless of the pressing temperature of the oil subjected to bleaching (C, H). In other cases, the effect of BE addition was inconclusive. This observation confirms that the choice of BE dosage should be determined on a case-by-case basis, taking into account the physical and chemical peculiarities of the oil (especially those obtained from niche raw materials), its production technology, and the expected results of the process. This issue is important not only from the point of view of costs and accounting in business, but also from the point of view of the need to manage the used BE [48].

2.3. Analysis of Significant Factors of Phytosterol Profiles of Hemp Oils with the PCA Method

Principal component analysis (PCA) was applied to observe possible clusters of phytosterol content in hemp oil of the Finola, Earlina and S.Jubileu varieties bleached in different conditions. The result of the distribution of the samples depending on the differentiating factor (different variety, temperature of pressing, type of bleaching earth, and earth dose) is shown in Figure 4. The first two principal factors accounted for 88.3% (Dim1 = 72.8% and Dim2 = 15.5%) of the total variation. Factor 1 was mainly correlated with the total phytosterols content ($r = 0.991$), β -sitosterol ($r = 0.985$) and campesterol content ($r = 0.978$).

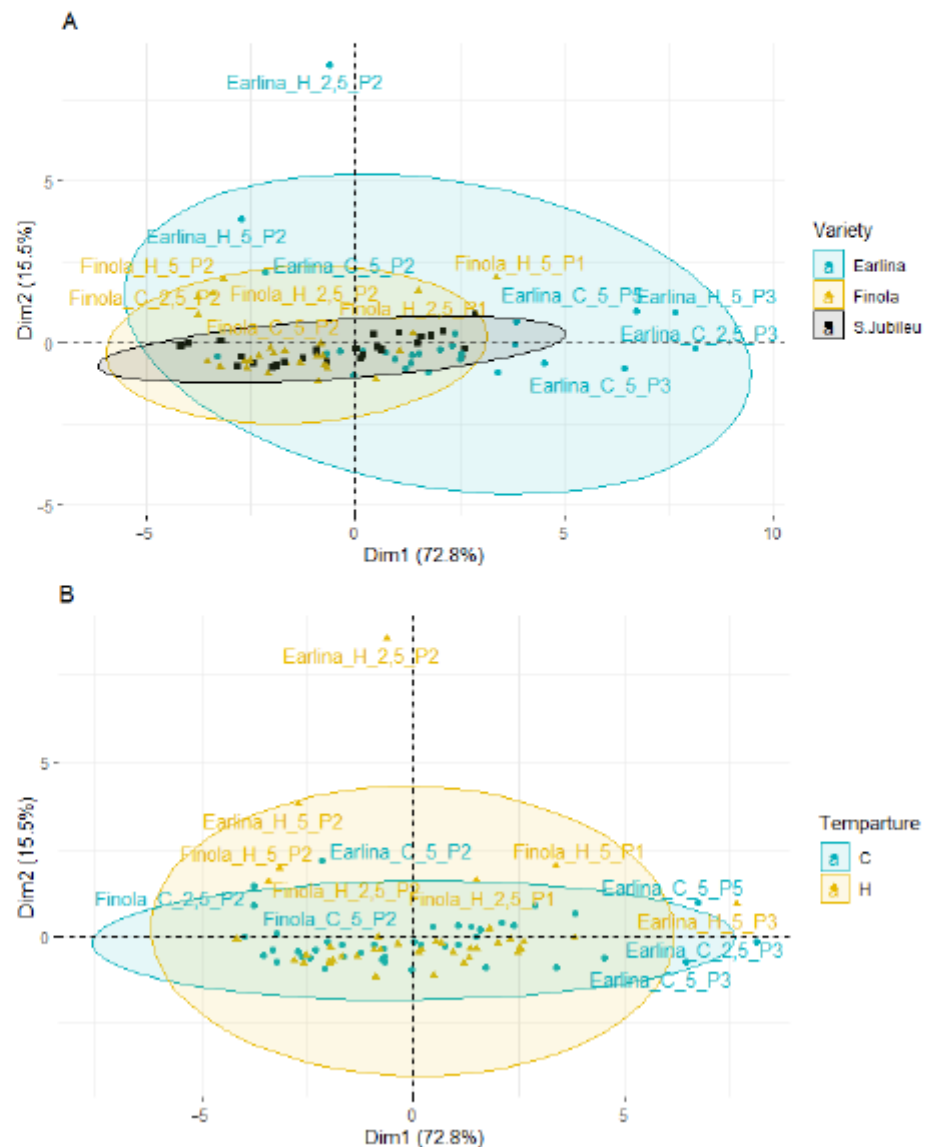


Figure 4. Cont.

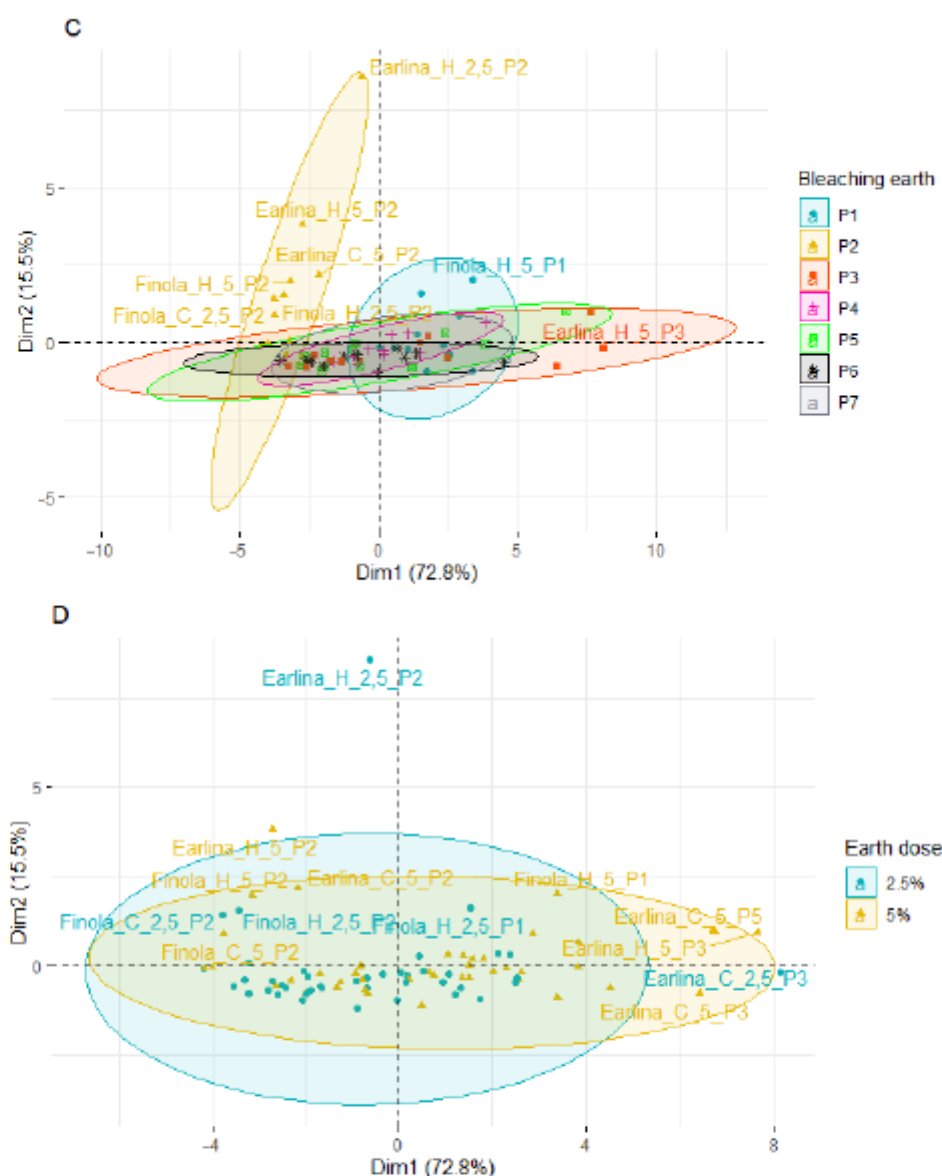


Figure 4. Principal component analysis (PCA) of the score plot of data from phytosterol content in extracted BE (mg/g) varieties (A), temperature of pressing process (B), type of bleaching earth (C), and earth dose (D).

PCA analysis showed that most of the samples are distributed longitudinally along the Y-axis in the center of the plot. A greater scattering of samples is observed on the left–right side of the X-axis. When analyzing the influence of the cannabis variety (Figure 4A), the smallest dispersion is characteristic of the S. Jubileu variety. ‘Finola’ and ‘Earlina 8 FC’ oil samples are more dispersed. This is especially true of the ‘Earlina 8 FC’ variety. In addition to centrally grouped samples, we can observe two groups of outliers. The first includes five samples (rightmost of the X-axis) including samples prepared with bleaching earth P3. In the second group, there is one sample with an extreme outlier. It is a sample obtained by hot-pressing that was bleached with P2 bleaching earth in an amount of 2.5%.

When analyzing the effect of the type of bleaching earth used for the treatment process (Figure 4C), greater variation in the samples was observed when bleaching earth P2 was used. These samples were arranged vertically above the Y-axis and on the left side of the X-axis. The use of other bleaching earths did not affect the obtained effects. Most of the

samples were centrally located in the plot. The exception was bleaching earth P3, where a greater horizontal dispersion was observed. During the analysis of the influence of the temperature of the oil production and the amount of bleaching earth used (Figure 4B,D), a similar scattering effect was observed. The samples were characterized by lower variability and a central distribution of the graphs and the Y-axis.








The PCA results show differences between individual oil sample's bleaching under different conditions. However, the factors influencing the most differentiation of the samples were the hemp variety and the type of bleaching earth used, in particular, type P2.

3. Materials and Methods

3.1. Description of the Source of Hemp Oils and the Parameters of Bleaching Earth

Hot-pressed and cold-pressed oils from three varieties of hemp seed, 'Finola', 'Earlina 8 FC' and 'S. Jubileu', harvested in August 2021 in Poland [35], were used in the study. The seeds were divided into samples of 25 kg each after a preliminary analysis of their parameters. The press was preheated, and 5 kg of seeds were pressed to stabilize the pressing variations. Subsequently, 10 kg of seeds were measured, and the proper measurement of yield and process efficiency was made. The oil was pressed at a variable seed temperature of 20 °C (C), and the seed was heated to 60 °C (H). A sample of 2 dm³ was taken from each oil portion and filtered into Buchner funnels. The oil after filtration was used to analyze the bleaching process. The pressing process is described in detail in the publication by Golimowski et al. [35]. The oil was subjected to bleaching with seven types of BE, the characteristics of which are shown in Table 2. BE is a commercial product dedicated to food products.

Table 2. Characteristics of bleaching earth.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Foto							
Mineral	Attapulgitic clay	Attapulgitic clay	Attapulgitic clay	Magnesian bentonite	Magnesian bentonite	Magnesian bentonite	Kerolite-hydrated magnesium silicate
Modified	Physically activated	pH-modified	Not modified	Not modified	Not modified	Acid-modified	Chemically modified
pH	8.0	3.2	8.0	8.5	10.0	6.5	6.0
Density (kg/m ³)	0.41	0.51	0.47	0.60	0.60	0.60	0.55
Composition (%)							
SiO ₂		55–60		58.8	56.1	63.1	53.5
Al ₂ O ₃		2.5		5.3	5.7	8.3	4.0
Fe ₂ O ₃		12–14		1.4	1.6	1.9	1.5
MgO		18–21		23.0	23.6	23.0	30.5
CaO		0.5–1.0		2.1	2.7	2.6	0.7
Na ₂ O		0.05–0.25		-	-	-	0.3

3.2. GC-MS Method Description and Phytosterol Profile of Hemp Oils

Many methods are known for determining phytosterols in edible oils. In addition to the well-known GC-MS and HPLC methods, spectroscopic methods have been developed [49]. Due to our extensive experience in GC-MS, this method was chosen for the presented study. For the analysis of PSs, a total of 0.05 g of each hemp oil was used. To the samples, we added 50 µg of internal standard (5 α -cholestane-Supelco, Bellefonte, PA, USA). The samples were saponified with 1 M KOH in methanol, and the unsaponifiables were extracted using a mixture of hexane and methyl tert-butyl ether (1:1, v/v). The solvent was evaporated under a nitrogen stream, and dry residues were dissolved in anhydrous pyridine (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and silylated with BSTFA + 1% TMCS (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The PSs were analyzed using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) in splitless mode with an FID detector and a DB-35MS

capillary column (25 m × 0.20 mm, 0.33 μm; Agilent J&W, Folsom, CA, USA). The detector and injector were set at a temperature of 300 °C. The oven temperature was initially 100 °C for 5 min, increasing at 25 °C/min to 250 °C, and then at 3 °C/min to 290 °C. The final temperature was held for 20 min. The carrier gas was hydrogen, and the flow rate was 1.5 mL/min. PS were identified by comparing their retention times with those of the standards. The PSs were determined in duplicate [50].

The subject of this study was the analysis of the effect of the bleaching process of hemp oil on the change of the phytosterol profile. Table 3 shows the phytosterol profile of the oils used for the study

Table 3. Phytosterols content (mg/g) in oils obtained from different hemp varieties and pressing temperature [35].

Phytosterol (mg/g)	Hemp Seeds Oils					
	'Finola' (C)	'Finola' (H)	'Earlina 8 FC' (C)	'Earlina 8 FC' (H)	'S. Jubileu' (C)	'S. Jubileu' (H)
campesterol	0.33 ± 0.00	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02
campestanol	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
stigmasterol	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00
β-sitosterol	1.35 ± 0.02	1.28 ± 0.00	1.23 ± 0.09	1.27 ± 0.09	1.26 ± 0.11	1.25 ± 0.07
sitostanol	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Δ5-avenasterol	0.16 ± 0.00	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02
Δ5,24-stigmastadienol	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.00
Δ7-avenasterol	0.10 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.00
24-methylenecholesterol	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01
TOTAL	2.13 ± 0.03	2.06 ± 0.03	1.95 ± 0.10	2.05 ± 0.15	1.97 ± 0.20	1.97 ± 0.11

C—cold pressing; H—hot pressing.

3.3. Mass Balance of the Process and Method of Bleaching Hemp Oil

The oil obtained by seed pressing at 20 °C and 60 °C was subjected to bleaching using seven different types of BE at 2.5% and 5% m/m by weight of the oil. The BE was added to 100 g of oil at 60 °C and stirred for 10 min. Solid fractions were separated from the mixture using a Buchner funnel with a cellulose membrane and vacuum system. The BE samples were stored at −20 °C. The BE samples were then extracted with methanol in appropriate amounts of 50 g for samples where 2.5 g of BE was used and 70 g for samples where 5 g of BE was used. The uneven ratio of methanol was due to previous experiments in which it was found that these amounts of methanol were entirely sufficient to extract PS from BE. The methanol, along with the BE sample, was stirred and heated evenly to about 50 °C and then poured into a Buchner funnel with a cellulose membrane. The methanol was removed from the extract using a vacuum evaporator. Using Algorithm 1, the relative amount of absorbed compounds from the hemp oil was calculated.

$$E_s = \frac{M_{ee} - M_{zb}}{M_o} [\%] \quad (1)$$

where:

E_s —the relative proportion of the amount of absorbed compounds from the oil (%);

M_{ee} —weight of bleaching earth after bleaching process (g);

M_{zb} — weight of bleaching earth before bleaching process (g);

M_o —weight of hemp oil (g).

The relative proportions of the amount of absorbed compounds from the oil are shown in Table 4.

Table 4. The relative proportion of the amount of absorbed compounds from the oil.

BE	TO	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
‘Finola’ (%)								
2.5	C	0.90	0.69	1.07	0.74	0.56	0.62	0.94
	H	0.95	0.72	0.99	0.64	0.72	0.56	0.90
5.0	C	2.16	1.62	2.14	1.51	1.36	1.26	2.40
	H	2.19	1.58	1.95	1.40	1.40	1.19	1.88
‘Earlina 8 FC’ (%)								
2.5	C	1.01	0.69	1.06	0.61	0.82	0.53	0.76
	H	0.88	0.65	0.85	0.54	0.66	0.52	0.89
5.0	C	2.20	1.49	2.04	1.29	1.66	1.24	1.73
	H	2.41	1.62	2.10	1.31	1.38	1.29	1.96
‘S. Jubileu’ [%]								
2.5	C	0.85	0.62	0.96	0.61	0.69	0.63	0.94
	H	0.96	0.72	0.87	0.57	0.68	0.55	0.89
5.0	C	2.21	1.46	1.94	1.39	1.56	1.40	1.72
	H	2.26	1.04	2.10	1.63	1.46	1.39	1.93

BE—relative share of bleaching earth (%); TO—press method; H—hot; C—cold.

The result of the methanol extraction was a small amount of condensed substance with a dark green color. Table 5 shows the mass of extract extracted from 100 g of hemp oil.

Table 5. Weight of extract after methanol extraction.

BE	TO	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
‘Finola’ (10^{-2} g)								
2.5	C	5.08	5.85	7.10	4.63	5.29	4.84	4.60
	H	4.31	7.54	6.25	4.69	6.14	4.43	4.31
5.0	C	5.53	7.97	7.71	5.18	4.94	5.23	6.18
	H	4.70	9.03	6.74	5.66	5.38	4.36	5.04
‘Earlina 8 FC’ (10^{-2} g)								
2.5	C	5.24	6.54	3.96	3.96	3.78	3.25	3.68
	H	4.40	5.94	3.82	3.49	3.73	3.51	3.99
5.0	C	5.07	6.27	4.17	3.96	3.84	3.91	4.30
	H	4.93	6.95	4.32	3.87	4.02	3.70	4.60
‘S. Jubileu’ (10^{-2} g)								
2.5	C	5.24	6.59	5.66	4.95	6.46	4.74	4.35
	H	6.38	8.80	6.51	6.22	6.09	5.58	5.53
5.0	C	6.56	7.98	6.95	6.15	6.53	5.04	5.41
	H	7.27	7.90	6.80	6.98	6.88	4.66	5.55

BE—relative share of bleaching earth (%); TO—press method; H—hot; C—cold.

The resulting sample solution of methanol and extracted substances was stored in a freezer at -20 °C. A vacuum evaporator was used, the methanol was evaporated entirely from the samples, and the net extracts were analyzed for PSs. The sterol content of the BE extracts was determined using an analogous GC method. Table 5 shows the average values of the results obtained in relation to the varying use of BE.

4. Conclusions

The presented research results are part of a project that comprehensively analyzed the effect of different bleaching earths on the change in physicochemical parameters of hemp oils of the ‘Finola’, ‘Earlina 8FC’ and ‘S. Jubileu’ varieties. Characteristics of the seeds and oil used in the presented research were described by Golimowski et al. [35]. Niche oils,

due to the small scale of their production and their large amounts of valuable nutritional compounds, are not refined. The process of blanching vegetable oil does not require the use of complex industrial apparatus and can be applied to small quantities of niche oils produced. The study shows that the use of bleaching earths up to 5% results in significant color changes without a significant reduction in the valuable phytosterols found in hemp seed oils. The bleaching process generates some loss of oil, which remains in the bleaching earth. The research shows that this amount is not small, up to 2% of the oil weight, and depends on the earth used. This is important information for niche oil producers.

The purpose of the study was to analyze the effect of the bleaching process on the change in the composition of sterols in oils. Statistical analysis and PCA analysis show that the type of bleaching earth and the variety of hemp seed have a significant effect on the change in the amount of reduced phytosterols in oil. The temperature of the pressed hemp seeds and the amount of earth used had no significant effect on the level of phytosterol reduction in the oil. In conclusion, the bleaching process does not cause significant changes in the amount of phytosterols in hemp seed oils, regardless of the variety and the conditions for obtaining oil from the seeds. The total relative value of phytosterol reduction in all cases was $2.69 \pm 0.69\%$.

Author Contributions: Conceptualization, W.G. and A.K.; methodology, W.G., M.T., D.K. and A.G.; software, A.G. and M.T.; validation, W.G., D.K., D.M. and A.K.; formal analysis, W.G., D.K., A.K. and M.T.; investigation, W.G. and A.K.; resources, M.T., D.M., A.G. and D.K.; data curation, W.G., M.T. and D.K.; writing—original draft preparation, W.G., D.M., M.T., A.G., A.K. and D.K.; writing—review and editing, W.G. and D.K.; visualization, D.K. and W.G.; supervision, W.G.; project administration, A.K.; funding acquisition, W.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by City of Wroclaw support of the program of the Partnership between Higher Education and Science and Business Activity Sector “Mozart”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

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

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

Appendix A

Table A1. The content of phytosterols in the paraffin extracts formed after washing bleaching earth with methanol bleaching earth after bleaching oil from the 'S. Jubileu' variety. Mean values based on $n = 3$.

Independent Variables		Phytosterols Content [mg/g of dm of Extract]										
Temperature	Bleaching Earth	Dose	CSROL	CSNOL	STI	β -S	SIT	$\Delta 5$ -A	$\Delta 5,24$ -SD	$\Delta 7$ -A	24-MC	TOTAL
C		2.5%	3.36 ± 0.03	0.23 ± 0.02	1.03 ± 0.02	12.49 ± 0.03	0.26 ± 0.00	1.08 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.07 ± 0.00	19.34 ± 0.09
H	P1		2.83 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.60 ± 0.01	10.63 ± 0.02	0.26 ± 0.00	0.95 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.44 ± 0.00	0.06 ± 0.00	16.33 ± 0.07
C		5%	3.69 ± 0.02	0.32 ± 0.01	1.08 ± 0.00	13.99 ± 0.15	0.56 ± 0.01	1.31 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.06 ± 0.00	22.10 ± 0.23
H			3.53 ± 0.02	0.26 ± 0.00	0.70 ± 0.01	12.41 ± 0.02	0.25 ± 0.00	1.16 ± 0.00	0.35 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.05 ± 0.00	19.30 ± 0.03
C		2.5%	0.71 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.37 ± 0.01	3.06 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.88 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.11 ± 0.00	5.59 ± 0.02
H	P2		0.66 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.29 ± 0.00	2.40 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.68 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.15 ± 0.01	4.52 ± 0.03
C		5%	0.60 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.22 ± 0.00	2.28 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.10 ± 0.01	4.05 ± 0.03
H			0.52 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.23 ± 0.00	2.13 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.64 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.14 ± 0.00	4.01 ± 0.00
C		2.5%	3.04 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.65 ± 0.01	11.45 ± 0.16	0.22 ± 0.00	0.99 ± 0.00	0.35 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.04 ± 0.00	17.43 ± 0.14
H	P3		2.61 ± 0.02	0.09 ± 0.00	0.51 ± 0.01	9.27 ± 0.03	0.24 ± 0.00	0.80 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.37 ± 0.00	0.04 ± 0.00	14.14 ± 0.04
C		5%	3.90 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.89 ± 0.02	15.21 ± 0.03	0.32 ± 0.00	1.31 ± 0.00	0.45 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.08 ± 0.00	23.19 ± 0.09
H			4.09 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.81 ± 0.01	14.26 ± 0.19	0.43 ± 0.01	1.23 ± 0.01	0.42 ± 0.00	0.59 ± 0.00	0.07 ± 0.00	22.13 ± 0.16
C		2.5%	3.23 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.71 ± 0.01	11.84 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.49 ± 0.01	0.07 ± 0.00	17.97 ± 0.04
H	P4		1.78 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.38 ± 0.00	6.28 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.02 ± 0.00	9.56 ± 0.01
C		5%	3.07 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.67 ± 0.00	10.83 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.05 ± 0.00	16.72 ± 0.02
H			2.81 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.59 ± 0.00	9.47 ± 0.03	0.25 ± 0.00	0.77 ± 0.00	0.24 ± 0.01	0.44 ± 0.00	0.04 ± 0.00	14.75 ± 0.04

Table A1. Cont.

Independent Variables				Phytosterols Content [mg/g of dm of Extract]										
Temperature	Bleaching Earth	Dose		CSROL	CSNOL	STI	β -S	SIT	Δ -5-A	Δ -5,24-SD	Δ -7-A	24-MC	TOTAL	
C		2.5%		2.07 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.47 ± 0.00	7.55 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.58 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.33 ± 0.01	0.07 ± 0.00	11.58 ± 0.05	
H				2.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.47 ± 0.01	7.19 ± 0.04	0.26 ± 0.00	0.61 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.33 ± 0.01	0.02 ± 0.00	11.25 ± 0.05	
C	P5	5%		2.99 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.65 ± 0.01	10.72 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.86 ± 0.00	0.35 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.05 ± 0.00	16.60 ± 0.02	
H				2.84 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.59 ± 0.00	9.53 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.78 ± 0.00	0.26 ± 0.00	0.44 ± 0.00	0.03 ± 0.00	14.88 ± 0.01	
C		2.5%		2.40 ± 0.03	0.12 ± 0.00	0.51 ± 0.01	8.91 ± 0.02	0.21 ± 0.00	0.63 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.38 ± 0.00	0.04 ± 0.00	13.42 ± 0.05	
H				2.07 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.43 ± 0.01	7.37 ± 0.02	0.18 ± 0.00	0.52 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.30 ± 0.00	0.02 ± 0.00	11.20 ± 0.02	
C	P6	5%		3.04 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.65 ± 0.01	10.95 ± 0.16	0.27 ± 0.01	0.87 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.51 ± 0.01	0.05 ± 0.00	16.78 ± 0.05	
H				3.75 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.80 ± 0.01	13.67 ± 0.13	0.40 ± 0.01	1.03 ± 0.00	0.38 ± 0.00	0.63 ± 0.00	0.05 ± 0.01	20.94 ± 0.18	
C		2.5%		4.25 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.91 ± 0.01	15.29 ± 0.02	0.36 ± 0.00	1.05 ± 0.01	0.37 ± 0.00	0.58 ± 0.01	0.08 ± 0.00	23.07 ± 0.05	
H				3.24 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.67 ± 0.00	11.18 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.82 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.40 ± 0.01	0.04 ± 0.00	16.94 ± 0.02	
C	P7	5%		3.26 ± 0.02	0.14 ± 0.00	1.20 ± 0.01	11.31 ± 0.01	0.22 ± 0.00	0.68 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.40 ± 0.00	0.05 ± 0.01	17.45 ± 0.03	
H				3.72 ± 0.01	0.39 ± 0.00	0.82 ± 0.00	13.69 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.99 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.49 ± 0.00	0.03 ± 0.00	20.75 ± 0.01	

C/cold pressed oil; H/hot pressed oil; CSROL/campesterol; CSNOL/campestanol; STI/stigmasterol; β -S/ β -sitosterol; SIT/sitostanol; Δ -5-A/ Δ -5-avenasterol; Δ -5,24-SD/ Δ -5,24-stigmastadienol; Δ -7-A/ Δ -7-avenasterol; 24-MC/24-methylerythrodiol.

Table A2. The content of phytosterols in the poraffin extracts formed after washing bleaching earth with methanol bleaching earth after bleaching oil from the 'Earline' variety. Mean values based on $n = 3$.

Independent Variables			Phytosterols Content [mg/g of dm of Extract]												
Temperature	Bleaching Earth	Dose	CSROL	CSNOL	STI	β -S	SIT	Δ 5-A	Δ 5,24-SD	Δ 7-A	24-MC	TOTAL			
C	H	2.5%	3.93 ± 0.04	0.28 ± 0.00	0.75 ± 0.00	13.13 ± 0.02	0.24 ± 0.02	1.10 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.51 ± 0.00	0.00 ± 0.00	20.35 ± 0.13			
			7.59 ± 0.02	0.84 ± 0.01	1.49 ± 0.01	27.81 ± 1.43	1.09 ± 0.00	2.33 ± 0.01	0.80 ± 0.02	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	42.95 ± 1.50			
C	H	5%	5.49 ± 0.07	0.25 ± 0.00	1.03 ± 0.00	17.59 ± 0.05	0.31 ± 0.02	1.46 ± 0.02	0.54 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.00 ± 0.00	27.32 ± 0.13			
			6.12 ± 0.08	1.10 ± 0.00	1.25 ± 0.00	22.11 ± 0.35	1.14 ± 0.03	1.94 ± 0.00	0.71 ± 0.00	0.93 ± 0.00	0.00 ± 0.00	35.31 ± 0.23			
C	H	2.5%	0.89 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.38 ± 0.01	3.15 ± 0.02	0.14 ± 0.00	0.67 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.03 ± 0.01	5.43 ± 0.03			
			1.97 ± 0.00	0.19 ± 0.00	1.00 ± 0.01	7.53 ± 0.02	1.94 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.27 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.53 ± 0.00	13.84 ± 0.05			
C	H	5%	0.93 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.37 ± 0.00	3.15 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.83 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.00	5.97 ± 0.03			
			1.51 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.54 ± 0.01	5.11 ± 0.00	1.22 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.29 ± 0.00	9.21 ± 0.02			
C	H	2.5%	5.32 ± 0.01	0.59 ± 0.01	1.10 ± 0.01	18.22 ± 0.03	0.42 ± 0.00	1.43 ± 0.01	0.47 ± 0.00	0.64 ± 0.01	0.00 ± 0.00	28.18 ± 0.07			
			7.45 ± 0.03	0.45 ± 0.02	1.36 ± 0.02	25.52 ± 0.15	0.49 ± 0.00	2.06 ± 0.03	0.81 ± 0.00	0.88 ± 0.02	0.08 ± 0.00	39.10 ± 0.03			
C	H	5%	5.95 ± 0.01	0.17 ± 0.00	1.10 ± 0.00	19.19 ± 0.17	0.35 ± 0.00	1.56 ± 0.00	0.67 ± 0.01	0.71 ± 0.03	0.00 ± 0.00	29.69 ± 0.20			
			9.80 ± 0.01	0.56 ± 0.01	2.02 ± 0.00	34.48 ± 0.13	0.88 ± 0.00	2.64 ± 0.01	1.03 ± 0.01	1.12 ± 0.01	0.16 ± 0.00	52.69 ± 0.15			
C	H	2.5%	3.09 ± 0.00	0.23 ± 0.00	1.25 ± 0.00	9.72 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.71 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.44 ± 0.00	0.04 ± 0.01	15.95 ± 0.05			
			5.82 ± 0.00	0.25 ± 0.00	1.14 ± 0.01	19.11 ± 0.03	0.41 ± 0.01	1.49 ± 0.00	0.51 ± 0.01	0.76 ± 0.00	0.13 ± 0.00	29.63 ± 0.06			
C	H	5%	5.33 ± 0.02	0.23 ± 0.00	1.11 ± 0.00	16.13 ± 0.03	0.37 ± 0.01	1.22 ± 0.02	0.53 ± 0.00	0.62 ± 0.02	0.08 ± 0.00	25.60 ± 0.10			
			6.51 ± 0.01	0.43 ± 0.01	1.29 ± 0.02	21.14 ± 0.02	0.40 ± 0.01	1.67 ± 0.05	0.75 ± 0.00	0.86 ± 0.01	0.11 ± 0.00	33.17 ± 0.10			
C	H	2.5%	3.97 ± 0.00	0.18 ± 0.00	0.84 ± 0.01	12.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.51 ± 0.02	0.06 ± 0.01	19.46 ± 0.06			
			5.49 ± 0.00	0.57 ± 0.00	1.11 ± 0.00	18.59 ± 0.01	0.33 ± 0.00	1.56 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.05 ± 0.00	29.00 ± 0.06			
C	H	5%	5.02 ± 0.01	0.30 ± 0.01	1.01 ± 0.00	15.45 ± 0.01	0.39 ± 0.01	1.30 ± 0.00	0.54 ± 0.00	0.67 ± 0.02	0.06 ± 0.00	24.73 ± 0.04			
			5.98 ± 0.02	0.26 ± 0.01	1.17 ± 0.01	19.23 ± 0.15	0.47 ± 0.01	1.71 ± 0.02	0.76 ± 0.00	0.86 ± 0.01	0.09 ± 0.00	30.53 ± 0.19			

Table A2. Cont.

Independent Variables			Phytosterols Content [mg/g of dm of Extract]										
Temperature	Bleaching Earth	Dose	CSROL	CSNOL	STI	β -S	SIT	Δ 5-A	Δ 5,24-SD	Δ 7-A	24-MC	TOTAL	
C		2.5%	3.63 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.73 ± 0.00	11.54 ± 0.00	0.20 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.38 ± 0.00	0.43 ± 0.00	0.00 ± 0.00	17.92 ± 0.02	
H			5.02 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.96 ± 0.01	16.33 ± 0.01	0.36 ± 0.02	1.14 ± 0.00	0.48 ± 0.00	0.59 ± 0.00	0.05 ± 0.00	25.13 ± 0.02	
C	P6	5%	5.30 ± 0.01	0.36 ± 0.00	1.06 ± 0.00	16.83 ± 0.15	0.36 ± 0.01	1.25 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.64 ± 0.01	0.00 ± 0.00	26.39 ± 0.19	
H			4.97 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.95 ± 0.01	16.27 ± 0.02	0.36 ± 0.00	1.31 ± 0.00	0.55 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.07 ± 0.00	25.43 ± 0.01	
C		2.5%	4.85 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.97 ± 0.00	15.28 ± 0.07	0.33 ± 0.01	1.18 ± 0.01	0.31 ± 0.00	0.52 ± 0.01	0.06 ± 0.00	23.74 ± 0.09	
H			6.92 ± 0.03	0.52 ± 0.01	1.36 ± 0.02	23.17 ± 0.08	0.43 ± 0.00	1.75 ± 0.01	0.73 ± 0.00	0.76 ± 0.01	0.07 ± 0.00	35.70 ± 0.01	
C	P7	5%	6.19 ± 0.01	0.22 ± 0.01	1.25 ± 0.00	19.45 ± 0.04	0.34 ± 0.02	1.32 ± 0.00	0.56 ± 0.01	0.58 ± 0.00	0.06 ± 0.00	29.95 ± 0.06	
H			7.13 ± 0.02	0.18 ± 0.00	1.34 ± 0.00	22.86 ± 0.03	0.63 ± 0.00	1.70 ± 0.01	0.74 ± 0.01	0.78 ± 0.00	0.07 ± 0.00	35.44 ± 0.03	

Table A3. The content of phytosterols in the porafin extracts formed after washing bleaching earth with methanol bleaching earth after bleaching oil from the 'Finola' variety. Mean values based on $n = 3$.

