

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Π.Μ.Σ. *“Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία – Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων”*

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Προσδιορισμός ποιότητας και νοθείας του saffron.

Επανεξέταση υφιστάμενων τεχνικών – Ανάπτυξη και αξιολόγηση εναλλακτικών χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων»

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΜΗΤΣΗ**

*Επιβλέπων Αν. Καθ. Π. Α. Ταραντίλης*



ΑΘΗΝΑ, 2014



# **ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Π.Μ.Σ. *“Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία – Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων”*

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

«Προσδιορισμός ποιότητας και νοθείας του saffron.

Επανεξέταση υφιστάμενων τεχνικών – Ανάπτυξη και αξιολόγηση  
εναλλακτικών χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων»

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΜΗΤΣΗ**

*Επιβλέπων Αν. Καθ. Π. Α. Ταραντίλης*

ΑΘΗΝΑ, 2014

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Π.Μ.Σ. *“Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία – Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων”*

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Προσδιορισμός ποιότητας και νοθείας του saffron.

Επανεξέταση υφιστάμενων τεχνικών – Ανάπτυξη και αξιολόγηση  
εναλλακτικών χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων»

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΜΗΤΣΗ**

### ***Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή***

Επιβλέπων: Πέτρος Α. Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη: Μόσχος Πολυσίου, Καθηγητής

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, 2014

## Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο σύνολό της στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Πέτρο Ταραντίλη για την ανάθεση του θέματος και τη στήριξή του στις εύκολες, αλλά και τις λιγότερο εύκολες στιγμές που συνόδευσαν την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Ιδιαίτερα τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για την επιμονή του, η οποία, αν και όχι πάντοτε ευχάριστη, ήταν σίγουρα απαραίτητη για την ολοκλήρωση αυτής της διαδρομής.

Τις ευχαριστίες μου θέλω να εκφράσω, επίσης, στον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου κ. Μόσχο Πολυσιού για τη δυνατότητα υλοποίησης της παρούσας μελέτης στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου και για το συνεχές ενδιαφέρον που έδειξε για την πορεία της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Παππά για τη συνεχή του στήριξη, τη συμβολή του στην πραγματοποίηση της εργασίας και κυρίως για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να γνωρίσω και να συνεργαστώ με έναν άνθρωπο του δικού του χαρακτήρα.

Τις πλέον θερμές μου ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στη Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα για την αποτελεσματικότερη καθοδήγησή της στο κομμάτι των εργαστηριακών αναλύσεων, χωρίς την οποία η παρούσα εργασία δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Ευχαριστώ, επίσης, για τη βοήθειά του τον κ. Θανάση Κυμπάρη, Επίκουρο Καθηγητή του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης και συνεργάτη του Εργαστηρίου Χημείας, του οποίου ο κρυστάλλινος τρόπος σκέψης και δράσης έδρασε καταλυτικά σε πολλές στιγμές της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Τις πιο θερμές μου ευχαριστίες οφείλω στον Dr Omar Santana Méridas του Parque Científico y Tecnológico de Albacete της Ισπανίας για την ολόπλευρη βοήθεια και στήριξή του και για την τιμή και χαρά που μου προσφέρει η φιλία μας.

Ολοκληρώνοντας αυτόν τον κύκλο, θεωρώ τον εαυτό μου ιδιαίτερα τυχερό που είχα την ευκαιρία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με ικανούς επιστήμονες και κυρίως εξαιρετικούς ανθρώπους. Σας ευχαριστώ για όσα γνωρίζετε και προσφερόχατε να μου μάθετε, μα περισσότερο σας ευχαριστώ για την ποιότητα του χαρακτήρα σας και την ευκαιρία που μου δώσατε να σας γνωρίσω.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια και τους φίλους μου για την ολόπλευρη στήριξη και την υπομονή τους.

Χριστίνα Μήτση

Αθήνα, 2014

## Περίληψη

### Προσδιορισμός ποιότητας και νοθείας του saffron. Επανεξέταση υφιστάμενων τεχνικών – Ανάπτυξη και αξιολόγηση εναλλακτικών χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων

Χριστίνα Μήτση

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να επανεξετάσει τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές προσδιορισμού της ποιότητας και της νοθείας στο saffron, όσο και να προτείνει εναλλακτικές ή συμπληρωματικές μεθόδους ενόργανης χημικής ανάλυσης, ώστε να υπερκεραστούν τα όποια μειονεκτήματα των υφιστάμενων.

Η εφαρμογή του προτύπου *ISO 3632* (2011) για τον προσδιορισμό της ποιότητας ελληνικών δειγμάτων saffron ανέδειξε ότι η πλειοψηφία τους εντάσσεται στην ανώτερη ποιοτική κατηγορία (Κατηγορία I), ενώ κανένα δείγμα δεν ανήκει στην κατώτερη ποιοτική κατηγορία. Επιπλέον, η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσίασε σημαντικά υψηλότερες τιμές από το ελάχιστο όριο της Κατηγορίας I, αναδεικνύοντας ότι η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ελληνικού saffron βάσει του *ISO 3632* (2011) πιθανά οδηγεί σε υποεκτίμηση της ποιότητάς τους. Παράλληλα, ο μη εκλεκτικός χαρακτήρας της φασματοσκοπίας UV-Vis σε συνδυασμό με την ασθενή συσχέτιση μεταξύ των χαρακτηριστικών του προτύπου *ISO 3632* (2011) με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από την HPLC, υπογραμμίζουν την αδυναμία του προτύπου για ακριβή ποιοτικό χαρακτηρισμό του saffron.

Η προτεινόμενη μέθοδος ποσοτικοποίησης των κροκινών του saffron βάσει της φασματοσκοπίας Raman παρουσίασε αποτελέσματα με αρκετά υψηλή συσχέτιση με αυτά που προκύπτουν από την HPLC, επιτρέποντας την εκτίμηση της συγκέντρωσης των κροκινών σε υδατικό διάλυμα saffron με μεγαλύτερη ακρίβεια από αυτή που επιτυγχάνεται μέσω του προτύπου *ISO 3632* (2011). Η προτεινόμενη μέθοδος ανίχνευσης της νοθείας βάσει της φασματοσκοπίας FT-IR επέτρεψε τη διάκριση μεταξύ των φασμάτων υδατικών εκχυλισμάτων αυθεντικού saffron και νοθευμένων με υλικά φυτικής προέλευσης. Τέλος, η ποιοτική διαφοροποίηση του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του *Crocus sativus* και άλλων ειδών του γένους *Crocus* με χρήση μεθόδων βασισμένων στην HPLC και τη φασματοσκοπία FT-IR ανέδειξε ότι η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη μπορούν να αποτελέσουν δείκτες διάκρισης μεταξύ του saffron και άλλων ειδών του γένους *Crocus*. Η ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών δε συμφωνεί με τη βοτανική τους ταξινόμηση, υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητα περαιτέρω χημιοτυπικής μελέτης τους. Αξιόλογη ομοιότητα με το ελληνικό saffron παρουσίασε το *C. cartwrightianus* από την Αστυπάλαια και τα *C. thomasii*, *C. cartwrightianus* cv 'albus', *C. longiflorus* και *C. niveus*.

## Abstract

### **Determination of quality and adulteration in saffron. Reassessment of existent techniques – Development and evaluation of alternative chromatographic and spectroscopic methods**

Christina Mitsi

The present study aimed at reexamining the most commonly employed techniques for determining quality and adulteration in saffron and at suggesting alternative or complementary methods of chemical instrumental analysis, in order to overcome any drawbacks of the existent methods.

The use of *ISO 3632* (2011) standard to determine the quality of Greek saffron samples revealed that most of them were classified under the highest quality category (Category I), while no sample was included in the lowest quality category. Given that the majority of samples presented significantly higher values than the required limits of Category I, the use of the *ISO 3632* (2011) standard may result in an underestimation of Greek saffron samples' quality. The non-selective nature of UV-Vis spectroscopy, along with the weak correlation among *ISO*-derived traits and the corresponding ones determined by means of HPLC, underline the inability of the *ISO 3632* (2011) standard to accurately determine saffron quality.

The results of the proposed method for the quantification of saffron crocins based on Raman spectroscopy presented a sufficiently high correlation to those of the HPLC-based method, thus allowing the estimation of crocins content in saffron aqueous solutions with a higher accuracy than the one achieved via implementation of the *ISO 3632* (2011) standard. The proposed method for adulteration detection by means of FT-IR spectroscopy achieved to differentiate among spectra of genuine saffron and those of products adulterated with plant derived materials. The qualitative secondary metabolites profiles' discrimination among *Crocus sativus* and wild *Crocus* species by means of HPLC and FT-IR spectroscopy revealed that picrocrocin and safranal may be used as biomarkers to differentiate among *Crocus sativus* and its allies. Based on the profile of their secondary metabolites, samples were not classified in accordance to their botanical classification, thus stressing the need for further chemotaxonomic studies. Among the examined wild *Crocus* species, *C. cartwrightianus* from Astypalaia, *C. thomasii*, *C. cartwrightianus* cv 'albus', *C. longiflorus* and *C. niveus* presented a profile most closely related to that of Greek saffron.

## Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή .....	1
1.1 Το saffron .....	1
1.2 Το φυτό <i>Crocus sativus</i> L.....	2
1.3 Στοιχεία της καλλιέργειας του <i>Crocus sativus</i> .....	4
1.4 Χρήσεις του saffron .....	5
1.4.1. Το saffron ως πρόσθετο τροφίμων.....	6
1.4.2 Το saffron στην παραδοσιακή και σύγχρονη ιατρική .....	6
1.4.3 Άλλες χρήσεις του saffron.....	7
1.5 Οικονομική σημασία του saffron .....	7
1.6 Ποιότητα του saffron.....	10
1.7 Νοθεία του saffron.....	11
1.8 Άλλα είδη του γένους <i>Crocus</i> .....	15
1.9 Σκοπός .....	20
2. Προσδιορισμός της ποιότητας saffron σύμφωνα με το πρότυπο ISO και αξιολόγηση της ευρωστίας του .....	21
2.1 Θεωρητικό μέρος.....	21
2.2 Πειραματικό μέρος.....	22
2.2.1 Ανάλυση ελληνικού saffron σύμφωνα με το πρότυπο ISO .....	22
2.2.2 Αξιολόγηση του προτύπου ISO .....	23
2.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση .....	24
2.3.1 Ανάλυση ελληνικού saffron σύμφωνα με το πρότυπο ISO .....	24
2.3.2 Αξιολόγηση του προτύπου ISO .....	28
3. Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικοποίησης των κροκινών βασισμένης στη φασματοσκοπία Raman.....	35
3.1 Θεωρητικό μέρος.....	35
3.2 Πειραματικό μέρος.....	36
3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	36
4. Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου ανίχνευσης της νοθείας του saffron βασισμένης στη φασματοσκοπία FT-IR .....	41
4.1 Θεωρητικό μέρος.....	41
4.2 Πειραματικό μέρος.....	42
4.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	43
5. Ποιοτική διαφοροποίηση του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών μεταξύ <i>Crocus sativus</i> και άλλων ειδών του γένους με χρήση HPLC και FT-IR .....	47



5.1	Θεωρητικό μέρος.....	47
5.2	Πειραματικό μέρος.....	48
5.3	Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	48
6.	Συμπεράσματα.....	52
	Βιβλιογραφία .....	54
	Παράρτημα.....	60

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1</b> Ταξινόμηση του γένους <i>Crocus</i> (Mathew, 1982). .....	3
<b>Πίνακας 2</b> Ποιοτική κατηγοριοποίηση του saffron βάσει των χημικών χαρακτηριστικών του ( <i>ISO 3632-1</i> , 2011). .....	10
<b>Πίνακας 3</b> Συνήθη είδη νοθείας του saffron και υλικά που χρησιμοποιούνται σε αυτά ( <i>Proyecto SAFFRON</i> , 2007). .....	12
<b>Πίνακας 4</b> Σύγχρονες μέθοδοι που έχουν προταθεί για την ανίχνευση των διάφορων ειδών νοθείας του saffron. ....	14
<b>Πίνακας 5</b> Τιμές του συντελεστή συσχέτισης Pearson μεταξύ των τιμών των απορροφήσεων ( <i>D</i> ) και των τιμών $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ( <i>E</i> ) για τα μήκη κύματος 257, 330 και 440 nm. ....	28
<b>Πίνακας 6</b> Τιμές του συντελεστή συσχέτισης Pearson μεταξύ του εμβαδού των απορροφήσεων ( <i>A</i> ) των κροκινών, της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης σύμφωνα με την μέθοδο της HPLC και των αντίστοιχων τιμών $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ( <i>E</i> ) που προέκυψαν από την εφαρμογή του <i>ISO 3632</i> (2011). ....	32
<b>Πίνακας 7</b> Μέση συγκέντρωση κροκινών (mg /mL υδατικού εκχυλίσματος) στα δείγματα που εξετάστηκαν βάσει της μεθόδου Raman και βάσει της HPLC.....	39
<b>Πίνακας 8</b> Μέσος συντελεστής συσχέτισης (%) των αναλυθέντων δειγμάτων με το μέσο φάσμα FT-IR των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron. ....	45

## Κατάλογος Πινάκων Παραρτήματος

<b>Πίνακας Π1</b> Συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων saffron που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με χρήση της HPLC, ο χρόνος έκλουσης ( $t_R$ ) και το φάσμα UV-Vis που παρουσίασαν.....	60
<b>Πίνακας Π2</b> Άγρια είδη του γένους <i>Crocus</i> που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία. ....	65

## Κατάλογος Γραφημάτων

<b>Γράφημα 1</b> Δομές των κυριότερων συστατικών του saffron.....	1
<b>Γράφημα 2</b> Στατιστικά στοιχεία της παραγωγής saffron στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1961 – 2010.....	9
<b>Γράφημα 3</b> Περιεχόμενο (%) σε υγρασία και πτητικά συστατικά των αναλυθέντων δειγμάτων saffron ως ποσοστά (%) επί του συνόλου ανά κλάση.....	25
<b>Γράφημα 4</b> Αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis (220-700 nm) υδατικού εκχυλίσματος saffron. ....	26
<b>Γράφημα 5</b> Ένταση της γεύσης ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 257 nm), ένταση του αρώματος ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 330 nm) και χρωστική δύναμη ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 440 nm) των αναλυθέντων δειγμάτων saffron ως ποσοστά (%) επί του συνόλου ανά κλάση. ....	27
<b>Γράφημα 6</b> Χρωματογραφικό προφίλ του υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron. ....	29
<b>Γράφημα 7</b> Λεπτομέρεια των χρωματογραφημάτων στα 330 nm υδατικού εκχυλίσματος saffron (κίτρινο) και το ίδιου δείγματος μετά την προσθήκη εσωτερικού προτύπου (μπλε) σαφρανάλης ( $t_R= 19,6$ min). ....	30
<b>Γράφημα 8</b> Λεπτομέρεια φασμάτων UV-Vis της πικροκροκίνης (μοβ), της σαφρανάλης (κίτρινο), μιας <i>cis</i> (κόκκινο διακεκομμένο) και μιας <i>trans</i> (κόκκινο) κροκίνης. ....	31
<b>Γράφημα 9</b> Πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού της συγκέντρωσης κροκινών (mg κροκινών/g saffron) μέσω (α) της φασματοσκοπίας UV-Vis (ISO 3632, 2011) και (β) της HPLC. ....	33
<b>Γράφημα 10</b> Φάσμα Raman υδατικού εκχυλίσματος saffron.....	37
<b>Γράφημα 11</b> Πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού της συγκέντρωσης κροκινών (mg κροκινών/mL υδατικού διαλύματος saffron) μέσω (α) της φασματοσκοπίας Raman και (β) της HPLC. ....	38
<b>Γράφημα 12</b> Μέσο φάσμα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron. ....	44
<b>Γράφημα 13</b> Δενδρογράμμα των εξεταζόμενων δειγμάτων βάσει του συντελεστή συσχέτισής τους με το μέσο φάσμα FT-IR ελληνικού saffron και αποστάσεις σύνδεσης των επιμέρους συστάδων. ....	46
<b>Γράφημα 14</b> Δενδροδιάγραμμα των εξεταζόμενων δειγμάτων βάσει των συντελεστών συσχέτισης των φασμάτων FT-IR των υδατικών τους εκχυλισμάτων και αποστάσεις σύνδεσης των επιμέρους συστάδων. ....	50

## Κατάλογος Γραφημάτων Παραρτήματος

<b>Γράφημα Π1</b> Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την ονομασία “saffron” (Τουρκία) και μορφή ταξιανθιών του <i>Carthamus tinctorius</i> (μπλε).....	62
<b>Γράφημα Π2</b> Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την ονομασία “saffron” (Τουρκία) και μορφή σκουρόχρωμης πούδρας (μπλε). ....	62
<b>Γράφημα Π3</b> Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την ονομασία “Άγριος Κρόκος” (Ελλάδα) και μορφή πορτοκαλί στιγμάτων σαφώς διάφορων του <i>Crocus sativus</i> (μπλε). ....	63
<b>Γράφημα Π4</b> Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την ονομασία “saffron” (Ισπανία) και μορφή κόκκινων ινών (μπλε).....	63
<b>Γράφημα Π5</b> Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού εκχυλίσματος καρπών <i>Gardenia jasminoides</i> με μορφή κίτρινης πούδρας (μπλε). ....	64
<b>Γράφημα Π6</b> Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εκχυλίσματος <i>Gardenia jasminoides</i> (Gardenia C046) με μορφή πορτοκαλί πούδρας (μπλε). ....	64

## Κατάλογος συντημήσεων

<b>ATR</b>	Attenuated Total Reflectance	Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση
<b>DAD</b>	Diode Array Detector	Ανιχνευτής Μεταβαλλόμενου Μήκους Κύματος
<b>FID</b>	Flame Ionization Detector	Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας
<b>FT-IR</b>	Fourier Transform – Infrared Spectroscopy	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με Μετασχηματισμό Fourier
<b>GC</b>	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization	Διεθνής Οργανισμός για την Τυποποίηση
<b>LC</b>	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
<b>MS</b>	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μαζών
<b>NIR</b>	Near InfraRed	Εγγύς Υπέρυθρο
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
<b>PTFE</b>	PolyTetraFluoroEthylene	Πολυτετραφθοροαιθυλένιο
<b>USAE</b>	UltraSound Assisted Extraction	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπέρηχους
<b>UV - Vis</b>	UltraViolet - Visible	Υπεριώδες - Ορατό