Independent Variables			Phytosterols Content [mg/g of dm of Extract]										
Temperature	Bleaching Earth	Dose	CSROL	CSNOL	STI	β -S	SIT	$\Delta 5$ -A	$\Delta 5,24$ -SD	$\Delta 7$ -A	24-MC	TOTAL	
C	P1	2.5%	3.86 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.85 ± 0.02	13.03 ± 0.06	0.23 ± 0.01	1.12 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.56 ± 0.02	0.04 ± 0.00	20.20 ± 0.13	
		5%	5.81 ± 0.08	0.29 ± 0.00	1.32 ± 0.03	19.66 ± 0.63	1.78 ± 0.02	1.83 ± 0.02	0.66 ± 0.01	0.83 ± 0.04	0.13 ± 0.01	32.30 ± 0.94	
H	P1	2.5%	3.59 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.81 ± 0.00	11.93 ± 0.04	0.27 ± 0.00	1.03 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.05 ± 0.00	18.78 ± 0.06	
		5%	6.25 ± 0.02	0.40 ± 0.03	1.42 ± 0.02	20.24 ± 0.38	1.79 ± 0.00	1.93 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.97 ± 0.01	0.14 ± 0.01	33.90 ± 0.49	
C	P2	2.5%	0.52 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.35 ± 0.00	2.02 ± 0.03	0.10 ± 0.00	0.65 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.16 ± 0.01	3.98 ± 0.05	
		5%	1.22 ± 0.02	0.08 ± 0.00	0.52 ± 0.01	4.56 ± 0.02	1.00 ± 0.02	0.21 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	8.00 ± 0.08	
H	P2	2.5%	0.55 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.25 ± 0.00	2.08 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.58 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.00	3.89 ± 0.00	
		5%	1.19 ± 0.00	0.18 ± 0.02	0.54 ± 0.00	4.69 ± 0.01	1.03 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.16 ± 0.01	8.23 ± 0.06	
C	P3	2.5%	2.38 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.53 ± 0.02	7.91 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.62 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.04 ± 0.00	12.23 ± 0.04	
		5%	3.06 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.73 ± 0.01	10.56 ± 0.07	0.25 ± 0.00	0.93 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.05 ± 0.00	16.69 ± 0.14	
H	P3	2.5%	3.13 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.73 ± 0.01	10.22 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.37 ± 0.00	0.05 ± 0.00	15.83 ± 0.00	
		5%	4.18 ± 0.10	0.29 ± 0.01	0.96 ± 0.02	13.83 ± 0.05	0.27 ± 0.02	1.16 ± 0.02	0.42 ± 0.00	0.51 ± 0.01	0.07 ± 0.02	21.70 ± 0.05	
C	P4	2.5%	2.94 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.58 ± 0.00	8.90 ± 0.01	0.25 ± 0.00	0.46 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.27 ± 0.00	0.00 ± 0.00	13.74 ± 0.02	
		5%	3.40 ± 0.09	0.16 ± 0.01	1.48 ± 0.01	10.88 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.82 ± 0.00	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.00	0.05 ± 0.01	17.92 ± 0.15	
H	P4	2.5%	3.42 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.73 ± 0.00	10.46 ± 0.04	0.23 ± 0.00	0.49 ± 0.00	0.32 ± 0.00	0.33 ± 0.01	0.00 ± 0.00	16.06 ± 0.05	
		5%	3.59 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.86 ± 0.01	11.36 ± 0.06	0.27 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.10 ± 0.00	18.11 ± 0.14	
C	P5	2.5%	3.02 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.60 ± 0.01	9.39 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.65 ± 0.00	0.30 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.00 ± 0.00	14.61 ± 0.02	
		5%	2.55 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.60 ± 0.04	8.16 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.64 ± 0.02	0.24 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.06 ± 0.01	12.95 ± 0.09	
H	P5	2.5%	3.51 ± 0.02	0.17 ± 0.00	0.73 ± 0.00	10.80 ± 0.05	0.24 ± 0.01	0.75 ± 0.02	0.32 ± 0.00	0.37 ± 0.00	0.00 ± 0.00	16.89 ± 0.08	
		5%	4.06 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.96 ± 0.00	12.61 ± 0.03	0.45 ± 0.00	1.09 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.55 ± 0.03	0.10 ± 0.00	20.37 ± 0.00	

Table A3. *Cont.*

Independent Variables			Phytosterols Content [$\mu\text{g/g}$ of dm of Extract]									
Temperature	Bleaching Earth	Dose	CSROL	CSNOL	STI	β -S	SIT	$\Delta 5$ -A	$\Delta 5,24$ -SD	$\Delta 7$ -A	24-MC	TOTAL
C		2.5%	2.03 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	0.45 \pm 0.01	6.51 \pm 0.01	0.14 \pm 0.00	0.39 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00	0.24 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	10.10 \pm 0.01
H	P6	2.5%	3.38 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01	0.79 \pm 0.01	10.90 \pm 0.02	0.39 \pm 0.00	0.77 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	17.20 \pm 0.05
C		5%	3.02 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.68 \pm 0.00	9.58 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00	0.68 \pm 0.01	0.34 \pm 0.01	0.38 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00	15.00 \pm 0.03
H		5%	5.35 \pm 0.06	0.14 \pm 0.02	1.21 \pm 0.00	17.17 \pm 0.10	0.43 \pm 0.00	1.26 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01	0.68 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	26.92 \pm 0.21
C		2.5%	3.32 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01	0.79 \pm 0.00	11.06 \pm 0.13	0.28 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00	0.30 \pm 0.01	0.36 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	16.83 \pm 0.12
H	P7	2.5%	4.62 \pm 0.06	0.15 \pm 0.00	1.06 \pm 0.01	14.41 \pm 0.41	0.31 \pm 0.02	0.96 \pm 0.00	0.35 \pm 0.00	0.56 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	22.42 \pm 0.50
C		5%	3.24 \pm 0.01	0.07 \pm 0.00	0.74 \pm 0.00	10.22 \pm 0.01	0.26 \pm 0.00	0.62 \pm 0.01	0.35 \pm 0.00	0.35 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	15.90 \pm 0.04
H		5%	5.53 \pm 0.00	0.35 \pm 0.01	1.33 \pm 0.03	17.61 \pm 0.21	0.47 \pm 0.00	1.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00	0.67 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	27.96 \pm 0.24

References

1. Fridrihsone, A.; Romagnoli, F.; Cabulis, U. Environmental Life Cycle Assessment of Rapeseed and Rapeseed Oil Produced in Northern Europe: A Latvian Case Study. *Sustainability* **2020**, *12*, 5699. [CrossRef]
2. Kumar, A.; Sharma, A.; Upadhyaya, K.C. Vegetable Oil: Nutritional and Industrial Perspective. *Curr. Genom.* **2016**, *17*, 230–240. [CrossRef] [PubMed]
3. Czwartkowski, K.; Wierzbic, A.; Golimowski, W. Quality, Key Production Factors, and Consumption Volume of Niche Edible Oils Marketed in the European Union. *Sustainability* **2022**, *14*, 1846. [CrossRef]
4. Aydın, C. Physical properties of almond nut and kernel. *J. Food Eng.* **2003**, *60*, 315–320. [CrossRef]
5. Charrouf, Z.; Guillaume, D. The argan oil project: Going from utopia to reality in 20 years. *OCL—Oilseeds Fats Crop. Lipids* **2018**, *25*, D209. [CrossRef]
6. Cervantes-Paz, B.; Yahia, E.M. Avocado oil: Production and market demand, bioactive components, implications in health, and tendencies and potential uses. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 4120–4158. [CrossRef]
7. El-Hamidi, M.; Zaher, F.A. Production of vegetable oils in the world and in Egypt: An overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2018**, *42*, 19. [CrossRef]
8. Spinei, M.; Oroian, M. The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances. *Foods* **2021**, *10*, 867. [CrossRef]
9. Fathi-Achachlouei, B.; Azadmard-Damirchi, S. Milk Thistle Seed Oil Constituents from Different Varieties Grown in Iran. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 643–649. [CrossRef]
10. Savic, I.; Gajic, I.S.; Gajic, D. Physico-Chemical Properties and Oxidative Stability of Fixed Oil from Plum Seeds (*Prunus domestica* Linn.). *Biomolecules* **2020**, *10*, 294. [CrossRef]
11. Fahimdanesh, M. Evaluation of Physicochemical Properties of Iranian Tomato Seed Oil. *J. Nutr. Food Sci.* **2013**, *3*, 3–6. [CrossRef]
12. Matthäus, B.; Brühl, L. Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 655–661. [CrossRef]
13. Landucci, G.; Pannocchia, G.; Pelagagge, L.; Nicoletta, C. Analysis and simulation of an industrial vegetable oil refining process. *J. Food Eng.* **2013**, *116*, 840–851. [CrossRef]
14. Pal, U.S.; Patra, R.K.; Sahoo, N.R.; Bakthara, C.K.; Panda, M.K. Effect of refining on quality and composition of sunflower oil. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 4613–4618. [CrossRef] [PubMed]
15. Verhé, R.; Verleyen, T.; Hoed, V.; De, W. Influence of refining of vegetable oils on minor components. *J. Oil Palm Res.* **2006**, *18*, 168–179.
16. Lamas, D.L.; Constenla, D.T.; Raab, D. Effect of degumming process on physicochemical properties of sunflower oil. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *6*, 138–143. [CrossRef]
17. Przybylski, R. Canola/Rapeseed Oil. In *Vegetable Oils in Food Technology*; Gustone, F.G., Ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2011; pp. 107–136.
18. Łaska-Zieja, B.; Golimowski, W.; Marcinkowski, D.; Niedbała, G.; Wojciechowska, E. Low-cost investment with high quality performance. Bleaching earths for phosphorus reduction in the low-temperature bleaching process of rapeseed oil. *Foods* **2020**, *9*, 603. [CrossRef]
19. Matthäus, B. *Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 2*; Gupta, S.K., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2012; ISBN 978-1-4614-0826-0.
20. Ramli, M.R.; Siew, W.L.; Ibrahim, N.A.; Hussein, R.; Kuntom, A.; Razak, R.A.A.; Nesaretnam, K. Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1839–1844. [CrossRef]
21. Sim, B.I.; Muhamad, H.; Lai, O.M.; Abas, F.; Yeoh, C.B.; Nehdi, I.A.; Khor, Y.P.; Tan, C.P. New insights on degumming and bleaching process parameters on the formation of 3-monochloropropane-1,2-diol esters and glycidyl esters in refined, bleached, deodorized palm oil. *J. Oleo Sci.* **2018**, *67*, 397–406. [CrossRef]
22. Didi, M.; Makhoukhi, B.; Azzouz, A.; Villemin, D. Colza oil bleaching through optimized acid activation of bentonite. A comparative study. *Appl. Clay Sci.* **2009**, *42*, 336–344. [CrossRef]
23. Dijkstra, A.J. Bleaching. In *Edible Oil Processing from a Patent Perspective*; Springer: Boston, MA, USA, 2013; pp. 173–198. ISBN 978-1-4614-3351-4.
24. Mba, O.I.; Dumont, M.J.; Ngadi, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry—A review. *Food Biosci.* **2015**, *10*, 26–41. [CrossRef]
25. Sehn, G.; Gonçalves, L.; Ming, C. Ultrafiltration-based degumming of crude rice bran oil using a polymer membrane. *Grasas Y Aceites* **2016**, *67*, e120. [CrossRef]
26. Carmo, A.L.V.; Angélica, R.S.; Paz, S.P.A. Ageing characteristics related to cation exchange and interlayer spacing of some Brazilian bentonites. *Heliyon* **2021**, *7*, e06192. [CrossRef] [PubMed]
27. Amutenya, E.L.M.; Zhou, F.; Liu, J.; Long, W.; Ma, L.; Liu, M.; Lv, G. Preparation of humic acid-bentonite polymer composite: A heavy metal ion adsorbent. *Heliyon* **2022**, *8*, e09720. [CrossRef] [PubMed]
28. Wang, F.; Zhang, R.; Donne, S.W.; Beyad, Y.; Liu, X.; Duan, X.; Yang, T.; Su, P.; Sun, H. Co-pyrolysis of wood chips and bentonite/kaolin: Influence of temperatures and minerals on characteristics and carbon sequestration potential of biochar. *Sci. Total Environ.* **2022**, *838*, 156081. [CrossRef] [PubMed]
29. Ramanaiah, S.V.; Venkata Mohan, S.; Sarma, P.N. Adsorptive removal of fluoride from aqueous phase using waste fungus (*Pleurotus ostreatus* 1804) biosorbent: Kinetics evaluation. *Ecol. Eng.* **2007**, *31*, 47–56. [CrossRef]

30. Temerdashev, Z.; Abakumov, A.; Bolshov, M.; Khalafyan, A.; Ageeva, N.; Vasilyev, A.; Ramazanov, A. Instrumental assessment of the formation of the elemental composition of wines with various bentonite clays. *Microchem. J.* **2022**, *175*, 107145. [[CrossRef](#)]
31. Ifa, L.; Wiyani, L.; Nurdjannah, N.; Ghalib, A.M.T.; Ramadhaniar, S.; Kusuma, H.S. Analysis of bentonite performance on the quality of refined crude palm oil's color, free fatty acid and carotene: The effect of bentonite concentration and contact time. *Heliyon* **2021**, *7*, e07230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Galasso, I.; Russo, R.; Mapelli, S.; Ponzoni, E.; Brambilla, I.M.; Battelli, G.; Reggiani, R. Variability in seed traits in a collection of cannabis sativa L. genotypes. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 20–25. [[CrossRef](#)]
33. Schluttenhofer, C.; Yuan, L. Challenges towards Revitalizing Hemp: A Multifaceted Crop. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 917–929. [[CrossRef](#)]
34. Shahzad, N.; Khan, W.; MD, S.; Ali, A.; Saluja, S.S.; Sharma, S.; Al-Allaf, F.A.; Abduljaleel, Z.; Ibrahim, I.A.A.; Abdel-Wahab, A.F.; et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *88*, 786–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Golimowski, W.; Teleszko, M.; Marcinkowski, D.; Kmiecik, D.; Grygier, A.; Kwaśnica, A. Quality of Oil Pressed from Hemp Seed Varieties: 'Earlina 8FC', 'Secuieni Jubileu' and 'Finola'. *Molecules* **2022**, *27*, 3171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Siano, F.; Moccia, S.; Picariello, G.; Russo, G.L.; Sorrentino, G.; Di Stasio, M.; La Cara, F.; Volpe, M.G. Comparative Study of Chemical, Biochemical Characteristic and ATR-FTIR Analysis of Seeds, Oil and Flour of the Edible Fedora Cultivar Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Molecules* **2019**, *24*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ferrari, R.A.; Schulte, E.; Esteves, W.; Brühl, L.; Mukherjee, K.D. Minor constituents of vegetable oils during industrial processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 587–592. [[CrossRef](#)]
38. Chew, S.C.; Ali, M.A. Recent advances in ultrasound technology applications of vegetable oil refining. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *116*, 468–479. [[CrossRef](#)]
39. Verleyen, T.; Szulczewska, A.; Verhe, R.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; De Greyt, W. Comparison of steradiene analysis between GC and HPLC. *Food Chem.* **2002**, *78*, 267–272. [[CrossRef](#)]
40. Bai, G.; Ma, C.; Chen, X. Phytosterols in edible oil: Distribution, analysis and variation during processing. *Grain Oil Sci. Technol.* **2021**, *4*, 33–44. [[CrossRef](#)]
41. Varleyen, T.; Cortes, E.; Varhe, R.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; De Greyt, W. Factors determining the steradiene formation in bleaching and deodorisation | Request PDF. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 331–339. [[CrossRef](#)]
42. Chew, S.C.; Nyam, K.L. Refining of edible oils. In *Lipids Edible Oils*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 213–241. ISBN 9780128171059. [[CrossRef](#)]
43. Temme, H.; Sohling, U.; Suck, K.; Ruf, F.; Niemeyer, B. Selective adsorption of aromatic ketones on kerolite clay for separation in biocatalytic applications. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *377*, 290–296. [[CrossRef](#)]
44. Soetaredjo, F.E.; Laysandra, L.; Putro, J.N.; Santoso, S.P.; Angkawijaya, A.E.; Yuliana, M.; Ju, Y.H.; Zhou, C.H.; Ismadji, S. Ecological-safe and low-cost activated-bleaching earth: Preparation, characteristics, bleaching performance, and scale-up production. *J. Clean. Prod.* **2021**, *279*, 123793. [[CrossRef](#)]
45. Essid, K.; Trabelsi, M.; Frikha, M.H. Oxidative stability of neutralized oils bleached with clays activated with ultrasound. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *89*, 268–272. [[CrossRef](#)]
46. El-Mallah, M.; El-Shami, S. Effect of chemical refining steps on the minor and major components of cottonseed oil. *Agric. Biol. J. North Am.* **2011**, *2*, 341–349. [[CrossRef](#)]
47. Igansi, A.V.; Engelmann, J.; Lütke, S.F.; Porto, F.B.; Pinto, L.A.A.; Cadaval, T.R.S. Isotherms, kinetics, and thermodynamic studies for adsorption of pigments and oxidation products in oil bleaching from catfish waste. *Chem. Eng. Commun.* **2019**, *206*, 1410–1424. [[CrossRef](#)]
48. Dijkstra, A.J. What to Do with Spent Bleaching Earth? A Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2020**, *97*, 565–575. [[CrossRef](#)]
49. Mo, S.; Dong, L.; Hurst, W.J.; van Breemen, R.B. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Lipids* **2013**, *48*, 949–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Qian, Y.; Grygier, A.; Majewski, A.; Walkowiak-Tomczak, D.; Siger, A.; Rudzińska, M. Purity of Olive Oil Commercially Available in Poland. *J. Oleo Sci.* **2022**, *71*, 43–50. [[CrossRef](#)]

V.1.3 Publikacja 3

TYTUŁ:

Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of Cannabis sativa Leaves

AUTORZY:








Kwaśnica A, Pachura N, Carbonell-Barrachina ÁA, Issa-Issa H, Szumny D, Figiel A, Masztalerz K, Klemens M, Szumny A.

CZASOPISMO:

Molecules 2023, 28(24), 8089; <https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

Article

Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of *Cannabis sativa* Leaves

Andrzej Kwaśnica ^{1,*} , Natalia Pachura ^{1,*} , Ángel A. Carbonell-Barrachina ² , Hanán Issa-Issa ² ,
Dorota Szumny ³, Adam Figiel ⁴ , Klaudia Masztalerz ⁴ , Marta Klemens ¹ and Antoni Szumny ¹ 

¹ Department of Food Chemistry and Biocatalysis, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland; antoni.szumny@upwr.edu.pl (A.S.)

² Departamento Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, 03312 Orihuela, Spain

³ Department of Pharmacology, Wrocław Medical University, ul. Jana Mikulicza-Radeckiego 2, 50-345 Wrocław, Poland

⁴ Institute of Agricultural Engineering, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chelmońskiego 37a, 51-630 Wrocław, Poland

* Correspondence: andrzej.kwasnica@upwr.edu.pl (A.K.); natalia.pachura@upwr.edu.pl (N.P.)

Abstract: Hemp is used as a source of fiber, oil and bioactive substances including volatile and cannabinoid-containing substances. This paper presents, for the first time, results on the evaluation of drying methods (convective, vacuum–microwave and combined convective pre-drying and vacuum–microwave finishing drying) of hemp leaves on the qualitative and quantitative changes in secondary metabolites, including essential oils, cannabinoids and sterols. A ranking and descriptive test of hemp leaves was also performed. Drying kinetics was presented using three models, including logarithmic, Midilli and modified Page. The SPME–Arrow technique was used to determine 41 volatile compounds, of which caryophyllene, β -myrcene and α -humulene were dominant in dried and fresh leaves. Regarding the essential oils obtained, 64 were identified, with caryophyllene, humulene epoxide II and limonene being the dominant ones. For preserving the highest amount of oils, the best method was the convective pre-drying followed by vacuum–microwave finishing drying (CD60-VMD) combined method, where the retention of volatile compounds was 36.08%, whereas the CD70 and 240-VMD methods resulted in the highest loss of 83%. The predominant cannabinoids in fresh hemp leaves were CBDA 6.05 and CBD 2.19 mg g⁻¹. Drying caused no change in the cannabinoid profile of the plant material. β -Sitosterol, campesterol and lupeol were dominant in the phytosterol and triterpene fractions. No changes in either quality or quantity were observed in any of the variants found.

Keywords: cannabinoids; drying; essential oils; GC-MS; profiling terpenoids; sensory analysis



Citation: Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.; Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of *Cannabis sativa* Leaves. *Molecules* **2023**, *28*, 8089. <https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

Academic Editor: Kemal Husnu Can Baser

Received: 30 October 2023

Revised: 6 December 2023

Accepted: 11 December 2023

Published: 14 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/>).

1. Introduction

Hemp (*Cannabis sativa* L.), known as cannabis, is a valued raw material used in the food industry, pharmaceuticals, cosmetics, the paper industry, etc. The most valuable of hemp's metabolites are cannabinoids, such as cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC), and cannabigerol (CBG) and their acidic forms, essential oils (EOs) and phytosterols [1]. Although the raw material used in the extraction of secondary metabolites is mainly hemp inflorescences, their leaves are an important, albeit underestimated, component of hemp processing. Hemp leaves are widely used industrially as livestock feed, animal bedding textile material, construction and paper components, fuel and biochar substrate [2]. Due to their high mass proportion relative to the inflorescences, despite their lower substance content, they can be a source of valuable phytochemicals such as essential oils or cannabinoids [3]. The extraction of essential oils in the case of raw herbal materials is performed usually from dried material. The effect of the type of drying method

of plant material on the profile of secondary metabolites has been proved repeatedly. This is particularly noticeable for essential oils, which, due to their volatility, evaporate very easily during the drying process. Losses of essential oils, depending on the type of plant material, can range from a few to more than 90% of the initial content [4]. Although the most common industrial method of drying herbs is convection drying, it is very rarely optimal in terms of preventing losses of volatile fractions. It should be emphasized here that in the case of industrial drying processes, it is very important to find a compromise between the cost intensity of the process, its efficiency, as well as quality, understood as the content of active compounds and sensory acceptability of the obtained products for consumers. A number of review publications have described how the drying process is a key element of quality assurance. It is a kind of result of two opposing processes, i.e., the loss of volatile components with increasing temperature and the passage of drying time [5,6]. Our experience, as well as that of other groups of researchers, indicates that we cannot predict which of the available drying variants will be the most conservative for the volatile material. Thus, for the volatile compounds present in *Origanum vulgare* [7], the most favorable drying method was vacuum-microwave drying, while for *Thymus vulgaris*, it was a combined 40 °C (pre-drying) and 480 W microwave power [8]. In contrast, for lavender flowers, convection drying at 50 °C had the lowest losses and highest acceptability for the sensory panel [9].

Thus, it seems rational to develop and use a drying technology that will most preserve the volatile compounds present in the plant material [6]. At the same time, the phenomenon of changing the profile of cannabinoids (mainly decarboxylation of acidic forms) during thermal processing and storage of cannabis is described. It has been described that drying of plant material at a relatively low temperature of 50 °C causes a loss of acidic forms of cannabinoids [10,11]. It is known that the therapeutic value of cannabis extracts from the cannabis plant depends not only on the content of various cannabinoids, but also on the ratio of acidic and neutral forms [12]. Hemp leaves are commonly used, also, as an herbal medicinal material or as an ingredient in beverages. They are also applied as a spice or substitute for lettuce for direct consumption. Due to the above, it is important to preserve their desired sensory characteristics during the drying process. Many papers have been published describing the effect of drying on the composition of secondary metabolites of hemp inflorescences [13–15].

The presented research shows for the first time what effects various methods of drying Henola hemp leaves, including convection, microwave, and combined, have on the profile of volatile compounds (EOs), phytosterols and cannabinoids. Also, the best drying variant for the sensory characteristics of hemp leaves is pointed out.

2. Results and Discussion

2.1. Drying Kinetics

The drying kinetics of cannabis leaves dried by convective drying (CD) (a), vacuum-microwave drying (VMD) (b) and combined drying (CD-VMD) (c) are shown in Figure 1, while Table 1 presents models used to fit the experimental data.

Three models were used, namely the modified Page, logarithmic and Midilli models. All of them presented a very good fit, determined on the basis of high values of the coefficient of determination ($R^2 > 0.9$) and low values of RMSE. The modified Page and Midilli models were previously used to describe the drying kinetics of hemp leaves in the study by Chasiotis and Filios [16]. As can be seen in Table 2, VMD480 drying was poorly described by the logarithmic model ($R^2 > 0.9527$, RMSE = 0.0816), while both modified Page and Midilli models proved to be more suitable to describe more intense drying process, as depicted by the drying kinetics of VMD480. Overall, the Midilli model was selected as the best choice to describe the drying kinetics of hemp leaves.

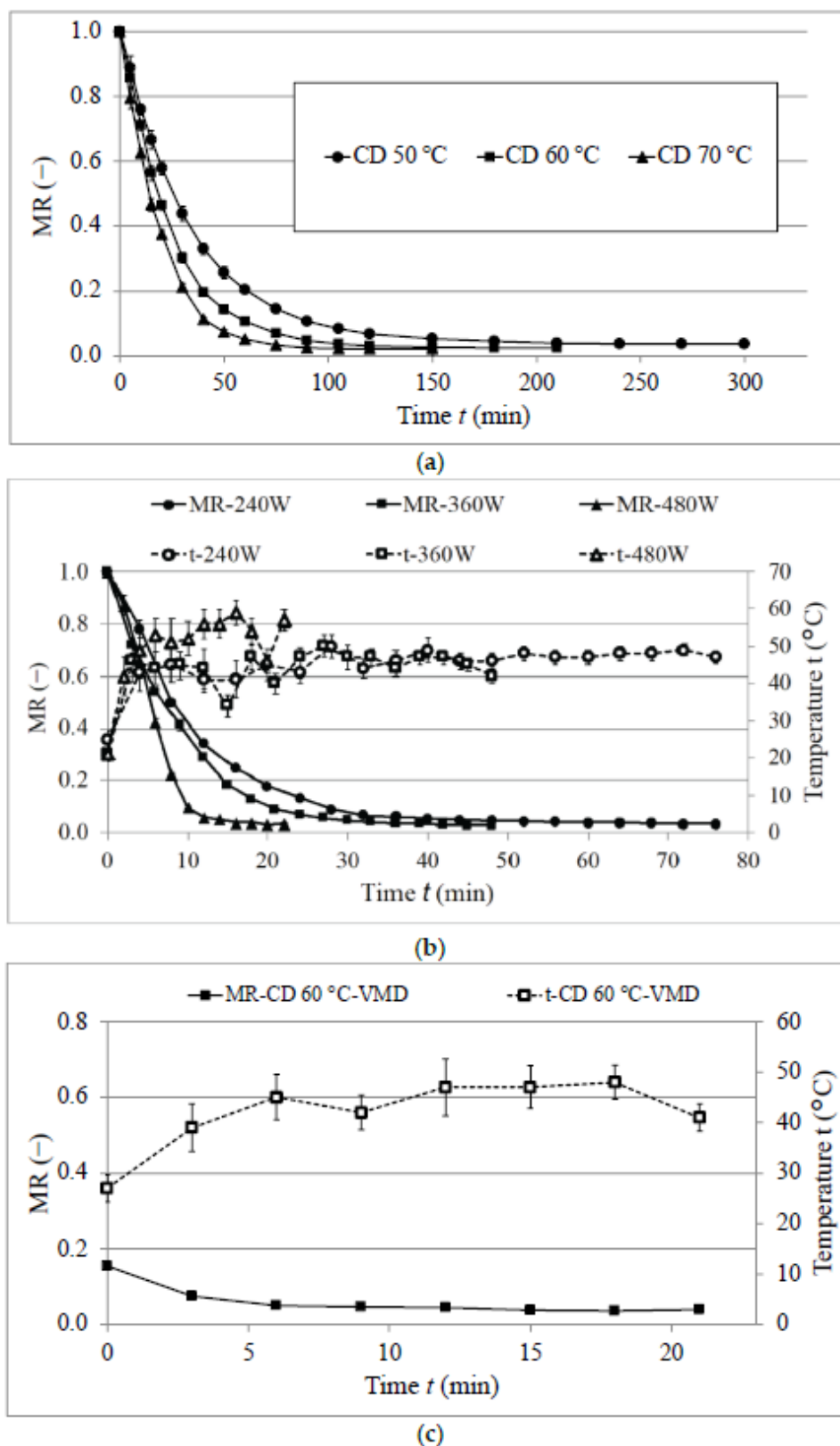


Figure 1. Drying kinetics of the samples treated by (a) convective drying (CD), (b) vacuum-microwave drying (VMD) and (c) combined convective pre-drying and vacuum-microwave finishing drying (CD-VMD).

Table 1. Mathematical models applied to fit experimental data during drying of hemp leaves.

Model Name	Drying Conditions	Constants			Statistics		
		<i>a</i>	<i>k</i>	<i>b</i>	RMSE	<i>R</i> ²	
Logarithmic	CD50	1.000	0.0301	0.0327	0.0102	0.9991	
	CD60	1.000	0.0412	0.0217	0.0125	0.9987	
	CD70	1.000	0.0525	0.0129	0.0121	0.9988	
	VMD240	1.000	0.0936	0.0291	0.0181	0.9958	
	VMD360	1.000	0.1111	0.0195	0.0154	0.9972	
	VMD480	1.000	0.1595	0.0055	0.0816	0.9527	
	CD60-VMD	0.115	0.3897	0.0395	0.0028	0.9966	
		<i>a</i>	<i>k</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	RMSE	<i>R</i> ²
Midilli	CD50	1.000	0.0288	0.9874	0.00015	0.0082	0.9994
	CD60	1.000	0.0307	1.0751	0.00017	0.0104	0.9991
	CD70	1.000	0.0403	1.0788	0.00018	0.0064	0.9997
	VMD240	1.000	0.0638	1.1228	0.00060	0.0143	0.9975
	VMD360	1.000	0.0930	1.0120	0.00071	0.0123	0.9984
	VMD480	1.000	0.0342	1.8377	0.00178	0.0113	0.9992
	CD60-VMD	0.155	0.4330	0.5643	0.01173	0.0027	0.9974
		<i>a</i>	<i>k</i>	<i>n</i>		RMSE	<i>R</i> ²
Modified Page	CD50	1.000	0.0332	0.9389		0.0218	0.9956
	CD60	1.000	0.0338	1.0367		0.0185	0.9970
	CD70	1.000	0.0436	1.0465		0.0136	0.9984
	VMD240	1.000	0.0806	1.0133		0.0277	0.9901
	VMD360	1.000	0.1087	0.9782		0.0193	0.9957
	VMD480	1.000	0.0393	1.7355		0.0245	0.9957
	CD60-VMD	0.155	0.5665	0.3242		0.0043	0.9959

Table 2. Maximum temperature (*T*_{max}), time of drying (*t*_{CD}, *t*_{VMD}) and color of hemp leaves.

Drying Method	<i>T</i> _{max} °C	<i>t</i> _{CD} min	<i>t</i> _{VMD} min	Color		
				<i>L</i> [*]	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]
CD50	50	300	-	43.27 ± 0.11 ^{a,1}	-4.32 ± 0.89 ^a	12.01 ± 0.31 ^{a,c}
CD60	60	210	-	43.45 ± 0.2 ^{a,d}	-3.21 ± 0.29 ^b	12.53 ± 0.27 ^a
CD70	70	150	-	44.08 ± 0.24 ^d	-3.51 ± 0.24 ^{b,c}	14.21 ± 0.22 ^d
VMD240	50	-	76	41.29 ± 0.3 ^e	-3.31 ± 0.1 ^{b,c}	11.49 ± 0.09 ^{b,c}
VMD360	50	-	48	42.93 ± 0.18 ^{a,c}	-4.02 ± 0.14 ^{a,c}	12.37 ± 0.13 ^a
VMD480	59	-	22	42.09 ± 0.44 ^b	-3.29 ± 0.26 ^{b,c}	12.4 ± 0.19 ^a
CD60-VMD	48	60	21	42.49 ± 0.64 ^{b,c}	-3.88 ± 0.29 ^{a,b,c}	11.18 ± 0.46 ^b

¹ Mean values followed by the same letter were not significantly different (*p* < 0.05) according to the HSD Tukey's least significance difference test. CD—convective drying, VMD—vacuum-microwave drying, *L*—lightness, *a*—red/green, *b*—blue/yellow value. *—according to CIELab convention.

In all models, the value of parameter *a* was equal to 1, as it shows the starting point for CD and VMD, while in the case of combined drying it was significantly lower, pointing to the beginning of the vacuum-microwave finishing drying. Parameter *k* in the models represented a drying rate. During CD, the *k* parameter was lower than during VMD and increased with an increase in the temperature of the hot air. This is consistent with the studies on the drying of hemp leaves [16]. Higher temperatures during CD accelerated the water evaporation from the surface of the material, leading to a shorter time of drying. An increase in temperature from 50 °C to 70 °C resulted in a significant reduction in drying time, from 300 min for 50 °C to 150 min in the case of 70 °C (Table 3). The VMD method proved to significantly reduce drying time compared to CD despite the power of magnetrons used. Vacuum-microwave drying has been reported for its ability to significantly reduce the drying time compared to other methods such as convective and freeze-drying [17]. This

is due to the volumetric heating occurring when the microwaves are applied. As a result, the material is heated from the inside, and an additional pressure gradient between the material and the environment increases the water evaporation, leading to a shorter time for the process. The application of higher power during VMD increases the drying rate, which can be seen as a higher k parameter (Table 1). A higher power of magnetrons also increases the temperature of the material, which can reduce the amount of thermolabile compounds in the dried hemp leaves. The obtained results are consistent with the previous studies on hemp flowers [14]. On the other hand, it is worth noting that the highest temperatures of the material were obtained during CD70 ($T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$), and an increase in power during VMD resulted in still lower temperatures of the material. However, the temperatures in the study were measured on the surface of the material, and the actual temperature in the inside might be different. The combination of CD as a pre-treatment with VMD has been reported for its ability to enhance the quality of the products with the following mechanism: pre-drying lowered the unbound moisture of fresh material without any impact on the bioactive compounds of the material, followed by vacuum-microwave drying that brought the moisture content to a certain desired level [18]. In the present study, the application of combined drying reduced the drying time as compared to CD; however, it still resulted in a longer time than when only VMD methods were applied.

According to the decrease in the moisture ratio (Figure 1), it can be observed that only a falling rate period can be distinguished in the convective drying of hemp leaves. This behavior indicates that drying kinetics is controlled by internal liquid diffusion governed by internal heat and mass transfer [19]. This is consistent with previous studies on sage [20] and hemp leaves [16]. On the other hand, during VMD, a constant rate period could be identified, followed by a falling rate period. This can be due to the high initial moisture content in the materials, which led to high microwave absorption resulting in intense water evaporation at the beginning of drying. Then, when the process progressed, the falling rate period could be reported when the drying rate decreased as a result of the dominance of the internal diffusion of bound water, which is consistent with the previous studies [8].

The effects of drying methods and parameters of the process on the color of dried hemp leaves was assessed and is presented in Table 2. Samples treated by CD were significantly brighter (L^*) than hemp leaves dried by VMD and CD-VMD techniques. Increases in both temperature during CD as well as the power of magnetrons during VMD led to the increase in the b^* parameter, which means a shifting towards yellowness. VMD and CD-VMD had the lowest values for yellowness (b^*) compared to the yellowness of the leaves that were treated with the CD treatment. Color degradation commonly occurred during the drying process due to thermal exposure; thus, minimizing thermal exposure during the drying process is expected to lower the color degradation [18]. The same result was observed wherein a higher temperature of CD damaged the color of thyme leaves [21].

2.2. Volatile Compounds

2.2.1. HS-SPME-Arrow and Essential Oils Profile of Fresh Hemp Leaves

Volatile organic compounds were analyzed by GC-MS analysis of essential oils and aroma profile analysis using HS-SPME. For the essential oil profile, 66 compounds were determined, 64 of which were identified. On the contrary, 41 compounds were found in the aroma profile, all of which were identified (Table 3). The vast majority of them belong to the group of terpenes and terpenoids.

Table 4 presents the results obtained. For essential oils, the volatile dominating compounds proved to be caryophyllene ($33.18\% \pm 2.76$), humulene epoxide II ($8.25\% \pm 0.45$), limonene ($4.67\% \pm 0.35$), caryophyllene oxide ($4.65\% \pm 0.76$), humulene ($3.57\% \pm 0.56$), which represented 55% of all EOs. This pattern of terpenes is characteristic of *Cannabis sativa* [22,23]. The aroma profile of the hemp leaves was dominated by (*E*)- β -caryophyllene ($30.95\% \pm 2.35$), α -humulene ($11.22\% \pm 0.86$), β -myrcene ($8.25\% \pm 1.45$), β -selinene ($8.95\% \pm 1.01$), limonene ($5.47\% \pm 0.88$), α -selinene ($7.00\% \pm 0.89$), which together provided 72% of the total fraction of VOCs. A difference in the two profiles was also observed,

with β -myrcene, α -humulene, β -selinene and α -selinene only in the aromatic profile (HS-SPME). Such variation in quantitative and qualitative content in the analysis of essential oils and VOCs is a well-known phenomenon. Obtaining essential oil requires the use of boiling water or steam, which completely degrades the glandular trichomes. In contrast, the low process temperature used during the microextraction technique to reach the solid phase causes volatile components that are less shielded by trichomes to volatilize and consequently be absorbed on the CAR/DVB/PDMS fiber.

On the contrary, compounds from the sesquiterpene group and sesquiterpenoids appeared significantly more in EOs, and compounds from the cannabinoid group were also observed: CBD (14.78% \pm 1.21), cannabidiol (0.13% \pm 0.03), Δ^8 -THC (0.09% \pm 0.02), CBC (0.27% \pm 0.06) and Δ^9 -THC (0.14% \pm 0.04). Comparing the two profiles, a similar α -pinene content (HS-SPME 2.24% vs. EOs 2.35%) was also noted, as well as a 15-fold higher terpinolene content in the aromatic profile than in the EOs profile and a 10 times higher humulene epoxide II content in the EOs than in HS-SPME. Absent in the volatile fraction analyzed by the SPME technique of cannabinoids, most sesquiterpenoids and the diterpenoid phytol are caused by their very low volatility. Only the work of Woźniczka et al. [24] observed the possibility of determining cannabinoids in biological matrices by SPME methods, but the authors there adsorbed aromatics directly into the liquid matrix.

No work describing the aromatic profile made with HS-SPME for hemp leaves has appeared so far. However, for oils, De Vita et al. [25], in Futura 75 hemp leaves, showed the presence of β -caryophyllene (13.82%), humulene (5.33%), caryophyllene oxide (5.7%) and bisabolol oxide (5.12%) as the main constituents of the essential oil. However, for cannabinoids, CBD was by far the dominant one, with 28.5%, twice that obtained in our study, which may be due to the variety of hemp used. Nagy et al. [26] defined the oil yield in leaves as 0.06%, which is more than 2.5 times lower than the data we obtained (0.16%). Regarding the chemical composition of the essential oil from hemp leaves, caryophyllene was also found to be the main constituent, with a percentage of 28.5%, which is in line with the result obtained by us. However, Nagy et al. [26] in their work obtained a higher humulene content (9.3%) and a lower humulene epoxide II content (1.2%). As far as cannabinoids are concerned, CBD was also the main component, and its variance (11.2%) is analogous to the content in the table below.

Table 3. Aroma profile (HS-SPME) and essential oils profile of fresh hemp leaves.

Compound	RI Exp. ¹	RI Adams ²	RI NIST20 ³	HS-SPME Content % ⁴	Essential Oil Content % ⁴	Identification ⁵
Hexanal	802	801	800	0.29 \pm 0.12	Nd ⁶	MS, RI, AS
3-Hexenal	804	794	810	nd	1.23 \pm 0.09	MS, RI, AS
2-Hexenal	851	855	851	1.98 \pm 0.27	0.74 \pm 0.07	MS, RI, AS
3-Hexen-1-ol	818	859	857	0.81 \pm 0.09	nd	MS, RI
cis-2-Hexen-1-ol	840	867	868	0.32 \pm 0.03	nd	MS, RI
Santolina triene	893	908	908	0.24 \pm 0.05	nd	MS, RI
n-Heptanal	904	895	901	nd	0.10 \pm 0.02	MS, RI, AS
Artemisia triene	924	929	921	nd	0.34 \pm 0.10	MS, RI
α -Pinene	939	939	937	2.24 \pm 0.21	2.35 \pm 0.32	MS, RI, AS
Camphene	944	954	952	0.26 \pm 0.07	0.28 \pm 0.09	MS, RI, AS
Benzaldehyde	946	960	962	0.34 \pm 0.04	0.53 \pm 0.12	MS, RI, AS
Sabinene	962	975	974	1.08 \pm 0.12	nd	MS, RI
1-Octen-3-ol	969	979	980	0.28 \pm 0.07	nd	MS, RI, AS
β -Pinene	977	980	981	nd	0.83 \pm 0.15	MS, RI, AS
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	978	985	986	0.34 \pm 0.04	0.43 \pm 0.09	MS, RI, AS
3-Octanone	980	983	985	nd	0.16 \pm 0.07	MS, RI, AS
β -Myrcene	982	990	991	8.25 \pm 1.45	nd	MS, RI, AS
2-Pentyl-furan	990	991	993	nd	1.09 \pm 0.05	MS, RI, AS

Table 3. Cont.