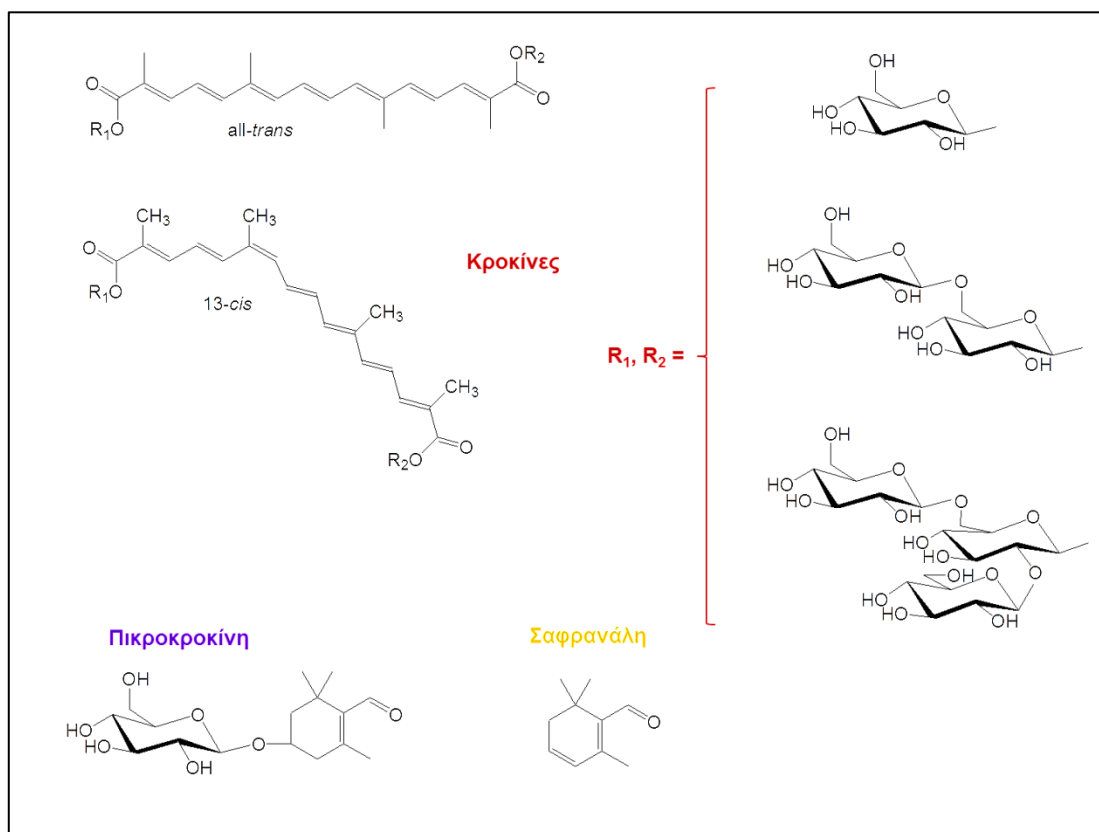
# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Το saffron

Η ονομασία saffron αναφέρεται στο μπαχαρικό που προκύπτει από τα αποξηραμένα στίγματα - ακέραια ή σε σκόνη - του φυτού *Crocus sativus* L. Στη χώρα μας το saffron είναι επίσης γνωστό με τις κοινές ονομασίες ζαφορά και σαφράνι, ενώ συχνά χρησιμοποιείται και ο όρος «κρόκος», αναφερόμενος όχι μόνο στο φυτό, αλλά και στο μπαχαρικό που παράγεται από αυτό.

Σύμφωνα με τον ελληνικό *Κώδικα Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης* (2011), ως κρόκος ή saffron «χαρακτηρίζονται τα αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού *Crocus sativus* L., που πρέπει να είναι απαλλαγμένα από τμήματα του στύλου ή άλλα μέρη του άνθους, καθώς και από στίγματα άλλων ειδών κρόκων ή άλλων λουλουδιών (π.χ. των φυτών *Carthamus tinctorius* L., *Calendula officinalis* L. κλπ.)».

Τα χαρακτηριστικά που προσδίδουν στο saffron την αναγνωρισμένη ανά τον κόσμο και τους αιώνες αξία του και επομένως, καθορίζουν την ποιότητά του, είναι το χρώμα, η γεύση και το άρωμά του. Στο Γράφημα 1 δίνονται οι δομές των κυριότερων συστατικών του saffron που ευθύνονται για τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά του.



Γράφημα 1 Δομές των κυριότερων συστατικών του saffron.

Το χαρακτηριστικό χρώμα του saffron και οι χρωστικές του ιδιότητες οφείλονται στις κροκίνες, οι οποίες αποτελούν εστέρες της κροκετίνης με σάκχαρα. Η κροκετίνη είναι ένα αποκαροτενοειδές ( $C_{20}H_{24}O_4$ ) που απαντάται στη φύση μόνο στην *all-trans* ισομερική μορφή (Carmona Delgado, Zalacain Aramburu & Alonso Díaz-Marta, 2006). Οι κροκίνες του saffron αποτελούν μίγμα εστέρων της κροκετίνης με γλυκόζη, γεντοβιόζη ή νεαπολιτανόζη. Στην περίπτωση των κροκινών με *cis* διαμόρφωση της κροκετίνης, δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ακριβής θέση των υποκαταστατών  $R_1$  και  $R_2$  ως προς το δεσμό  $C_{13-14}$  (Carmona Delgado et al., 2006). Η παρουσία των σακχάρων στα μόρια των κροκινών του saffron τις καθιστά υδατοδιαλυτές, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα λιπόφιλα καροτενοειδή.

Η χαρακτηριστική πικρή γεύση του saffron οφείλεται στην πικροκροκίνη, η οποία είναι γλυκοζίτης της σαφρανάλης. Η πικροκροκίνη παρουσιάζεται στο saffron σε συγκέντρωση που φτάνει έως και το 13% επί ξηρού, ωστόσο αναφέρεται ότι η πικρή γεύση του saffron ενδέχεται να οφείλεται και σε επιμέρους συστατικά του, όπως τα φλαβονοειδή και οι γλυκοζίτες τους (Carmona Delgado et al., 2006).

Η σαφρανάλη είναι μια μονοτερπενική αλδεΐδη, αποτελεί το πλέον άφθονο συστατικό του αιθέριου ελαίου του saffron και στην παρουσία της αποδίδεται, κατά κύριο λόγο, το χαρακτηριστικό άρωμα του saffron. Η σαφρανάλη βιοσυντίθεται με πρόδρομο μόριο την πικροκροκίνη κατά τη διαδικασία της ξήρανσης του saffron, είτε λόγω των υψηλών θερμοκρασιών είτε λόγω της δράσης των γλυκοσιδασών (Carmona Delgado et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα πλήθους επιστημονικών μελετών υποστηρίζουν τη θεωρία ότι η πικροκροκίνη μετατρέπεται σε σαφρανάλη είτε απευθείας μέσω θερμικής διάσπασής της είτε ως αποτέλεσμα της ενζυματικής μετατροπής της πικροκροκίνης σε 4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλ-1-κυκλοεξεν-1-καρβοξυαλδεΐδη (HTCC), η οποία ακολουθώντας οδηγεί στην παραγωγή σαφρανάλης κατά την ξήρανση (Iborra, Castellar, Cánovas & Manjón, 1992; Carmona Delgado et al., 2006; Sánchez, Maggi, Carmona & Alonso, 2011).

Επιπλέον των κύριων αυτών συστατικών, στο saffron περιέχονται, σε μικρότερες συγκεντρώσεις, άλλα καροτενοειδή όπως  $\alpha$  και  $\beta$ -καροτένιο, λυκοπένιο και ζεαξανθίνη, λιπαρές ουσίες, πρωτεΐνες και άλλες ουσίες (Carmona Delgado et al., 2006).

## 1.2 Το φυτό *Crocus sativus* L.

Το είδος *Crocus sativus* L. είναι φυτό μονοκότυλο (κλάση Liliatae, υποκλάση Liliidae) και ανήκει στην οικογένεια *Iridaceae* της τάξης των Liliales (Carmona Delgado et al., 2006). Η βοτανική ταξονόμησή του εντός του γένους *Crocus* παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Το *C. sativus* είναι πολυετές, ποώδες φυτό, με ύψος 10-25 cm (Carmona Delgado et al., 2006). Ως τριπλοειδές είδος, δεν παράγει σπόρους και αναπαράγεται αγενώς με κόρμους (Κουτσός, 2006). Οι κόρμοι αποτελούν υπόγειους βλαστούς, διαμέτρου 5-7 cm και φέρουν το 75% των οφθαλμών στο άνω, κεντρικό τμήμα τους (Carmona Delgado et al., 2006). Τα φύλλα του *C. sativus* είναι σκούρου πράσινου χρώματος, πλάτους 1,5-2,5 mm, μήκους περίπου 50 cm και εκφύονται 5-11 ανά οφθαλμό (Carmona Delgado et al., 2006). Κάθε φυτό φέρει δύο ή τρεις βλαστούς, καθένας από τους οποίους φέρει ένα ή τρία άνθη. Τα άνθη αποτελούνται από έξι τέπαλα, μοβ

**Πίνακας 1** Ταξινόμηση του γένους *Crocus* (Mathew, 1982). Περιλαμβάνονται τα είδη που προστέθηκαν αργότερα από 1. Mariotti (1988), 2. Kerndorff & Pasche (1994), 3. Al-Eisawi (2001), 4. Randjelović et al. (1990), 5. Pasche (1993), 6. Mathew (1995; 2000), 7. Yüzbaşıoğlu & Varol (2004) και 8. Kerndorff (1993).

Υπογένος <i>Crocus</i>	
Διαίρεση (section) <i>Crocus</i>	
Σειρά	
<i>Verni</i>	<i>C. vernus</i> , <i>C. tommasinianus</i> , <i>C. etruscus</i> , <i>C. kosaninii</i> , <i>C. baytopiorum</i>
<i>Scardici</i>	<i>C. scardicus</i> , <i>C. pelistericus</i>
<i>Versicolores</i>	<i>C. versicolor</i> , <i>C. malyi</i> , <i>C. imperati</i> , <i>C. minimus</i> , <i>C. corsicus</i> , <i>C. cambessedesii</i>
<i>Longiflori</i>	<i>C. longiflorus</i> , <i>C. nudiflorus</i> , <i>C. serotinus</i> , <i>C. niveus</i> , <i>C. goulimyi</i> , <i>C. ligusticus</i> <sup>1</sup> (συν. <i>C. medius hort</i> , non <i>Balbis</i> )
<i>Kotschyani</i>	<i>C. kotschyanus</i> , <i>C. scharojanii</i> , <i>C. vallicola</i> , <i>C. autranii</i> , <i>C. karduchorum</i> , <i>C. gilanicus</i> , <i>C. ochroleucus</i>
<i>Crocus</i>	<i>C. sativus</i> , <i>C. pallasii</i> , <i>C. thomasii</i> , <i>C. cartwrightianus</i> , <i>C. moabiticus</i> , <i>C. oreoreticus</i> , <i>C. asumaniae</i> , <i>C. hadriaticus</i> , <i>C. mathewii</i> <sup>2</sup> , <i>C. naqabensis</i> <sup>3</sup>
Διαίρεση (section) <i>Nudiscapus</i>	
Σειρά	
<i>Reticulati</i>	<i>C. reticulatus</i> , <i>C. veluchensis</i> , <i>C. cvijicii</i> , <i>C. dalmaticus</i> , <i>C. sieberi</i> , <i>C. robertianus</i> , <i>C. cancellatus</i> , <i>C. hermoneus</i> , <i>C. abantensis</i> , <i>C. angustifolius</i> , <i>C. ancyrensis</i> , <i>C. gargaricus</i> , <i>C. sieheanus</i> , <i>C. rujanensis</i> <sup>4</sup>
<i>Biflori</i>	<i>C. biflorus</i> , <i>C. chrysanthus</i> , <i>C. almehensis</i> , <i>C. danfordiae</i> , <i>C. pestalozzae</i> , <i>C. aerius</i> , <i>C. cyprius</i> , <i>C. hartmannianus</i> , <i>C. adanensis</i> , <i>C. leichtlinii</i> , <i>C. caspius</i> , <i>C. kerndorffiorum</i> <sup>5</sup> , <i>C. wattiorum</i> <sup>6</sup> , <i>C. nerimaniae</i> <sup>7</sup>
<i>Orientales</i>	<i>C. korolkowii</i> , <i>C. michelsonii</i> , <i>C. alatavicus</i>
<i>Flavi</i>	<i>C. flavus</i> , <i>C. antalyensis</i> , <i>C. olivieri</i> , <i>C. candidus</i> , <i>C. vitellinus</i> , <i>C. graveolens</i> , <i>C. hyemalis</i> , <i>C. paschei</i> <sup>*</sup>
<i>Aleppici</i>	<i>C. aleppicus</i> , <i>C. veneris</i> , <i>C. boulosii</i>
<i>Carpetani</i>	<i>C. carpetanus</i> , <i>C. nevadensis</i>
<i>Intertexti</i>	<i>C. fleischeri</i>
<i>Speciosi</i>	<i>C. speciosus</i> , <i>C. pulchellus</i>
<i>Laevigati</i>	<i>C. laevigatus</i> , <i>C. boryi</i> , <i>C. tournefortii</i>
Υπογένος <i>Crociris</i>	
	<i>C. banaticus</i>
Μη ταξινομημένο είδος	<i>C. boissieri</i>



χρώματος, με σκουρόχρωμες νευρώσεις. Κάθε άνθος φέρει τρεις κίτρινους στήμονες και ένα μεγάλο μήκος, ωχρολευκό στη βάση του στύλο. Ο στύλος καταλήγει στο στίγμα, το οποίο φέρει τρεις διακλαδώσεις και έχει σκούρο κόκκινο χρώμα (Carmona Delgado et al., 2006).

Σε ότι αφορά στους προγόνους του *C. sativus*, στην επιστημονική βιβλιογραφία εμφανίζονται δύο κύριες θεωρίες. Η πρώτη υποστηρίζει ότι το *C. sativus* είναι είδος αυτοτριπλοειδές και προέρχεται πιθανότατα από το διπλοειδές *C. cartwrightianus*, ενώ ως επίσης πιθανοί πρόγονοι αναφέρονται και τα *C. thomasii* και *C. hadriaticus* (Carmona Delgado et al., 2006; Caiola & Canini, 2010). Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία, η οποία ενισχύεται από τα σύγχρονα επιστημονικά ευρήματα, το *C. sativus* είναι αλλοτριπλοειδές είδος που προήρθε από τη διασταύρωση μεταξύ δύο διαφορετικών αγρίων ειδών (Carmona Delgado et al., 2006; Caiola & Canini, 2010).

Η προέλευση του *C. sativus* δεν έχει διασαφηνιστεί. Ως πιθανά κέντρα καταγωγής του προτείνονται είτε η Μεσογειακή λεκάνη και συγκεκριμένα η Ελλάδα, είτε η δυτική Ασία και συγκεκριμένα η περιοχή μεταξύ Τουρκίας, Ινδίας και Ιράν (Caiola & Canini, 2010). Πλήθος αρχαιολογικών ευρημάτων και τοπωνυμίων που συνδέονται με το *C. sativus* πιστοποιούν την παρουσία του και στις δυο αυτές περιοχές από την αρχαιότητα (Ordoudi & Tsimidou, 2004; Carmona Delgado et al., 2006; Caiola & Canini, 2010). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τοιχογραφίες από το Ακρωτήριο της Σαντορίνης οι οποίες χρονολογούνται από τα 1500 πΧ. Στις τοιχογραφίες αυτές παρουσιάζεται η συλλογή φυτών *C. cartwrightianus* και η προσφορά, στη συνέχεια, των σιγμάτων στην Πότνια θηρών, αρχαία θεότητα – προστάτιδα του κυνηγιού και των ζώων. Η εικονιζόμενη πρακτική συλλογής και η χρήση των σιγμάτων του φυτού είναι ίδια με αυτή που ακολουθείται ως τις μέρες μας για τη συλλογή του άγριου *C. cartwrightianus* και δεν απέχει πολύ από την αντίστοιχη για τον καλλιεργούμενο *C. sativus* (Sarpaki, 2013).

### 1.3 Στοιχεία της καλλιέργειας του *Crocus sativus*

Η καλλιέργεια του *Crocus sativus* δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες απαιτήσεις σε κλίμα και έδαφος. Ευδοκίμει σε ποικίλα υψόμετρα, αν και η ανάπτυξή του ευνοείται σε πλαγιές λόφων, πεδιάδες ή κοιλάδες μεταξύ ορεινών όγκων, σε υψόμετρο μεταξύ 600 και 1200 μέτρων (Carmona Delgado et al., 2006). Η ανάπτυξη του φυτού ευνοείται σε εύκρατα κλίματα, ωστόσο ανέχεται θερμοκρασίες της τάξης των 35-40°C το καλοκαίρι και ως -20°C το χειμώνα (Carmona Delgado et al., 2006). Η καλλιέργεια του *C. sativus* εμφανίζει ελάχιστες απαιτήσεις σε υγρασία και το φυτό αναπτύσσεται τόσο σε ημι-ξηρικές, όσο και σε ξηρικές περιοχές (Carmona Delgado et al., 2006). Την περίοδο της ανθοφορίας και για τα ελληνικά δεδομένα, η καλλιέργεια ευνοείται από θερμοκρασίες 10-15°C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες τα άνθη ξηραίνονται και σε χαμηλότερες τα άνθη κλείνουν (Κουτσός, 2006). Το *C. sativus* ευδοκίμει σε ποικίλα εδαφικά περιβάλλοντα, αλλά ευνοείται από ελαφρά και αμμώδη εδάφη, με καλή αποστράγγιση (Κουτσός, 2006). Εδάφη βαριά και με κακή αποστράγγιση εμποδίζουν την κανονική ανάπτυξη των κόρμων και ευνοούν το σάπισμά τους.

Η κυριότερη ασθένεια στις φυτείες του *C. sativus* είναι η σήψη των κόρμων που προκαλείται από το μύκητα *Rhizoctonia crocorum* και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κενών περιοχών στο χωράφι (Κουτσός, 2006; Carmona Delgado et al.,

2006). Ζημιές στις καλλιέργειες ενδέχεται να προκληθούν και από τρωκτικά (Κουτσός, 2006; Carmona Delgado et al., 2006). Σημαντικό πρόβλημα αποτελούν τα ζιζάνια, τα οποία αντιμετωπίζονται είτε με καλλιεργητικά μέσα, είτε με την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων. Η χημική ζιζανιοκτονία δεν εφαρμόζεται σε περιπτώσεις βιολογικών καλλιεργειών, ενώ θεωρείται ασυνήθης πρακτική ακόμη και για τις συμβατικές καλλιέργειες στην Castilla – La Mancha της Ισπανίας (Carmona Delgado et al., 2006). Στην Ελλάδα, χρησιμοποιούνται στις συμβατικές καλλιέργειες οι χλωροτριαζίνες atrazine και simazine (Κουτσός, 2006).

Η εγκατάσταση μιας νέας φυτείας *C. sativus* γίνεται συνήθως το Μάιο ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, έως και τα τέλη Ιουλίου. Οι κόρμοι που θα χρησιμοποιηθούν, και οι οποίοι προέρχονται από παλαιότερες φυτείες, συλλέγονται, καθαρίζονται και γίνεται η διαλογή τους. Η φύτευση των κόρμων που θα αποτελέσουν τη νέα φυτεία γίνεται μηχανικά, σε βάθος 25 cm και σε γραμμές. Οι αποστάσεις φύτευσης των κόρμων κυμαίνονται στα 10-20 cm μεταξύ των γραμμών και 10-15 cm πάνω στη γραμμή. Μια φυτεία διατηρείται και αποδίδει ικανοποιητικά για πέντε έως επτά ή, κάποιες φορές, και για οκτώ χρόνια (Κουτσός, 2006; Proyecto SAFFRON, 2007).