Compound	RI Exp. ¹	RI Adams ²	RI NIST20 ³	HS-SPME Content % ⁴	Essential Oil Content % ⁴	Identification ⁵
δ -2-Carene	1000	1001	1000	nd	Tr ⁷	MS, RI
α -Phellandrene	1004	1002	1005	0.29 \pm 0.09	0.30 \pm 0.02	MS, RI, AS
<i>trans,trans</i> -2,4-Heptadienal	1011	1007	1012	nd	0.34 \pm 0.08	MS, RI, AS
3-Carene	1013	1011	1013	0.25 \pm 0.05	nd	MS, RI
Limonene	1018	1029	1030	5.47 \pm 0.88	4.67 \pm 0.35	MS, RI, AS
<i>p</i> -Cymene	1028	1024	1025	nd	0.09 \pm 0.03	MS, RI, AS
Eucalyptol	1036	1031	1032	nd	0.11 \pm 0.03	MS, RI, AS
β - <i>cis</i> -Ocimene	1030	1037	1038	0.87 \pm 0.16	nd	MS, RI, AS
β - <i>trans</i> -Ocimene	1042	1048	1049	1.57 \pm 0.13	nd	MS, RI, AS
Benzeneacetaldehyde	1050	1051	1054	nd	tr	MS, RI, AS
γ -Terpinene	1052	1059	1060	0.35 \pm 0.08	nd	MS, RI, AS
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1061	1070	1068	0.28 \pm 0.05	nd	MS, RI, AS
<i>trans,trans</i> -3,5-Octadien-2-one	1075	-	1073	nd	0.25 \pm 0.08	MS, RI
Terpinolene	1082	1088	1088	2.28 \pm 0.45	0.15 \pm 0.05	MS, RI, AS
Linalool	1095	1096	1099	0.30 \pm 0.04	nd	MS, RI, AS
3,5-Heptadien-2-one, 6-methyl-	1097	-	1102	nd	0.16 \pm 0.04	MS, RI
<i>n</i> -Nonanal	1106	1100	1107	nd	0.20 \pm 0.09	MS, RI, AS
Fenchol	1107	1116	1113	0.34 \pm 0.07	0.16 \pm 0.22	MS, RI
<i>trans</i> -Pinene hydrate	1117	1122	1121	0.31 \pm 0.08	0.25 \pm 0.09	MS, RI
<i>p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	1139	1137	1123	nd	0.53 \pm 0.12	MS, RI
Pinocarveol	1143	1139	1139	nd	0.07 \pm 0.06	MS, RI, AS
<i>cis</i> -Verbenol	1144	1141	1142	nd	0.07 \pm 0.03	MS, RI, AS
Ipsdienol	1147	1145	1147	0.22 \pm 0.04	nd	MS, RI
Myrcenone	1150	1149	1145	0.50 \pm 0.06	nd	MS, RI
<i>trans,cis</i> -2,6-Nonadienal	1160	1154	1155	0.44 \pm 0.04	nd	MS, RI
<i>trans</i> - β -Terpineol	1165	1161	1163	0.33 \pm 0.08	nd	MS, RI, AS
Borneol	1169	1167	1169	0.29 \pm 0.04	nd	MS, RI
1-Nonanol	1180	1173	1169	0.37 \pm 0.03	nd	MS, RI
α -Terpineol	1188	1188	1189	nd	0.33 \pm 0.09	MS, RI, AS
Hexyl butanoate	1191	1192	1192	0.31 \pm 0.10	nd	MS, RI
Estragole	1197	1196	1196	0.96 \pm 0.12	nd	MS, RI, AS
Carvone	1249	1243	1242	nd	0.16 \pm 0.04	MS, RI, AS
Geranial	1275	1267	1270	nd	0.08 \pm 0.03	MS, RI, AS
Carvacrol	1303	1299	1300	nd	0.07 \pm 0.02	MS, RI, AS
Guaiacol	1317	1309	1309	nd	0.23 \pm 0.09	MS, RI, AS
Cinnamaldehyde	1330	1331	1327	nd	0.08 \pm 0.02	MS, RI, AS
Eugenol	1362	1359	1360	nd	0.22 \pm 0.09	MS, RI, AS
Ylangene	1380	1375	1372	0.65 \pm 0.06	nd	MS, RI
<i>cis</i> -Jasmone	1406	1392	1394	nd	0.09 \pm 0.02	MS, RI
β -Longipinene	1410	1400	1405	nd	0.61 \pm 0.12	MS, RI
Isocaryophyllene	1419	1408	1406	3.86 \pm 0.99	nd	MS, RI
(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1435	1419	1419	30.95 \pm 2.35	33.18 \pm 2.76	MS, RI, AS
Humulene	1452	1454	1454	nd	3.57 \pm 0.56	MS, RI, AS
Aristolene	1455	-	1455	0.89 \pm 0.12	nd	MS, RI
9- <i>epi-trans</i> -Caryophyllene	1465	1466	1464	nd	0.44 \pm 0.11	MS, RI
α -Humulene	1470	1454	1454	11.22 \pm 0.86	nd	
γ -Selinene	1478	1479	1479	1.25 \pm 0.14	nd	MS, RI
<i>trans</i> - β -Ionone	1490	1488	1488	nd	0.88 \pm 0.21	MS, RI, AS
β -Selinene	1504	1490	1489	8.95 \pm 1.01	nd	MS, RI
α -Selinene	1513	1498	1494	7.00 \pm 0.89	nd	MS, RI
γ -Cadinene	1515	1513	1503	nd	0.26 \pm 0.06	MS, RI
δ -Cadinene	1524	1523	1522	nd	0.44 \pm 0.09	MS, RI
Citronellyl butyrate	1530	1529	-	nd	0.11 \pm 0.08	MS, RI

Table 3. Cont.

Compound	RI Exp. ¹	RI Adams ²	RI NIST20 ³	HS-SPME Content % ⁴	Essential Oil Content % ⁴	Identification ⁵
<i>epi</i> -Longipinanol	1558	1563	1556	nd	0.84 ± 0.15	MS, RI
<i>trans</i> -Nerolidol	1568	1563	1566	nd	0.73 ± 0.13	MS, RI, AS
Caryophyllene oxide	1589	1583	1588	nd	4.65 ± 0.76	MS, RI, AS
Hexadecane	1600	1600	1600	2.31 ± 0.32	nd	
Humulene epoxide I	1603	1601	1604	nd	0.75 ± 0.13	MS, RI
Humulane-1,6-dien-3-ol	1608	-	1619	nd	0.12 ± 0.05	MS, RI
Humulene epoxide II	1609	1608	1606	0.73 ± 0.12	8.25 ± 0.45	MS, RI, AS
Javanol isomer II	1623	-	1622	nd	0.30 ± 0.07	MS, RI
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	1638	1640	1640	nd	2.02 ± 0.18	MS, RI
14-hydroxy- <i>cis</i> -Caryophyllene	1652	1657	1654	nd	2.71 ± 0.15	MS, RI
<i>Allo</i> -Himachalol	1663	1661	1662	nd	1.45 ± 0.13	MS, RI
14-hydroxy-9- <i>epi-trans</i> -Caryophyllene	1677	1669	1676	nd	3.16 ± 0.21	MS, RI
α -Bisabolol	1688	1685	1687	nd	0.17 ± 0.12	MS, RI, AS
Nootkatone	1812	1806	1811	nd	0.99 ± 0.06	MS, RI, AS
Phytone	1848	-	1847	nd	0.98 ± 0.08	MS, RI
<i>trans,trans</i> -Farnesyl acetone	1922	1913	1921	nd	0.27 ± 0.05	MS, RI
Phytol	2115	2114	2114	nd	2.33 ± 0.17	MS, RI
Unknown 1 ⁹	2225	-	-	nd	0.08 ± 0.04	-
Unknown 2 ⁹	2364	-	-	nd	0.78 ± 0.11	-
Cannabidivarol	2401	-	2406	nd	0.11 ± 0.03	MS, RI
Cannabidiol	2432	-	2430 ⁸	nd	12.73 ± 1.21	MS, RI, AS
Cannabichromene	2438	-	2440 ⁸	nd	0.23 ± 0.06	MS, RI
Δ^9 -THC	2468	-	2465	nd	0.20 ± 0.04	MS, RI

¹ Experimental retention index calculated by *n*-alkanes; ² literature index according to Adams; ³ literature index according to NIST20; ⁴ calculated by peak area normalization according to internal standard; ⁵ identification method: MS—mass spectra (Adams, NIST20), RI—retention index, AS—authentic standard; ⁶ not detected; ⁷ trace < 0.05%; ⁸ according to NAGY [26]. ⁹—MS spectrum available in Supplementary Data S1.

2.2.2. Changes in Aroma Profile during Various Drying Methods

Changes in the content of the major components selected from the HS-SPME profile were significant for each drying method used in the experiment. Although the first three compounds in Table 4 are monoterpenes, the drying methods had markedly different effects on their content. For β -myrcene, a decrease in content was observed with an increase in convection drying temperature, whereas this relationship was not observed for vacuum-microwave drying. For limonene and terpinolene, on the other hand, the situation is the opposite, as an increase in content was observed with increasing vacuum-microwave drying power. For the sesquiterpene group, particularly for caryophyllene, a decrease in content was observed with increasing temperature and power of the drying methods, wherein the combination method resulted in the highest loss of content of this compound. For the other compounds in this group, a decrease in content was observed for all types of drying.

So far, one publication has been published on the profile of volatile organic compounds in hemp leaves. Rather et al. identified *trans*-caryophyllene, α -humulene and α -pinene as the main constituents [27]. Referring to the HS-SPME analysis of cannabis flowers by Cicaloni et al. proved that β -caryophyllene, humulene and selina-3,7(11)-diene were found to be the main constituents in the different cannabis varieties [28]. On the other hand, in flowers dried by Oduola et al., the compounds with the highest content turned out to be β -pinene, α -pinene, limonene, β -myrcene and caryophyllene [13].

Table 4. Changes in aroma profiles of hemp leaves according to various drying methods.

Compound	Fresh	CD50	CD60	CD70	Content % ¹			
					240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD
β -Myrcene	8.25 ^{a,2}	11.96 ^b	3.95 ^c	1.62 ^f	1.19 ^g	1.30 ^h	2.14 ^e	2.47 ^d
Limonene	5.47 ^a	5.73 ^b	1.95 ^e	2.01 ^e	0.95 ^g	1.40 ^f	4.78 ^c	3.84 ^d
Terpinolene	2.28 ^a	1.32 ^c	6.33 ^d	3.34 ^b	6.38 ^d	9.53 ^e	12.29 ^g	10.36 ^f
Isocaryophyllene	3.86 ^a	1.95 ^f	2.32 ^d	2.09 ^e	1.13 ^h	1.64 ^g	2.59 ^c	3.08 ^b
(E)- β -Caryophyllene	30.95 ^a	18.03 ^d	14.90 ^e	13.24 ^f	21.43 ^b	20.69 ^c	9.11 ^g	7.10 ^h
α -Humulene	11.22 ^a	5.50 ^d	5.26 ^e	5.04 ^f	7.45 ^b	7.16 ^c	4.11 ^g	3.92 ^h
β -Selinene	8.95 ^a	1.21 ^h	1.89 ^e	2.05 ^d	1.78 ^f	1.50 ^g	2.35 ^c	2.84 ^b
α -Selinene	7.00 ^a	1.51 ^g	2.07 ^e	2.15 ^d	1.19 ^h	1.81 ^f	2.33 ^c	2.80 ^b

¹ Calculated by peak area normalization according to internal standard; ² values followed by the same letters are not statistically different (Tukey's test, $p > 0.05$).

2.2.3. Changes in Essential Oils Profiles during Various Drying Methods

The effect of the drying methods used on the essential oil content was significant in all variants. These changes, as well as the individual main oil components, are presented in Table 5. The most favorable drying method in terms of oil recovery proved to be the mixed CD60/VMD method, with an oil recovery of 36.08%. The least effective methods were CD70 and VMD240, with an oil recovery of only 16%. It is also worth noting that the oil recovery values change with the drying methods used and their parameters. For microwave drying, an increase in essential oil recovery was observed with increasing process power, and the difference in recovery between the highest and lowest drying power was 12.59%. With regard to the individual components, particularly for limonene, a relationship was observed; with increasing parameters of the drying methods (temperature for CD, and magnetrons for VMD), the content of this monoterpene decreases significantly. This relationship was also observed for caryophyllene, but only during convection drying. In contrast, an increase in content was observed for the other components (humulene, caryophyllene, caryophyllene oxide, humulene epoxide II, Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol, 14-hydroxy-*cis*-Caryophyllene and 14-hydroxy-9-*epi-trans*-Caryophyllene). Due to their very low volatility, in most sesquiterpenoid components belonging to the alcohol group, their share increases once the process temperature increases.

There is not a precedent for work in the literature addressing the drying of hemp leaves and analyzing changes in the composition of essential oils. In contrast, these changes are documented for leaves of other plants. For lemon balm leaves, Argyropoulos et al. [29] noted that for β -caryophyllene, with increasing drying temperatures of 30–60 °C the percentage content also increases, while for caryophyllene oxide the highest content was observed at a drying temperature of 60 °C. Szumny et al. [30], investigating the effect of drying on changes in oil content, proved that the content of *trans*-caryophyllene, caryophyllene oxide and β -caryophyllene decreased by half during the drying methods used (CD, CPD-VMFD and VMD). During hop drying, Rybka et al. [31] documented no change during drying at 40 °C and at 50 °C for compounds such as limonene, α -caryophyllene, β -humulene, caryophyllene oxide, humulene epoxide II.

Table 5. Changes in essential oils profiles of hemp leaves according to various drying methods.

Compound	Fresh	CD50	CD60	CD70	Content % ¹			
					240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD
Limonene	4.67 ^{a,2}	0.46 ^c	0.45 ^c	0.17 ^d	1.26 ^b	1.06 ^b	0.41 ^c	0.49 ^c
Caryophyllene	33.18 ^a	20.76 ^b	12.50 ^f	10.19 ^g	13.76 ^{ef}	16.58 ^d	14.32 ^e	21.12 ^c
Humulene	3.57 ^a	9.96 ^g	6.40 ^c	4.85 ^b	6.79 ^d	7.80 ^e	7.40 ^e	8.28 ^f
Caryophyllene oxide	4.65 ^a	13.44 ^e	11.38 ^{cd}	8.92 ^b	11.93 ^d	10.21 ^c	13.82 ^e	11.18 ^{cd}

Table 5. Cont.

Compound	Fresh	CD50	CD60	CD70	Content % ¹			
					240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD
Humulene epoxide II	8.25 ^a	5.61 ^b	4.57 ^d	3.46 ^f	4.94 ^c	4.21 ^e	5.72 ^b	4.40 ^{ed}
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	2.02 ^a	8.16 ^b	12.14 ^c	8.24 ^b	9.80 ^b	9.80 ^b	8.75 ^b	8.96 ^b
14-hydroxy- <i>cis</i> -Caryophyllene	2.71 ^a	5.81 ^b	7.41 ^c	5.87 ^b	7.12 ^c	6.19 ^b	6.00 ^b	6.00 ^b
14-hydroxy-9- <i>epi-trans</i> -Caryophyllene	3.16 ^a	5.36 ^b	7.20 ^e	5.43 ^b	6.66 ^{de}	5.63 ^{bc}	6.23 ^{cd}	5.57 ^{bc}
TOTAL (mg/100 g) d.w.	166.13	28.13	31.15	27.51	27.12	47.75	48.02	59.95
% recovery of EOs	100	16.93	18.75	16.55	16.32	28.56	28.91	36.08

¹ Calculated by peak area normalization according to internal standard; ² values followed by the same letters are not statistically different (Tukey's test, $p > 0.05$).

2.3. Cannabinoids

Analysis of cannabinoids in hemp leaves revealed the presence of nine compounds (Table 6). The main compound was found to be CBD (2.19 mg g⁻¹) and its acid form, CBDA (6.05 mg g⁻¹), as well as Δ^9 -THC (0.25 mg g⁻¹) and THCA (0.63 mg g⁻¹). Other cannabinoids were detected in concentrations below 0.2 mg g⁻¹. This profile is in agreement with other authors, including Azad [32] and Li [33].

Table 6. Changes in cannabinoids and triterpenoids profiles of hemp leaves according to various drying methods.

Compound, TMS	ANOVA	Fresh	CD50	CD60	CD70	Concentration (mg g ⁻¹) ¹			
						240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD
CBD	NS ²	2.19	1.98	1.87	1.88	1.89	2.01	2.08	1.95
CBC	NS	0.05	0.06	0.06	0.08	0.07	0.07	0.08	0.05
Δ^8 -THC-d ₈	NS	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
Δ^9 -THC-d ₉	NS	0.25	0.21	0.23	0.27	0.28	0.25	0.28	0.24
CBG	NS	0.09	0.07	0.08	0.10	0.08	0.14	0.10	0.09
CBN	NS	0.04	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02
CBDA	NS	6.05	5.48	5.65	5.74	5.79	5.62	5.61	5.85
THCA	NS	0.63	0.59	0.67	0.60	0.55	0.48	0.49	0.52
CBGA	NS	0.19	0.20	0.23	0.20	0.17	0.19	0.16	0.14
TOTAL		9.51	8.64	8.84	8.93	8.90	8.83	8.87	8.90

¹ Data are relative concentrations expressed per internal standard; ² NS—not statistically different.

Our analyses of total cannabinoid content in fresh and dried material proved that the applied variants did not have a statistically significant effect on the quantitative and qualitative profiles. This is an original finding about cannabinoid stability. According to other authors, in general, the storage process leads in effectiveness, with significant degradation of cannabinoids [34].

Other authors, regarding cannabis inflorescences, noted a decrease in acidic forms during the storage of the material. Meija et al. [10] found that after 8 weeks of storage of *C. sativa* herbs in 40 °C THCA, they degraded from 125 to 20 mg g⁻¹, whereas CBDA went from 24 to 8 mg g⁻¹. At the same time, the amount of THC increased from 60 to 115 mg g⁻¹. The concentration of cannabinodiol increased from 9.1 to 18 mg g⁻¹ at the same time. Authors found the same values of the sum of acid and neutral forms of cannabinoids. Jaidee et al. [11] have shown that in a temp. of 70 °C, the acidic form degrades to neutral.

2.4. Sterols and Triterpenoids

Analysis of the profile of sterols extracted from hemp leaves revealed the presence of four sterols (Table 7), the dominant being β -sitosterol ($534.11 \mu\text{g g}^{-1}$), followed by campesterol ($97.90 \mu\text{g g}^{-1}$), stigmasterol ($44.51 \mu\text{g g}^{-1}$) and isofucosterol ($41.38 \mu\text{g g}^{-1}$). However, for the triterpenoid profile, three compounds were identified, wherein the dominant triterpenoid was lupeol ($97.45 \mu\text{g g}^{-1}$), while β -amyirin and α -amyirin were at similar levels (65.96 and $61.07 \mu\text{g g}^{-1}$). The overall content of sterols and triterpenoids in hemp leaves was 0.07% and 0.02%, respectively, according to GC-MS analyses.

Table 7. Changes in sterols profiles of hemp leaves according to various drying methods.

Compound, TMS	ANOVA	Fresh	CD50	CD60	CD70	240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD
		Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) ¹							
Campesterol	NS ²	97.90	100.37	86.70	92.27	93.22	108.87	107.33	104.11
Stigmasterol	NS	44.51	36.31	35.26	49.23	33.39	43.27	51.22	50.51
β -Sitosterol	NS	534.11	515.77	421.81	448.79	527.28	444.21	414.75	371.27
β -Amyrin	NS	65.96	40.68	60.41	64.33	49.50	60.41	65.12	56.53
Isofucosterol	NS	41.38	40.56	44.94	47.94	38.27	47.31	46.65	50.64
α -Amyrin	NS	61.07	65.91	72.09	73.80	67.42	70.45	73.15	73.26
Lupeol	NS	97.45	90.30	94.21	90.78	82.49	84.80	96.59	101.87
TOTAL		855.38	889.9	815.42	867.14	891.57	869.32	874.81	808.19

¹ Data are relative concentrations expressed per internal standard; ² NS—not statistically different.

The results for total sterols and triterpenoids agree with the findings of Jin et al., who in two articles [35,36] showed a similar correlation, as for sterols and terpenoids it was 0.03–0.05%. The main components of the sterol profile were β -sitosterol, campesterol and stigmasterol. On the other hand, in the triterpenoid profile, friedelin appeared to be the main component, followed by epifriedelanol and β -amyirin [35].

Up to now, the content of sterols and triterpenoids in hemp leaves has not been investigated by comparing the effects of different drying methods. In our study, the drying methods used for hemp leaves did not have a significant effect on qualitative and quantitative changes in the profiles of sterol and triterpenoid.

2.5. Sensory Analysis

The ranking test showed that samples dried using CD at 50 °C were equivalent to those taken as the control (fresh). Samples were grouped into two clusters: (i) the first one having a higher intensity of the studied key descriptor, including CD at 50 and 70 °C, VMD at 240 and 360 W; (ii) the second one having a lower intensity, including CD at 60 °C, CD 60/VMD, and VMD at 480 W.

The first comment in this section is that the aroma profile of the dried samples was soft, as represented by intensities of the key descriptors (e.g., hemp leaves-ID, citrus, etc.) having maximum values below three units. Significant effects of the drying treatment on only four attributes were found; these included fresh vegetables, hemp leaves-ID, citrus and balsamic notes.

The fresh sample was taken as the control, and it is easy to see in Figure 2 that the samples with the closest aroma profile to this control were those dried using CD at 50 °C and VMD at 240, 360 and 480 W. This descriptive data agreed quite well with the data found in the ranking experiment, with CD at 50 °C and VMD at 240 and 360 W leading to samples with the highest aroma intensity and the more complex aroma profiles.

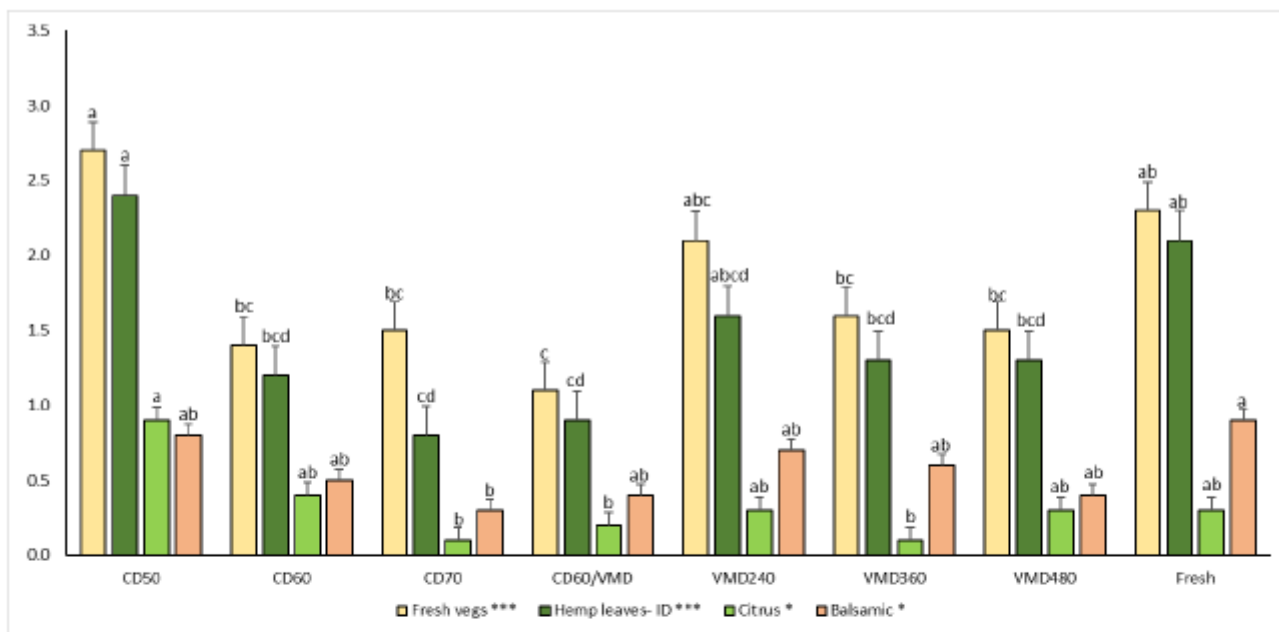


Figure 2. Sensory analysis of hemp leaves according to various drying methods. Bars, for a particular sensory descriptor (e.g., fresh vegs), with the same letter were not significantly different ($p < 0.05$) according to the HSD Tukey's least significance difference test.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material

Leaves of hemp var. Henola amounting to 15 kg were collected on 15 October 2022 from a field in Oborniki Śląskie (16°55' E, 51°18' N), Poland. After being manually removed from the stalk, the leaves were combined and subjected to drying processes, followed by distillation and other chemical analyses. The moisture content of the material at the beginning of the study was 82%, which was assessed using an SPT-200 ZEAMIL vacuum dryer (Horyzont, Kraków, Poland). The drying processes were suspended when no changes in the sample masses were observed. Voucher specimens were deposited at the Department of Food Chemistry and Biocatalysis at Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

3.2. Drying Methods

Hemp leaves samples (60 g) were subjected to convective drying (CD), vacuum–microwave drying (VMD) as well as combined convective pre-drying and vacuum–microwave finishing drying (CD-VMD) according to the methods described by Kwaśnica et al. [14]. Briefly, CD was performed at 50, 60 and 70 °C using a dryer constructed at the Institute of Agricultural Engineering (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland), while VMD was conducted at 240, 360 and 480 W using an SM 200 dryer (Plazmatronika, Wrocław, Poland). Drying conditions were determined based on the preliminary studies and literature review [14]. As previously proved in the studies on thyme [8] and marjoram [37], combined drying provides good results both in terms of reduced drying time and improved chemical properties of dried material due to the synergistic effect of drying methods used. Therefore, CD-VMD was performed, wherein the first part of drying was constituted by CD at 60 °C for 1 h followed by vacuum–microwave finishing drying at 360 W. All drying variants were performed until the same weight of the material was maintained during three consecutive weight measurements. The drying experiment was performed in two technological replications.

3.3. Drying Kinetics and Models

Drying kinetics were appointed on the basis of mass losses and illustrated as moisture ratio calculated using the simplified equation according to Calín-Sánchez et al. [38] (Equation (1)).

$$MR = \frac{M(t)}{M_0} \quad (1)$$

where $M(t)$ is the moisture ratio at the time of drying and M_0 is the initial moisture content. Based upon drying kinetics, simple mathematical models were fitted to the experimental data using Table Curve 2D software. Drying was performed in monolayer in two technological repetitions and modified Page, logarithmic as well as Midilli models were used to describe drying kinetics (Table 8).

Table 8. Mathematical models used in the study.

Model Name	Equation	References
Modified Page	$MR = a \cdot e^{-k \cdot t^b}$	[38,39]
Midilli	$MR = a \cdot e^{-k \cdot t^b} + C \cdot t$	[40]
Logarithmic	$MR = a \cdot e^{-k \cdot t} + B$	[16,41]

3.4. Sample Preparation and Chromatographical Analysis

3.4.1. Volatile Compounds Analysis

Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME)

The extraction of VOCs from hemp leaves was carried out using the HS-SPME technique, using fiber (2 cm, DVB/CAR/PDMS, Supelco, Bellefonte, PA, USA). A weighed quantity of homogenized 0.02 g dry and 0.06 g fresh plant sample was placed in a headspace analysis vial with the addition of an internal standard of 25 µg 2-undecanone (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The prepared sample was incubated in a water bath for 10 min at 45 °C and then the volatile compounds absorbed on the fiber for 25 min. Analysis of the prepared sample was performed on a Varian CP-3800/Saturn 2000 (Varian, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a Zebtron ZB-5 column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Desorption of analytes from the fiber took 3 min in a 250 °C injector. The GC temperature program was programmed as follows: 40 °C hold for 3 min (initial temperature), then to 110 °C at a rate of 5 °C min⁻¹ and to 270 °C min at a rate of 20 °C min⁻¹. Scanning was set to range between 40 and 300 *m/z* in electron impact (EI) mode at 70 eV. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.1 mL min⁻¹ and with the split ratio of 1:20. The analysis was carried out in triplicate. Obtained results of SPME analyses are expressed as percentage of all identified compounds according to MS total ion current. Response factor for MS detector for each group of compounds was used for quantification.

Essential Oils

A Deryng apparatus was used to extract essential oils from hemp leaves. A weighed amount of fresh and dry plant material was transferred to a 250 mL round-bottom flask and poured over 100 mL of distilled water. The flask was placed on a heating bench and the contents brought to a boil. The process was carried out for 50 min and the essential oil was collected in a volume of 1 mL of cyclohexane, which contained 1 mg of 2-undecanone as internal standard (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After distillation, the organic fraction was collected and stored at −18 °C until chromatographic analysis.

The profile of volatile compounds was determined using a gas chromatographer coupled to a mass spectrometer (Shimadzu GCMS QP 2020, Shimadzu, Kyoto, Japan). The column used for compound separation was a Zebtron ZB-5 with the following dimensions: 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA. The apparatus operated according to the following parameters during analyses: electron ionization mode at 70 eV,

scanning in the range of 35 to 400 m/z in the option 2 scans s^{-1} . The carrier gas was helium at a flow rate of 13.3 $mL\ min^{-1}$ with a split of 1:10. The temperature program of the GC unit was programmed as follows: 50 °C (initial temperature) to 250 °C at a rate of 3 °C min^{-1} and kept for 3 min. The analysis was carried out in triplicate. Response factor for MS detector for each group of compounds was used for quantification. Results are expressed as mg per 100 g and percentage of identified EOs constituents.

3.4.2. Cannabinoids, Sterols and Triterpenoids Analysis

Leaves with a mass of 100 mg were placed in an Eppendorf tube and 100 μg of cholesterol was also added to the sample to serve as an internal standard. The entire sample was flooded with a mixture of organic solvents (acetone:dichloromethane 1:1) and vigorously shaken. Samples were centrifuged on a bench-top centrifuge at 13,000 rpm and the extract, after filtration through a celite filter, was transferred to a GC vial. The extraction was performed twice. The organic fraction was evaporated on a vacuum evaporator under reduced pressure. An amount of 500 μL of pyridine and 100 μL of the derivatizing reagent *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) were added to the samples. The derivatization process was carried out on a heating panel at 70 °C for 20 min. Analyses were prepared in triplicate.

Samples were also analyzed using Shimadzu GC-MS equipment (Shimadzu GCMS QP 2020, Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a Zebron ZB-5 column (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA). During the analysis, the camera operated in two modes: SCAN and SIM (3 scans s^{-1}). For SCAN mode, the scan range was 50 to 650 m/z , while for SIM mode, the detector collected the following ion m/z values: 129, 203, 218, 303, 337, 343, 357, 367, 371, 386, 390, 394 and 491. The carrier gas flow rate, which was helium, was set at 0.98 $mL\ min^{-1}$ with a 1:50 split. The injector was set at 250 °C. The program settings during the analysis were as follows: initial temperature 180 °C, then a rate of 5 °C min^{-1} to 280 for 7 min.

3.4.3. Analysis of Obtained Data

The analysis and identification of compounds was based on three independent methods: (i) comparison of the calculated retention indices (RIs) using the retention index calculator with the values appearing in the NIST20 and Adams databases, (ii) comparison of the obtained spectra with the NIST20 and Adams databases, (iii) comparison of the retention indices of the compounds with authentic standards. The following software was used during the data analysis: GCMS Solution (v. 4.20), Spectrus Processor (v. S55S41) and AMDIS (v. 2.73).

3.5. Sensory Analysis

3.5.1. Ranking Test

The samples with the highest and lowest intensity of “fresh hemp leaves-ID” were identified using a ranking test. This test is very useful in reducing the number of samples to be used in descriptive testing, by determining whether significant differences in the intensities of key attributes exist. Sixteen panelists (50% females and 50% males, with ages ranging from 24 to 55 years) ranked the intensity of “fresh hemp leaves-ID”. Between samples, crackers and water were available to clean the mouth.

3.5.2. Descriptive Test

A trained panel (8 panelists, 50% female, ages 24–55 years) was used to rate the intensity of the key sensory descriptors of dried hemp leaves. These panelists can be considered highly trained, as they have over 1000 h of experience in describing dried products [21], and even hemp-based products [14]. Panel selection, training and validation were conducted according to the International Organization for Standardization ISO standard 8586-1 (1993) [42].

Descriptive sensory analysis (DSA) was used to define the aroma (perception of volatile compounds with the samples outside the mouth) profile of dried hemp leaves. To develop a proper lexicon (1 session of 90 min), panelists tried different hemp-based products to agree on the key descriptors to be used in a full description of the products under analysis (fresh and dried hemp leaves). The final lexicon consisted of 7 attributes: (i) fresh hemp-based products: fresh vegetables, hemp leaves-ID, citrus, balsamic and spicy; and (ii) dried hemp-based products: hay-woody and chamomile. Attributes previously found in dried hemp flowers such as cooked, earthy and burnt were not used because they were not identified in the samples under analysis. To have a fully objective use of the scale, ranging from 0 to 10 (0 = none or not perceptible intensity and 10 = extremely high intensity), reference products were prepared, with intensities similar to those of the samples under evaluation.

The sensory tests were conducted in normalized cabins with controlled temperature and illumination. Samples were prepared in odor-free plastic cups with lids (100 mL) and were left to equilibrate for 15 min at room temperature before serving. Then, samples were randomly served to panelists, using 3-digit codes. To avoid fatigue among the panelists, the 8 samples to be analyzed were divided in two groups of 4 and were analyzed in two independent sessions.

3.6. Statistical Analysis

Mathematical modelling was performed using Table Curve 2D v. 5.01 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Models were fitted based on root mean square error (RMSE) and coefficient of determination R^2 . A one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to analyze the experimental data obtained using STATISTICA v. 13.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). For chromatographical analysis, Tukey's test was used.

4. Conclusions

For the first time, a study was performed on the detailed analysis of phytochemical changes in hemp leaves subjected to microwave, convection and combined drying. The essential oil content in hemp leaves was measured at 166 mg 100 g⁻¹ d.w. level. The most conservative result for the essential oil content maintenance methods was the CD60 VMD combined method, in which a loss of 63% of volatile fractions was observed. The least favorable (a loss of 83.68 and 83.45%) was observed in the VMD 240 and CD 70 variants. Sensory analysis showed that a temperature of 50 °C leads to the least change in the plant material, which is associated with higher consumer acceptance. We proved that none of the applied drying variants has a statistically significant effect on the quantitative and qualitative profiles of phytosterols and cannabinoids. No CBDA or THCA decarboxylation processes were observed in all the applied drying variants. This is the first result proving the thermal stability of the cannabinoid fraction in hemp leaves during the mild drying process.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28248089/s1>, Data S1: EI-MS spectrum of unknown compound 1, Data S2: EI-MS spectrum of unknown compound 2, Data S3: Sample chromatogram of essential oil (liquid injection), Data S4: Sample chromatogram of aroma volatiles (SPME). Table S1. Changes in aroma profile of hemp leaves according to various drying methods. Table S2. Changes in essential oils profile of hemp leaves according to various drying methods. Table S3. Changes in cannabinoids and triterpenoids profile of hemp leaves according to various drying methods. Table S4. Changes in sterols profile of hemp leaves according to various drying methods. Tables S1–S4 are Tables 4–7 from manuscript with \pm SD.

Author Contributions: Conceptualization, A.K., N.P., Á.A.C.-B., H.L.-I., D.S., A.F., K.M. and M.K.; Methodology, A.K., N.P., Á.A.C.-B., H.L.-I., A.F., K.M. and M.K. Formal analysis, D.S.; Writing—review & editing, A.K. and N.P.; Project administration, A.K. and A.S.; Funding acquisition, A.K. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Work financed from Ministry of Science and Higher Education budgetary funds for science in 2018–2022, as a project under the “Implementation doctorate” II edition program. The APC is financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Materials and available upon reasonable request from the corresponding author.