Το σημαντικότερο ίσως στάδιο της καλλιέργειας για την παραγωγή του saffron είναι η συλλογή των ανθέων και ο διαχωρισμός των σιγμάτων από τους στήμονες και τα τέπαλα. Στην Ελλάδα, η ανθοφορία του *C. sativus* αρχίζει τον Οκτώβριο, οπότε και οι παραγωγοί αρχίζουν τη συλλογή των ανοιχτών ανθέων. Η συλλογή γίνεται σταδιακά, με τους παραγωγούς να κόβουν κάθε ημέρα τα πλήρως ανοιχτά άνθη στη βάση των τεπάλων και διαρκεί 20-25 ημέρες, από την ανατολή μέχρι τη δύση του ήλιου. Τα άνθη που συλλέγονται τοποθετούνται σε καλάθια και μεταφέρονται στο χώρο όπου θα γίνει ο διαχωρισμός και η ξήρανση των σιγμάτων. Η παραλαβή των σιγμάτων γίνεται, στη χώρα μας, είτε χειρωνακτικά είτε μηχανικά. Κατά το μηχανικό διαχωρισμό, τα άνθη τοποθετούνται αραιά πάνω σε ειδικό, στρογγυλό, περιστρεφόμενο τραπέζι και, με τη βοήθεια ρεύματος αέρα που δημιουργείται από ανεμιστήρα, τα τέπαλα παρασύρονται και πάνω στο τραπέζι παραμένουν τα στίγματα και οι στήμονες. Στη συνέχεια, τα στίγματα διαχωρίζονται χειρωνακτικά από τους στήμονες. Η ξήρανση γίνεται με τοποθέτηση των σιγμάτων σε λεπτά στρώματα πάνω σε τελάρα που στη βάση τους φέρουν πλέγμα από μετάξι. Τα τελάρα τοποθετούνται σε δωμάτια θερμαινόμενα στους 25-30°C και με καλό αερισμό για 12 έως 24 ώρες. Τέλος, τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα τοποθετούνται σε κατάλληλα δοχεία, ώστε, στη συνέχεια, να τυποποιηθούν και να συσκευαστούν, προκειμένου να προωθηθούν στο εμπόριο (Ordoudi & Tsimidou, 2004; Κουτσός, 2006; Proyecto SAFFRON, 2007).

#### **1.4 Χρήσεις του saffron**

Το saffron χρησιμοποιείται ως αρτυματικό, φαρμακευτικό και βαφικό φυτό από την αρχαιότητα. Αρχαιολογικά ευρήματα και γραπτές αναφορές πιστοποιούν ότι το saffron ήταν γνωστό και χρησιμοποιούταν, μεταξύ άλλων, από τους πολιτισμούς της Μεσοποταμίας, της μινωικής Κρήτης, τον αρχαιοελληνικό Κυκλαδικό πολιτισμό, τους αρχαίους Αιγύπτιους, τους Ινδούς, τους Εβραίους και τους Ρωμαίους (Basker & Negbi, 1983).

#### 1.4.1. Το saffron ως πρόσθετο τροφίμων

Οι χρήσεις του saffron ως πρόσθετου τροφίμων είναι οι σημαντικότερες από εμπορικής πλευράς, τουλάχιστον στις μέρες μας, και οι πλέον διαδεδομένες σε παγκόσμιο επίπεδο. Χρησιμοποιείται για το χρωματισμό και τη βελτίωση της γεύσης και του αρώματος σε αρτοποιήματα, πιάτα κρεατικών και ψαριών, ζυμαρικά και πολλά άλλα πιάτα.

Ιδιαίτερα γνωστή και συνυφασμένη με την ιστορική πορεία της παραγωγής του σε διάφορες χώρες είναι η χρήση του saffron ως απαραίτητου συστατικού της ισπανικής *paella* και *zarzuela*, του ιταλικού *risotto milanese*, της γαλλικής *bouillabaisse* και του ινδικού *biryani* (Bown, 2008).

Επιπλέον των παραδοσιακών χρήσεων του saffron στην κουζίνα των χωρών παραγωγής του, παρατηρείται, ειδικότερα τα τελευταία χρόνια, αύξηση στον αριθμό των τροφίμων στα οποία προστίθεται το saffron. Σε βιομηχανικό επίπεδο, χρησιμοποιείται για το χρωματισμό και αρωματισμό οινοπνευματωδών ποτών και γαλακτοκομικών προϊόντων (Carmona Delgado et al., 2006; Bown, 2008).

#### 1.4.2 Το saffron στην παραδοσιακή και σύγχρονη ιατρική

Οι αναφορές που σχετίζονται με τη χρήση του saffron στην παραδοσιακή ιατρική διάφορων πολιτισμών και χωρών είναι πολυάριθμες. Εκτενής αναφορά στις φαρμακευτικές ιδιότητες του saffron γίνεται στη μονογραφία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization – WHO) (WHO, 2007). Στη μονογραφία αυτή το saffron ή *Stigma Croci*, όπως αναφέρεται, περιγράφεται ως αντιοξειδωτικό, τονωτικό, ηρεμιστικό, εμμηναγωγό, αφροδισιακό, τονωτικό της όρεξης, εφιδρωτικό, αντισυλληπτικό, αντισπασμωδικό και αντιθρομβωτικό.

Επιπλέον, στην παραδοσιακή ιατρική αναφέρεται ότι το saffron βοηθά στην πρόληψη και αντιμετώπιση της αρτηριοσκλήρωσης, της αμηνόρροιας, των κοιλιακών πόνων, του βήχα, της κατάθλιψης και των πεπτικών διαταραχών (WHO, 2007). Η χρήση του saffron συνιστάται στην παραδοσιακή ιατρική και για την αντιμετώπιση του πυρετού και του πόνου από τραύματα, των σπασμών, του άσθματος και για τη μείωση της αρτηριακής πίεσης (van Wyk & Wink, 2004; WHO, 2007; Bown, 2008).

Στη σύγχρονη ιατρική, δεν υπάρχουν στοιχεία για τις φαρμακευτικές ιδιότητες του saffron που να υποστηρίζονται από κλινικές δοκιμές (WHO, 2007). Ωστόσο, πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί *in vitro* και *in vivo* σε ζώα έχουν αναδείξει πολυάριθμες βιολογικές δράσεις του saffron. Εκτενής επισκόπηση της βιβλιογραφίας που σχετίζεται με τη βιολογική δράση του saffron και των κροκινών γίνεται από τους Melnyk, Wang και Marcone (2010) και τους Alavizadeh και Hosseinzadeh (2014) αντίστοιχα.

Ενδεικτικά, πλήθος μελετών αναφέρει ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων saffron ή μεμονωμένων συστατικών του παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, μεταξύ άλλων, λευχαιμίας (Tarantilis, Morjani, Polissiou & Manfait, 1994a), καρκίνου του τραχήλου (Escribano, Alonso, Coca-Prados & Fernández, 1996; Abdullaev et al., 2003), του ήπατος και των μυϊκών ιστών (Abdullaev et al., 2003).

Επιπλέον, πειράματα σε ζώα ανέδειξαν ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων saffron ή μεμονωμένων συστατικών του παρείχε προστασία από την οξειδωτική καταπόνηση (Premkumar, Abraham, Santhiya & Ramesh, 2003), είχε θετικά αποτελέσματα σε

περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών διαταραχών με ακόλουθη εξασθένηση μνήμης (Abe & Saito, 2000), εξασθένησε τα συμπτώματα σχιζοφρενικών διαταραχών (Georgiadiou, Grivas, Tarantilis & Pitsikas, 2013), μείωσε την αίσθηση του πόνου και είχε αντιφλεγμονώδη (Hosseinzadeh & Younesi, 2002) και αγχολυτική (Pitsikas, Boulfadakis, Georgiadiou, Tarantilis & Sakellaridis, 2008) δράση. Τέλος, από πειράματα σε ανθρώπους προέκυψε ότι εκχυλίσματα saffron είχαν θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση ήπιας και μέτριας έντασης κατάθλιψης (Noorbala, Akhondzadeh, Tahmacebi-Pour & Jamshidi, (2005).

#### **1.4.3 Άλλες χρήσεις του saffron**

Το saffron είναι γνωστό για τις βαφικές του ιδιότητες, αν και αυτή η χρήση του είναι πλέον περιορισμένη. Από την αρχαιότητα χρησιμοποιούταν για τη βαφή ενδυμάτων ευγενών, κληρικών και πολιτικών ηγετών στη Μεσοποταμία, την Αίγυπτο και την Ιρλανδία, γυναικείων γαμήλιων ενδυμάτων από τους Φοίνικες, τους Καρχηδόνιους, τους αρχαίους Έλληνες και τους Ρωμαίους και των ενδυμάτων των βουδιστών μοναχών, ενώ αρχαιολογικά ευρήματα πιστοποιούν τη χρήση του saffron ως μελάνης για γραφή σε παπύρους (Basker & Negbi, 1983; Carmona Delgado et al., 2006). Οι βαφικές του ιδιότητες οδήγησαν και στη χρήση του ως καλλυντικού για τη βαφή μαλλιών, νυχιών και χειλιών στην αρχαία Αίγυπτο, την Αγγλία του 12<sup>ου</sup> και τη Βενετία του 16<sup>ου</sup> αιώνα (Carmona Delgado et al., 2006). Στις μέρες μας, η χρήση του saffron ως βαφή είναι ιδιαίτερα περιορισμένη και εντοπίζεται σε υφάσματα υψηλής ποιότητας και παραδοσιακά ενδύματα και υφάσματα της Σαρδηνίας (Carmona Delgado et al., 2006). Παράλληλα, το αιθανολικό εκχύλισμα του saffron χρησιμοποιείται ως χρωστική σε ιστοχημικές μελέτες (Negbi, 2003).

Το saffron χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα και στην αρωματοποίηση. Οι Πέρσες το χρησιμοποιούσαν για τον αρωματισμό του σώματος, οι αρωματικές του ιδιότητες ήταν γνωστές στην αρχαία Ελλάδα, ενώ οι Ρωμαίοι αρωμάτιζαν με saffron και τα θέατρα ή σκόρπιζαν saffron στους δρόμους της πόλης στη διάρκεια εορτασμών (Basker & Negbi, 1983; Carmona Delgado et al., 2006). Στις μέρες μας, αποτελεί συστατικό πολλών αρωμάτων, τόσο της παραδοσιακής αρωματοποίησης, όσο και μεγάλων οίκων.

### **1.5 Οικονομική σημασία του saffron**

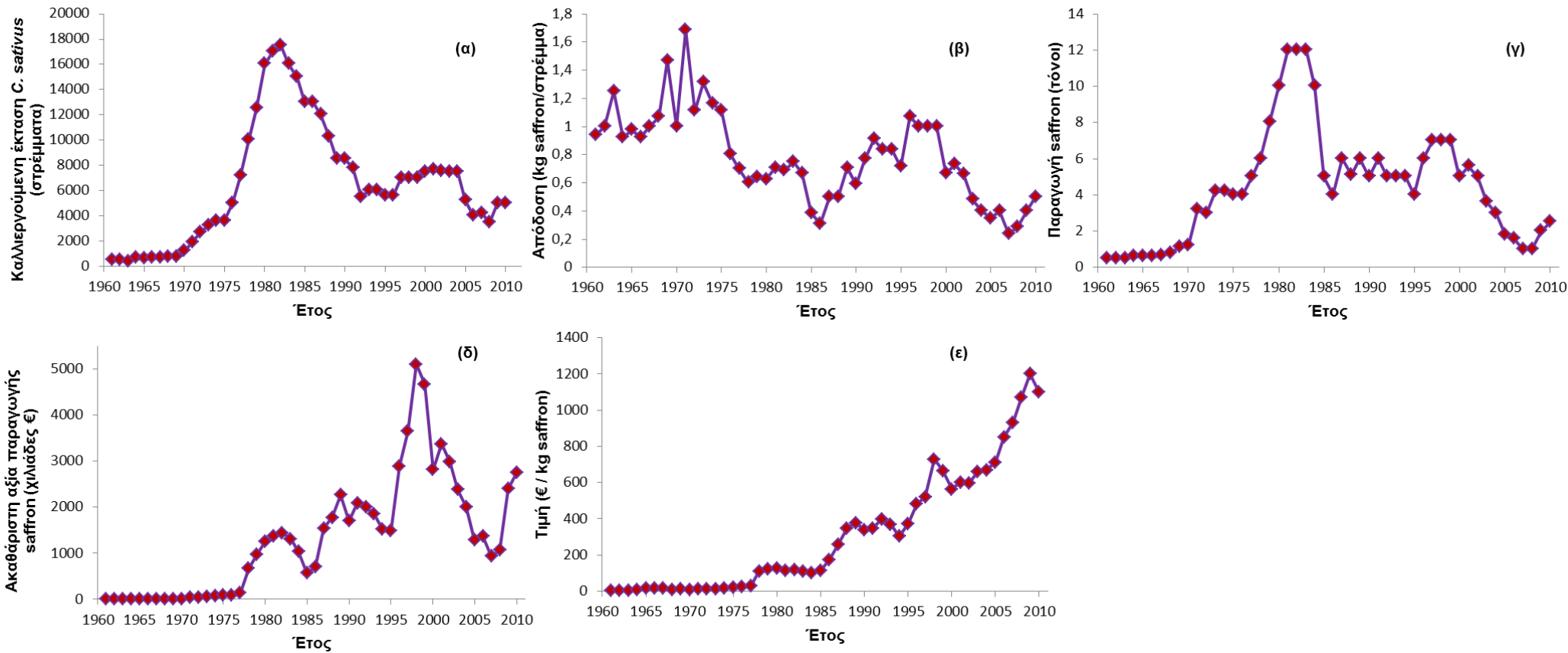
Η καλλιέργεια του *C. sativus* έχει μειωθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, τόσο ως προς τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, όσο και ως προς την παραγόμενη ποσότητα saffron, κυρίως λόγω του υψηλού οικονομικού κόστους της καλλιέργειας. Αντίθετα, η χρήση και η ζήτηση του saffron έχει αυξηθεί, με τη χρήση του σε νέα προϊόντα, τη βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος και την ανάδειξη των ιδιοτήτων του ως αρτυματικού, αλλά και φαρμακευτικού φυτού (Caiola & Canini, 2010).

Στις μέρες μας, οι κυριότερες χώρες παραγωγής saffron είναι το Ιράν, η Ινδία, η Ελλάδα, το Μαρόκο και η Ισπανία (Carmona Delgado et al., 2006). Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η παραγωγή και αρχική εμπορία saffron εντοπίζεται στην περιοχή της Κοζάνης στη Δυτική Μακεδονία, την Castilla – La Mancha της Ισπανίας και τη Σαρδηνία στην Ιταλία (Proyecto SAFFRON, 2007). Παράλληλα, στην Ευρωπαϊκή

Ένωση χαρακτηρίζονται ως προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης ο ελληνικός 'Κρόκος Κοζάνης' (*Official Journal of the European Communities*, 1999), το ισπανικό 'Azafrán de la Mancha' (*Official Journal of the European Communities*, 2001) και τα ιταλικά 'Zafferano dell' Aquila', 'Zafferano di San Gimignano' (*Official Journal of the European Communities*, 2005) και 'Zafferano di Sardegna' (*Official Journal of the European Communities*, 2009).

Οι αποδόσεις σε saffron των φυτειών *C. sativus* διαφοροποιούνται μεταξύ των παραγωγών χωρών λόγω διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών, αλλά κυρίως λόγω διαφορετικών καλλιεργητικών συνθηκών και πρακτικών συλλογής, διαχωρισμού και ξήρανσης των σιγμάτων των ανθέων. Για τα ελληνικά δεδομένα, η μέση ετήσια απόδοση είναι 1 kg saffron/στρέμμα και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν το φθινόπωρο (Proyecto SAFFRON, 2007). Η απόδοση εξαρτάται και από την ηλικία κάθε φυτείας, με τις χαμηλότερες αποδόσεις να σημειώνονται τον πρώτο χρόνο της φυτείας και τις υψηλότερες στον τρίτο και τέταρτο (Proyecto SAFFRON, 2007).

Τα στατιστικά στοιχεία της περιόδου 1961-2010 που αφορούν στην καλλιέργεια του *C. sativus* και την οικονομική σημασία του saffron στη χώρα μας, σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ, 2014), παρουσιάζονται στο Γράφημα 2. Τα οικονομικά στοιχεία των ετών 1961-2000 που αναφέρονταν σε δραχμές δίνονται μετά την προσαρμογή σε ευρώ (€). Στην Ελλάδα, ο Αναγκαστικός Συνεταιρισμός Κροκοπαραγωγών Κοζάνης διατηρεί το αποκλειστικό δικαίωμα συλλογής του κρόκου Κοζάνης, συσκευασίας και διακίνησης του παραγόμενου saffron. Η ίδρυση του Συνεταιρισμού το 1971 αποτελεί ορόσημο για την παραγωγή του ελληνικού saffron, η οποία μέχρι τότε βρισκόταν σε εμβρυακό στάδιο, τόσο σε ότι αφορά στις καλλιεργούμενες εκτάσεις (Γράφημα 2 α) και τη συνολική παραγωγή (Γράφημα 2 γ), όσο και σε σχέση με την ακαθάριστη αξία της παραγωγής (Γράφημα 2 δ) και την τιμή (€) ανά kg saffron (Γράφημα 2 ε). Ωστόσο, όπως προκύπτει και από τα Γραφήματα 2 α και β, η παγκόσμια τάση συρρίκνωσης της παραγωγής saffron εκφράζεται και στη χώρα μας. Μετά από μια περίοδο δέκα χρόνων (1978-1988) στην οποία η παραγωγή saffron σημείωσε ιδιαίτερη άνθιση, ακολουθεί μια φθίνουσα πορεία ως τις μέρες μας. Το γεγονός ότι η απόδοση (kg saffron/στρέμμα) των καλλιεργειών *C. sativus* σημειώνει στις μέρες μας ιστορικό ελάχιστο (Γράφημα 2 β) αναδεικνύει τη σημασία που έχει η έρευνα γύρω από τη βελτιστοποίηση των καλλιεργητικών τεχνικών για την παραγωγή saffron όχι μόνο για την επιστημονική κοινότητα, αλλά και για τους Έλληνες παραγωγούς saffron και, συνολικά, για την οικονομία της χώρας. Ωστόσο, ιδιαίτερα ενθαρρυντικό στοιχείο αποτελεί ότι, παρά τη μείωση της καλλιεργούμενης έκτασης, της συνολικής παραγόμενης ποσότητας και της στρεμματικής απόδοσης, η τιμή (€/kg saffron) του τελικού προϊόντος σημειώνει εντυπωσιακή αύξηση. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην παγκόσμια αύξηση της ζήτησης, σε συνδυασμό με την υψηλή ποιότητα του ελληνικού saffron, αλλά και στην επιστημονική έρευνα γύρω από θέματα ποιότητας του saffron και την εφαρμογή των ευρημάτων της στην εμπορική πρακτική που ακολουθείται από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης.