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

References

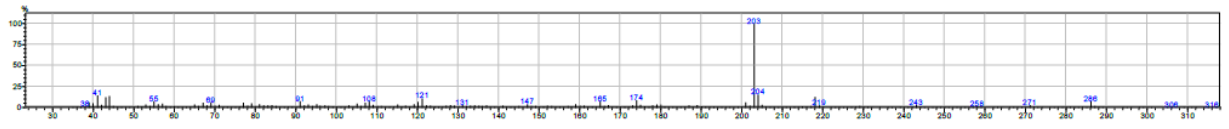
1. Cerino, P.; Buonerba, C.; Cannazza, G.; D’Auria, J.; Ottoni, E.; Fulgione, A.; Di Stasio, A.; Pierri, B.; Gallo, A. A Review of Hemp as Food and Nutritional Supplement. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2021**, *6*, 19–27. [CrossRef] [PubMed]
2. Visković, J.; Zheljzkov, V.D.; Sikora, V.; Noller, J.; Latković, D.; Ocamb, C.M.; Koren, A. Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Agronomy and Utilization: A Review. *Agronomy* **2023**, *13*, 931. [CrossRef]
3. Noppawan, P.; Bainier, C.; Lanot, A.; McQueen-Mason, S.; Supanchaiyamat, N.; Attard, T.M.; Hunt, A.J. Effect of Harvest Time on the Compositional Changes in Essential Oils, Cannabinoids, and Waxes of Hemp (*Cannabis sativa* L.). *R. Soc. Open Sci.* **2022**, *9*, 211699. [CrossRef]
4. Chua, L.Y.W.; Chua, B.L.; Figiel, A.; Chong, C.H.; Wojdyło, A.; Szumny, A.; Choong, T.S.Y. Antioxidant Activity, and Volatile and Phytosterol Contents of Strobilanthes Crispus Dehydrated Using Conventional and Vacuum Microwave Drying Methods. *Molecules* **2019**, *24*, 1397. [CrossRef] [PubMed]
5. Orphanides, A.; Goulas, V.; Gekas, V. Effect of Drying Method on the Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Spearmint. *Czech J. Food Sci.* **2013**, *31*, 509–513. [CrossRef]
6. Thamkaew, G.; Sjöholm, I.; Galindo, E.G. A Review of Drying Methods for Improving the Quality of Dried Herbs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 1763–1786. [CrossRef]
7. Figiel, A.; Szumny, A.; Gutiérrez-Ortiz, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Composition of Oregano Essential Oil (*Origanum vulgare*) as Affected by Drying Method. *J. Food Eng.* **2010**, *98*, 240–247. [CrossRef]
8. Calín-Sánchez, Á.; Figiel, A.; Lech, K.; Szumny, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Effects of Drying Methods on the Composition of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oil. *Dry. Technol.* **2013**, *31*, 224–235. [CrossRef]
9. Lyczko, J.; Jalozyński, K.; Surma, M.; García-Garvía, J.M.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Szumny, A. Determination of Various Drying Methods’ Impact on Odour Quality of True Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Flowers. *Molecules* **2019**, *24*, 2900. [CrossRef]
10. Meija, J.; McRae, G.; Miles, C.O.; Melanson, J.E. Thermal Stability of Cannabinoids in Dried Cannabis: A Kinetic Study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**, *414*, 377–384. [CrossRef] [PubMed]
11. Jaidee, W.; Siridechakorn, I.; Nessopa, S.; Wisuitiprot, V.; Chaiwangrath, N.; Ingkaninan, K.; Waranuch, N. Kinetics of CBD, Δ^9 -THC Degradation and Cannabinol Formation in Cannabis Resin at Various Temperature and PH Conditions. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2022**, *7*, 537–547. [CrossRef] [PubMed]
12. Kladar, N.; Čonić, B.S.; Božin, B.; Torović, L. European Hemp-Based Food Products—Health Concerning Cannabinoids Exposure Assessment. *Food Control* **2021**, *129*, 108233. [CrossRef]
13. Oduola, A.A.; Bruce, R.M.; Shafiekhani, S.; Atungulu, G.G. Impacts of Industrial Microwave and Infrared Drying Approaches on Hemp (*Cannabis sativa* L.) Quality and Chemical Components. *Food Bioprod. Process.* **2023**, *137*, 20–27. [CrossRef]
14. Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Różański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* **2020**, *9*, 1118. [CrossRef] [PubMed]
15. Spano, M.; Di Matteo, G.; Ingallina, C.; Sobolev, A.P.; Giusti, A.M.; Vinci, G.; Cammarone, S.; Tortora, C.; Lamelza, L.; Prencipe, S.A.; et al. Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Inflorescences as Novel Food: The Effect of Different Agronomical Practices on Chemical Profile. *Foods* **2022**, *11*, 3658. [CrossRef] [PubMed]
16. Chasiotis, V.K.; Tzempelikos, D.A.; Filios, A.E. Assessment of Constant and Time-Varying Temperature Schemes on the Convective Drying Characteristics of Hemp Leaves. *Case Stud. Therm. Eng.* **2021**, *26*, 101098. [CrossRef]
17. Challa, S.K.R.; Misra, N.N.; Martynenko, A. Drying of Cannabis—State of the Practices and Future Needs. *Dry. Technol.* **2021**, *39*, 2055–2064. [CrossRef]
18. Calín-Sánchez, Á.; Lipan, L.; Cano-Lamadrid, M.; Kharaghani, A.; Masztalerz, K.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Figiel, A. Comparison of Traditional and Novel Drying Techniques and Its Effect on Quality of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs. *Foods* **2020**, *9*, 1261. [CrossRef]
19. Altay, K.; Hayaloglu, A.A.; Dirim, S.N. Determination of the Drying Kinetics and Energy Efficiency of Purple Basil (*Ocimum basilicum* L.) Leaves Using Different Drying Methods. *Heat Mass Transf.* **2019**, *55*, 2173–2184. [CrossRef]
20. Doymaz, İ.; Karasu, S. Effect of Air Temperature on Drying Kinetics, Colour Changes and Total Phenolic Content of Sage Leaves (*Salvia officinalis*). *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* **2018**, *10*, 269–276. [CrossRef]

21. Rahimmalek, M.; Goli, S.A.H. Evaluation of Six Drying Treatments with Respect to Essential Oil Yield, Composition and Color Characteristics of *Thymus Daenensis* Subsp. *Daenensis*. Celak Leaves. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *42*, 613–619. [CrossRef]
22. Ibrahim, E.; Wang, M.; Radwan, M.; Wanas, A.; Majumdar, C.; Avula, B.; Wang, Y.-H.; Khan, I.; Chandra, S.; Lata, H.; et al. Analysis of Terpenes in *Cannabis sativa* L. Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. *Planta Med.* **2019**, *85*, 431–438. [CrossRef]
23. Abdollahi, M.; Sefidkon, F.; Calagari, M.; Mousavi, A.; Mahomoodally, F. Impact of Four Hemp (*Cannabis sativa* L.) Varieties and Stage of Plant Growth on Yield and Composition of Essential Oils. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *155*, 112793. [CrossRef]
24. Woźniczka, K.; Koniecznyński, P.; Plenis, A.; Bączek, T.; Roszkowska, A. SPME as a Green Sample-Preparation Technique for the Monitoring of Phytocannabinoids and Endocannabinoids in Complex Matrices. *J. Pharm. Anal.* **2023**, *13*, 1117–1134. [CrossRef] [PubMed]
25. De Vita, S.; Finamore, C.; Chini, M.G.; Saviano, G.; De Felice, V.; De Marino, S.; Lauro, G.; Casapullo, A.; Fantasma, F.; Trombetta, F.; et al. Phytochemical Analysis of the Methanolic Extract and Essential Oil from Leaves of Industrial Hemp Futura 75 Cultivar: Isolation of a New Cannabinoid Derivative and Biological Profile Using Computational Approaches. *Plants* **2022**, *11*, 1671. [CrossRef] [PubMed]
26. Nagy, D.U.; Cianfaglione, K.; Maggi, F.; Sut, S.; Dall'Acqua, S. Chemical Characterization of Leaves, Male and Female Flowers from Spontaneous Cannabis (*Cannabis sativa* L.) Growing in Hungary. *Chem. Biodivers.* **2019**, *16*, e1800562. [CrossRef] [PubMed]
27. Rather, M.A.; Dar, B.A.; Sofi, S.N.; Hassan, T.; Ali, N.; Lone, A.; Shawl, A.S.; Shah, W.; Qurishi, M.A.; Prakash, P. Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Gas Chromatography Mass Spectrometric Analysis of the Volatile Constituents of *Cannabis sativa* L. from Kashmir. *J. Pharm. Res.* **2011**, *4*, 2651–2653.
28. Cicaloni, V.; Salvini, L.; Vitalini, S.; Garzoli, S. Chemical Profiling and Characterization of Different Cultivars of *Cannabis sativa* L. Inflorescences by SPME-GC-MS and UPLC-MS. *Separations* **2022**, *9*, 90. [CrossRef]
29. Argyropoulos, D.; Müller, J. Changes of Essential Oil Content and Composition during Convective Drying of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 118–124. [CrossRef]
30. Szumny, A.; Figiel, A.; Gutiérrez-Ortiz, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Composition of Rosemary Essential Oil (*Rosmarinus Officinalis*) as Affected by Drying Method. *J. Food Eng.* **2010**, *97*, 253–260. [CrossRef]
31. Rybka, A.; Krofta, K.; Heřmánek, P.; Horzík, I.; Pokorný, J. Effect of Drying Temperature on the Content and Composition of Hop Oils. *Plant Soil. Environ.* **2018**, *64*, 512–516. [CrossRef]
32. Azad, M.O.K.; Ryu, B.R.; Rana, M.S.; Rahman, M.H.; Lim, J.-D.; Lim, Y.-S. Enhancing the Cannabidiol (CBD) Compound in Formulated Hemp (*Cannabis sativa* L.) Leaves through the Application of Hot-Melt Extrusion. *Processes* **2021**, *9*, 837. [CrossRef]
33. Li, H.; Zhao, Q.-S.; Wang, L.-W.; Chang, S.-L.; Wang, P.-D.; Zhao, B. Optimization of Cyclodextrin-Assisted Green Extraction of Cannabidiol from Industrial Hemp Leaves: Release Behavior, Permeability, Bioactivity, and Stability. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *188*, 115709. [CrossRef]
34. Das, P.C.; Vista, A.R.; Tabil, L.G.; Baik, O.-D. Postharvest Operations of Cannabis and Their Effect on Cannabinoid Content: A Review. *Bioengineering* **2022**, *9*, 364. [CrossRef] [PubMed]
35. Jin, D.; Dai, K.; Xie, Z.; Chen, J. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3309. [CrossRef] [PubMed]
36. Jin, D.; Henry, P.; Shan, J.; Chen, J. Identification of Chemotypic Markers in Three Chemotype Categories of Cannabis Using Secondary Metabolites Profiled in Inflorescences, Leaves, Stem Bark, and Roots. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 699530. [CrossRef] [PubMed]
37. Calín-Sánchez, Á.; Figiel, A.; Lech, K.; Szumny, A.; Martínez-Tomé, J.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Drying Methods Affect the Aroma of *Origanum majorana* L. Analyzed by GC-MS and Descriptive Sensory Analysis. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *74*, 218–227. [CrossRef]
38. Calín-Sánchez, Á.; Kharaghani, A.; Lech, K.; Figiel, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Tsotsas, E. Drying Kinetics and Microstructural and Sensory Properties of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as Affected by Drying Method. *Food Bioprocess Technol.* **2015**, *8*, 63–74. [CrossRef]
39. Erbay, Z.; Icier, F. A Review of Thin Layer Drying of Foods: Theory, Modeling, and Experimental Results. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 441–464. [CrossRef]
40. Midilli, A.; Kucuk, H.; Yapar, Z. A New Model for Single-Layer Drying. *Dry. Technol.* **2002**, *20*, 1503–1513. [CrossRef]
41. Yaldýz, O.; Ertekýn, C. Thin Layer Solar Drying of Some Vegetables. *Dry. Technol.* **2001**, *19*, 583–597. [CrossRef]
42. ISO 8586:2012; Sensory Analysis: General Guidelines for the Selection, Training and Monitoring of Selected Assessors and Expert Sensory Assessors. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2012.

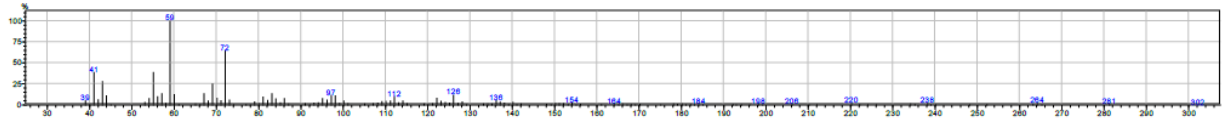
Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any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

Supplementary materials:

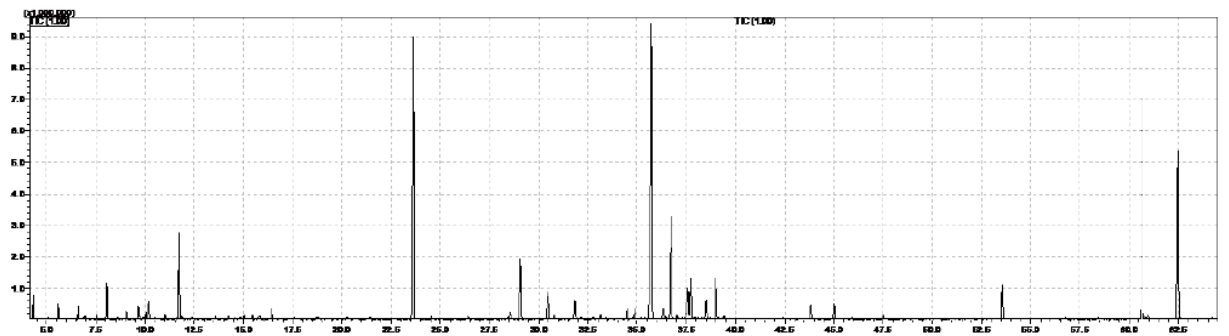
1. Data S1: EI-MS spectrum of unknown compound 1



2. Data S2: EI-MS spectrum of unknown compound 2:



3. Data S3: Sample chromatogram of essential oil (liquid injection)



4. Data S4: Sample chromatogram of aroma volatiles (SPME)

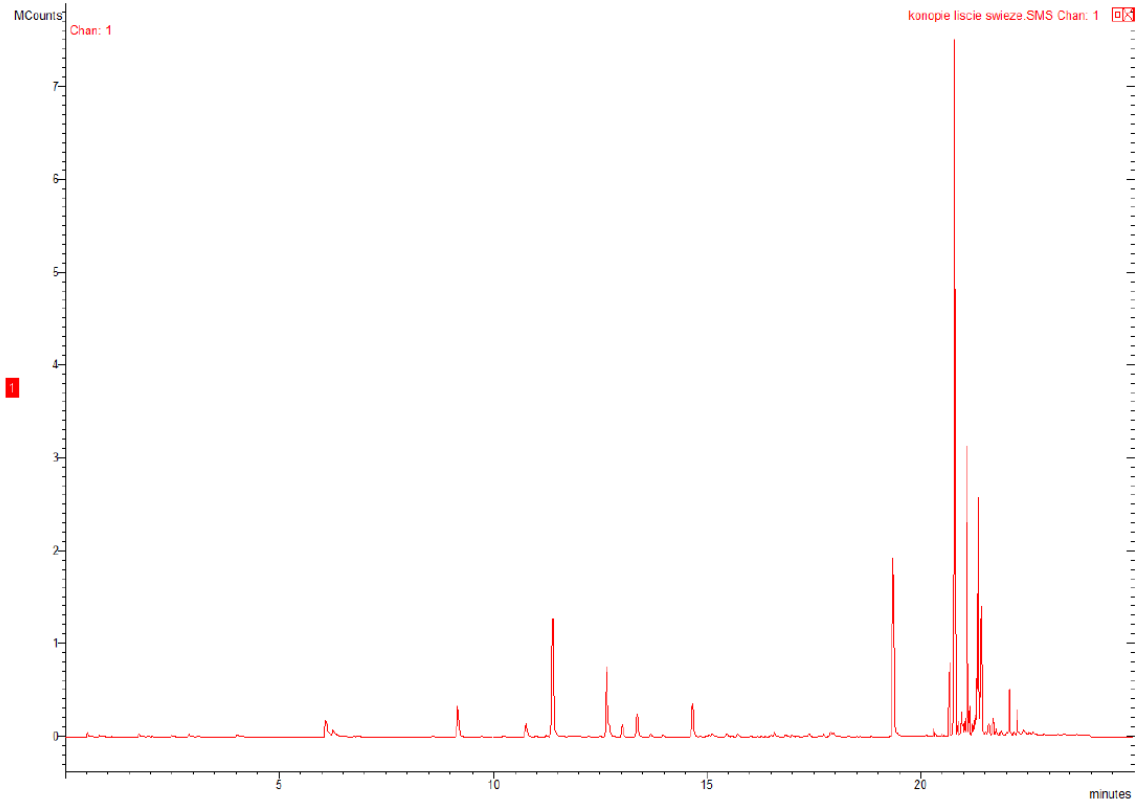


Table S1. Changes in aroma profile of hemp leaves according to various drying methods.

Compound	Fresh	Content % ¹						
		CD50	CD60	CD70	240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD
β -Myrcene	8.25±1.09 ^{a,2}	11.96±1.56 ^b	3.95±0.77 ^c	1.62±0.89 ^f	1.19±0.44 ^g	1.30±0.26 ^h	2.14±0.46 ^e	2.47±0.41 ^d
Limonene	5.47±0.98 ^a	5.73±0.68 ^b	1.95±0.65 ^e	2.01±0.66 ^e	0.95±0.12 ^g	1.40±0.32 ^f	4.78±0.51 ^c	3.84±0.89 ^d
Terpinolene	2.28±0.0.45 ^a	1.32±0.24 ^c	6.33±0.89 ^d	3.34±0.41 ^b	6.38±1.43 ^d	9.53±1.45 ^e	12.29±1.39 ^g	10.36±1.06 ^f
Isocaryophyllene	3.86±0.78 ^a	1.95±0.21 ^f	2.32±0.41 ^d	2.09±0.16 ^e	1.13±0.17 ^h	1.64±0.98 ^g	2.59±0.35 ^c	3.08±0.86 ^b
(E)- β -Caryophyllene	30.95±3.53 ^a	18.03±1.86 ^d	14.90±1.01 ^e	13.24±1.06 ^f	21.43±2.42 ^b	20.69±1.78 ^c	9.11±1.36 ^g	7.10±1.36 ^h
α -Humulene	11.22±1.42 ^a	5.50±1.06 ^d	5.26±1.08 ^e	5.04±0.26 ^f	7.45±1.45 ^b	7.16±1.24 ^c	4.11±0.98 ^g	3.92±1.05 ^h
β -Selinene	8.95±0.98 ^a	1.21±0.24 ^h	1.89±0.33 ^e	2.05±0.11 ^d	1.78±1.06 ^f	1.50±0.98 ^g	2.35±0.44 ^c	2.84±0.76 ^b
α -Selinene	7.00±1.04 ^a	1.51±0.33 ^g	2.07±0.21 ^e	2.15±0.48 ^d	1.19±0.13 ^h	1.81±0.34 ^f	2.33±0.56 ^c	2.80±0.44 ^b

¹ Calculated by peak area normalization according to internal standard; ² Values followed by the same letters are not statistically different (Tukey's test, $p > 0.05$)

Compound	Table S2. Changes in essential oils profile of hemp leaves according to various drying methods.									
	Fresh	CD50	CD60	CD70	240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD	Content % ¹	
Limonene	4.67±0.27 ^{a2}	0.46±0.06 ^c	0.45±0.11 ^c	0.170±0.06 ^d	1.26±0.03 ^b	1.06±0.13 ^b	0.41±0.22 ^c	0.49±0.09 ^c		
Caryophyllene	33.18±1.41 ^a	20.76±0.99 ^b	12.50±1.03 ^f	10.19±1.41 ^e	13.76±1.22 ^{ef}	16.58±1.88 ^d	14.32±1.29 ^e	21.12±2.11 ^c		
Humulene	3.57±0.21 ^a	9.96±1.01 ^e	6.40±0.77 ^c	4.85±0.35 ^b	6.79±0.41 ^d	7.80±0.49 ^e	7.40±0.54 ^e	8.28±0.48 ^f		
Caryophyllene oxide	4.65±0.41 ^a	13.44±0.89 ^e	11.38±0.99 ^{cd}	8.92±0.56 ^b	11.93±1.01 ^d	10.21±1.21 ^c	13.82±1.46 ^e	11.18±1.03 ^{cd}		
Humulene epoxide II	8.25±0.22 ^a	5.61±0.24 ^b	4.57±0.46 ^d	3.46±0.43 ^f	4.94±0.51 ^c	4.21±0.49 ^e	5.72±1.87 ^b	4.40±0.59 ^{ed}		
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5α-ol	2.02±0.11 ^a	8.16±0.36 ^b	12.14±0.78 ^c	8.24±0.78 ^b	9.80±0.43 ^b	9.80±0.87 ^b	8.75±0.98 ^b	8.96±0.49 ^b		
14-hydroxy- <i>cis</i> -Caryophyllene	2.71±0.23 ^a	5.81±0.16 ^b	7.41±0.66 ^c	5.87±0.66 ^b	7.12±0.51 ^c	6.19±0.66 ^b	6.00±0.43 ^b	6.00±0.78 ^b		
14-hydroxy-9- <i>epi-trans</i> -Caryophyllene	3.16±0.14 ^a	5.36±0.14 ^b	7.20±0.41 ^e	5.43±0.89 ^b	6.66±0.44 ^{de}	5.63±0.48 ^{bc}	6.23±0.47 ^{cd}	5.57±0.44 ^{bc}		
TOTAL (mg/100g) d.w. ³	166.13	28.13	31.15	27.51	27.12	47.75	48.02	59.95		
% recovery of EOS	100	16.93	18.75	16.55	16.32	28.56	28.91	36.08		

¹ Calculated by peak area normalization according to internal standard; ² Values followed by the same letters are not statistically different (Tukey's test, $p > 0.05$)

Table S3. Changes in cannabinoids and terpenoids profile of hemp leaves according to various drying methods.

Compound, TMS	ANOVA	Fresh	CD50	CD60	CD70	240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD	Concentration (mg g ⁻¹) ¹				
CBD	NS ²	2.19±0.27	1.98±0.12	1.87±0.13	1.88±0.24	1.89±0.65	2.01±0.14	2.08±0.12	1.95±0.33					
CBC	NS	0.05±0.01	0.06±0.02	0.06±0.02	0.08±0.02	0.07±0.03	0.07±0.03	0.08±0.03	0.05±0.01					
Δ ⁸ -THC-d ₈	NS	0.02±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01					
Δ ⁹ -THC-d ₉	NS	0.25±0.09	0.21±0.09	0.23±0.04	0.27±0.06	0.28±0.09	0.25±0.12	0.28±0.08	0.24±0.06					
CBG	NS	0.09±0.01	0.07±0.03	0.08±0.02	0.10±0.04	0.08±0.02	0.14±0.09	0.10±0.04	0.09±0.03					
CBN	NS	0.04±0.02	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01					
CBDA	NS	6.05±0.56	5.48±0.36	5.65±0.25	5.74±0.29	5.79±0.54	5.62±0.36	5.61±0.24	5.85±0.44					
THCA	NS	0.63±0.09	0.59±0.08	0.67±0.12	0.60±0.08	0.55±0.14	0.48±0.24	0.49±0.07	0.52±0.06					
CBGA	NS	0.19±0.08	0.20±0.09	0.23±0.07	0.20±0.15	0.17±0.05	0.19±0.11	0.16±0.04	0.14±0.03					
TOTAL		9.51	8.64	8.84	8.93	8.90	8.83	8.87	8.90					

¹Data are relative concentrations expressed per internal standard; ²NS – not statistically different.

Table S4. Changes in sterols profile of hemp leaves according to various drying methods.

Compound, TMS	ANOVA	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) ¹							
		Fresh	CD50	CD60	CD70	240VMD	360VMD	480 VMD	CD60/VMD
Campesterol	NS ²	97.90±1.43	100.37±3.13	86.70±2.18	92.27±2.47	93.22±3.27	108.87±3.46	107.33±3.57	104.11±4.12
Stigmasterol	NS	44.51±1.27	36.31±1.22	35.26±1.05	49.23±1.47	33.39±1.89	43.27±1.56	51.22±2.54	50.51±3.44
β -Sitosterol	NS	534.11±17.32	515.77±15.26	421.81±13.27	448.79±15.28	527.28±19.20	444.21±18.26	414.75±17.29	371.27±18.26
β -Amyrin	NS	65.96±2.48	40.68±1.45	60.41±2.10	64.33±1.99	49.50±1.79	60.41±2.48	65.12±4.99	56.53±2.56
Isofucosterol	NS	41.38±2.37	40.56±1.88	44.94±1.24	47.94±2.37	38.27±2.18	47.31±2.66	46.65±4.01	50.64±3.31
α -Amyrin	NS	61.07±2.11	65.91±1.36	72.09±1.56	73.80±3.11	67.42±2.14	70.45±3.56	73.15±4.19	73.26±4.28
Lupcol	NS	97.45±1.77	90.30±2.87	94.21±3.99	90.78±4.37	82.49±3.19	84.80±3.59	96.59±3.89	101.87±5.22
TOTAL		855.38	889.9	815.42	867.14	891.57	869.32	874.81	808.19

¹Data are relative concentrations expressed per internal standard; ² NS – not statistically different.

V.2 WYNIKI CZĘŚCI DOŚWIADCZALNEJ NIEOPUBLIKOWANE.

V.2.1 Analiza profilu kannabinoidów konopi w próbkach z lat 2018-2022.

Zebrano i poddano analizie statystycznej dane dot. zawartości pięciu głównych (tj. THC, CBD, CBG, CBC) kannabinoidów zebrane w trakcie pomiarów próbek komercyjnych pochodzące z upraw prowadzonych w Polsce, w trzech ostatnich lat działalności operacyjnej firmy. Pomiary wykonano techniką GC-MS. Do oznaczenia fitokannabinoidów wykorzystano metodę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Przeanalizowano próbki materiałów roślinnych pochodzących z odmiany *Futura*, *Santhica*, *Finola* i *Carmagnola*. Łącznie przeanalizowano dane dla 105 próbek suszu. Dane wartości średnich zestawiono w tabeli poniżej (Tabela 8).

CARMAGNOLA							
Rok	Nr	Typ	THC % mas.	CBD % mas.	CBG %mas.	CBC % mas.	CBN % mas.
2018	F44/18	<i>Carmagnola</i>	0,31	6,76	0	0,41	0
	F64/18	<i>Carmagnola</i>	0,44	6,46	0,39	0,1	0
	F65/18	<i>Carmagnola</i>	0,24	4,21	0,11	0,08	0
	F125/18	<i>Carmagnola s purple hemp</i>	0,11	3,33	0,12	0,03	0
		<i>Carmagnola s og +</i>	0,21	6,22	0	0,45	0
		<i>Carmagnola super silver hemp</i>	0,07	1,52	0,01	0,09	0
		<i>Carmagnola hemp og</i>	0,14	3,27	0,01	0,16	0
2019	F226/19 -1	<i>Carmagnola</i>	0,17	4,30	0,04	0,03	0,01
	F311/19 1	<i>Carmagnola selezionata</i>	0,19	4,44	0,32	0,13	0
	F318/19 2	<i>Carmagnola selezionata</i>	0,19	4,77	0,22	0,15	0
	F335/19	<i>Carmagnola selezionata</i>	0,79	8,23	0,16	0,37	0,01
	F331/19	<i>Carmagnola</i>	0,08	1,86	0,14	0,12	0
	F346/19 1	<i>Carmagnola</i>	0,12	3,19	0,11	0,11	0
	F341/19 2	<i>Carmagnola cs</i>	0,37	7,72	0,2	0,62	0
	F383/19 2	<i>Carmagnola</i>	0,33	1,74	0,12	0,19	0

	F385/19 3	<i>Carmangola</i>	0,15	0,90	0,02	0,04	0
2020	F195/20 1	<i>Carmangola</i>	1,56	5,34	0,47	0,19	0,02
2022	65/22 -4	<i>Carmangola</i>	0,19	3,14	0,04	0,19	0

FINOLA

Rok	Nr	Typ	THC %	CBD %	CBG %	CBC %	CBN %
	F3/18	<i>Finola</i>	0,34	1,48	0	0,02	0
	F5/18	<i>Finola</i>	0,45	1,48	0	0,08	0
	F6/18	<i>Finola</i>	0,02	2,75	0,01	0,01	0,01
	F8/18 - 1	<i>Finola</i>	0,16	1,16	0	0,01	0
	F8/18 - 2	<i>Finola</i>	0,42	2,82	0,05	0,12	0,01
	F8/18 - 4	<i>Finola</i>	0,14	1,93	0,03	0,08	0,01
	F11/18 - 1	<i>Finola</i>	0,28	1,72	0,03	0,08	0,01
	F11/18 - 2	<i>Finola</i>	0,11	1,40	0	0,02	0
	F15/18 - 2	<i>Finola</i>	0,13	1,86	0	0	0
	F15/18 - 3	<i>Finola krusz</i>	0,21	1,10	0,01	0	0
	F15/18 - 4	<i>Finola</i>	0,26	5,26	0,08	0,13	0,02
	F20/18 - 1	<i>Finola</i>	0,20	0,75	0	0,01	0
	F20/18 - 2	<i>Finola</i>	0,20	1,12	0,02	0,02	0
	F23/18 - 1	<i>Finola krusz</i>	0,23	0,85	0	0,01	0
	F23/18 - 2	<i>Finola krusz</i>	0,21	0,85	0	0,01	0
	F23/18 - 4	<i>Finola</i>	0,11	0,33	0	0,01	0
	F23/18 - 6	<i>Finola krusz</i>	0,22	0,82	0,01	0,02	0,01
	F40/18 - 2	<i>Finola premium</i>	0,16	3,40	0	0,07	0

	F40/18 - 3	<i>Finola</i>	0,14	2,95	0	0,08	0
	F42/18	<i>Finola</i>	0,17	1,66	0,01	0,15	0
	F43/18 - 2	<i>Finola krusz</i>	0,09	0,41	0	0,01	0
	F45/18	<i>Finola</i>	0,29	2,21	0	0,14	0
	F47/18 - 2	<i>Finola krusz</i>	0,26	1,72	0,04	0,09	0
	F47/18 - 3	<i>Finola krusz ii</i>	0,34	1,63	0,02	0,07	0
	F48/18 - 2	<i>Finola krusz</i>	0,21	1,37	0,01	0,08	0
	F48/18 - 3	<i>Finola</i>	0,67	2,72	0	0,38	0
	F50/18 - 4	<i>Finola</i>	0,50	4,19	0,02	0,06	0,01
	F65/18 - 2	<i>Finola</i>	0,24	2,69	0,07	0,04	0,01
	F88/18 - 2	<i>Finola krusz</i>	0,16	1,06	0,02	0,01	0,01
	F101/18 - 2	<i>Finola</i>	0,23	1,49	0,05	0,03	0,02
	F103/18 - 2	<i>Finola 17</i>	0,22	1,50	0,05	0,06	0,02
	F130/18 - 2	<i>Finola</i>	0,14	1,02	0	0,03	0,02
2019	F28/19 - 1	<i>Finola krusz</i>	0,22	1,43	0	0,03	0
	F28/19 - 2	<i>Finola 2 krusz</i>	0,15	1,03	0	0,03	0
	F28/19 - 4	<i>Finola krusz</i>	0,12	0,68	0	0,03	0
	F39/19	<i>Finola</i>	0,07	1,66	0,17	0,05	0
	F159/19	<i>Finola</i>	0,08	0,56	0	0,01	0
	F175/19 - 1	<i>Finola</i>	0,78	4,42	0,16	0,1	0
	F175/19 - 2	<i>Finola</i>	0,92	3,28	0,14	0,06	0
	F189/19 - 1	<i>Finola</i>	0,69	2,68	0,15	0,08	0
	F189/19 - 2	<i>Finola</i>	0,1	1,88	0,09	0,08	0

	F213/19 - 2	<i>Finola</i>	0,20	1,56	0,06	0,05	0
	F224/19 - 2	<i>Finola</i>	0,27	1,47	0,05	0,07	0
2020	68/20	<i>Finola v1</i>	0,29	6,34	0,11	0,23	0,01
	195/20 - 3	<i>Finola seedless</i>	0,19	3,99	0,07	0,14	0,1
	195/20 - 4	<i>Finola</i>	0,94	3,23	0,08	0,02	0,11
2021	248/21 - 1	<i>Finola</i>	0,10	3,01	0,08	0,06	0
2022	65/22 - 7	<i>Finola</i>	0,23	3,71	0,09	0,19	0
	65/22 - 8	<i>Finola</i>	0,14	2,32	0,05	0,11	0

SANTHICA

Rok	Nr	Typ	THC %	CBD %	CBG %	CBC %	CBN %
2018	F40/18 - 1	<i>Santhica 27</i>	LOQ	0,02	1,98	0,01	0
	F50/18 - 5	<i>Santhica</i>	0,01	0,53	2,49	0,17	0
	F65/18 - 4	<i>Santhica</i>	0,06	1,06	2	0,57	0
2019	F225/19	<i>Santhica 27</i>	LOQ	0,03	1,89	0,01	0
	F232/19 - 3	<i>Santhica</i>	0,02	0,34	2,16	0,01	0
	F243/19 - 4	<i>Santhica</i>	0,02	0,73	0,67	0,04	0
	F243/19 - 5	<i>Santhica</i>	LOQ	0,01	1,69	0,01	0
	F247/19 - 1	<i>Santhica</i>	LOQ	0,05	2,54	0,01	0
	F247-19 - 3	<i>Santhica</i>	LOQ	0,02	2,94	0,01	0
	F266/19 - 3	<i>Santhica</i>	LOQ	0,02	2,21	0,01	0
	F266/19 - 4	<i>Santhica</i>	LOQ	0,02	1,94	0	0
	F337/19 - 1	<i>Santhica</i>	0,03	0,83	1,57	0,08	0

	F337/19 - 7	<i>Santhica</i>	LOQ	0,02	1,5	0,07	0
	F340/19 - 3	<i>Santhica</i>	LOQ	0,25	0,83	0,07	0
	F358/19 - 1	<i>Santhica 70</i>	0,02	0,47	1,06	0,05	0
2021	283/21 - 2	<i>Santhica 27</i>	LOQ	0,08	1,12	0,01	0

Futura

Rok	Nr	Typ	THC %	CBD %	CBG %	CBC %	CBN %
2018	F34/18	<i>Futura 75</i>	0,07	2,51	0,01	0,06	0
	F36/18 - 2	<i>Futura</i>	0,09	1,87	0,01	0,06	0
	F37/18 - 2	<i>Futura</i>	0,33	2,21	0,1	0,01	0
	F71/18 - 3	<i>Futura</i>	0,18	2,40	0,8	0,15	0
2019	F232/19 - 1	<i>Futura</i>	0,10	2,38	0,08	0,08	0,01
	F232/19 - 2	<i>Futura</i>	0,10	2,49	0,11	0,11	0,01
	F234/19	<i>Futura 75</i>	0,09	2,21	0,12	0,08	0,01
	F247/19 - 2	<i>Futura</i>	0,10	2,62	0,09	0,04	0
	F252/19 - 1	<i>Futura</i>	0,14	2,93	0,16	0,07	0
	F276/19 - 6	<i>Futura 75</i>	0,04	0,95	0,02	0,02	0
	F282/19 - 2	<i>Futura 75</i>	0,19	4,00	0,23	0,18	0,01
	F287/19	<i>Futura 75</i>	0,08	2,41	0,16	0,08	0
	F311/19 - 2	<i>Futura 75</i>	0,17	4,30	0,14	0,1	0
	F326/19 - 2	<i>Futura 75</i>	0,06	1,63	0,06	0,05	0
	F337/19 - 2	<i>Futura</i>	0,15	3,48	0,11	0,07	0
F337/19 - 5	<i>Futura</i>	0,07	1,46	0,07	0,03	0	

F340/19 – 1	<i>Futura</i>	0,06	1,68	0,11	0,02	0
F340/19 – 2	<i>Futura</i>	0,09	2,39	0,2	0,03	0
F354/19	<i>Futura 75</i>	0,14	4,05	0,04	0,01	0
F385/19 – 5	<i>Futura</i>	0,09	1,24	0,02	0,01	0
F442/19 – 2	<i>Futura</i>	0,07	2,40	0,03	0,01	0

Tabela 8. Zawartość wybranych kannabinoidów: THC, CBD, CBN CBG (suma form kwasowych i obojętnych) w próbkach ziela konopi odmian Karmaniola, Finola, Futura, Santhica, mierzonych w latach 2018-2022

W analizie statystycznej wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Duncana (przedstawiono w materiałach dodatkowych). Istnieje istotna statystycznie różnica między grupami pod względem zawartości poszczególnych kannabinoidów. Carmagnola wykazała w tych latach największą zawartość THC, CBD oraz CBC w porównaniu do innych odmian. Najniższe stężenie THC było charakterystyczne dla Santhici, przy czym jest ona typową odmianą CBG charakteryzującą się niskim równoczesnym stężeniem CBD. Odmiany Futura i Finola były podobne pod względem zawartości CBD i CBC. Nie wykazano, by któraś z analizowanych odmian charakteryzowała się profilem kannabinoidowym na tyle charakterystycznym by jednoznacznie wskazywał on na konkretną odmianę. Wyraźnie widoczne jest natomiast znacznie zróżnicowanie zawartości kannabinoidów nie tylko pomiędzy odmianami, ale i w ramach jednej odmiany.

V.2.2 Wpływ rozpuszczalnika na skład wyciągu z konopi.

Zbadano również wpływ użytego rozpuszczalnika organicznego na profil metabolitów wtórnych ekstraktów suchych z kwiatostanu konopi włóknistej *Cannabis sativa*. Do badań wykorzystano specjalnie przygotowaną mieszankę dwóch odmian konopi siewnej uprawianych w 2021 r. na terenie Polski: *Finola* i *Santhica* w stosunku 4:1. Zastosowanie mieszaniny dwóch odmian konopi miało na celu zwiększenie zawartości cennego fitokannabinoidu, jakim jest CBG (kannabigerol), którego niewielkie ilości występują w odmianie *Finola*, a dominuje on w odmianie *Santhica*. W tabeli poniżej (Tabela 9) zamieszczono procentową zawartość pięciu fitokannabinoidów: THC (Δ^9 -tetrahydrokannabinol), CBD (kannabidiol), CBG, CBC (kannabichromen) oraz CBN (kannabinol) występujących w przygotowanej mieszance kwiatów konopi oraz wilgotność masy surowej.

ZAWARTOŚĆ FITOKANNABINOIDÓW W KWIATACH ORAZ ICH WILGOTNOŚĆ.						
Parametr	THC	CBD	CBG	CBC	CBN	Wilgotność
Udział [% mas.]	0.152	3.651	2.530	0.031	0.011	18.458

Tabela 9. Zawartość kannabinoidów (suma form kwaśnych i obojętnych) oraz wilgotność biomasy przygotowanej do eksperymentów ekstrakcyjnych.