**Γράφημα 2** Στατιστικά στοιχεία της παραγωγής saffron στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1961 – 2010.

## 1.6 Ποιότητα του saffron

Η ποιότητα του saffron εξαρτάται και προσδιορίζεται κυρίως από τη χημική του σύσταση και τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη κατάλληλων αναλυτικών μεθοδολογιών για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ποιότητας του saffron, αλλά και η θέσπιση κοινών μεθοδολογιών και προτύπων ποιότητας σε παγκόσμιο επίπεδο, επιτρέποντας έτσι την ενιαία προσέγγιση των ζητημάτων που σχετίζονται με την ποιότητα του προϊόντος σε κάθε στάδιο της παραγωγής, εμπορίας και κατανάλωσής του.

Επί του παρόντος, το πλέον διαδεδομένο πρότυπο ποιότητας του saffron που χρησιμοποιείται στο σύνολο σχεδόν των διεθνών εμπορικών συναλλαγών είναι το πρότυπο *ISO 3632 (2011)* του Διεθνούς Οργανισμού για την Τυποποίηση. Το πρότυπο αυτό περιέχει εκτενή κριτήρια ποιότητας και μεθόδους ελέγχου που αφορούν στην εμφάνιση αλλοιώσεων λόγω προσβολών και την παρουσία άλλων μερών του άνθους πλην των σιγμάτων και ξένων υλών, ενώ περιέχει συγκεκριμένα κριτήρια που αφορούν στη συσκευασία και τυποποίηση του προϊόντος. Επιπλέον, σύμφωνα με το πρότυπο *ISO 3632 (2011)*, το saffron κατατάσσεται σε τρεις ποιοτικές κατηγορίες βάσει των χημικών χαρακτηριστικών του, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 Πίνακας 2.

**Πίνακας 2** Ποιοτική κατηγοριοποίηση του saffron βάσει των χημικών χαρακτηριστικών του (*ISO 3632-1, 2011*).

Χαρακτηριστικά	Κατηγορίες		
	I	II	III
Περιεχόμενο σε υγρασία και πτητικά συστατικά (w/w), %, μέγιστο			
saffron σε νήματα και κομμένα νήματα	12	12	12
saffron σε σκόνη	10	10	10
Ολική τέφρα (w), επί ξηρού, %, μέγιστο	8	8	8
Αδιάλυτη σε οξύ τέφρα (w/w), %, επί ξηρού, μέγιστο	1,0	1,0	1,0
Διαλυτό εκχύλισμα σε κρύο νερό (w/w), επί ξηρού, %, μέγιστο	65	65	65
Ισχύς της γεύσης (εκφρασμένη ως πικροκροκίνη) $E_{1cm}^{1\%}$ 257 nm, επί ξηρού, ελάχιστο	70	55	40
Ισχύς του αρώματος (εκφρασμένη ως σαφρανάλη) $E_{1cm}^{1\%}$ 330 nm, επί ξηρού			
ελάχιστο	20	20	20
μέγιστο	50	50	50
Χρωστική δύναμη (εκφρασμένη ως κροκίνες) $E_{1cm}^{1\%}$ 440 nm, επί ξηρού, ελάχιστο	200	170	120
Συνθετικές χρωστικές	απουσίες	απουσίες	απουσίες

Ωστόσο, κάθε χώρα εκδίδει εθνικούς κανονισμούς και πρότυπα ποιότητας που ενδέχεται να αποκλίνουν από το πρότυπο *ISO 3632 (2011)*, κυρίως λόγω διαφοροποιήσεων στον τρόπο παραγωγής και χρήσης του saffron σε κάθε χώρα. Έτσι, σύμφωνα με τον ελληνικό *Κώδικα Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής*

Χρήσης (2011), το saffron πρέπει να μην περιέχει τμήματα του στύλου ή άλλα μέρη του άνθους του *Crocus sativus*, ούτε στίγματα από άλλα φυτά. Επιπλέον, προβλέπεται ότι πρέπει να περιέχει αιθέριο έλαιο σε ποσοστό τουλάχιστον 0,6%, υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τουλάχιστον 58% (υπολογιζόμενο σε ξηρά ουσία), υγρασία όχι πάνω από 12,5%, τέφρα όχι πάνω από 7% και αδιάλυτα σε υδροχλωρικό οξύ συστατικά της τέφρας όχι πάνω από 1,5%. Τέλος, ο *Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης* (2011) προσδιορίζει ότι «η χρωστική δύναμη του saffron πρέπει να είναι τέτοια ώστε μέρος του διηθήματος που λαμβάνεται μετά από παραμονή μερικών ωρών κρόκου σε χλιαπλάσια ποσότητα νερού να χρωματίζει σαφώς κίτρινη χλιαπλάσια ποσότητα νερού (τελική αραιώση 1:1.000.000)». Είναι προφανές ότι οι λιγότερο αυστηρές προϋποθέσεις που θέτει ο ελληνικός κανονισμός σε σχέση με το διεθνές πρότυπο *ISO 3632* (2011) ενδέχεται να προκαλέσουν συγχύσεις ή στρεβλώσεις ως προς την ποιότητα του ελληνικού saffron, δεν προωθούν τη βελτίωση του τρόπου παραγωγής του και πιθανά να οδηγήσουν σε αδυναμία εξαγωγής του σε τρίτες χώρες.

## 1.7 Νοθεία του saffron

Η ποιότητα και η νοθεία του saffron είναι έννοιες αντικρουόμενες, ωστόσο άρρηκτα συνδεδεμένες καθ' όλη την πορεία παραγωγής του saffron ανά τους αιώνες και σε παγκόσμιο επίπεδο. Το γεγονός ότι το saffron ανέκαθεν αποτελούσε ένα από τα ακριβότερα καρυκεύματα -αν όχι το ακριβότερο- δικαιολογεί την ένταση και την έκταση της νοθείας σε αυτό. Η νοθεία του saffron παρουσιάζει την ίδια διαχρονικότητα με την παραγωγή και χρήση του, με τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο να αναφέρει ήδη από τον 1<sup>ο</sup> μ.Χ. αιώνα στο έργο του *Naturalis Historia* ότι «τίποτα δε νοθεύεται τόσο όσο το saffron» (Bostock & Riley, 1855).

Η προσπάθεια καταπολέμησης της νοθείας του saffron εμφανίζει την ίδια διαχρονικότητα. Ειδικά ένοπλα σώματα είχαν ιδρυθεί στη Βενετία και τη Γερμανία του 15<sup>ου</sup> αιώνα έχοντας ως αποκλειστικό καθήκον τον έλεγχο και τη διασφάλιση της αυθεντικότητας του saffron, καθώς και την επιβολή κυρώσεων σε όσους κρίνονταν ένοχοι νοθείας (Carmona Delgado et al., 2006). Ενδεικτική της έντασης των κυρώσεων αυτών είναι η μαρτυρία ότι το 15<sup>ο</sup> αιώνα στη Νυρεμβέργη ένας έμπορος, ένοχος για νοθεία, καταδικάστηκε να θαφτεί ζωντανός μαζί με το νοθευμένο saffron που διακινούσε (Bown, 2008).

Τα είδη της νοθείας του saffron που αναφέρονται διαχρονικά ποικίλουν τόσο ως προς τη στόχευσή τους, όσο και ως προς το υλικό ή τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη του επιδιωκόμενου αποτελέσματος. Στον Πίνακα 3 αναφέρονται οι πλέον συνηθείς τύποι νοθείας του saffron και τα υλικά που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση, όπως καταγράφηκαν από το *Proyecto SAFFRON* (2007).

Στο πλαίσιο της καταπολέμησης της νοθείας, πολλές μέθοδοι ανίχνευσης νοθευμένου saffron έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί διαχρονικά. Σε αυτές περιλαμβάνονται τόσο απλές και εμπειρικές τεχνικές, όσο και μεθοδολογίες που βασίζονται σε σύγχρονα επιστημονικά και τεχνολογικά επιτεύγματα. Οι εμπειρικοί τρόποι ανίχνευσης της νοθείας στο saffron αποτελούσαν, στην πλειοψηφία τους, εφαρμογή της επιστημονικής γνώσης της εποχής κατά την οποία αναπτύχθηκαν και