Biomasę konopną wysuszono na wstępie w temperaturze 60°C przez 45 minut w suszarce Goldbrunn 450, co pozwoliła na zmniejszenie wilgotności materiału poniżej 8%. Tak przygotowane próbki biomasy ekstrahowano przy użyciu dziewięciu wariantach przy użyciu sześciu popularnych w przemyśle spożywczym rozpuszczalników organicznych (rozpuszczalniki pochodziły od Sigma-Aldrich®). Ekstrakcję alkoholową prowadzono w dwóch wariantach temperaturowych, a ekstrakcję heksanem w połączeniu z procesem winteryzacji. Proces pozyskania metabolitów wtórnych prowadzono przy użyciu: alkoholu metylowego (> 99.5 % v/v czystości), alkoholu etylowego (> 95.6 % v/v czystości), alkoholu izopropylowego (> 99 % v/v czystości), *n*-heksanu (> 95 % v/v czystości), acetonu (> 98.5 % v/v czystości) oraz eteru dietylowego (> 99.5 % v/v czystości). Próbkę przygotowanego do ekstrakcji surowca o masie 50 g wprowadzono 500 cm³ rozpuszczalnika i ekstrahowano w temperaturze 20°C, w zamkniętym zbiorniku wyposażonym w mieszadło magnetyczne przez 30 minut. Dla alkoholu etylowego i alkoholu izopropylowego proces powtórzono w temperaturze -45°C w celu ustalenia wpływu temperatury procesu na skład metabolitów wtórnych po ekstrakcji alkoholowej. Dla *n*-heksanu proces powtórzono w celu późniejszej winteryzacji jednego z uzyskanych ekstraktów. Winteryzację prowadzono w -45°C przez 24 godziny rozpuszczając ekstrakt w alkoholu metylowym w stosunku v/v 1:8. Następnie odfiltrowano fazę stałą (stanowiącą wytrącone z ekstraktu woski) pod obniżonym ciśnieniem 300 mbar na lejku ze spiekem (POR1) w obecności tlenku glinu III (> 96 % m/m czystości, Chempur®) jako adsorbenta z wykorzystaniem jakościowych filtrów celulozowych. Rozpuszczalniki odparowywano na rotacyjnej wyparce próżniowej model SBS-RV-5000 marki Steinberg Systems pod obniżonym ciśnieniem 100 mbar w zakresie temperatur 20 – 65°C do usunięcia całości rozpuszczalnika, a następnie ekstrakt wygrzewano przez 15 minut w temperaturze 65°C.

Uzyskane ekstrakty zostały zakodowane w następujący sposób: A – ekstrakt na bazie acetonu, B – ekstrakt na bazie eteru dietylowego, C – ekstrakt na bazie etanolu w 20°C, D – ekstrakt na bazie etanolu w -45°C, E – ekstrakt na bazie izopropanolu w 20°C, F – ekstrakt na bazie izopropanolu w -45°C, G – ekstrakt na bazie metanolu, H – ekstrakt na bazie *n*-heksan oraz I – ekstrakt na bazie *n*-heksan z późniejszą winteryzacją.

Realizując przyjęte cele pracy, uzyskane ekstrakty poddano badaniom metodami: chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

W każdym wariantcie ekstrakcji uzyskano inny profil fitokannabinoidów oraz różną masę uzyskanego ekstraktu. Profile kannabinoidów wyznaczono metodą GC-MS. Analizując uzyskane wyniki pomiarów, można stwierdzić, że największą czystością cechują się ekstrakty *n*-heksanowe po winteryzacji (ponad 67 % zawartości fitokannabinoidów) oraz etanolu w -45°C (ponad 60 %). Ekstrakty na bazie acetonu i alkoholu etylowego w 20°C wykazują najmniejszą czystość względem fitokannabinoidów, ale ich masy są największe. Oznacza to, że te rozpuszczalniki oprócz pożądanych fitokannabinoidów ekstrahują również wiele innych metabolitów wtórnych z suszu. Analiza statystyczna wpływu rozpuszczalnika na zawartość fitokannabinoidów wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy ich zawartością w poszczególnych ekstraktach. Wykazano również wpływ temperatury na efektywność ekstrakcji alkoholowej. Etanol oraz izopropanol w temperaturze -45°C wykazują lepszą zdolność do ekstrakcji fitokannabinoidów, niż w temperaturze 20°C. Ma to prawdopodobnie związek z wytrącaniem się części zanieczyszczeń w postaci wosków w trakcie ekstrakcji w -45°C. Z kolei proces winteryzacji zmniejsza masę ekstraktu o około 30%, ale zwiększa czystość ekstraktów o około 25%. Oznacza to, że oprócz wosków usunięta została również część fitokannabinoidów. Największa efektywność usuwania fitokannabinoidów z kwiatostanu konopi cechuje alkohole w temperaturze 20°C (metanol > 94%, etanol > 93%, izopropanol > 89%) i eter dietylowy (> 90%). Wynik ten jest zaskakujący, ponieważ poprzednia analiza wykazała, że ekstrakty uzyskane w ten sposób, nie cechują się wysoką czystością w zakresie zawartości fitokannabinoidów. Oznacza to, że alkohole, a w szczególności metanol, usuwają z roślin wiele innych metabolitów wtórnych. Ponadto metanol i etanol wykazują najlepszą zdolność do usuwania CBG (96–97%). Ogólna efektywność pozostałych rozpuszczalników wynosi 85 – 87%. Aceton i alkohole w temperaturze -45°C wykazują najmniejszą zdolność do ekstrakcji THC i CBD. Z kolei eter dietylowy, *n*-heksan i alkohole w -45°C wykazują najlepszą zdolność do ekstrakcji CBN. Poniżej (Tabela 10) zestawiono oznaczone metodą GC-MS zawartości pięciu podstawowych kannabinoidów w uzyskanych ekstraktach wraz z wyliczeniem odzysku ekstrakcji danego kannabinoidu w odniesieniu do wyjściowej biomasy.

EKSTRAKT	Zawartość w ekstrakcie [% mas] (Wydajność ekstrakcji [%])					
	THC	CBD	CBG	CBC	CBN	Σ
<i>A</i>	1.3 (81)	31.8 (84)	12.5 (91)	1.8 (90)	0.15 (91)	47.6 (86)
<i>B</i>	1.3 (91)	33.1 (89)	17.2 (92)	1.7 (90)	0.15 (95)	53.5 (90)
<i>C</i>	1.1 (90)	30.4 (91)	15.0 (97)	1.5 (92)	0.14 (86)	48.1 (93)
<i>D</i>	1.5 (83)	39.5 (83)	17.6 (93)	1.9 (90)	0.23 (95)	60.8 (87)
<i>E</i>	1.3 (91)	31.4 (87)	15.6 (93)	1.9 (89)	0.22 (91)	50.5 (90)
<i>F</i>	1.1 (80)	32.8 (82)	20.1 (92)	1.2 (86)	0.12 (95)	55.3 (85)
<i>G</i>	1.2 (91)	33.7 (92)	17.4 (97)	1.9 (93)	0.15 (91)	54.3 (94)
<i>H</i>	1.4 (90)	35.7 (92)	11.6 (86)	1.6 (93)	0.14 (95)	50.5 (87)
<i>I</i>	2.0 (90)	44.9 (86)	18.1 (84)	2.1 (90)	0.22 (91)	67.4 (85)

Tabela 10 Zawartość fitokannabinoidów w ekstraktach z konopi oraz wydajność ekstrakcji [%]. * za 100% przyjęto wydajność ekstrakcji kannabinoidów zaprezentowaną w Tabeli 6

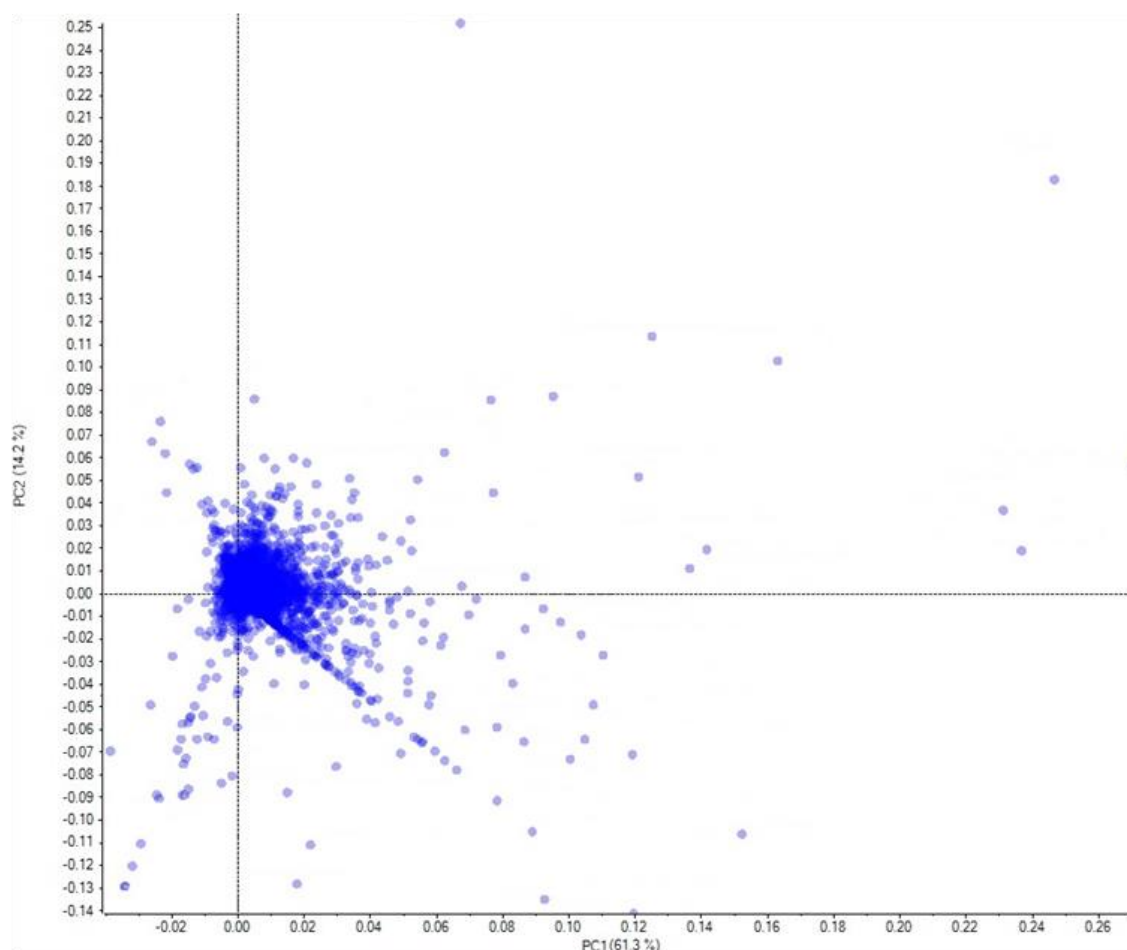
Różne masy ekstraktów i efektywności usuwania fitokannabinoidów przez użyte rozpuszczalniki wskazują na różne profile metabolitów wtórnych w uzyskanych ekstraktach. Z tego powodu ekstrakty poddano dalszym badaniom przy pomocy chromatografii cieczowej LC-MS oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Kompletne wyniki analizy LC-MS, ze względu na ich bardzo obszerną ilość załączono w materiałach dodatkowych. W wyniku analizy danych uzyskanych metodą LC-MS można stwierdzić, że ekstrakt metanolowy cechuje się najbogatszym składem. Dominują oczywiście sygnały pochodzące od kannabinoidów i ich form kwaśnych. Na chromatogramach ekstraktów na bazie n-heksanu nie stwierdzono obecności kwasowych form fitokannabinoidów. Prawdopodobnie ich ilość jest w nich śladowa. Eter dietylowy dobrze ekstrahuje pochodne kannabinolu i kannabigerolu, a gorzej pochodne Δ^9 -tetrahydrocannabinol. Nie stwierdzono istotnego wpływu acetonu na ekstrakcję kwasowych pochodnych któregoś z badanych fitokannabinoidów. Dzięki zastosowanej metodyce oznaczono również pozostałe metabolity wtórne występujące w badanych ekstraktach. Do analizy wyników uzyskanych techniką LC-MS zastosowano analizę wariancji (ANOVA) (Tabela 11) oraz analizę głównych składowych (PCA) (Rysunek 6, Rysunek 7) Analizę statystyczną ANOVA przeprowadzono przy użyciu

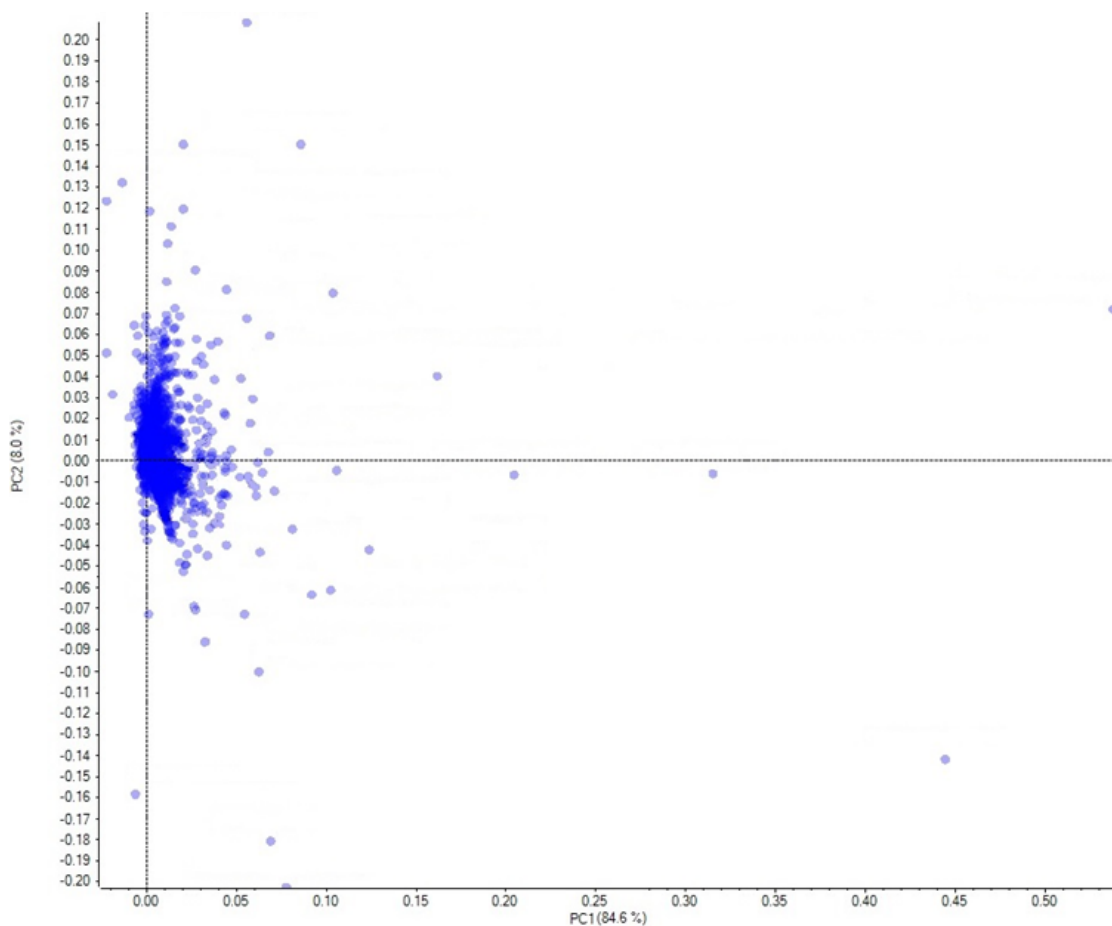
programu PS IMAGO PRO 8.0 (IBM SPSS) dla $p < 0.05$ z wykorzystaniem testu Duncana. Analizę PCA z wykorzystaniem programu MarkerView 1.3.1 (SCIEX).

EKSTRAKT	WARTOŚĆ	F	dF Effect	Df Error	p
A	31.9067	9929.515	2.630	534.834	<0.001
B	33.2605	9558.368	3.023	624.070	<0.001
C	30.4817	9660.146	2.929	519.215	<0.001
D	39.6552	9801.547	2.779	858.579	<0.001
E	32.5406	9510.816	2.962	549.989	<0.001
F	32.9030	9491.000	3.328	656.191	<0.001
G	33.8396	9561.796	3.012	644.490	<0.001
H	35.8599	10344.077	2.431	683.572	<0.001
I	45.0566	9936.123	2.651	1090.538	<0.001

Tabela 11. Wyniki analizy PCA analizy uzyskanych ekstraktów



Rysunek 6 Analiza głównych składowych (PCA) metabolitów wtórnych ekstraktów konopnych dla jonizacji dodatniej.



Rysunek 7 Analiza głównych składowych (PCA) metabolitów wtórnych ekstraktów konopnych dla jonizacji ujemnej.

Analiza PCA wykazała, że większość metabolitów wtórnych w uzyskanych ekstraktach jest taka sama bez względu na użyty rozpuszczalnik. Najwięcej metabolitów wtórnych powstaje w ekstrakcjach alkoholowych w temperaturze 20°C, ponadto metanol ekstrahuje nieporównywalnie więcej substancji niż pozostałe rozpuszczalniki organiczne (zidentyfikowano 225 metabolitów wtórnych, drugi etanol 165). Najmniej metabolitów wtórnych zidentyfikowano w próbkach ekstraktu n-heksanowego po winteryzacji (63 metabolity wtórne). Zaobserwowano również spadek ilości metabolitów wtórnych w przypadku ekstrakcji alkoholowej w -45 °C względem tego samego rozpuszczalnika w 20°C (dla etanolu 15% ubytku metabolitów wtórnych, dla izopropanolu 8%). Oznacza to, że część metabolitów wtórnych to substancje woskotwórcze i mogą być usunięte z ekstraktu poprzez winteryzację. Analiza LC-MS prowadzona przy jonizacji dodatniej i jonizacji ujemnej pozwoliła zidentyfikować substancje charakterystyczne dla zastosowanego rozpuszczalnika i wariantu temperaturowego (Tabela 12).

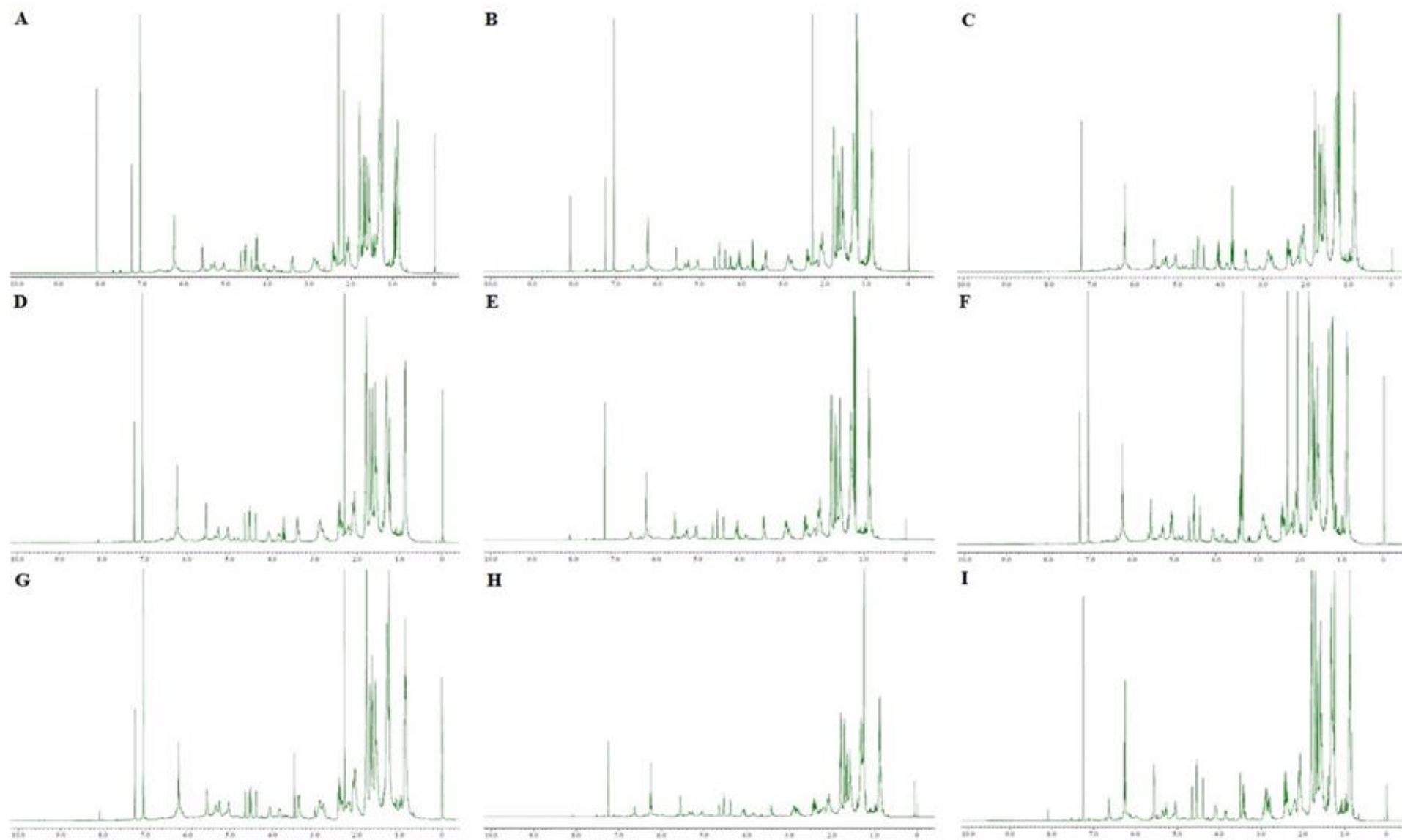
Ekstrakt	Zidentyfikowane charakterystyczne metabolity wtórne*
A	7,7,10-trimethyl-4-pentyl-7H-benzofuro<6,7-c><2>benzopyran; Carvone; 5-acetoxy-6-geranyl-3-n-pentyl-1,4-benzoquinone; α -bisabolol; malic acid; 11-acetoxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A;
B	6-isopentenyl apigenin; friedelan-3-one; dehydrocannabifuran; 8-hydroxycannabinolic acid A; 5,7-dihydroxy-1-spiro-cyclohexane; 4-allylguaiacol
C	Luteolin-8-C-glucoside; epifriedelanol; isoleucine betaine; Cannabidivarin; cannabispiradienone-A; D-myo-inositol; cannabivarichromene; ((1-pentyl-1H-indol-3-yl)(2,2,3,3-tetramethyl-cyclopropyl)methanone); 1-hydroxy-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-benzo[c]chromene-2-carboxylic acid; isopulegone; 5-[2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) ethyl]-2-methoxyphenol; vitexin; Acetylcannabispinol; 5'-methyl-4-pentylbiphenyl-2,2',6-triol; chrysoeriol
D	4-acetoxycannabichromene; Oleanolic acid; Linolenic acid; 2-carbethoxyindole; 6,7-trans-epoxycannabigerolic acid; 6,7-cis-epoxycannabigerolic acid
E	30-nor-9,19-cyclolanost-24-methylene-3 β -acetate; 7R-cannabicoumaronic acid A; 7-methoxycannabispirone; 6-geranylapiogenin
F	methyl 4-hydroxybenzoate; 2,6,6,9-tetramethyl-cycloundeca-1,4,8-triene; 12S-hydroxy-9Z,13E,15Z-octadecatrienoic acid
G	2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-7-propyl-5-chromenol; cyttoside; (6S,9R)-6,9-dihydroxymegastigman-4-en-3-one; β -4'-O-acetylcannabispiranol; (E)-2-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-5-propylbenzene-1,3-diol; methyl 4-hydroxycinnamate; scullcapflavone II; cannabisin C; 5-acetoxy-6-geranyl-3-n-pentyl-1,4-benzoquinone; 4'-methoxyluteolin-8-C- β -D-glucopyranoside; Cannabidiolic acid diacetate; nipasol; dihydroxyisoechinulin A; trans-grossamide; Cannabinin; 4-methylisopropylbenzene; 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylic acid
H	4-hydroxy-benzaldehyde; (8S,9Z)-cannabiphenolic acid B; cannabispirane; 1-methyl-4-isopropenylbenzene; canniflavone-2; 5-hydroxy-3,4-dimethyl-5-pentyl-2(5H)-furanone
I	-

Tabela 12 Metabolity wtórne charakterystyczne dla użytych rozpuszczalników.

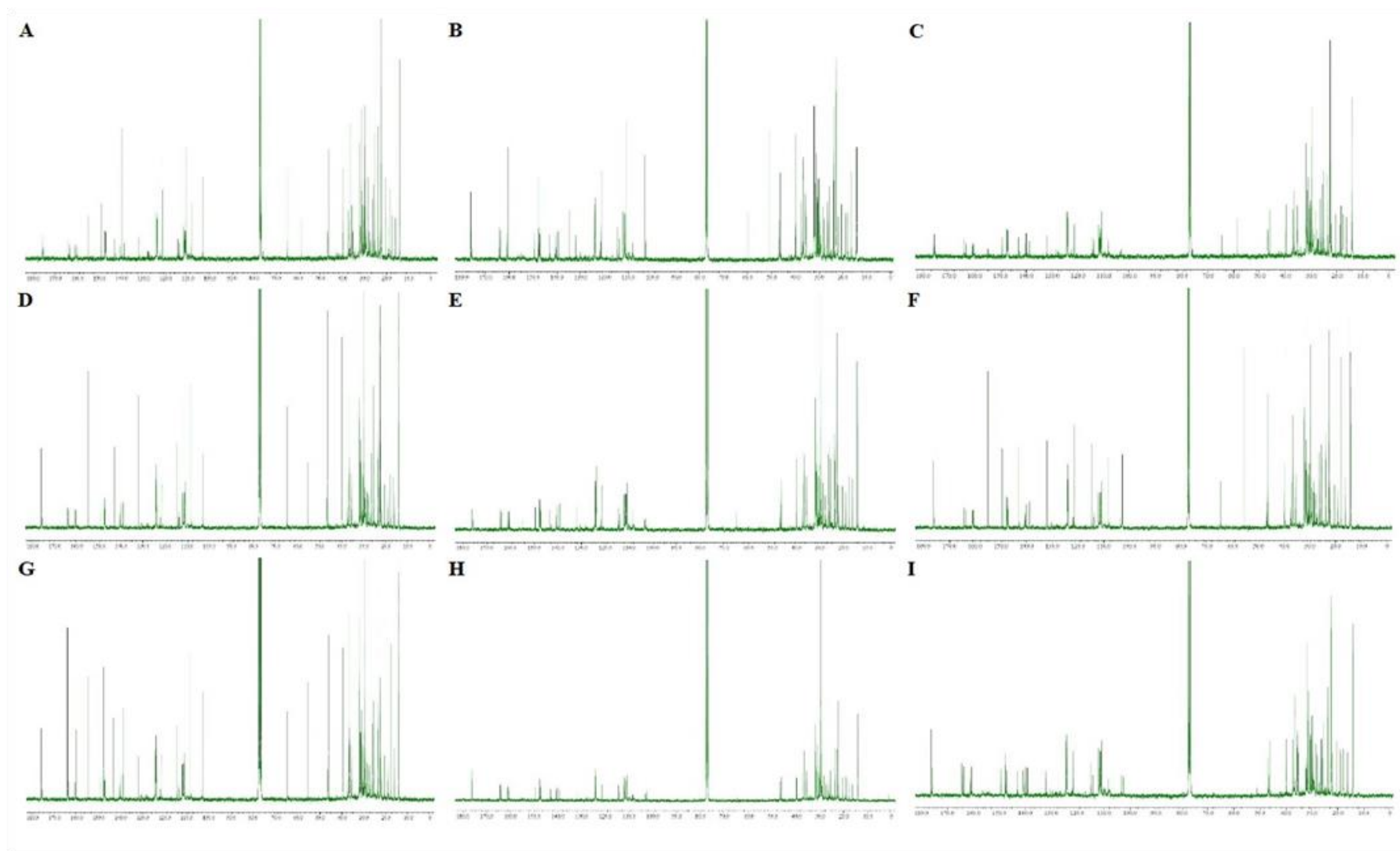
Najwięcej charakterystycznych metabolitów wtórnych zidentyfikowano w ekstraktach na bazie metanolu i etanolu w 20°C. Oznacza to, że pozyskane w ten sposób ekstrakty są najbardziej zanieczyszczone – lub z innego punktu widzenia różnorodne. Profile metabolitów wtórnych

ekstrakcji alkoholowych są do siebie podobne dla metanolu i etanolu, a izopropanol wykazuje większą selektywność ekstrakcji. Ekstrakcja alkoholowa w -45°C powoduje zmianę profilu charakterystycznych metabolitów wtórnych. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że część substancji, które ulegają ekstrakcji w temperaturze 20°C , w obniżonej temperaturze nie rozpuszcza się w zastosowanym ekstrakencie. Ekstrakty na bazie *n*-heksanu cechują się najlepszą czystością produktu względem występowania charakterystycznych metabolitów wtórnych. Proces winteryzacji nie powoduje zanieczyszczenia ekstraktów dodatkowymi związkami organicznymi. W ekstrakcie po winteryzacji nie zidentyfikowano żadnych charakterystycznych metabolitów wtórnych.

Uzyskane ekstrakty poddano także analizie techniką NMR zbierając widma protonowe i węglowe. Pomiary wykonano bez dodatku wzorca wewnętrznego. Cele było uwidocznienie ewentualnych różnic w obrazie spektroskopowym. Poniżej (Rysunek 8, Rysunek 9) zestawiono uzyskane widma protonowe (^1H) oraz widma węglowe (^{13}C) pozyskanych ekstraktów konopnych.



Rysunek 8 Widma protonowe ^1H uzyskanych ekstraktów konopnych.



Rysunek 9 Widma węglowe C^{13} ekstraktów konopnych.

Widma rezonansowe NMR pokazują różnice w odczytach sygnałów związków zawartych w badanych próbkach. Zarówno widma protonowe (^1H NMR), jak i widma węglowe (^{13}C NMR) potwierdzają badania przeprowadzone za pomocą LC-MS. W widmach ^1H w zakresach 0-2 ppm występują szumy związane z obecnością użytego rozpuszczalnika. W pozostałych zakresach widoczne są różnice w zawartości alifatycznych i aromatycznych związków zawartych w badanych próbkach. Widma ^1H dają możliwość identyfikacji zawartych w ekstraktach substancji, a więc mogą posłużyć do identyfikacji typu fingerprint. W widmach ^{13}C występują większe różnice w intensywności sygnałów dla poszczególnych związków zawartych w analizowanych ekstraktach niż w przypadku widm ^1H . Największą intensywności sygnału cechują się próbki metanolowe, co potwierdza wyniki badania LC-MS.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów na wpływem rozpuszczalnika na skład ekstraktu z konopi włóknistej (*Cannabis sativa* L.) wykazano, że profil metabolitów wtórnych w/w ekstraktów zależy od użytego rozpuszczalnika organicznego. W ekstraktach występują substancje charakterystyczne. Ekstrakcja alkoholowa w 20°C zapewnia najmniejszą selektywność uzyskanego profilu metabolitów wtórnych, ale obniżenie temperatury zwiększa ją i pozwala na zredukowanie ilości zanieczyszczeń nawet o 15%. Najlepszą selektywnością cechuje się ekstrakcja za pomocą węglowodorów krótkołańcuchowych, co zapewne ma związek z nierozpuszczaniem się części związków polarnych w *n*-heksanu. W próbkach poddanych winteryzacji nie wykryto substancji charakterystycznych, ale cechuje je większe stężenie fitokannabinoidów. Przeprowadzone badania pokazały, że użyty ekstrahent ma istotny wpływ na profil fitokannabinoidów w ekstraktach. Wybór rozpuszczalnika organicznego do ekstrakcji kwiatostanu konopi powinien zależeć od przeznaczenia ekstraktu. Wykazane różnice w efektywności usuwania fitokannabinoidów oraz składzie poszczególnych ekstraktów są cenną rekomendacją dla producentów, ale i użytkowników tego rodzaju produktów. Ekstrakty (wyciągi lub pasta) konopne są podstawowym produktem uzyskiwanym z konopi, stanowiącym surowiec w dalszych procesach przetwarzania, z którego uzyskuje się cały szereg produktów takich jako np. olejki, dodatki do żywności dla zwierząt, surowce kosmetyczne. Ekstrakty konopne stanowią też źródło kannabinoidów izolowanych z nich na drodze przeróbki chemicznej.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują również na możliwość wykorzystania ekstrakcji metanolem jako narzędzia w analizie typu fingerprint. Ekstrakt metanolowy okazał się być najbardziej zróżnicowanym. Analiza metodą LC-MS czy NMR może stanowić podstawę do badań porównawczych (tożsamościowych) materiałów roślinnych.

V.2.3 Analiza profilu frakcji lotnych.

Przeprowadzono również eksperymenty związane oznaczeniem profilu terpenowego wybranych odmian konopi włóknistych techniką GC-MS, w trakcie ich przechowywania, w okresie styczeń-czerwiec 2032. Analizy wykonano wykorzystując mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) Do badań wybrano odmiany *Finola*, *Futura*, *Fibror*, *Santhica* i *Matternhorn*. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli poniżej (Tabela 13).

Nr	Nazwa	tR (min)	RI exp. ¹	RI lit. ²	CAS	Styczeń			Kwiecień			Czerwiec		
						Finola A	Finola B	Finola C	Finola A	Finola B	Finola C	Finola A	Finola B	Finola C
1	Heksanal	3,425	n.d.	801	66 - 25 - 1	0,105	0,175	1,428	1,475	2,215	1,684	0,736	0,437	0,556
2	α -Pinen	7,035	933	933	80 - 56 - 8	10,515	5,619	10,826	16,059	13,568	14,164	4,84	4,623	5,191
3	β -Pinen	8,315	977	978	127 - 91 - 3	2,263	1,281	2,474	3,802	3,136	3,527	1,9	1,892	2,41
4	Myrcen	8,715	990	991	123 - 35 - 3	2,291	3,32	3,197	33,316	36,125	33,221	6,464	6,367	4,311
5	3-Karen	9,35	1011	1009	13466 - 78 - 9	0,38	0,304	0,6	0,552	0,534	0,661	0,177	0,277	0,339
6	Limonen	9,955	1029	1030	138 - 86 - 3	1,512	4,542	0,864	1,935	1,887	1,723	0,636	0,645	0,596
7	Eukaliptol	10,05	1031	1032	3779 - 61 - 1	2,426	2,921	3,052	0,385	0,428	0,5	1,331	1,375	1,63
8	Ocymenten	10,235	1037	1046	3779 - 61 - 1	0,151	0,18	0,207	1,277	1,477	1,494	0,251	0,329	0,348
9	(E)- β -Ocymenten	10,585	1047	1046	3779 - 61 - 1	0,573	1,128	0,798	9,033	9,766	9,549	1,288	1,681	1,397
10	Terpinolen	11,985	1089	1086	586 - 62 - 9	1,497	1,56	1,497	3,215	2,934	2,596	0,222	0,856	0,854
11	Kariofilen	22,67	1427	1424	13877 - 93 - 5	50,036	47,295	47,023	21,112	20,412	22,396	55,295	55,647	54,884
12	α -Bergamoten	22,95	1442	1435	13474 - 59 - 4	4,357	4,777	4,316	1,662	1,263	1,584	4,838	3,726	4,288
13	Humulen	23,37	1463	1454	6753 - 98 - 6	10,799	10,874	10,159	4,597	4,881	5,181	15,6	16,299	16,311
14	Aromandendren	23,515	1470	1461	68832 - 35 - 9	2,439	2,646	2,416	0,642	0,583	0,716	1,802	1,517	1,818
15	γ -Muurolen	23,995	1495	1477	30021-74-0	1,208	1,595	1,393	0,159	0,133	0,182	0,686	0,574	2,093
16	α -Selinen	24,15	1503	1501	473 - 13 - 2	1,506	1,739	1,453	0,145	0,107	0,151	1,639	1,621	0,519
17	γ -Kuprenen	24,595	1532	1530	58893 - 88 - 2	0,91	1,232	0,923	0,076	0,064	0,078	0,334	0,228	0,265
18	Selina-4(15),7(11)-dien	24,835	1548	1540	58893 - 88 - 2	3,148	3,669	3,258	0,202	0,154	0,209	0,575	0,528	0,561
19	Selina-3,7(11)-dien	24,94	1555	1546	222187 - 60 - 2	3,122	3,72	3,238	0,122	0,114	0,135	0,435	0,473	0,488
20	Tlenek kariofilenu	25,585	1597	1587	1139 - 30 - 6	0,764	1,424	0,876	0,236	0,218	0,249	0,952	0,904	1,142

Nr	Nazwa	tR (min)	RI _{exp.}	RI _{lit.}	CAS	Styczeń			Kwiecień			Czerwiec		
						Fibror A	Fibror B	Fibror C	Fibror A	Fibror B	Fibror C	Fibror A	Fibror B	Fibror C
1	Heksanal	3,425	n.d.	801	66 - 25 - 1	5,35	1,931	3,427	9,304	8,6	8,952	7,954	1,807	2,628
2	α -Pinen	7,035	933	933	80 - 56 - 8	0,388	0,58	0,589	1,151	1,211	1,181	1,041	0,427	0,322
3	β -Pinen	8,315	977	978	127 - 91 - 3	0,312	0,578	0,453	1,93	3	2,465	1,796	13,643	6,604
4	Myrcen	8,715	990	991	123 - 35 - 3	6,068	7,724	7,818	16,389	16,562	16,4755	20,346	11,571	7,155
5	3-Karen	9,35	1011	1009	13466 - 78 - 9	0,054	0,093	0,058	0,39	0,58	0,485	0,238	1,087	0,181
6	Limonen	9,955	1029	1030	138 - 86 - 3	4,065	5,751	5,494	9,579	8,971	9,275	9,111	2,226	2,713
7	Eukaliptol	10,05	1031	1032	3779 - 61 - 1	0,425	0,341	0,456	0,732	0,354	0,543	0,148	1,123	0,185
8	Ocymenten	10,235	1037	1046	3779 - 61 - 1	0,027	0,058	0,047	0,323	0,251	0,287	0,095	0,125	0,261
9	(E)- β -Ocymenten	10,585	1047	1046	3779 - 61 - 1	0,585	0,795	0,591	1,892	1,746	1,819	1,652	0,411	0,432
10	Terpinolen	11,985	1089	1086	586 - 62 - 9	2,349	0,83	0,779	2,036	1,956	1,996	1,643	2,882	2,799
11	Kariofilen	22,67	1427	1424	13877 - 93 - 5	42,019	44,81	44,902	31,849	32,174	32,0115	32,923	32,952	40,479
12	α -Bergamoten	22,95	1442	1435	13474 - 59 - 4	5,583	6,307	5,579	3,169	3,487	3,328	3,688	4,003	5,404
13	Humulen	23,37	1463	1454	6753 - 98 - 6	8,244	8,084	8,226	6,244	6,036	6,14	5,943	7,315	8,657
14	Aromandendren	23,515	1470	1461	68832 - 35 - 9	0,695	0,988	0,833	0,783	0,98	0,8815	0,913	0,909	1,714
15	γ -Muurolen	23,995	1495	1477	30021-74-0	0,719	0,697	0,634	0,734	0,751	0,7425	0,702	1,478	1,756
16	α -Selinen	24,15	1503	1501	473 - 13 - 2	1,071	0,938	0,697	0,641	0,612	0,6265	0,611	3,475	3,646
17	γ -Kuprenen	24,595	1532	1530	58893 - 88 - 2	1,545	1,564	1,341	0,878	1,06	0,969	0,906	1,592	2,569
18	Selina-4(15),7(11)-dien	24,835	1548	1540	58893 - 88 - 2	8,11	7,863	7,121	4,665	4,502	4,5835	4,146	5,184	5,27
19	Selina-3,7(11)-dien	24,94	1555	1546	222187 - 60 - 2	7,843	7,843	7,066	3,947	3,831	3,889	3,713	3,124	3,025
20	Tlenek kariofilenu	25,585	1597	1587	1139 - 30 - 6	4,548	2,225	3,889	3,363	3,335	3,349	2,429	4,665	4,2

Nr	Nazwa	tR (min)	RI		CAS	Futura A	Futura B	Futura C	Futura A	Futura B	Futura C	Futura A	Futura B	Futura C
			exp.	RI lit.										
1	Heksanal	3,425	n.d.	801	66 - 25 - 1	0,598	0,354	0,411	0,271	0,246	0,243	0,04	0,051	0,055
2	α -Pinen	7,035	933	933	80 - 56 - 8	23,905	22,05	18,265	27,233	26,868	25,376	22,041	16,229	14,044
3	β -Pinen	8,315	977	978	127 - 91 - 3	8,064	7,827	6,59	8,048	7,957	7,465	6,438	4,609	3,129
4	Myrcen	8,715	990	991	123 - 35 - 3	16,016	20,205	16,649	24,296	23,769	21,988	8,085	10,692	7,353
5	3-Karen	9,35	1011	1009	13466 - 78 - 9	0,599	0,808	0,672	0,762	0,742	0,788	0,319	0,311	0,267
6	Limonen	9,955	1029	1030	138 - 86 - 3	2,82	3,494	2,827	2,65	2,897	2,739	1,217	1,56	1,217
7	Eukaliptol	10,05	1031	1032	3779 - 61 - 1	0,432	0,256	0,325	0,234	0,124	0,202	1,377	0,442	0,49
8	Ocymen	10,235	1037	1046	3779 - 61 - 1	0,906	1,201	0,996	0,937	0,83	0,784	0,426	0,419	0,467
9	(E)- β -Ocymen	10,585	1047	1046	3779 - 61 - 1	6,146	7,818	6,441	5,201	4,708	4,454	3,046	2,447	2,366
10	Terpinolen	11,985	1089	1086	586 - 62 - 9	16,461	17,652	18,314	7,649	8,443	7,268	3,435	4,535	2,746
11	Kariofilen	22,67	1427	1424	13877 - 93 - 5	13,702	10,634	14,765	15,836	16,174	19,748	35,8	39,074	44,882
12	α -Bergamoten	22,95	1442	1435	13474 - 59 - 4	2,635	1,97	2,983	1,191	1,425	1,98	2,665	3,809	5,445
13	Humulen	23,37	1463	1454	6753 - 98 - 6	2,391	1,767	3,795	3,098	3	3,631	8,321	8,62	9,507
14	Aromandendren	23,515	1470	1461	68832 - 35 - 9	0,035	0,097	0,16	0,207	0,184	0,232	0,786	0,452	0,587
15	γ -Muurolen	23,995	1495	1477	30021-74-0	0,398	0,285	0,474	0,576	0,449	0,532	1,704	1,4	0,59
16	α -Selinen	24,15	1503	1501	473 - 13 - 2	0,536	0,37	0,629	0,557	0,46	0,528	1,241	0,936	0,877
17	γ -Kuprenen	24,595	1532	1530	58893 - 88 - 2	0,28	0,208	0,365	0,1	0,134	0,175	0,298	0,194	0,806
18	Selina-4(15),7(11)-dien	24,835	1548	1540	58893 - 88 - 2	2,163	1,557	2,745	0,61	0,885	0,992	1,498	2,372	2,978
19	Selina-3,7(11)-dien	24,94	1555	1546	222187 - 60 - 2	1,776	1,278	2,287	0,328	0,5	0,588	0,819	1,346	1,848
20	Tlenek kariofilenu	25,585	1597	1587	1139 - 30 - 6	0,138	0,17	0,308	0,216	0,206	0,287	0,441	0,501	0,348

Styczeń

Kwiecień

Czerwiec

Nr	Nazwa	tR (min)	RI		CAS	Santhica			Santhica			Santhica		
			exp.	RI lit.		A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	Heksanal	3,425	n.d.	801	66 - 25 - 1	0,73	1,278	2,354	2,192	2,111	2,306	0,636	0,166	0,401
2	α -Pinen	7,035	933	933	80 - 56 - 8	0,219	0,286	0,433	0,823	0,913	0,821	0,47	0,127	0,2985
3	β -Pinen	8,315	977	978	127 - 91 - 3	2,075	2,646	3,043	2,515	2,515	2,657	5,778	9,335	7,5565
4	Myrcen	8,715	990	991	123 - 35 - 3	3,578	0,682	3,827	22,748	19,945	16,662	9,201	4,38	6,7905
5	3-Karen	9,35	1011	1009	13466 - 78 - 9	0,123	0,158	0,129	0,335	0,396	0,33	1,062	0,161	0,6115
6	Limonen	9,955	1029	1030	138 - 86 - 3	0,641	1,537	1,822	8,778	8,719	7,237	0,683	2,766	1,7245
7	Eukaliptol	10,05	1031	1032	3779 - 61 - 1	0,135	0,574	0,658	0,987	1,763	2,245	1,721	1,017	1,369
8	Ocymen	10,235	1037	1046	3779 - 61 - 1	0,333	0,182	0,154	0,107	0,199	0,166	0,444	0,058	0,251
9	(E)- β -Ocymen	10,585	1047	1046	3779 - 61 - 1	0,187	0,31	0,23	1,221	0,941	0,498	0,242	0,681	0,4615
10	Terpinolen	11,985	1089	1086	586 - 62 - 9	45,361	45,225	45,841	0,624	0,693	0,669	1,025	2,337	1,681
11	Kariofilen	22,67	1427	1424	13877 - 93 - 5	2,732	3,09	2,517	33,837	35,079	38,691	40,885	41,98	41,4325
12	α -Bergamoten	22,95	1442	1435	13474 - 59 - 4	10,503	10,125	9,841	2,68	3,104	4,44	2,912	3,647	3,2795
13	Humulen	23,37	1463	1454	6753 - 98 - 6	1,109	0,538	0,513	6,304	6,229	6,394	9,806	10,016	9,911
14	Aromandendren	23,515	1470	1461	68832 - 35 - 9	1,156	1,287	1,057	1,082	1,228	1,439	1,35	1,581	1,4655
15	γ -Muurolen	23,995	1495	1477	30021-74-0	0,095	1,049	0,993	0,594	0,567	0,559	1,11	1,028	1,069
16	α -Selinen	24,15	1503	1501	473 - 13 - 2	1,049	1,925	0,843	0,787	0,779	0,635	4,679	2,822	3,7505
17	γ -Kuprenen	24,595	1532	1530	58893 - 88 - 2	2,013	1,993	1,715	0,966	0,984	0,883	2,195	2,087	2,141
18	Selina-4(15),7(11)-dien	24,835	1548	1540	58893 - 88 - 2	11,947	11,694	10,408	6,075	6,292	5,863	6,24	6,457	6,3485
19	Selina-3,7(11)-dien	24,94	1555	1546	222187 - 60 - 2	12,315	12,189	10,725	5,725	5,868	5,898	2,84	3,355	3,0975
20	Tlenek kariofilenu	25,585	1597	1587	1139 - 30 - 6	3,699	3,235	2,899	1,619	1,675	1,608	6,721	5,998	6,3595

Styczeń

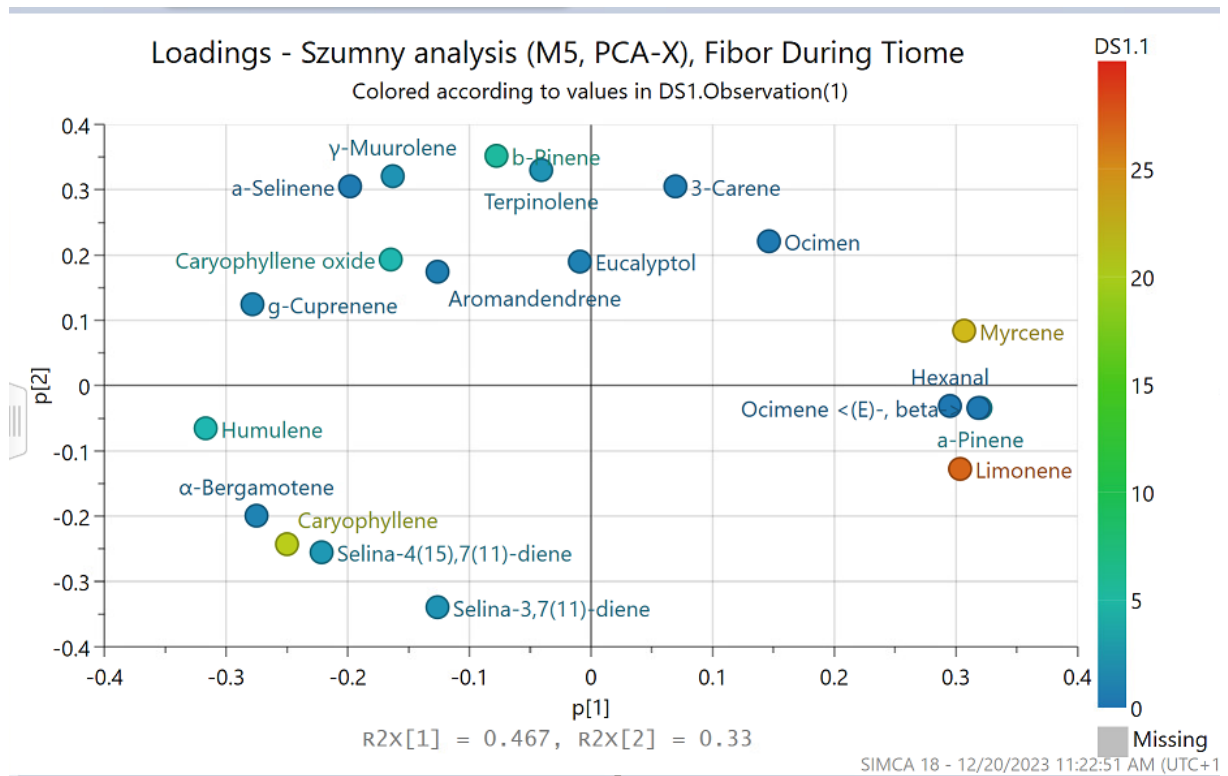
Kwiecień

Czerwiec

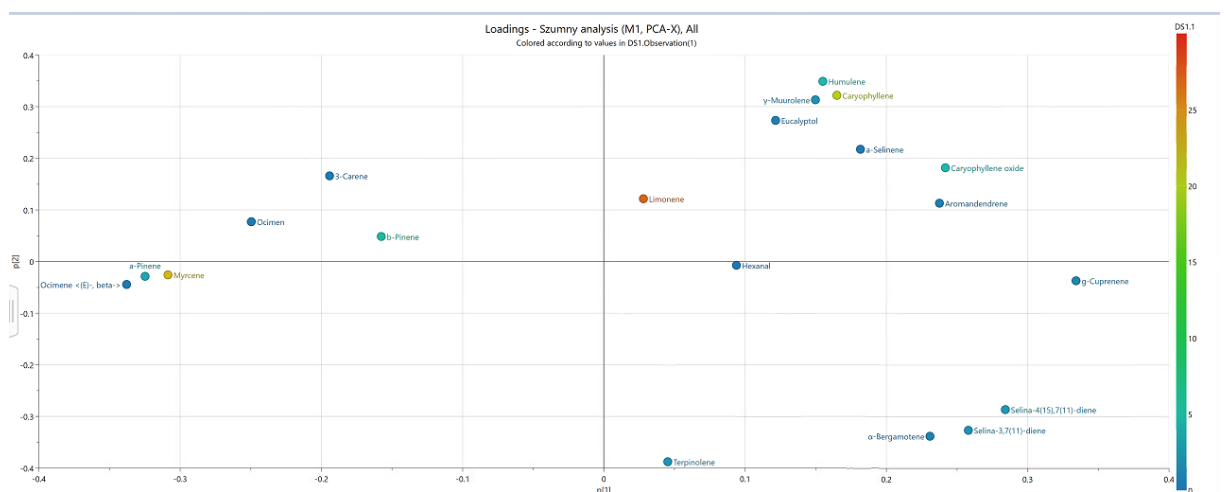
Nr	Nazwa	tR (min)	RI		CAS	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>	<i>Matternh</i>
			exp.	RI lit.		<i>orn A</i>	<i>orn B</i>	<i>orn C</i>	<i>orn A</i>	<i>orn B</i>	<i>orn C</i>	<i>rn A</i>	<i>orn B</i>	<i>orn C</i>
1	Heksanal	3,425	n.d.	801	66 - 25 - 1	5,07	2,654	3,862	4,535	4,769	0,261	0,261	1,637	0,93
2	α -Pinen	7,035	933	933	80 - 56 - 8	0,725	1,366	1,0455	0,865	1,826	2,845	2,845	3,359	0,589
3	β -Pinen	8,315	977	978	127 - 91 - 3	1,484	1,647	1,5655	1,625	3,86	5,354	5,354	4,354	4,706
4	Myrcen	8,715	990	991	123 - 35 - 3	7,446	7,963	7,7045	6,703	20,459	22,77	22,77	2,228	6,391
5	3-Karen	9,35	1011	1009	13466 - 78 - 9	0,249	0,14	0,1945	0,091	0,229	0,526	0,526	0,718	1,081
6	Limonen	9,955	1029	1030	138 - 86 - 3	9,087	10,706	9,8965	8,766	18,606	27,001	27,001	5,505	9,099
7	Eukaliptol	10,05	1031	1032	3779 - 61 - 1	0,838	0,928	0,883	1,018	0,474	0,812	0,812	1,396	5,277
8	Ocymen	10,235	1037	1046	3779 - 61 - 1	0,062	0,101	0,0815	0,121	0,334	0,402	0,402	0,579	2,246
9	(E)- β -Ocymen	10,585	1047	1046	3779 - 61 - 1	0,237	0,114	0,1755	0,624	0,307	0,319	0,319	2,335	1,509
10	Terpinolen	11,985	1089	1086	586 - 62 - 9	0,805	0,985	0,895	0,821	1,211	1,798	1,798	1,085	1,302
11	Kariofilen	22,67	1427	1424	13877 - 93 - 5	51,453	51,083	51,268	53,112	27,523	20,726	20,726	42,043	30,503
12	α -Bergamoten	22,95	1442	1435	13474 - 59 - 4	1,002	1,188	1,095	1,085	1,235	0,876	0,876	0,955	1,608
13	Humulen	23,37	1463	1454	6753 - 98 - 6	12,84	11,127	11,9835	11,656	5,406	4,178	4,178	10,518	7,111
14	Aromandendren	23,515	1470	1461	68832 - 35 - 9	0,693	0,689	0,691	0,774	0,652	0,642	0,642	1,212	1,295
15	γ -Muurolen	23,995	1495	1477	30021-74-0	1,44	1,501	1,4705	1,464	1,233	1,843	1,843	3,199	4,748
16	α -Selinen	24,15	1503	1501	473 - 13 - 2	0,413	0,432	0,4225	0,481	0,551	0,427	0,427	5,065	5,909
17	γ -Kuprenen	24,595	1532	1530	58893 - 88 - 2	0,727	0,837	0,782	0,756	0,613	1,038	1,038	1,063	1,832
18	Selina-4(15),7(11)-dien	24,835	1548	1540	58893 - 88 - 2	0,83	1,16	0,995	0,911	3,316	2,117	2,117	1,244	3,44
19	Selina-3,7(11)-dien	24,94	1555	1546	222187 - 60 - 2	0,515	0,839	0,677	0,596	3,393	1,823	1,823	0,844	2,353
20	Tlenek kariofilenu	25,585	1597	1587	1139 - 30 - 6	4,083	4,54	4,3115	3,996	4,003	4,244	4,244	10,659	8,072

Tabela 13. Profile terpenowe dla odmian *Finola*, *Mathethorn*, *Futura*, *Fibor* i *Santhica*. ¹ Literaturowy indeks retencji; ² – eksperymentalny indeks retencji

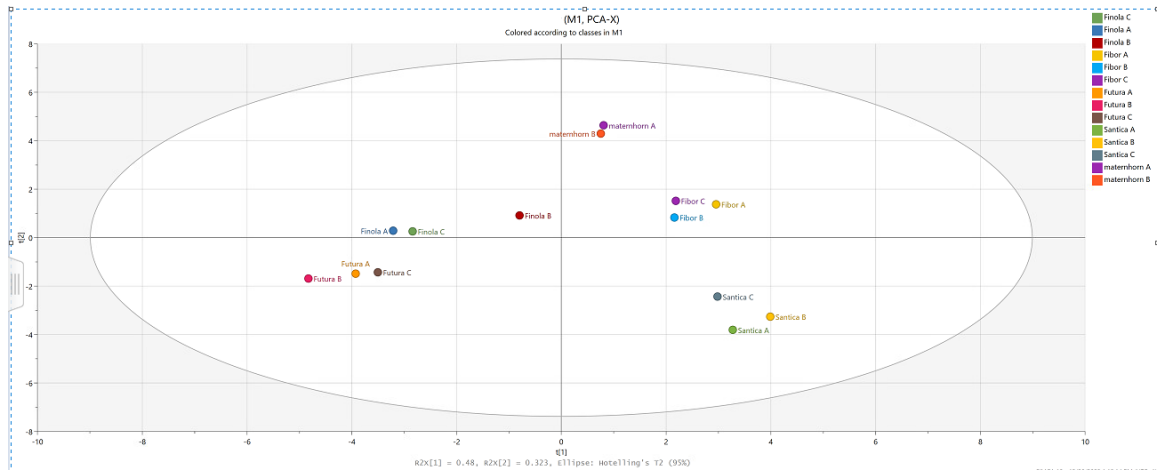
Wyniki analizy zawartości terpenów poddano również analizie statystycznej PCA. Wyniki analizy statystycznej przedstawiono na wykresach poniżej (Rysunek10)



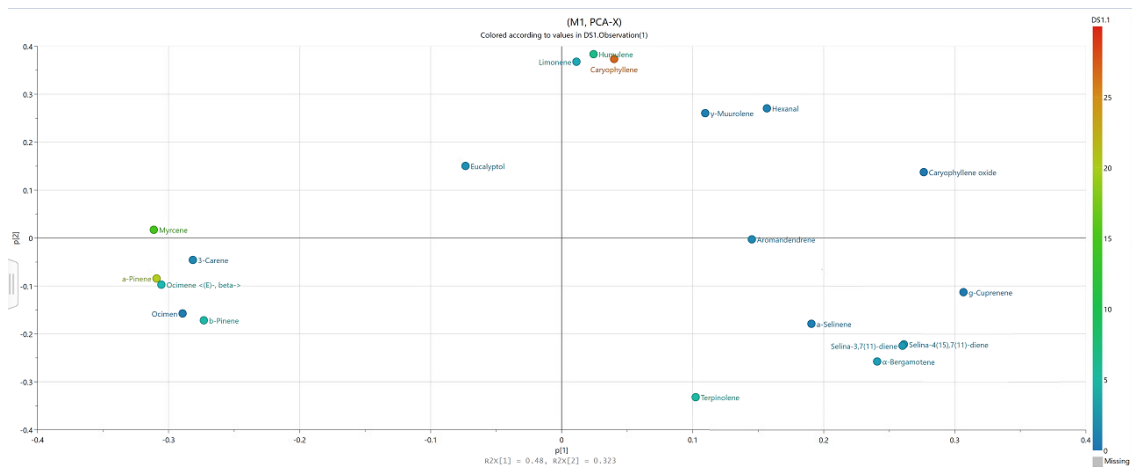
Rysunek 10. Analizy PCA dla zmiennych VOCs. Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs w obrębie miesięcy



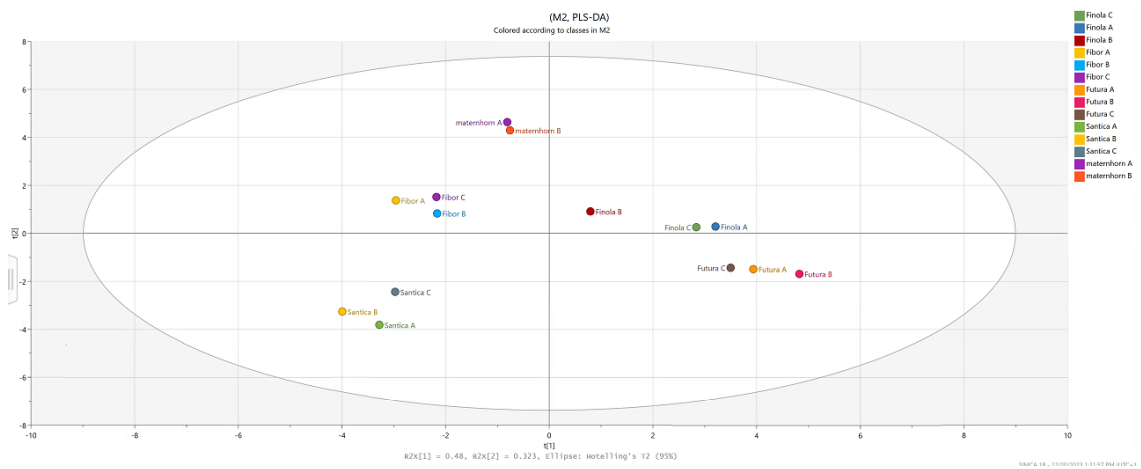
Rysunek 11. Analizy PCA dla zmiennych VOCs. Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs (zbiorczo)



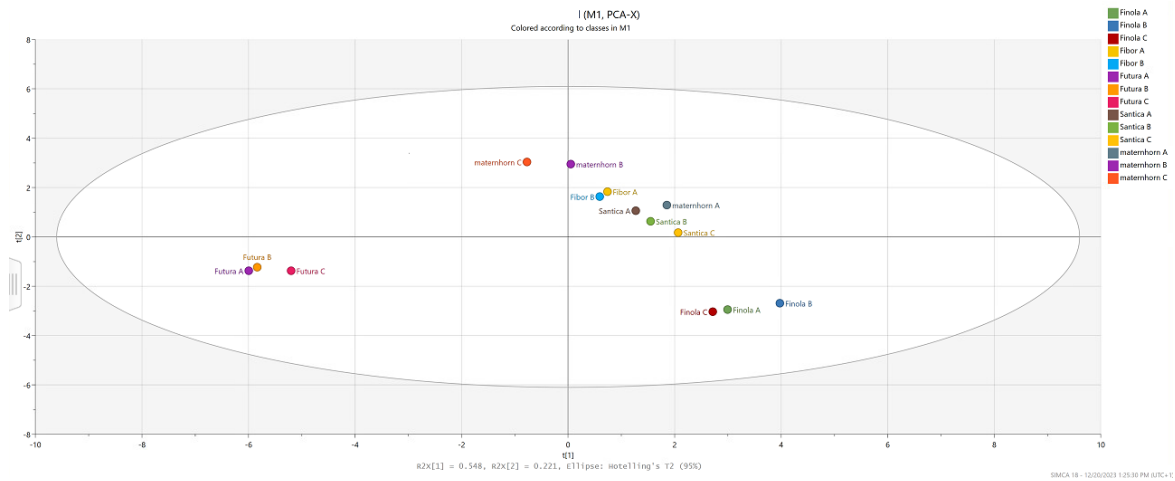
Rysunek 12 Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs (próbki ze stycznia 2022)



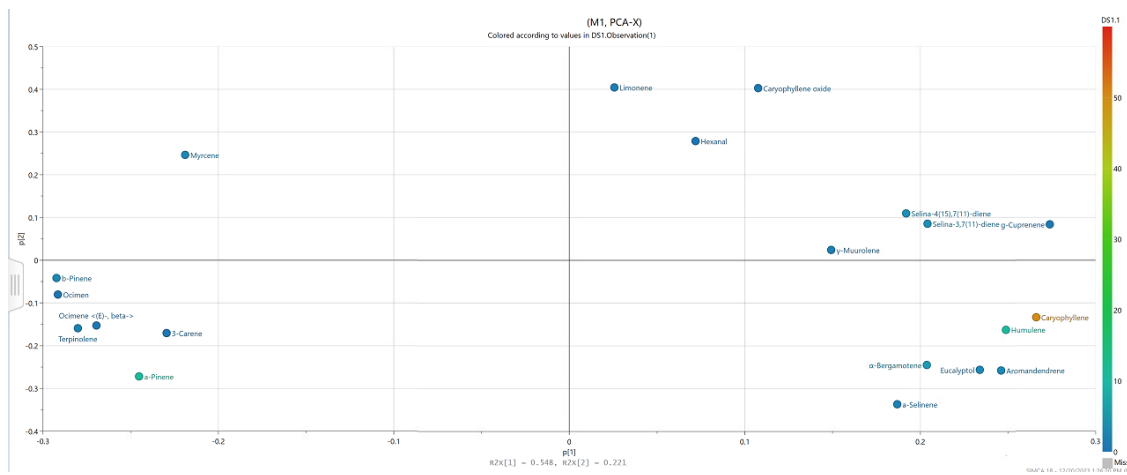
Rysunek 13 Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs (próbki ze stycznia 2022)



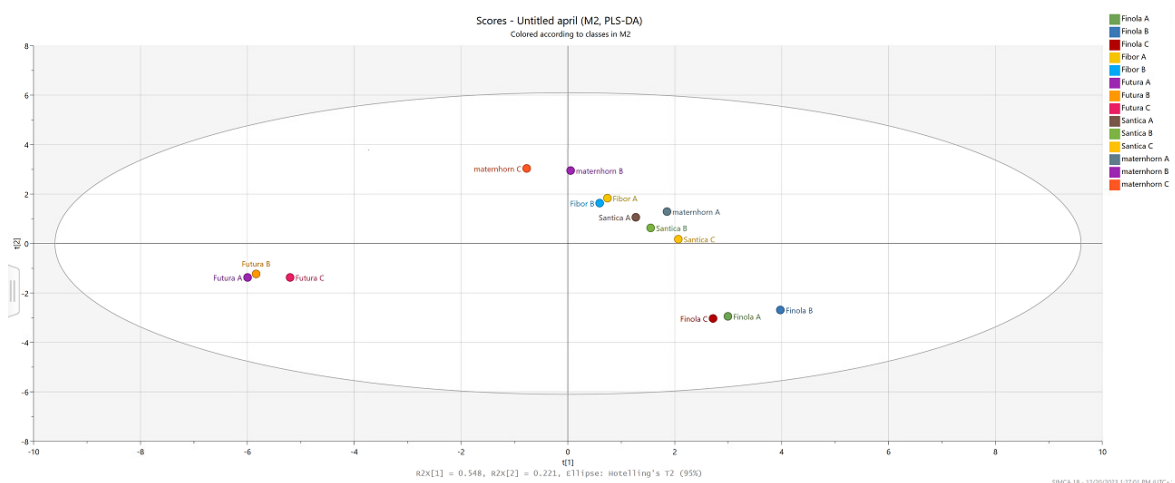
Rysunek 14 Wykres metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów - analiza dyskryminacyjna (PLSDA) VOCs dla kultuwarów konopii (próbki ze stycznia).



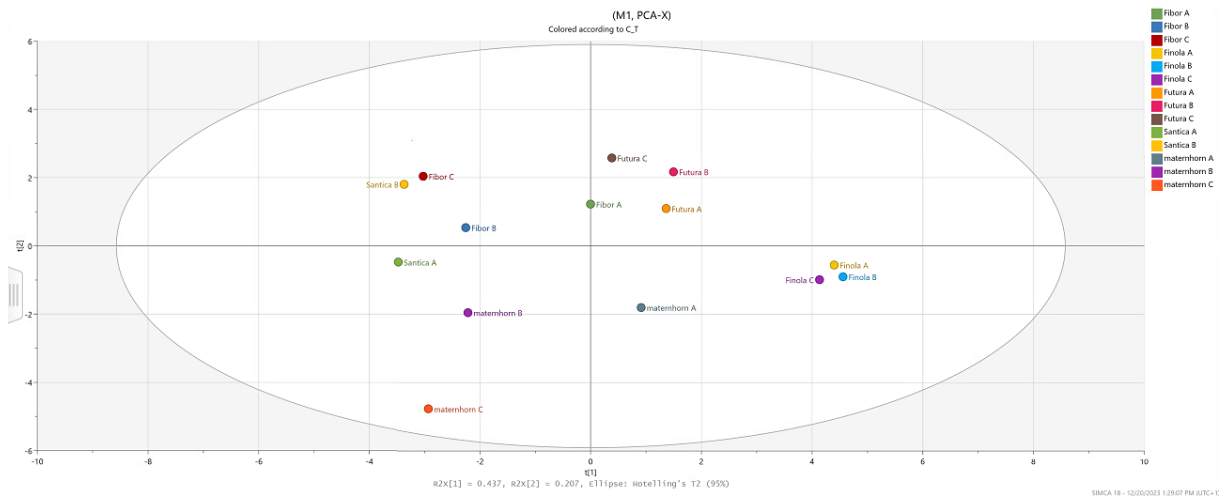
Rysunek 15 Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs (próbki z kwietnia 2022)



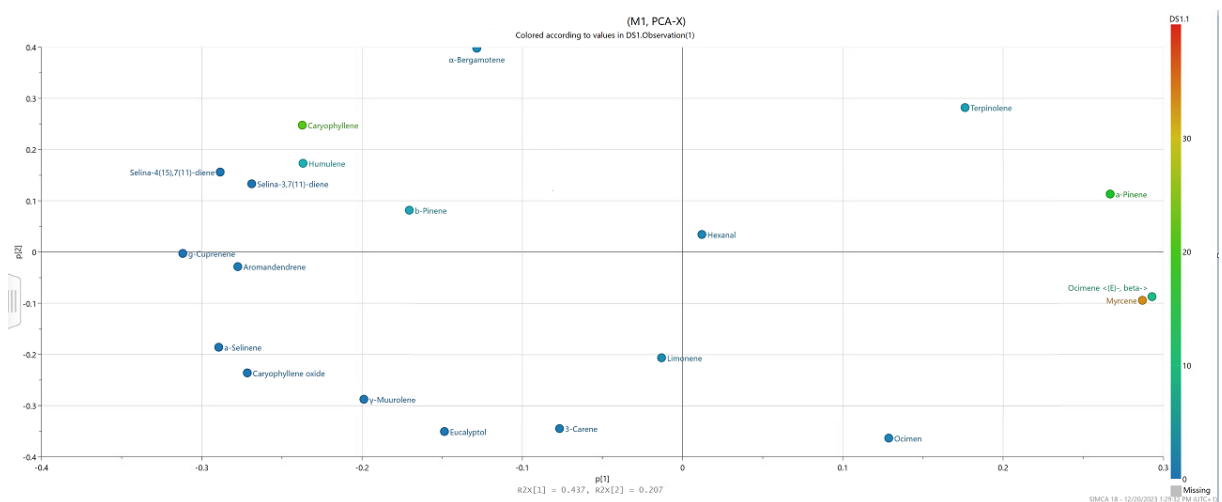
Rysunek 16 Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs (próbki z kwietnia 2022)



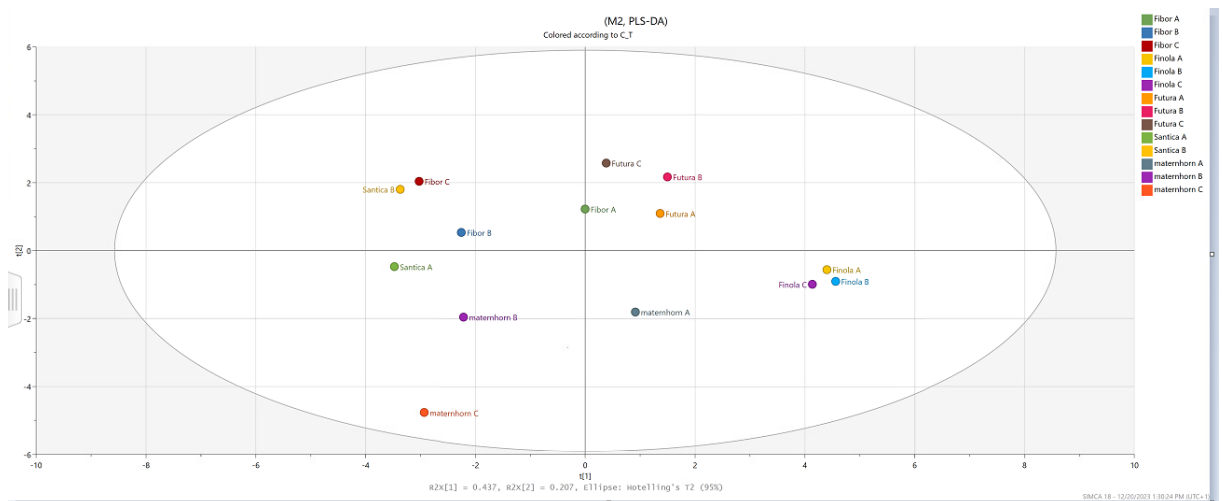
Rysunek 17 Wykres metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów - analiza dyskryminacyjna (PLSDA) VOCs dla kultywarów konopi (próbki ze kwiecien)



Rysunek 18 Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs (próbki z kwietnia 2022)



Rysunek 19 Wykresy obciążenia analizy dla głównych składowych (Loading plot) PCA-X dla zmiennych VOCs (próbki z czerwca 2022).



Rysunek 20 Wykres metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów - analiza dyskryminacyjna (PLSDA) VOCs dla kultywarów konopi (próbki z czerwca)

Próbki były przechowywane w warunkach chłodniczych. W wyniku analizy uzyskanych wyników można zauważyć znaczną zmienność w czasie zawartości poszczególnych terpenów w obrębie każdej z odmian. Ponadto profil terpenowy poszczególnych odmian również wykazuje znaczące zróżnicowanie. Wynika z tego, że warunki i czas przechowywania mają ogromne znaczenie. Jest to bardzo istotna, z punktu widzenia badań jakościowych porównawczych obserwacja. Z wykonanych pomiarów wynika, że związki lotne konopi zmieniając z czasem jej przechowywania i nabierają cech indywidualnych. Stwarza to możliwość ich porównywania a w konsekwencji analizę tożsamościową.

V.2.4 Wyniki analiz genetycznych

Genomowe DNA wyekstrahowano z każdej próbki przy użyciu zestawu Fast DNA Plant Screen PCR A&A BIOTECHNOLOGY zgodnie z instrukcjami producenta. Fragment tkanki roślinnej o średnicy ok. 0,5cm wycięto i przeniesiono do próbki typu Eppendorf. Następnie dodano 100ul buforu A i inkubowano przez 10min w temp. 95stC. Po schłodzeniu próbki do temp. pokojowej dodano 100ul buforu B i dokładnie wymieszano przez pipetowanie. Tak przygotowane próbki poddano dalszej analizie. Próbki przechowywano w lodówce w temp. od +4 do +8stC do 3 miesięcy. Każdorazowo, na potrzeby każdej kolejnej analizy, po przekroczeniu trzymiesięcznego okresu przechowywania w podanych warunkach, próbki izolowano ze świeżego materiału. Pracę rozpoczęto od przygotowania wyjściowych 100 µM stocków primerów poprzez dodanie odpowiedniej (podanej przez producenta) objętości wolnej od nukleaz wody – startery były zamrożone i chronione przed światłem (znakowane).

W celu optymalizacji warunków reakcji wykonano kilka powtórzeń w kilku kombinacjach: Proporcje i stężenia primerów do reakcji PCR przygotowano korzystając z protokołu producenta Invitrogen Platinum Hot Start PCR 2X Master Mix. Pierwsza próba została przeprowadzona dla 2 próbek roślinnych opisanych jako „*Dioica*” i „*Kompolti*”. W próbie tej przygotowano reakcje przy użyciu wszystkich 20 par badanych primerów – celem próby było wstępne ocenienie warunków reakcji i ich optymalizacja. Każda z badanych próbek była nastawiona w 4 wariantach – 4 multiplexy (mixy) primerów (Tabela 14).

Multiplex 1	Multiplex 2	Multiplex 3	Multiplex 4
SSR_6-3	SSR_2-1	SSR_1-4	SSR_9-4
SSR_2-2	SSR_4-1	SSR_3-1	SSR_1-1
SSR_X-1	SSR_8-2	SSR_8-4	SSR_5-5
SSR_4-2	SSR_5-2		SSR_6-4
SSR_7-3	SSR_6-1		
SSR_2-3	SSR_X-3		
SSR_3-3			

Tabela 14. Zestawy primerów użyte w reakcji amplifikacji.

Odczyt sekwenatora nie uwidoczniał obecności żadnego produktu. Postanowiono przeprowadzić kolejną próbę przy użyciu innych stężeń primerów. Próba została przeprowadzona dla 2 próbek roślinnych opisanych jako „1” (próbka A) oraz „1A” (próbka B). W próbie tej przygotowano reakcje przy użyciu wszystkich 20 par badanych primerów – celem próby było ponowna ocena warunków reakcji i ich optymalizacja. Każda z badanych próbek była nastawiona w czterech wariantach – 4 multiplexy (mixy) primerów (Tabela 14).

Produkty reakcji PCR nastawiono na sekwenatorze, a następnie wysłano do sekwencjonowania przez firmę GENOMED. Próbnie przygotowano 2 próbki roślinne: próbka A – gatunek opisany jako „1”, próbka B – gatunek opisany jako „1A”. Wyniki sekwencjonowania przeanalizowano pod kątem wystąpienia pożądaných trafień SSR. Podczas analizy wytypowano następujące locus: SSR_7-3, SSR_3-3, SSR_X-3, SSR_8-4, SSR_9-4, SSR_1-1, SSR_5-5, SSR_6-4. Wybrane Locus postanowiono poddać dalszej analizie na większej ilości prób. Próba została przeprowadzona dla wszystkich 10 badanych próbek roślinnych. W próbie tej przygotowano reakcje przy użyciu 8 par wyselekcjonowanych wcześniej primerów. Primery zebrano w 4 multiplexy (Tabela 15)

Multiplex 1	Multiplex 2	Multiplex 3	Multiplex 4
SSR_7-3 SSR_3-3	SSR_X-3	SSR_8-4	SSR_9-4 SSR_1-1 SSR_5-5 SSR_6-4

Tabela 15 Zestawy primerów użyte w reakcji amplifikacji.

Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR wykonano w firmę GENOMED. Wbrew danym, otrzymanym w publikacji Borin i wsp. 2021 otrzymano niestety produkty niespecyficzne. Postanowiono przeprowadzić ponowną analizę przy zmianie stężeń primerów użytych do reakcji. Podjęto kolejną próbę przy większym stężeniu primerów ograniczając ilość prób materiału roślinnego (*Tibor, Slallasi, Carmagnola i Henola*) oraz ilość primerów – do pięciu (Tabela 16). Celem próby było przebadanie wyselekcjonowanych par primerów przy wykorzystaniu dysproporcji w ilości użytych primerów forward i reverse. Każda z 3 badanych próbek roślinnych była nastawiona w 4 wariantach – 4 multiplexy (mixy) primerów (Tabela 16).

Multiplex 1	Multiplex 2	Multiplex 3	Multiplex 4
SSR_7-3 SSR_3-3	SSR_X-3	SSR_8-4	SSR_6-4

Tabela 16 Zestawy primerów użyte w reakcji amplifikacji.

Produkty reakcji PCR ponownie wysłano do sekwencjonowania przez firmę GENOMED. Ponownie otrzymano produkty niespecyficzne.

W tabeli poniżej (Tabela 17) przedstawiono przykładowy wydruk sekwencji produktów reakcji PCR otrzymanych w wyniku prowadzonych analiz genetycznych.

Pełne tabele przedstawiające wydruk sekwencji produktów (zawierające zarówno surowe dane pomiarowe, jak również ich kompilację) otrzymanych w trakcie przeprowadzonych eksperymentów, ze względu na obszerność danych, załączono w **materiałach dodatkowych** (link na ostatniej stronie dysertacji).

	NAZWA LOCUS STARTER	SEKWENCJA <ul style="list-style-type: none"> • Próbka A – gatunek „1” • Próbka B – gatunek „1A” 	MOTYW
A	1F-SSR_6-3	GCGCGTGAGAGATAGACGTNGGAGTCTANCTANNGGNNTCACCGTGNGAGTCAGGGGGGGNTACCNGACGTACTACGGTANGAGCT AGATTTGCTAGTAGCTAG	AAT (10) -
B	1F-SSR_6-3	CGCCATTAGTGTAGGCCGCGGGTAGGGGGGAGNNATAAAATAAAGNNGGNNTATCCCCTCCNCCGGTTANCGCGGGGGGGCG CNACTCGGGNNGGTCCNCCNNTGGGAAGTGCCCTATTTGGAGGCCCCCCCATTTCTCNNGGGTGGGNCCCCCCCCCTNCCC CCCCCTCCCCCNCTTNCNCCCCCCCCCCAATAANCGCAGACAGAAGCAGAGGAGAGANATTGTGCGNANGAGNGNCNGCCC T	AAT (10) -
A	1R-SSR_6-3	GAGATCGCAGAGCGCGACAGGNNNCTANACAGATNACGNNNCNGNGGATATGGCTTATATGGAGCTAGCCCCCGNCCGTNCCCTA CCWNGACCNNTNACCCCNWTCWNTANTAGGAAGGAAAGG AGGCAGAAGAAGCAAGAGGAGGAGGANGAGAGAGTAGAAATATAATTTCGTTACCGCTCCCAGGGAGAAATCAAGCGACTGCGGAW GTGGAGGAGCTACTAGGGGGGGGCGGTAANGGAGTAAGTTTNTNTTGGAGGGTGGGGAGTAGTTCCCAAGCCTTTCTCGGGTTTA GAAGNGNGGCNNGATGTGAGAAAGAAGATAATAAGATCACTCTCNACNCTTTTTCAAGAATTGTGNTCCACCCTTTCCCTNTTTTAG CCTAAATTTTANTCCCGCACTTATCAGCGNCCCCAAAGCACAANCNTGGNGCANATAGTGNCTTTACTTGTCCGCGTCCTANCANAT TCTACTGAGAATGCACCCTAGTGGATCTGCAGATCCCTCTATCCATCACCTTTCTTGGGACTATTATTGNAGAAACCAGANGACCCCC TCCCCTTAANAGGTNGGGGCACTTCACTGTTCTTCTCGCGACGCCATANCCCTGTAAATGCTTCCNAAATAAAGTNAATGGGANC ANAGTATTCNNANTCCCTGCCNCCCTATCCCTTNTTTGNTCCTTTTGCCTTCCAGTTGTTGCTCGGGAAGANACCAGGGNAATGN ANATACGGAGGATNGGNTGGGGGCACGATTCGGTGANTCGCACTGNTCACATCNACNTCTA	ATT (10) -
B	1R-SSR_6-3	ATCTATCAATCACCCANGCGAGGGAGAAGTCGTCCCTAATGAGGAAGCTGCTCTCAACCCCNACCCCCCCCCCNNTCGNTAGACC ANNCTCTCNTTNGCNCNCNTTNTNNANNGTGGGAGGGCTATGGNA	ATT (10) -

Tabela 17. Przykłady sekwencji produktów uzyskanych w wyniku analizy metodami genetycznymi.

Analizując uzyskane sekwencje w programie do obróbki danych genetycznych okazywało się że miejsce przyłączenia starterów jest inne niż zakładano a produkty nie opiewają sekwencji konserwatywnych wymienionych w bazowej publikacji. Wskazuje to na albo nieprawidłowe dobranie starterów albo mało uniwersalny ich charakter. Ewentualnie wskazywać to może na bardzo dużą różnorodność genetyczną konopi i na niemożność stosowania wybranych par starterów dla wszystkich odmian lub odmian różniących się pochodzeniem geograficznym. Wydaje się, że opracowanie uniwersalnego zestawu starterów spełniającego oczekiwania wymaga znacznie szerszej zakrojonych badań – znacznie przekraczających możliwości jakie stwarza projekt Doktorat Wdrożeniowy.

VI Dyskusja

Prace przeprowadzone w ramach prezentowanego doktoratu wdrożeniowego prowadzone były w wielu, mocno zróżnicowanych obszarach. Wspólnym mianownikiem było opracowanie metody na porównywanie próbek materiałów roślinnych ze sobą oraz wskazanie ich pochodzenia. Skupiono się na konopiach, roślinie generującej większość problemów badawczych w codziennej praktyce firmy Lab4Tox sp. z o.o. Konopie potraktowano również jako model dla badań nad innymi surowcami roślinnymi. Prace skupiły się wokół problemu porównania profilu metabolitów wtórnych pochodzących z różnych grup, tj. związki lotne (w tym terpeny), fitosterole czy kannabinoidy. Jednocześnie badania obejmowały szereg prac optymalizacyjnych na chromatografie gazowym sprzężonym ze spektrometrem mas – Shimadzu 2020 QP Ultra Plus, który od 2019 roku znajduje się w zasobach sprzętowych firmy Lab4Tox.

Metabolity wtórne konopi były przedmiotem eksperymentów prowadzonych przez wielu badaczy, przy zastosowaniu różnych metodyk, na bardzo zróżnicowanych próbach roślin^{57,58,59,60,61}. W ramach prezentowanego doktoratu wdrożeniowego szczególnie skupiono się na lotnych metabolitach pochodzących z konopi. Przeprowadzono eksperymenty z suszeniem liści i kwiatostanów konopi oceniając m.in. wpływ tego procesu na profil metabolitów wtórnych jak również przeprowadzono prace badające wpływ przechowywania. Prace te były w znacznie mierze nowatorskie, pokrywały istniejącą lukę w badaniach nad tym problemem. Wnioski, jeśli chodzi o profil lotnych frakcji metabolitów wtórnych konopi pokryły się z rezultatami prac innych badaczy^{62,63}. Przede wszystkim stwierdzono, że profil frakcji lotnych zależy od odmiany, ale też i od warunków suszenia i przechowywania⁶⁴. Nadaje to materiałom roślinnym cechy indywidualne, które są podstawą do ich porównywania (badań tożsamościowych).

Podobnie wykazano w rezultacie przeprowadzonych eksperymentów, że profil kannabinoidowy nie jest cechą, którą można jednoznacznie scharakteryzować daną odmianę konopi. Podobnie jak profil terpenowy jest on zależny od czynników zewnętrznych towarzyszących procesom suszenia i przechowywania^{65,66}. W literaturze wykazano, że czynnikami mającymi wpływ na tej proce to przede wszystkim czas, dostęp światła i temperatura^{67,68,69}. Podobnie jak w przypadku frakcji lotnych, kombinacja tych czynników odciska indywidualne piętno na materiale roślinnym nadając mu pewne cechy indywidualne. Badania nad profilem frakcji sterolowej nie wykazały, by był on cechą indywidualną, którą można skorelować z odmianą lub miejscem uprawy. Nie wykazano również by warunki

wpływające zmiany w profilu terpenowym i kannabinoidowym wywoływały istotne zmiany profilu fitosterolowego⁷⁰. W związku z powyższym uznano, że ten obszar metabolitów wtórnych nie będzie stanowił podstawy do badań porównawczych.

Stosując opisane w publikacji warianty suszenia ziela konopi po raz pierwszy udowodniono, że nie są obserwowane reakcje dekarboksylacji lub innych przemian wybranych kannabinoidów. W przeciwieństwie do publikacji innych autorów, np. Maija i wsp.⁷¹ oraz Challa⁷² nie obserwowano zmian statystycznie istotnych dla profilu kannabinoidowego, oznaczonego techniką GC-MS z derywatyzacją. Wspomniani autorzy obserwowali proces naturalnej dekarboksylacji (tj. przemiany THCA do THC i CBDA do CBD) w trakcie przechowywania ziela konopi przez okres 8 tygodni w temperaturze 40 °C. Jednocześnie w pracy Maia i wsp. obserwowany był ubytek ilościowy całkowitej zawartości (tj. sumy form kwaśnych i obojętnych) dla THC, CBD i CBC. Z kolei w swojej pracy Challa zaobserwował wzrost zawartości CBDA z 2,09% w materiale suszonym w 25 °C do 2,52% dla konopi suszonej w 70 °C. Co zaskakujące, zaobserwował on największy spadek sumy CBD i CBDA w stosunku do materiału świeżego z 1,99% do 1,28% dla procesu suszenia metodą liofilizacji.

Technika NMR wykorzystana w ramach prowadzonych badań dała bardzo dobre rezultaty. Na podstawie widm protonowych przeprowadzono oznaczenia ilościowe podstawowych kannabinoidów (THC, CBD) i ich kwasowych form. Eksperymenty te potwierdziły rezultaty prac A. Hazekamp i wsp.⁴⁴. Potwierdzono w pełni obserwacje w/w autorów co do użyteczności i prostoty wykonania analiz. Ponadto, analizując widma uzyskane w wyniku analiz ekstraktów uzyskanych z konopi, podobnie jak Xinyi Wang i wsp.⁷³ stwierdzono, że ich zmienność w zakresie przesunięć chemicznych właściwych dla protonów alifatycznych jest bardzo wysoka a uzyskane widma różnią się pomiędzy sobą istotnie, co może zostać wykorzystane w analizie typu fingerprint. Wymaga to zebrania odpowiednio szerokiej bazy danych do porównań. Minusem tej metody jest ograniczenie jej stosowalności do ekstraktów z konopi – ze względu na fizyczne ograniczenia techniki NMR.

W ramach przeprowadzonych prac wykonano również serię eksperymentów z genotypowaniem roślin konopi. Wybrana technika analizy sekwencji mikrosatelitarnych (STR) była już eksplorowana z pozytywnym skutkiem jako metoda różnicująca poszczególne odmiany konopi^{74,75,76}. Wybrano zestaw dwudziestu markerów testowany na ponad stu próbkach pochodzących z jedenastu źródeł (geograficznie)⁷⁷. Niestety, w powtórzonych przez nas eksperymentach nie uzyskano zbieżnych wyników. Przy zastosowaniu wybranych primerów STR otrzymano niespecyficzne, nienadające się do identyfikacji produkty. Trudno

jednoznacznie wskazać przyczynę tego niepowodzenia. Bardzo prawdopodobne jest, że przyczyna tkwi w większej niż sądzono zmienności genomu roślin z konopi.

VII Wnioski

1. Metoda GC-MS w technice nastrzyku ciekłego pozyskanych olejków eterycznych i mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) jest efektywnym narzędziem analizy związków lotnych obecnych w kwiatostanach i liściach konopi siewnych *Cannabis Sativa*. W trakcie przeprowadzonych badań udowodniono znaczne zróżnicowanie otrzymanego profilu jakościowego i ilościowego otrzymanego tymi technikami. Może ono być spowodowane częściową retencją związków lotnych z tkance i zbiorniczkach olejkowych w trakcie ich stopniowego uwalniania w technice SPME;
2. Suszenie materiału roślinnego w przypadku konopi siewnych ma kluczowy wpływ na profil jakościowy i ilościowy związków lotnych. W przebadanych wariantach obserwowane były zmiany zarówno jakościowe jak i ilościowe;
3. Po raz pierwszy udowodniono brak wpływu rodzaju suszenia na zmiany ilościowe i jakościowe metabolitów „cięższych”, takich jak fitokannabinoidy i sterole. Nie obserwowano również przemian związanych z dekarboksylacją form kwaśnych kannabinoidów;
4. Udowodniony został brak wpływu procesu ekstrakcji i bielienia na profil fitosteroidów obecnych w frakcji lipidowej wybranych odmian konopi siewnych;
5. Badanie związków lotnych techniką SPME-arrow wykazało, że profil kwiatostanów dla odmian *Santhica*, *Maternhorn*, *Futura*, *Finola* i *Fibor* różnicuje się w czasie przechowywania materiału. I chociaż istnieją tendencje do grupowania cech, analiza metodą PCA-X oraz PLSDA udowodniła, że nie są one statystycznie istotne. Narzędzie może mieć jedynie charakter uzupełniający dla porównywania pomiędzy sobą próbek konopi;
6. Na podstawie danych z lat 2018-2021 brak jest wyraźnych statystycznych zależności pomiędzy odmianami konopi a profilem kannabinoidowym (wg GC-MS) identyfikowanym w ekstraktach (przemysłowych pastach konopnych) i materiałach roślinnych.
7. Technika ^1H i ^{13}C nadaje się do screeningowych badań porównawczych (tzw. tożsamościowych pochodzenia np. pasty), jednak nie znajduje zastosowania do badań identyfikacyjnych, tj. wskazujących na pochodzenie (geograficzne bądź rodzajowe) próby.
8. Zastosowane w trakcie realizacji badań primery w analizie genetycznej (referencyjne, wytypowane na podstawie wcześniejszych doniesień literaturowych) nie pozwoliły na

skuteczną amplifikację. Może to świadczyć o genetycznym zróżnicowaniu odmian konopi w stosunku referencyjnych.

9. Doświadczenia zdobyte w trakcie pracy badawczej umożliwiły stworzenie 3 procedur analitycznych identyfikacji konopi w tym porównawczych. Były one użyte w wielu opracowaniach stworzonych dla zarówno Prokuratury, Policji, jak i osób prywatnych w firmie Lab4Tox.

VIII. DOROBEK NAUKOWY I WDROŻENIE

PUBLIKACJE

WCHODZĄCE W CYKL PUBLIKACYJNY

1. **Kwaśnica, A.**, Pachura, N., Masztalerz, K., Figiel, A., Zimmer, A., Kupczyński, R., Wujcikowska, K., Carbonell-Barrachina, A.A., Szumny, A. and Róžański, H., 2020. Volatile composition and sensory properties as quality attributes of fresh and dried hemp flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods*, 9(8), p.1118.
140 pkt MEiN; **5,200**; IF₂₀₂₂
2. **Kwaśnica, A.**, Teleszko, M., Marcinkowski, D., Kmiecik, D., Grygier, A. and Golimowski, W., 2022. Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils. *Molecules*, 27(21), p.7196.
140 pkt MEiN; **4,60**; IF₂₀₂₂
3. **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.
140 pkt MEiN; **4,60** IF₂₀₂₂

POZOSTAŁE

4. Golimowski, W., Teleszko, M., Marcinkowski, D., Kmiecik, D., Grygier, A. and **Kwaśnica, A.**, 2022. Quality of oil pressed from hemp seed varieties: 'Earlina 8FC', 'Secuieni Jubileu' and 'Finola'. *Molecules*, 27(10), p.3171.
140 pkt MEiN; **4,60** IF₂₀₂₂
5. Żubrycka, Anna, **Andrzej Kwaśnica**, Monika Haczekwicz, Karolina Sipa, Konrad Rudnicki, Sławomira Skrzypek, and Lukasz Poltorak. "Illicit drugs street samples and their cutting agents. The result of the GC-MS based profiling define the guidelines for sensors development." *Talanta* 237 (2022): 122904.
140 pkt MEiN; **6,10** IF₂₀₂₂

6. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; **Kwaśnica, A.**;
 Marcinkowski, D. Indicators of Engine Performance Powered by a Biofuel Blend
 Produced from Microalgal Biomass: A Step towards the Decarbonization of Transport.
Energies 2023, 16, 5376.
140 pkt MEiN; **3,20** IF₂₀₂₂

Sumarycznie zestawienie dorobku:

28,30 pkt IF i **840** pkt MEiN

WDROŻENIA – OPINIE BIEGŁEGO

Nr zlecenia	Rok	Zleceniodawca	Rodzaj
70/22	2022	PR WROC PSIE POLE	Analiza ziela konopi
103/22	2022	KP WROC OSIEDLE	Analiza ziela konopi
104/22	2022	KP WROC OSIEDLE	Analiza ziela konopi
105/22	2022	KP WROC OSIEDLE	Analiza ziela konopi
768/22	2022	PR WROC KRZYKI ZACHÓD	Analiza ziela konopi
115/23	2022	KP ŚRODA ŚLĄSKA	Analiza ziela konopi
116/23	2022	KP WROC-OSIEDLE	Analiza ziela konopi
135/23	2022	KP KAMIENIEC ZĄBKOWICKI	Analiza ziela konopi
136/23	2022	KP KAMIENIEC ZĄBKOWICKI	Analiza ziela konopi
149/23	2022	KPP ŚRODA ŚLĄSKA	Analiza ziela konopi
366/22	2022	KPP ŚWIDNICA	Analiza ziela konopi
370/22	2022	PR KLUCZBORK	Analiza ziela konopi
371/22 AN	2022	PR KLUCZBORK	Analiza ziela konopi
372/22 AN	2022	PR KLUCZBORK	Analiza ziela konopi
381/23	2023	PR WROC FABRYCZNA	Analiza ziela konopi
388/23	2023	KP WROC OSIEDLE	Analiza ziela konopi
390/23	2023	KPP ŚRODA ŚLĄSKA	Analiza ziela konopi
391/23	2023	KP WROC OSIEDLE	Analiza ziela konopi
392/23	2023	KPP ŚRODA ŚLĄSKA	Analiza ziela konopi
546/23	2023	PR OPOLE	Analiza ziela konopi
566/23	2023	KP WROC OŁBIN	Analiza ziela konopi
577/23	2023	KP WROC OSIEDLE	Analiza ziela konopi
1007/23	2023	PR WROC ŚRÓDMIEŚCIE	Analiza ziela konopi
1011/23	2023	KP WROC OŁBIN	Analiza ziela konopi

KP - Komisariat Policji

KPP - Komenda Powiatowa Policji

PR - Prokuratora Rejonowa

WROC - Wrocław

Każde z w/w zleceń zrealizowano i zakończono wydaniem opinii kryminalistycznej. W badaniach wykonanych w ramach w/w opinii wykorzystano wyniki badań przeprowadzonych

w ramach realizowanego projektu Doktorat Wdrożeniowy. Przykładem pełnego wykorzystania opracowanych metod jest opinia do sprawy L4T-768/22 zleconej przez Prokuraturę Rejonową dla Wrocławia Krzyki Zachów. W ramach tej opinii porównywano ze sobą trzy próbki konopi innych niż włókniste. W wyniku przeprowadzonych badań, na podstawie analizy profilu frakcji lotnych oraz frakcji kannabinoidowej stwierdzono istnienie zasadnych różnic pomiędzy wszystkimi trzema próbkami, co doprowadziło do konkluzji, że nie pochodzą one z tego samego źródła.

PROCEDURY ANALITYCZNE



Laboratorium Badań Toksykologicznych

Lab4Tox sp z o.o.

50-369 Wrocław, ul. Skłodowskiej Curie 55/61

tel.: 792 045 333

lab4tox@lab4tox.pl

INSTRUKCJA BADAWCZA IB-01/23

Instrukcja pobierania próbek do badań

Egzemplarz nr

Nadzorowany: TAK NIE

Opracował:	Zatwierdził:
Starszy Specjalista ds. analiz mgr inż. Martyna Marszałek (data, podpis)	Prezes Zarządu Lab4Tox. Sp z o.o. mgr inż. Andrzej Kwaśnica (data, podpis)

*Dokument jest własnością Lab4Tox sp. z o.o.
Zabrania się samowolnego dokonywania zmian,
kopiowania i rozpowszechniania*

KARTA ZMIAN

Lp.	Charakter zmiany	Wprowadził	Zatwierdził	Uwagi

1. Cel

Celem jest pobranie odpowiedniej wielkości i liczby próbek do analizy.

2. Zasada

Procedura określa wielkość próby niezbędną do przeprowadzenia analiz a także sposób jej pobrania.

Uwzględniono również sposób postępowania w przypadku nadesłania do badań większej niż 10 liczby pojedynczych prób. W tym wypadku metoda próbkowania oparta jest na modelu hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa z poziomem ufności 95%.

3. Pobieranie próby materiału roślinnego.

3.1 W przypadku, kiedy ilość przekazanego do badań materiału nie przekracza 10g – do badań pobiera się 30% jego masy.

3.2. W przypadku, kiedy ilość przekazanego do badań materiału przekracza 10g, całość materiału uśrednia delikatnie mieszając i formując z niego kopczyk. Uformowany kopczyk dzieli się na cztery części. Trzy części odrzuca się a z jedną pozostałą odtwarza się opisany wyżej sposób postępowania aż do chwili, kiedy masa postawionej $\frac{1}{4}$ części będzie mieścić się w granicach od 3 do 10 gram.

3.3. W przypadku roślin całych, na wstępie oddziela się kwiatostany i liście od łodyg, a następnie stosuje się schematy postępowania opisane w pkt. 3.

3. Próbkowanie z dużej liczby takich samych próbek.

Do badań wybiera się losowo, z przekazanej do badań partii próbek liczbę próbek zgodnie ze schematem przedstawionym w tabela nr 1.

Tabela 1. Plan próbkowania metodą hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa.

<i>Całkowita opakowań</i>	<i>liczba</i>	<i>Liczba opakowań pobieranych do analizy</i>
10÷12		9
13		10
14		11
15÷16		12
17		13
18		14
19÷24		15
25÷26		16
27		17
28÷35		18
36÷37		19
38÷46		20
47÷48		21
49÷58		22
59÷77		23
78÷88		24
89÷118		25
119÷178		26
179÷298		27
299÷1600		28
>1600		29

Jeżeli w wyniku przeprowadzonych następnie analiz nie uzyskano zbieżnych wyników, poprzestaje się na liczbie badań podanej powyżej. W przypadku, gdy jeden lub dwa wyniki są odbiegające, należy z pozostałej części materiału dowodowego „dobrać” dodatkowe próbki do badań – zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli nr 2.

Tabela 2. Plan próbkowania gdy nie wszystkie uzyskane wcześniej wyniki były zbieżne

Całkowita liczba Opakowań	Jeden wynik negatywny pozytywne wyniki/ dodatkowe próbki	Dwa wyniki negatywne pozytywne wyniki / dodatkowe próbki
13÷37	uwaga pod tabelą*	uwaga pod tabelą*
38÷59	uwaga pod tabelą*	uwaga pod tabelą*
60÷68	30/ 32	uwaga pod tabelą*
69÷73	31/ 33	uwaga pod tabelą*
74÷84	34/ 36	uwaga pod tabelą*
85÷106	38/ 40	uwaga pod tabelą*
107÷126	41/ 43	uwaga pod tabelą*
127÷156	44/ 46	uwaga pod tabelą*
157÷198	47/ 49	uwaga pod tabelą*
199÷222	48/ 50	123/ 133
223÷246	49/ 51	131/ 142
247÷259	50/ 52	137/ 148
260÷287	51/ 53	147/ 159
288÷324	52/ 54	150/ 162
325÷372	53/ 55	162/ 175
373÷392	53/ 55	172/ 186
393÷465	65/ 68	175/ 189
466÷590	67/ 70	185/ 200
591÷770	68/ 71	195/ 210
771÷940	69/ 72	208/ 224
941÷1150	69/ 72	221/ 238
1151÷1500	70/ 73	234/ 252
1501÷10000	72/ 75	245/ 264
10001÷30000	72/ 75	255/ 274
>30000	73/ 76	256/ 275

* - z dodatkowymi próbkami, całkowita liczba pozytywnych rezultatów otrzymanych w pierwszym i drugim próbkowaniu musi stanowić 90% całkowitej liczby opakowań pobranych do szczegółowych badań.

W sprawach, w których otrzymano więcej niż dwa wyniki negatywne, zaleca się ponowną wizualną ocenę materiału i dokonanie (jeżeli to możliwe) ponownego podziału na nowe podgrupy. Jeżeli mimo wszystko w dalszym ciągu otrzymujemy więcej niż dwa wyniki negatywne, badający winien skonsultować się w sprawie zasadności i konieczności dalszych badań z prowadzącym sprawę.

4. Dokumentacja

Zapis w karcie badań konopi – załącznik nr 1 do procedury badawczej nr PB-03/23 „Profilowanie materiału roślinnego pochodzącego z konopi” lub załącznik nr 1 do procedury badawczej nr PB-01/23 „Oznaczanie kannabinoidów”

Procedura Badawcza PB-01/23

**Analiza ilościowa kannabinoidów
metodą chromatografii gazowej**

Egzemplarz nr

Nadzorowany : TAK NIE

Opracował:	Zatwierdził:
Starszy Specjalista ds. analiz mgr inż. Martyna Marszałek (data, podpis)	Prezes Zarządu Lab4Tox. Sp z o.o. mgr inż. Andrzej Kwaśnica (data, podpis)

*Dokument jest własnością Lab4Tox. Sp. z o.o.
Zabrania się samowolnego dokonywania zmian,
kopiowania i rozpowszechniania*

KARTA ZMIAN

Lp.	Charakter zmiany	Wprowadził	Zatwierdził	Uwagi

SPIS TREŚCI

1. Cel
2. Przedmiot i zakres badań
3. Dokumenty związane
4. Niezbędne wyposażenie i materiały
 - 4.1. Aparatura badawcza
 - 4.2. Wyposażenie pomiarowe
 - 4.3. Wyposażenie pomocnicze
 - 4.4. Odczynniki
5. Warunki środowiskowe
6. Przygotowanie roztworów
 - 6.1. Roztwór wzorca wewnętrznego (ISTD)
 - 6.2. Roztwory do kalibracji
 - 6.3. Próbką kontrolna (PK_9T1-1C)
7. Sposób postępowania podczas badań
 - 7.1. Przygotowanie chromatografu gazowego do przeprowadzenia badań
 - 7.2. Warunki chromatograficzne
 - 7.3. Kalibracja chromatografu
8. Przygotowanie próbek do badań
9. Analiza chromatograficzna
10. Walidacja metody i szacowanie niepewności wyników badań ilościowych
11. Kontrola jakości
12. Interpretacja wyników
13. Zapisy z badań
14. Załączniki

1. Cel

Instrukcja określa zasady postępowania podczas wykonywania badań ilościowych zawartości kannabinoidów

2. Przedmiot i zakres badań

- 2.1. Badania wykonywane są w celu ilościowego oznaczenia zawartości kannabinolu (CBN), kannabidiolu (CBD), kannabigerolu (CBG), kannabinochromenu (CBC) i Δ -9-tetrahydrokannabinolu (9THC)
- 2.2. Badanie może zostać wykonane z uwzględnieniem zawartości form kwasowych w/w kannabinoidów.
- 2.3. Procedura stosowana jest w przypadku otrzymania do badań materiału roślinnego w ilości co najmniej 50 mg.

3. Dokumenty związane

Procedura Badawcza nr PB-03/23 „Profilowanie materiału roślinnego pochodzącego z konopi”.

4. Niezbędne wyposażenie i materiały

4.1. Aparatura badawcza

Chromatograf gazowy z detektorem masowym typu pojedynczy kwarupol, z automatycznym podajnikiem próbek oraz sterownikiem komputerowym z odpowiednim oprogramowaniem.

4.2. Wyposażenie pomiarowe

- Waga analityczna o działce elementarnej równej co najmniej 0,1 mg, posiadająca świadectwo legalizacji i wzorcowania.
- Pipety pozwalające na odmierzenie objętości do 1 ml, z wymaganą dokładnością i precyzją. Pipety powinny podlegać nadzorowi i okresowym sprawdzeniom grawimetrycznym w celu zachowania spójności pomiarowej.
- Dozownik przeznaczony do odmierzenia roztworu standardu wewnętrznego, pozwalający na odmierzenie objętości 3 ml, z wymaganą dokładnością i precyzją. Dozownik powinien podlegać nadzorowi i okresowym sprawdzeniom grawimetrycznym w celu zachowania spójności pomiarowej.

4.3. Wyposażenie pomocnicze

Wytrząsarka do mieszania roztworów.

5. Warunki środowiskowe

Laboratorium powinno zapewnić stabilne warunki oświetlenia, temperatury i/lub wilgotności powietrza, stosownie do wymagań użytkowanej aparatury analitycznej oraz komfortu pracy personelu

6. Przygotowanie roztworów

6.1. Roztwór wzorca wewnętrznego (ISTD).

W celu przygotowania roztworu wzorca wewnętrznego (difenylaminy- DFA) w

chloroformie, o stężeniu 1mg/ml, należy odważyć 200 mg DFA na wadze analitycznej, a następnie dodać 200 ml chloroformu. Całość należy wymieszać i tak przygotowany roztwór przelać do butelki z dozownikiem (na butelce, poza opisem roztworu należy zapisać datę przygotowania roztworu).

6.2. **Roztwory do kalibracji**

W celu przygotowania roztworów do kalibracji należy sporządzić serię roztworów kalibracyjnych stosując metodę kolejnych rozcieńczeń przy użyciu Certyfikowanego Materiału Odniesienia będącego mieszaniną kannabinoidów bądź oddzielnie dla pojedynczego kannabinoidy. Należy przygotować roztwory dla co najmniej trzech rozcieńczeń pokrywających przewidywany zakres stosowania procedury. Wyliczyć stężenia dla poszczególnych roztworów.

6.3. **Próbka kontrolna (PK)**

W celu przygotowania próbki kontrolnej o stężeniu 0,02 mg/ml, należy pobrać 100 µl certyfikowanego materiału odniesienia (CBD) o stężeniu 1 mg/ml, odparować do sucha w temperaturze pokojowej w strumieniu gazu obojętnego a następnie dodać do niej 0,5 ml chloroformu i 0,5 ml roztworu ISTD.

7. **Sposób postępowania podczas badań**

7.1. **Przygotowanie chromatografu gazowego do przeprowadzenia badań**

- Sposób przygotowania sprzętu (uruchomienie, sprawdzenie, wyłączenie) szczegółowo określa instrukcja pracy z chromatografem gazowym z detektorem masowym. Szczególną uwagę należy zwrócić na wymianę elementów zużywalnych, których limity pracy określone zostały przez producenta w Instrukcji Obsługi.
- Każdorazowo po włączeniu urządzenia należy je sprawdzić zgodnie z instrukcją obsługi. Do badań można przystąpić dopiero po potwierdzeniu, że chromatograf jest sprawny technicznie.
- W przypadku wystąpienia jakiegokolwiek usterki aparatu, osoba odpowiedzialna za dany sprzęt, decyduje, czy sama usunie usterkę, czy też należy zaprzestać pracy z aparatem i skontaktować się z serwisem.
- Jeżeli usterka nastąpi podczas analizy sekwencji próbek, wówczas decyzje o dalszym postępowaniu z próbkami podejmuje kierownik techniczny.

7.2. **Warunki chromatograficzne**

Badania ilościowe należy prowadzić w następujących warunkach chromatograficznych:

- kolumna niepolarna ZB-5 (lub analogiczna) o długości 30 m, średnicy 0,25 mm, grubości filmu 0,25 µm
- temperatura dozownika: 280°C;
- temperatura linii transferowej: 300°C;
- czas ekspozycji włókna 3 min
- dozownik typu split-splitless: tryb split 1:120
- gaz nośny: hel, prędkość przepływu 1,1 mL/min
- chromatograf pracuje w trybie rejestracji pełnego prądu jonowego (TIC), zakres zbieranych mas: 40 – 550 m/z
- energia jonizacji: 70eV
- program temperaturowy pracy pieca:

Temp. pocz. [°C]	Przyrost temp. [°C / min]	Temp. końcowa [°C]	Czas [min]
180	-	180	3
180	25	320	0
320	-	320	10

7.3. Kalibracja chromatografu

W celu wykonania kalibracji, należy przygotować krzywą kalibracyjną składającą się z co najmniej trzech poziomów stężeń. W tym celu należy wykonać następujące czynności:

- Wykonać analizy roztworów kalibracyjnych przygotowanych zgodnie z ppkt. 6.2, co najmniej 3 oznaczenia dla każdego roztworu kalibracyjnego
- Uzupelnic dane dotyczące stężeń analitów na poszczególnych punktach kalibracyjnych w systemie sterującym chromatografem gazowym.
- Wykreślić krzywą kalibracyjną dla każdego z kalibrowanych analitów, jak dla modelu analizy z wzorcem wewnętrznym bez wymuszenia przejścia krzywej przez początek układu współrzędnych.
- Po wykonaniu kalibracji należy dokonać oceny jakości przeprowadzonej kalibracji - wartości współczynnika kalibracji powinna wynosić co najmniej 0,998. W przypadku kiedy kalibracji nie przeszła pozytywnie oceny jakości – sprawdzić poprawność integracji pików a w razie potrzeby powtórzyć kalibrację w części lub w całości.

8. Przygotowanie próbek do badań

- 8.1. Z przygotowanych zgodnie z instrukcją IB-1/23 „Próbkowanie” próbki materiału roślinnego odważyć do fiolek o pojemności 4 ml po dwie naważki o masie ok. 50 mg. Zanotować masę próbek analitycznych w Karcie Badań.
- 8.2. Do każdej dodać po 1 ml chloroformu. Fiolki zamknąć i wytrząsać przez co najmniej 10 min, po czym odwirować z prędkością co najmniej 3000 rpm
- 8.3. Pobrać 0,5ml ekstraktu do oznakowanej fiołki szklanej przeznaczonej do pracy z automatycznym podajnikiem próbek a następnie dodać taką samą objętość roztworu wzorca wewnętrznego (ISTD). Fiolki zamknąć i wymieszać.
- 8.4. W przypadku, kiedy przedmiotem zlecenia jest również określenie zawartości form kwaśnych kannabinoidów, dodatkowo do fiołki dodać 50µl MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) z 1% TMCS (2,2,2-Trifluoro-N-methyl-N-(trimethylsilyl)-acetamide, Chlorotrimethylsilane). Fiolkę zamknąć i umieścić w bloku grzejnym w temperaturze 55 °C na czas 25 min. Po wyjęciu fiołki pozostawić do ostygnięcia w temperaturze otoczenia.

9. Analiza chromatograficzna

- 9.1. Przygotowane do analizy próbki umieścić a podajniku próbek chromatografu gazowego
- 9.2. Analizę prowadzi się w trybie pełnego prądu jonowego (TIC)
- 9.3. Próbkę analizować w sekwencjach zaczynających się i kończących próbą ślepa.
- 9.4. W zależności od długości sekwencji, pomiędzy próbkami badanymi (co 10 próbek) należy umieścić dodatkowe próbki kontrolne i ślepe.
- 9.5. Integracji pików (odpowiednie dane powinny zostać zapisane w ustawieniach metody analitycznej) dokonać na podstawie wybranych jonów – zgodnie z tabelą poniżej:

Analit	Jon
CBD	231
CBD-2TMS	390
CBDA-3TMS	491
Delta-9THC	299
Delta-9THC-TMS	371
Delta-9THCA-2TMS	487
CBN	295
CBN-TMS	367
CBG	193
CBG-2TMS	337
CBGA-3TMS	561
CBC	231
CBC-TMS	303

10. Walidacja metody.

Walidację metody wykonuje się w oparciu o Instrukcję IB-2/23 „Walidacja”

11. Kontrola jakości

- 11.1. Ocenę poprawności metody prowadzi się na podstawie analiz próbek kontrolnych (pole powierzchni pod pikiem) oraz prowadzonej karty kontrolnej.
- 11.2. Kartę Kontrolną należy przygotować zgodnie z następującym schematem:
Wykonać 10-20 pomiarów dla próbki ślepej (zawierającej tylko wzorzec wewnętrzny).
- 11.3. Obliczyć wartość średnią \bar{X} oraz wartość odchylenia standardowego s , przy czym obie te wartości należy wyznaczyć dla serii nieobciążonych, tzn. po wstępnym odrzuceniu wyników odbiegających.
- 11.4. Nanieść na osi X układu współrzędnych kolejne numery wyników oznaczeń, natomiast na osi pionowej Y wartości obserwowanej charakterystyki dla poszczególnych pomiarów.
- 11.5. Zaznaczyć na wykresie linię centralną, odpowiadającą wyznaczonej wartości średniej z serii przeprowadzonych pomiarów oraz dwie określone statystycznie granice kontrolne, umieszczone powyżej i poniżej linii centralnej w odległości $2s$ i $3s$ (s -odchylenie standardowe) zwane górną i dolną granicą ostrzegania ($\pm 2s$) i górną i dolną granicą działania ($\pm 3s$).
- 11.6. W celu oceny poprawności metody na kartę kontrolną należy nanieść wynik analizy (pole powierzchni wzorca wewnętrznego) dla każdego kolejnego pomiaru a następnie ocenić jej położenie na karcie zgodnie z zasadami:
 - Jeżeli wynik oznaczeń mieści się w granicy ostrzegania, jest uznawany za zadowalający, co oznacza, że proces pomiaru przebiegł bez zakłóceń, a uzyskane w trakcie danego pomiaru wyniki są wiarygodne.
 - Dopuszczalne jest wystąpienie wyników między granicami ostrzegania, a działania, jednak nie częściej niż 2 wyniki na 20 oznaczeń.
 - Jeżeli wynik dla próbki kontrolnej znajdzie się poza granicą działania lub 7 kolejnych wyników tworzy trend malejący lub rosnący, niezwłocznie przerwać badania i przeprowadzić szczegółowe sprawdzenie aparatury oraz sposobu przygotowania próbek, w celu jednoznacznego ustalenia przyczyny uzyskania wyników wątpliwych.
- 11.7. W trakcie badań specjalista prowadzący badania zobowiązany jest do ciągłej samokontroli. W przypadku, gdy ma on jakiegokolwiek wątpliwości co

prawidłowości przebiegu procesu pomiarowego, ma on obowiązek zasięgnięcia konsultacji w celu wyjaśnienia problemu.

12. Interpretacja wyników badań

- 12.1. Jeżeli uzyskany wynik wykracza poza zakres sporządzonej krzywej kalibracyjnej:
 - Pasuje się poniżej najniższego punktu kalibracyjnego – należy przygotować nowe roztwory do analizy z większej naważki badanego materiału.
 - Wykracza poza najwyższy punkt kalibracyjny – ekstrakty chloroformowe przygotowane z badanego materiału rozcieńczyć 10-krotnie i z tak przygotowanego ekstraktu przygotować kolejne próbki do analizy
- 12.2. Dokonać oceny poprawności integracji pików wprowadzając w razie potrzeby wprowadzając niezbędne korekty. Jeśli analiza obciążona jest błędem nie dającym się usunąć – analizę należy powtórzyć.
- 12.3. Wynik końcowy oznaczenia stanowi średnią z analizy dwóch naważek badanego materiału. Dopuszczalna różnica pomiędzy wynikami cząstkowymi nie może być większa niż 10% wyższej wartości. W przeciwnym wypadku należy przygotować kolejną próbkę i poddać ją analizie.

13. Zapisy z badań

Zapisy należy sporządzać i umieszczać na Karcie Badań.

14. Załączniki

14.1 Karta Kontrolna procesu

14.2 Karta Badań

Procedura Badawcza PB-03/23

**PROFILOWANIA MATERIAŁU
ROŚLINNEGO POCHODZĄCEGO
Z KONOPI**

Egzemplarz nr

Nadzorowany : TAK NIE

Opracował:	Zatwierdził:
Starszy Specjalista ds. analiz mgr inż. Martyna Marszałek (data, podpis)	Prezes Zarządu Lab4Tox. Sp z o.o. mgr inż. Andrzej Kwaśnica (data, podpis)

*Dokument jest własnością Lab4Tox sp. z o.o.
Zabrania się samowolnego dokonywania zmian,
kopiowania i rozpowszechniania*

KARTA ZMIAN

Lp.	Charakter zmiany	Wprowadził	Zatwierdził	Uwagi

Spis treści

- 1. Cel**
- 2. Przedmiot badań**
- 3. Zakres**
- 4. Odpowiedzialność**
- 5. Przegląd Zlecenia**
- 6. Czynności wstępne, próbkowanie**
- 7. Badania chromatograficzne**
- 8. Wnioskowanie**
- 9. Zapisy z badań**
- 10. Załączniki**
- 11. Dokumenty związane**

1. Cel

Celem procedury jest określenie trybu postępowania przy realizacji badań profilujących materiału roślinnego zawierającego pochodzącego z konopi (*Cannabis Sativa L.*).

2. Przedmiot badań

Przedmiotem badań jest próbka materiału roślinnego.

3. Zakres

Procedura jest stosowana w przypadku nadesłania próbek materiału roślinnego w celu określenia czy jest to materiał pochodzący z roślin konopi oraz czy pochodzi lub może pochodzić z innej wskazanej partii materiału.

4. Odpowiedzialność

4.1. Osobą odpowiedzialną za stosowanie procedury w badaniach prowadzonych przez personel Lab4Tox sp. z o.o. jest Kierownik Techniczny.

4.2. Osoba prowadząca badania jest odpowiedzialna za przestrzeganie zasad wynikających z procedury badań na swoim stanowisku pracy. Ponosi ona odpowiedzialność merytoryczną i prawną za prawidłowość oraz obiektywizm przeprowadzonych badań.

4.3. Badania może prowadzić osoba upoważniona pod nadzorem uprawnionego specjalisty. Wykonuje czynności w takim zakresie, w jakim jej kompetencje sprawdził i potwierdził specjalista.

4.4. Laboratorium odpowiada za jednoznaczną identyfikację wszystkich badanych próbek, aż do chwili zwrotu zleceniodawcy. Laboratorium deklaruje, że w czasie, kiedy przejmuje na siebie odpowiedzialność za badane próbki, będą zachowane wszelkie wymogi poufności, a ich stan nie będzie w żaden sposób zmieniony bez zgody zleceniodawcy w sposób inny niż wynikający z wymogów procedur badawczych.

4.3. Do oznaczania poszczególnych próbek stosuje się oznaczenia przyjęte w trakcie rejestracji zlecenia w bazie danych zleceń Laboratorium w postaci symbolu: *L4T-numer kolejny zlecenia/rok/kolejny numer próbki badanego materiału.*

5. Przegląd Zlecenia

Na wstępie dokonuje się oględziny otrzymanego do badań materiału pod względem jakościowej i ilościowej zgodności ze zleceniem. W przypadku wystąpienia jakichkolwiek rozbieżności, należy skontaktować się ze zleceniobiorcą w celu wyjaśnienia ich wyjaśnienia. W tym czasie badania zostają wstrzymane.

6. Czynności wstępne, próbkowanie

6.1 Identyfikacja makro i mikroskopowa. Badania makro i mikroskopowe wykonuje się w przypadku każdej otrzymanej do badań próbki roślinnej. Przeprowadzane jest ono za pomocą mikroskopu stereoskopowego z oświetlaczem pracującym w świetle odbitym. Badanie ma na celu określenie cech materiału roślinnego takich jak: charakterystyczne cechy makro i mikroskopowe, kolor, stopień rozdrobienia, obecność kwiatostanów oraz obecność ewentualnych domieszek. Zapisy z badań należy podać w Karcie Badań.

6.2. Dokonuje się poboru próbek do analiz zgodnie z instrukcją IB-01/23 „Próbkowanie”

- 6.3. Pobrane do badań próbki należy zhomogenizować. Jeśli któraś z pobranych próbek tego wymaga (znaczny stopień wilgotności uniemożliwiający homogenizację) próbkę należy wysuszyć konwekcyjnie w temperaturze nie przekraczającej 35 °C
- 6.4. W przypadku, kiedy masa netto pobranej do badań próbki jest mniejsza niż 0,60g odstępuje się od przeprowadzenia badań profilujących zgodnie z niniejszą procedurą.

7. Badania chromatograficzne.

- 7.1. Przeprowadzić oznaczenie zawartości kannabinoidów w przygotowanych do badań próbkach zgodnie z Procedurą Badawczą PB-01/23 „Oznaczenie kannabinoidów”.
- 7.2 Przeprowadzić oznaczenie zawartości lotnej frakcji terpenowej w przygotowanych do badań próbkach zgodnie z Procedurą Badawczą PB-02/23 „Analiza składu lotnej frakcji terpenoidowej metodą chromatografii gazowej”.

8. Wnioskowanie

Dokonać porównania:

- względnej zawartości terpenoidów
- oznaczonej zawartości kannabinoidów

W przypadku, kiedy skład jakościowy terpenów jest zgodny a rozbieżność pomiędzy względną, procentową zawartością poszczególnych składników nie przekracza 3% wyższej wartości profil terpenoidowy należy uznać za zgodny.

W przypadku, kiedy skład jakościowy terpenów jest zgodny a rozbieżność pomiędzy względną, procentową zawartością poszczególnych składników przekracza 3% ale nie przekracza 15% wyższej wartości profil terpenoidowy należy uznać za częściowo zgodny.

W przypadku, kiedy skład ilościowy oznaczonych kannabinoidów jest zgodny – tj. rozbieżność pomiędzy zawartością poszczególnych kannabinoidów nie przekracza 3% wyższej wartości profil kannabinoidowy należy uznać za zgodny.

W przypadku zgodności profilu kannabinoidowego oraz terpenoidowego można uznać, badane próbki pochodzą z tego samego źródła

W przypadku zgodności profilu kannabinoidowego oraz częściowej zgodności profilu terpenoidowego można uznać, badane próbki mogą pochodzić z tego samego źródła.

W pozostałych przypadkach należy uznać, że próbki różnią się od siebie w istotny sposób.

9. Zapisy z badań

Wszystkie zapisy powstałe podczas przeprowadzenia badań należy umieścić w Karcie Badania stanowiącej załącznik do niniejszej procedury. W przypadku wytworzenia zapisów na innym nośniku, należy dołączyć te zapisy do materiałów zlecenia i archiwizować je w taki sam sposób co Kartę Badań.

10. Załączniki

Karta Badania.

11. Dokumenty związane

- 11.1. Norma PN-EN ISO/IEC 17025 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
- 11.2. Instrukcja IB-01/23 „Próbkowanie”.
- 11.3. Procedura Badawcza PB-01/23 „Oznaczanie kannabinoidów”.
- 11.4. Procedura Badawczą PB-02/23 „Analiza składu lotnej frakcji terpenowej metodą chromatografii gazowej”

IX Oświadczenia

Mgr inż. Natalia Pachura

Wrocław, 14 12 2023

(miejsowość i data)

Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt

UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Różański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

mój udział polegał na wykonaniu części doświadczeń chromatograficznych i współredakcji manuskryptu

Pachura 14.12.2023

data i podpis

Prof. dr hab. Adam Figiel

Wrocław, 14 12 2023

(miejsowość i data)

Instytut Inżynierii Rolniczej
UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Różański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

mój udział polegał na wykonaniu części analiz chromatograficznych i współredakcji manuskryptu

14.12.2023 Adam Figiel

data i podpis

dr inż. Klaudia Masztalerz

Wrocław, 14 12 2023

(miejsowość i data)

Instytut Inżynierii Rolniczej

UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Róžański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). Foods 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

mój udział polegał na wykonaniu części badań suszarniczych i współredakcji manuskryptu w obszarze suszarniczym

14.12.2023 *Masztalerz Klaudia*

data i podpis

Mgr inż. K. Wujcikowska

Wrocław, 14 12 2023

(miejscowość i data)

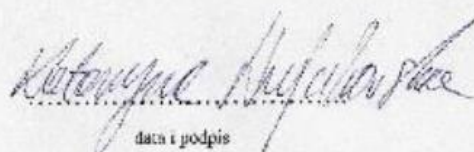
Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt
UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupeczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Różański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

Mój udział polegał na współwykonywaniu analiz statystycznych


data i podpis

Prof. dr hab. Robert Kupczyński

Wrocław, 14 12 2023
(miejsceowość i data)

Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt
UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Różański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

Mój udział polegał na współwykonywaniu analiz statystycznych

14.12.2023v. 
.....
data i podpis

Mgr inż. Aleksandra Zimmer

Wrocław, 14 12 2023

(miejsowość i data)

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Różański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

mój udział polegał na wykonaniu części badań suszarniczych i współredakcji manuskryptu w obszarze suszarniczym



.....
data i podpis

dr Henryk Róžański

Wrocław, 14 12 2023

(miejsowość i data)

Państwowa Akademia Nauk Stosowanych

Rynek I

38-400 Krosno

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Róžański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

mój udział polegał na dostarczeniu i identyfikacji botanicznej surowców roślinnych

Henryk Róžański
14 X 12 2023

— data i podpis

Angel A. Carbonell-Barrachina

Alicante Spain, 14 12 2023

(miejsce i data)

place and date

Departamento Tecnología Agroalimentaria,
Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel,
03312-Orihuela, Alicante, Spain

OŚWIADCZENIE

STATEMENT

Oświadczam, że w pracy

I declare that at work

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.;
Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Szumny, A.; Różański, H. Volatile
Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers
(Cannabis sativa L.). Foods 2020, 9, 1118. <https://doi.org/10.3390/foods9081118>

Mój udział polegał na współwykonywaniu analiz sensorycznych i współredagowaniu części
sensorycznej manuskryptu

*My participation consisted of co-performing sensory analyses and co-editing the sensory
section of the manuscript*

ANGEL
ANTONIO|
CARBONELL|
BARRACHINA
Firmado digitalmente
por ANGEL ANTONIO|
CARBONELL|
BARRACHINA
Fecha: 2023.12.18
12:15:28 +01'00'

.....
data i podpis

dr hab. inż. Wojciech Golimowski, prof. UEW
imię i nazwisko

Wrocław, 8.12.2023
(miejscowość i data)

Wydział Inżynierii Produkcji; Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu; ul. Komandorska 118-120,
53-345 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Kwaśnica Andrzej, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmiecik, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. 2022. "Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils" *Molecules* 27, no. 21: 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>; Wykonywałem częściowo analizę stanu wiedzy, koordynowałem prace analityczne, omówiłem wyniki badań. Brałem udział w przygotowaniu manuskryptu pod względem edycyjnym.

8.12.2023 Golimowski

data i podpis

Dr hab. inż. Dominik Kmieciak, prof. UPP
imię i nazwisko

Poznań, 8.12.2023
(miejscowość i data)

Wydział nauk o Żywności i Żywieniu; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 28,
60-637 Poznań
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Kwaśnica Andrzej, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmieciak, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. 2022. "Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils" *Molecules* 27, no. 21: 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>; wykonałem analizę statystyczną PCA. Wyniki mojej pracy są zawarte na ilustracji nr 4 oraz opis wyników pod ilustracją. Wykonywałem korektę tekstu przed jego opublikowaniem.

15.12.2023 
data i podpis

dr Damian Marcinkowski

imię i nazwisko

Wrocław, 8.12.2023

(miejscowość i data)

Wydział Inżynierii Produkcji
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
ul. Komandorska 118-120
53-345 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Kwaśnica Andrzej, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmiecik, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. 2022. "Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils" *Molecules* 27, no. 21: 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>; Wykonywałem prace laboratoryjne bielenia olejów konopnych oraz opracowałem wyniki (obraz 1-3, Tabela 2). Opisałem część metodyczną poświęconą bieleniu oraz część poświęconą omówieniu wyników badań bielenia oleju konopnego.

08.12.2023r.
Marcinkowski

data i podpis

dr hab. inż. Mirosława Teleszko, prof. UEW
imię i nazwisko

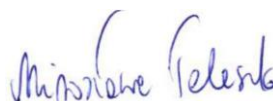
Wrocław, 8.12.2023 r.
(miejsceowość i data)

Wydział Inżynierii Produkcji; Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
ul. Komandorska 118-120
53-345 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Andrzej Kwaśnica, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmieciak, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. 2022. "Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils" *Molecules* 27, no. 21: 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>

wykonałam omówienie wyników zawartości steroli w badanym oleju, w tym analizę statystyczną wyników (załączniki A1-A3) oraz korektę maszynopisu przed jego opublikowaniem.



08.12. 2023 r.

.....
data i podpis

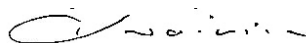
mgr inż. Andrzej Kwaśnica.

Wrocław 08.12.2023

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
Wrocławski Uniwersytet Przyrodniczy
Ul. C.K. Norwida 25
50-375 Wrocław, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Kwaśnica Andrzej, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmiciek, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. 2022. "Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils" *Molecules* 27, no. 21: 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>, byłem kierownikiem projektu, z którego sfinansowano badania. Jestem autorem koncepcji pracy. Koordynowałem prace badaczy z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu i Uniwersytet Ekonomicznego we Wrocławiu. Odpowiadałem za napisanie całego manuskryptu przy uwzględnieniu fragmentów pozostałych współautorów. Wykonałem prace edytorskie i językowe składając manuskrypt w jedną całość.



08.12.2023

data i podpis

Dr inż. Anna Grygier

Poznań, 8.12.2023

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 31
60-624 Poznań

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Kwaśnica Andrzej, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmiecik, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. 2022. "Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils" *Molecules* 27, no. 21: 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>; Wykonałam analizę zawartości steroli metodą GC. Brałam udział w przygotowaniu części manuskryptu poświęconej opisowi metodyki badań dotyczącej analiz z wykorzystaniem metody GC.

8.12.2023. Grygier Anna
data i podpis

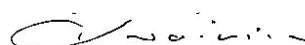
Wrocław, 08.12.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że w artykule: Kwaśnica Andrzej, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmiecik, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. 2022. "Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils" *Molecules* 27, no. 21: 7196. <https://doi.org/10.3390/molecules27217196>;

wkład poszczególnych Autorów w powstanie publikacji jest następujący:

Lp.	Imię i nazwisko Autora	Udział %
1	Andrzej Kwaśnica	50
2	Wojciech Golimowski	10
3	Mirosława Teleszko	10
4	Damian Marcinkowski	10
5	Anna Grygiel	10
6	Dominik Kmiecik	10



podpis

Natalia Pachura

imię i nazwisko

Wrocław, 14 12 2023

(miejscowość i data)

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

UPWr

afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.; Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of Cannabis sativa Leaves. *Molecules* 2023, 28, 8089. <https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

przygotowaniu analiz, wykonaniu części badań chromatograficznych GC-MS liści konopii, przygotowaniu derywatyzowanych próbek i analizie danych

Pachura 14.12.2023r.

data i podpis

mgr inż. Marta Klemens

Wrocław, 14 12 2023
(miejscowość i data)

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.;
Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory
Properties of Cannabis sativa Leaves. Molecules 2023, 28, 8089.
<https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

przygotowaniu próbek do analiz GC-MS w metodzie z derywatyzacją

14.12.23r. *Klemens Marta*

data i podpis

dr Dorota Szumny

Wrocław, 14 12 2023

(miejsowość i data)

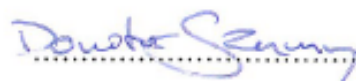
Katedra i Zakład Farmakologii
Wrocławski Uniwersytet Medyczny

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.;
Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory
Properties of Cannabis sativa Leaves. *Molecules* 2023, 28, 8089.
<https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

mój udział polegał na udostępnieniu i identyfikacji wybranych wzorców chromatograficznych.



data i podpis

Prof. dr hab. Adam Figiel

Wrocław, 14 12 2023
(miejsowość i data)

Instytut Inżynierii Rolniczej
UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.;
Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and
Sensory Properties of Cannabis sativa Leaves. Molecules 2023, 28, 8089.
<https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

mój udział polegał na wykonaniu badań suszarniczych

14.12.2023 Adam Figiel

data i podpis

dr inż. Klaudia Masztalerz

Wrocław, 14 12 2023

(miejsowość i data)

Instytut Inżynierii Rolniczej
UPWr

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica A, Pachura N, Carbonell-Barrachina AA, Issa-Issa H, Szumny D, Figiel A, Masztalerz K, Klemens M, Szumny A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of Cannabis sativa Leaves. *Molecules*. 2023; 28(24):8089. <https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

mój udział polegał na wykonaniu części badań suszarniczych i współredakcji manuskryptu w obszarze suszarniczym

14.12.2023 Masztalerz Klaudia

.....
data i podpis

dr Hanan Issa-Issa

Alicante Spain, 14 12 2023

(miejsowość i data)

place and date

Departamento Tecnología Agroalimentaria,
Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel,
03312-Orihuela, Alicante, Spain

OŚWIADCZENIE
STATEMENT

Oświadczam, że w pracy

I declare that at work

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.;
Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory
Properties of Cannabis sativa Leaves. *Molecules* 2023, 28, 8089.
<https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

Mój udział polegał na współwykonywaniu analiz sensorycznych i współredagowaniu części
sensorycznej manuskryptu

*My participation consisted of co-performing sensory analyses and co-editing the sensory
section of the manuscript*

HANAN|ISSA|ISSA
Firmado digitalmente por HANAN|ISSA|ISSA
Fecha: 2023.12.18 12:14:56 +01'00'

.....
data i podpis

date and signature

Prof. Angel A. Carbonell-Barrachina

Alicante Spain, 14 12 2023

(miejsowość i data)

place and date

Departamento Tecnología Agroalimentaria,
Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel,
03312-Orihuela, Alicante, Spain

OŚWIADCZENIE

STATEMENT

Oświadczam, że w pracy

I declare that at work

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.; Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of Cannabis sativa Leaves. *Molecules* 2023, 28, 8089. <https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

Mój udział polegał na współwykonywaniu analiz sensorycznych i współredagowaniu części sensorycznej manuskryptu

My participation consisted of co-performing sensory analyses and co-editing the sensory section of the manuscript

ANGEL
ANTONIO|
CARBONELL|
BARRACHINA

Firmado digitalmente
por ANGEL ANTONIO|
CARBONELL|
BARRACHINA
Fecha: 2023.12.18
12:14:06 +01'00'

.....
data i podpis

date and signature

prof. dr hab. Antoni Szumny

Wrocław, 14 12 2023

(miejscowość i data)

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

UPWr

OŚWIADCZENIE

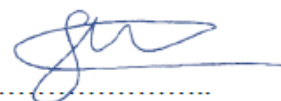
Oświadczam, że w pracy

Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Issa-Issa, H.; Szumny, D.; Figiel, A.; Masztalerz, K.; Klemens, M.; Szumny, A. Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of Cannabis sativa Leaves. *Molecules* 2023, 28, 8089.

<https://doi.org/10.3390/molecules28248089>

koordynowaniu badań, wyznaczeniu indeksów retencji i współredakcją manuskryptu.

14.12.2023



.....
data i podpis

X. Literatura

-
- ¹ Ustawa z dnia 29 lipca 2005r. o przeciwdziałaniu narkomanii (Dz.U. 1764 poz 23)
- ² Rozporządzenie Ministra zdrowia w sprawie wykazu środków odurzających, substancji psychotropowych i nowych substancji psychoaktywnych (Dz.U.2022.poz. 1665)
- ³ Ustawa z dnia 6 grudnia 2008r. o wyrobach akcyzowych (Dz.U. 2023. poz. 1542)
- ⁴ Ustawa Prawo Farmaceutyczne (Dz.U.2921 poz.1977)
- ⁵ Ustawa o podatku akcyzowym z dnia 6 grudnia 2008r. (Dz.U.2023 poz. 1542)
- ⁶ Ustawa o ochronie zdrowia przed następstwami używania tytoniu i wyrobów tytoniowych z dnia 9 listopada 1995r. (Dz.U.2023 poz. 700)
- ⁷ Clarke, R.C. and Merlin, M.D., 2015. Small, Ernest. 2015. Evolution and classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in relation to human utilization. *Botanical review* 81 (3): 189-294.
- ⁸ Radwan, Mohamed M., et al. "Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis." *Molecules* 26.9 (2021): 2774.
- ⁹ Tahir, M. Nazir, et al. "The biosynthesis of the cannabinoids." *Journal of cannabis research* 3.1 (2021): 1-12.
- ¹⁰ Namdar, Dvory, et al. "Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods." *Industrial crops and products* 113 (2018): 376-382.
- ¹¹ Sommano, Sarana Rose, et al. "The cannabis terpenes." *Molecules* 25.24 (2020): 5792.
- ¹² Cox-Georgian, Destinney, et al. "Therapeutic and medicinal uses of terpenes." *Medicinal plants: from farm to pharmacy* (2019): 333-359.
- ¹³ Pollastro, Federica, Alberto Minassi, and Luigia G. Fresu. "Cannabis phenolics and their bioactivities." *Current medicinal chemistry* 25.10 (2018): 1160-1185.
- ¹⁴ Joly, Alexis, et al. "Interactive plant identification based on social image data." *Ecological Informatics* 23 (2014): 22-34.
- ¹⁵ Bruno, Odemir Martinez, et al. "Fractal dimension applied to plant identification." *Information Sciences* 178.12 (2008): 2722-2733.
- ¹⁶ Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products, United Nations Office on Drugs and Crime (2009)
- ¹⁷ Nakabayashi, Ryo, and Kazuki Saito. "Metabolomics for unknown plant metabolites." *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (2013): 5005-5011.
- ¹⁸ Best Practice manual of application of molecular methods_ or the forensic examination of non-human biological traces, ENFSI-BMP-APS-01 (2015)
- ¹⁹ Taberlet, P., et al. "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl Molec Biol* 17: 1105–1109." (1991).
- ²⁰ Köhnemann, Stephan, et al. "The validation of a 15 STR multiplex PCR for Cannabis species." *International journal of legal medicine* 126 (2012): 601-606.
- ²¹ Houston, Rachel, et al. "Evaluation of a 13-loci STR multiplex system for Cannabis sativa genetic identification." *International journal of legal medicine* 130 (2016): 635-647.

-
- ²² Howard, Christopher, et al. "Developmental validation of a Cannabis sativa STR multiplex system for forensic analysis." *Journal of forensic sciences* 53.5 (2008): 1061-1067.
- ²³ Howard, Christopher, et al. "A Cannabis sativa STR genotype database for Australian seizures: forensic applications and limitations." *Journal of forensic sciences* 54.3 (2009): 556-563.
- ²⁴ de Oliveira Pereira Ribeiro, Lucas, et al. "Evaluation of two 13-loci STR multiplex system regarding identification and origin discrimination of Brazilian Cannabis sativa samples." *International Journal of Legal Medicine* 134 (2020): 1603-1612.
- ²⁵ Nurhaslina, C. R., Sharlien Andi Bacho, and A. N. Mustapa. "Review on drying methods for herbal plants." *Materials Today: Proceedings* 63 (2022): S122-S139.
- ²⁶ Ashafa, A. O. T., D. S. Grierson, and A. J. Afolayan. "Effects of Drying Methods on the Chemical Composition of." *Asian Journal of Plant Sciences* 7.6 (2008): 603-606.
- ²⁷ Hamrouni-Sellami, Ibtissem, et al. "Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods." *Food and Bioprocess Technology* 6.3 (2013): 806-817.
- ²⁸ Pourseyed Lazarjani, Masoumeh, et al. "Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review." *Journal of Cannabis Research* 2.1 (2020): 1-10.
- ²⁹ Pellati, Federica, et al. "New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in Cannabis sativa L.(hemp)." *Molecules* 23.10 (2018): 2639.
- ³⁰ Leghissa, Allegra, Zacariah L. Hildenbrand, and Kevin A. Schug. "A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products." *Journal of separation science* 41.1 (2018): 398-415.
- ³¹ Cardenia, Vladimiro, et al. "Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L." *journal of food and drug analysis* 26.4 (2018): 1283-1292.
- ³² Ibrahim, Elsayed A., et al. "Analysis of terpenes in Cannabis sativa L. using GC/MS: method development, validation, and application." *Planta medica* 85.05 (2019): 431-438.
- ³³ Kumeroa, Fern, et al. "Characterization of the Volatile Profiles of Six Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivars." *Agronomy* 12.11 (2022): 2651.
- ³⁴ Stenerson, Katherine, and Michael R. Halpenny. "Analysis of terpenes in Cannabis using headspace solid-phase microextraction and GC-MS." (2017): 27-32.
- ³⁵ Berman, Paula, et al. "A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis." *Scientific reports* 8.1 (2018): 14280.
- ³⁶ Dei Cas, Michele, et al. "The Italian panorama of cannabis light preparation: determination of cannabinoids by LC-UV." *Forensic science international* 307 (2020): 110113.
- ³⁷ Gul, Waseem, et al. "Detection and quantification of cannabinoids in extracts of cannabis sativa roots using LC-MS/MS." *Planta Medica* 84.04 (2018): 267-271.
- ³⁸ Gul, Waseem, et al. "Detection and quantification of cannabinoids in extracts of cannabis sativa roots using LC-MS/MS." *Planta Medica* 84.04 (2018): 267-271.

-
- ³⁹ Grauwiler, Sandra B., André Scholer, and Jürgen Drewe. "Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts." *Journal of chromatography B* 850.1-2 (2007): 515-522.
- ⁴⁰ Galand, N., et al. "Separation and identification of cannabis components by different planar chromatography techniques (TLC, AMD, OPLC)." *Journal of chromatographic science* 42.3 (2004): 130-134.
- ⁴¹ Lavanya, Korlimarla, and Tulsidas R. Baggi. "An improved thin-layer chromatographic method for the detection and identification of cannabinoids in cannabis." *Forensic science international* 47.2 (1990): 165-171.
- ⁴² Goutam, Shubhra, M. Goutam, and Poonam Yadav. "Thin Layer Chromatographic Analysis of Psychoactive Plant Cannabis sativa L." *Int. J. Multidiscip. Approach Stud.* 2 (2015): 166-175.
- ⁴³ Wang, Xinyi, Peter de B. Harrington, and Steven F. Baugh. "Comparative study of NMR spectral profiling for the characterization and authentication of cannabis." *Journal of AOAC International* 100.5 (2017): 1356-1364.
- ⁴⁴ Hazekamp, Arno, Young Hae Choi, and Robert Verpoorte. "Quantitative analysis of cannabinoids from Cannabis sativa using 1H-NMR." *Chemical and pharmaceutical bulletin* 52.6 (2004): 718-721.
- ⁴⁵ Choi, Young Hae, et al. "Metabolomic differentiation of Cannabis sativa cultivars using 1H NMR spectroscopy and principal component analysis." *Journal of natural products* 67.6 (2004): 953-957.
- ⁴⁶ Barthlott, Ines, et al. "A quantitative 1H NMR method for screening cannabinoids in CBD oils." *Toxics* 9.6 (2021): 136.
- ⁴⁷ Hädener, Marianne, et al. "High-resolution ion mobility spectrometry for rapid cannabis potency testing." *Analytical chemistry* 90.15 (2018): 8764-8768.
- ⁴⁸ Vautz, Wolfgang. "Fast Detection of Recent Cannabis Sativa L." *Consumption in Exhaled Breath Using a Mobile Ion Mobility Spectrometer. J Forensic Res Crime Stud* 3 (2019): 1-11.
- ⁴⁹ Radwan, Mohamed M., et al. "Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis." *Molecules* 26.9 (2021): 2774.
- ⁵⁰ Borin M, Palumbo F, Vannozzi A, Scariolo F, Sacilotto GB, Gazzola M, Barcaccia G. Developing and Testing Molecular Markers in Cannabis sativa(Hemp) for Their Use in Variety and Dioecy Assessments. *Plants* (Basel). 2021 Oct 14;10(10):2174.
- ⁵¹ Barčauskaitė, K., Bakšinskaitė, A., Szumny, A., & Tilvikienė, V. (2022). Variation of secondary metabolites in Cannabis sativa L. inflorescences under applied agrotechnological measures. *Industrial Crops and Products*, 188, 115570.
- ⁵² Vuerich, M., Ferfuia, C., Zuliani, F., Piani, B., Sepulcri, A., & Baldini, M. (2019). Yield and quality of essential oils in hemp varieties in different environments. *Agronomy*, 9(7), 356.
- ⁵³ Abdollahi, M., Sefidkon, F., Calagari, M., Mousavi, A., & Mahomoodally, M. F. (2020). Impact of four hemp (Cannabis sativa L.) varieties and stage of plant growth on yield and composition of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 155, 112793.
- ⁵⁴ Citti, C., Pacchetti, B., Vandelli, M. A., Forni, F., & Cannazza, G. (2018). 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.

-
- ⁵⁵ Moreno, T., Dyer, P., & Tallon, S. (2020). Cannabinoid decarboxylation: a comparative kinetic study. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(46), 20307-20315.
- ⁵⁶ 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.
- ⁵⁷ Pellati, Federica, et al. "New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L.(hemp)." *Molecules* 23.10 (2018): 2639.
- ⁵⁸ Hazekamp, A., and J. T. Fishedick. "Cannabis-from cultivar to chemovar." *Drug testing and analysis* 4.7-8 (2012): 660-667.
- ⁵⁹ Eržen, Marjeta, et al. "Metabolomic analysis of cannabinoid and essential oil profiles in different hemp (*Cannabis sativa* L.) phenotypes." *Plants* 10.5 (2021): 966.
- ⁶⁰ Jordan, W. P., et al. "Evaluation of the Effect of Harvesting Time on Three Varieties of Industrial Hemp (*Cannabis Sativa* L.)." *J Horticulture* 9 (2022): 309.
- ⁶¹ Chen, Chang, and Zhongli Pan. "Cannabidiol and terpenes from hemp—ingredients for future foods and processing technologies." *Journal of Future Foods* 1.2 (2021): 113-127.
- ⁶² Jin, D., et al. "Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Sci Rep* 10: 3309." (2020).
- ⁶³ Noppawan, Pakin, et al. "Effect of harvest time on the compositional changes in essential oils, cannabinoids, and waxes of hemp (*Cannabis sativa* L.)." *Royal Society Open Science* 9.6 (2022): 211699.
- ⁶⁴ Trofin, Irenne Gabriela, et al. "Influence of storage conditions on the chemical potency of herbal cannabis." *Rev. Chim* 62.6 (2011): 639-645.
- ⁶⁵ Trofin, IRENNE GABRIELA, et al. "The influence of long-term storage conditions on the stability of cannabinoids derived from cannabis resin." *Rev Chim Bucharest* 63.4 (2012): 422-7.
- ⁶⁶ Addo, Philip Wiredu, et al. "Cannabis chemistry, post-harvest processing methods and secondary metabolite profiling: A review." *Industrial Crops and Products* 170 (2021): 113743.
- ⁶⁷ Lindholst, Christian. "Long term stability of cannabis resin and cannabis extracts.
- ⁶⁸ Zamengo, Luca, et al. "The role of time and storage conditions on the composition of hashish and marijuana samples: A four-year study." *Forensic science international* 298 (2019): 131-137.
- ⁶⁹ Turner, Carlton E., et al. "Constituents of *Cannabis sativa* L. IV: Stability of cannabinoids in stored plant material." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 62.10 (1973): 1601-1605.
- ⁷⁰ Oomah, B. Dave, et al. "Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil." *Food chemistry* 76.1 (2002): 33-43.
- ⁷¹ Meija, J., McRae, G., Miles, C. O., & Melanson, J. E. (2022). Thermal stability of cannabinoids in dried cannabis: a kinetic study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-8.
- ⁷² Challa, S. K. (2021). *Drying Kinetics and the Effects of Drying Methods on Quality (CBD, Terpenes and Color) of Hemp (Cannabis sativa L.) Buds* (Doctoral dissertation).
- ⁷³ Wang, Xinyi, Peter de B. Harrington, and Steven F. Baugh. "Comparative study of NMR spectral profiling for the characterization and authentication of cannabis." *Journal of AOAC International* 100.5 (2017): 1356-1364.

⁷⁴ Coyle, H. Miller, et al. "An overview of DNA methods for the identification and individualization of marijuana." *Croatian medical journal* 44.3 (2003): 315-321.

⁷⁵ Linacre, Adrian, and James Thorpe. "Detection and identification of cannabis by DNA." *Forensic science international* 91.1 (1998): 71-76.

⁷⁶ Gilmore, Simon, Rod Peakall, and James Robertson. "Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations." *Forensic science international* 131.1 (2003): 65-74.

MATERIAŁY DODATKOWE

Pod zamieszczonym linkiem znajdują się materiały (dane analiz genetycznych, pliki źródłowe MS), które ze względu na ich objętość nie weszły do niniejszej dysertacji.

https://upwredupl-mv.sharepoint.com/:f:/g/personal/antoni_szumnv_upwr_edu_pl/Enfhp-WUsVLgSQtGO7DcqIBu3UvwxrMIPWe-Qp-UeuP-Q?e=9FrBwn