**Πίνακας 3** Συνήθη είδη νοθείας του saffron και υλικά που χρησιμοποιούνται σε αυτά (Proyecto SAFFRON, 2007).

Είδη νοθείας	Υλικό που χρησιμοποιείται
Χωρίς προσθήκη ξένων υλών	Ανάμειξη με saffron που έχει εκχυλιστεί ή είναι παλαιάς εσοδείας
Προσθήκη άλλων μερών του φυτού <i>Crocus sativus</i> L.	Προσθήκη των στημόνων ή των στύλων, πιθανά αφού έχουν κοπεί και βαφεί
Προσθήκη ξένων υλών με στόχο την αύξηση του βάρους	- Αύξηση του περιεχομένου σε υγρασία - Εμποτισμός σε σιρόπι, μέλι ή γλυκερίνη - Προσθήκη στο άνωθεν σιρόπι θειικού βαρίου, θειικού νατρίου, θειικού ασβεστίου, ανθρακικού ασβεστίου, υδροξειδίου του καλίου, νιτρικού καλίου, όξινου τρυγικού καλίου, βορικού νατρίου, λακτόζης, αμύλου ή γλυκόζης.
Προσθήκη υλικού από άλλα φυτά	- Άνθη <i>Carthamus tinctorius</i> και καλέντουλας ( <i>Calendula officinalis</i> ) - Στίγματα άλλων ειδών <i>Crocus</i> , γενικά μικρότερου μήκους και χωρίς χρωστικές ιδιότητες ( <i>C. vernus</i> , <i>C. speciosus</i> , κ.ά.) - Άνθη παπαρούνας ( <i>Papaver rhoeas</i> ), ροδιάς ( <i>Punica granatum</i> ), άρνικας ( <i>Arnica montana</i> ) και <i>Scolymus hispanicus</i> , κομμένα σε λωρίδες - Στήμονες ορισμένων ειδών γαρύφαλλου - Άλεσμα κόκκινης πιπεριάς - Ποώδη φυτά κομμένα σε κομμάτια και χρωματισμένα με χρήση αζω ενώσεων - Ριζίδια πράσου ( <i>Allium porrum</i> ) - Σκόνη ξύλου σάνδαλου και ξύλου <i>Haematoxylum campechianum</i> - Κουρκουμάς ( <i>Curcuma longa</i> L.) - Καρποί γαρδένιας ( <i>Gardenia jasminoides</i> Ellis)
Προσθήκη υλικού ζωικής προέλευσης	Ίνες αποξηραμένου, αλατισμένου κρέατος
Προσθήκη συνθετικών υλικών	Χρωματισμένες ίνες ζελατίνης
Προσθήκη χρωστικών*	Martius Yellow (11802), τροπεολίνη (18170), φουξίνη (12447), πικρικό οξύ (6954), ταρτραζίνη (164825), ερυθροζίνη (12961638), Ponceau 4R (54604869), αζωρουμπίνη (6321394), κίτρινο της κινολίνης (6731), Sunset Yellow (6093232), κίτρινο της ναφθόλης (10226), ερυθρό 2G (6507024), αμαράνθη (5359521), πορτοκαλί II (23682006), όξινο ερυθρό 88 (23670762), ερυθρό Allura AC (6093299)

\* Οι αριθμοί εντός των παρενθέσεων αποτελούν τον κωδικό της χρωστικής (CID) στη βιβλιοθήκη PubChem.

βασίζονταν κυρίως στη μακροσκοπική εικόνα του saffron, λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικές και χημικές του ιδιότητες, στο βαθμό που αυτές ήταν εφικτό να αναλυθούν και να διερευνηθούν. Ενδεικτικά, κατά τον 1<sup>ο</sup> αιώνα ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος αναφέρει στο *Naturalis Historia* (Bostock & Riley, 1855) ότι το saffron θα πρέπει να θρυμματίζεται όταν πιεστεί με τα δάκτυλα, ενώ το αντίθετο είναι ένδειξη νοθείας με διαβροχή του saffron με νερό προκειμένου να αυξηθεί το βάρος του. Αναφορές των αρχών του 20<sup>ου</sup> αιώνα περιγράφουν τρόπους ανίχνευσης της νοθείας μέσω καύσης και βύθισης σε νερό (Carmona Delgado et al., 2006). Το αυθεντικό saffron καίγεται γρήγορα, αφήνοντας ελάχιστα υπολείμματα, ενώ η καύση του νοθευμένου είναι δύσκολη και συνοδεύεται από σπινθήρες και σαφώς περισσότερα υπολείμματα. Επιπλέον, το αυθεντικό saffron επιπλέει στο νερό, ενώ το νοθευμένο κατακάθεται ταχύτατα και αποχρωματίζεται ταχύτερα. Οι εμπειρικές τεχνικές ανίχνευσης της νοθείας του saffron, αν και σήμερα θεωρούνται παρωχημένες, υπογραμμίζουν τη διαχρονική σημασία της πιστοποίησης της αυθεντικότητας του προϊόντος αυτού.

Στις μέρες μας, η προσπάθεια ανίχνευσης και καταπολέμησης της νοθείας του saffron βασίζεται σε σύγχρονες επιστημονικές μεθόδους. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 ορισμένες από τις μεθόδους που έχουν προταθεί για τα διάφορα είδη νοθείας του saffron, με έμφαση στις μεθόδους ενόργανης χημικής ανάλυσης.

Ο συνδυασμός των σύγχρονων μεθόδων ενόργανης χημικής ανάλυσης με αυτές που βασίζονται στη μελέτη του γονιδιώματος, αλλά και με μεθόδους και τεχνικές όπως η οπτική φασματοσκοπία έχουν ως αποτέλεσμα να είναι πλέον σχετικά εύκολος ο προσδιορισμός της νοθείας που στοχεύει στην αύξηση του βάρους ή που βασίζεται στην προσθήκη ουσιών με μικρή συγγένεια με το saffron.

Η προσθήκη συνθετικών χρωστικών με στόχο τη βελτίωση ή αλλαγή του χρώματος χαμηλής ποιότητας saffron ή άλλων ουσιών που έχουν προστεθεί για την αύξηση του βάρους ή ως υποκατάστατα αποτελεί την πλέον συνήθη πρακτική νοθείας στις μέρες μας (Sánchez et al., 2011). Γενικά, η ανίχνευση συνθετικών χρωστικών σε τρόφιμα αποτελεί αντικείμενο πλήθους μελετών και, επιπρόσθετα των μεθόδων που αναφέρονται στον Πίνακα 4, έχουν προταθεί και άλλες τεχνικές που βασίζονται, για παράδειγμα, σε ηλεκτροφορητικές μεθόδους (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 1995; Berzas Nevado, Guiberteau Cabanillas & Contento Salcedo, 1999). Στην περίπτωση του saffron, συνήθως γίνεται χρήση περισσότερων της μίας χρωστικών, προκειμένου να είναι δυσκολότερη η ανίχνευσή τους (Carmona Delgado et al., 2006). Ωστόσο, η εφαρμογή των αποτελεσμάτων των επιστημονικών ερευνών στην καθημερινή πρακτική έχει διευκολύνει σημαντικά την καταπολέμηση των προαναφερθέντων ειδών νοθείας, όπως προκύπτει και από την ενσωμάτωση δοκιμών για αυτούς τους τύπους νοθείας στο πρότυπο *ISO 3632* (2011).

Αντίθετα, μεγαλύτερη δυσκολία παρουσιάζει η ανίχνευση της νοθείας στο saffron όταν αυτή γίνεται με την προσθήκη μερών από άλλα φυτά ή ακόμη και από το ίδιο το *Crocus sativus*, όπως επίσης και όταν η νοθεία έγκειται στην ανάμειξη με saffron παλιότερης εσοδείας. Η διερεύνηση αυτών των τύπων νοθείας, σύμφωνα με το πρότυπο *ISO 3632* (2011), βασίζεται κυρίως στην παρατήρηση και τη μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων, η πολυπλοκότητα και η υποκειμενικότητα των οποίων δυσχεραίνει τη διαπίστωση της νοθείας, ειδικά στην περίπτωση του saffron σε σκόνη, το οποίο είναι γνωστό ότι νοθεύεται σε μεγαλύτερη έκταση και ένταση από αυτό σε μορφή νημάτων (Alonso, Salinas, Sánchez-Fernández & Garijo, 2000).

**Πίνακας 4** Σύγχρονες μέθοδοι που έχουν προταθεί για την ανίχνευση των διάφορων ειδών νοθείας του saffron.

Μέθοδος ανίχνευσης νοθείας	Είδη νοθείας	Αναφορές
Αέρια Χρωματογραφία (GC-MS/FID)	προσθήκη υλικού από άλλα φυτά προσθήκη saffron παλαιάς εσοδείας γεωγραφική διαφοροποίηση	Alonso et al., 1998; Carmona et al., 2006a; Anastasaki et al., 2009; Maggi et al., 2010
Υγρή Χρωματογραφία (LC-DAD/MS)	προσθήκη στύλων <i>C. sativus</i> προσθήκη υλικού από άλλα φυτά προσθήκη συνθετικών χρωστικών γεωγραφική διαφοροποίηση	Carmona et al., 2006b; Carmona et al., 2007; Haghghi et al., 2007; del Campo et al., 2009; ISO 3632, 2011; Sabatino et al., 2011
Φασματοσκοπία UV-Vis	προσθήκη συνθετικών χρωστικών	Zalacain et al., 2005a; Zougagh et al., 2005
Φθορισμομετρία	προσθήκη συνθετικών χρωστικών	Ordoudi & Tsimidou, 2011
Υπέρυθη Φασματοσκοπία (FT-IR, NIR)	προσθήκη saffron παλαιάς εσοδείας γεωγραφική διαφοροποίηση	Zalacain et al., 2005b; Anastasaki et al., 2010a; Ordoudi et al., 2014
Φασματοσκοπία NMR	προσθήκη υλικού από άλλα φυτά άγνωστου τύπου νοθεία σε εμπορικά δείγματα	Yilmaz et al., 2010
Μέθοδοι βασισμένες στο DNA	προσθήκη υλικού από άλλα φυτά	Javanmardi et al., 2012; Marieschi et al., 2012; Babaei et al., 2014; Torelli et al., 2014

Επιπλέον των ειδών νοθείας που περιγράφονται στον Πίνακα 3, στην επιστημονική βιβλιογραφία γίνεται αναφορά και σε μεθόδους για τη διαφοροποίηση του saffron βάσει της γεωγραφικής του προέλευσης (Πίνακας 4). Διαφορετικής προέλευσης δείγματα saffron παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση ως προς την ποιότητά τους, ως αποτέλεσμα διαφορετικών καλλιεργητικών πρακτικών, τεχνικών επεξεργασίας και ιδιαίτερα αυτών της ξήρανσης, καθώς και λόγω της επίδρασης διακριτών εδαφοκλιματικών παραγόντων (Sánchez et al., 2011). Οι λόγοι αυτοί, σε συνδυασμό με τη διαφοροποίηση της τιμής ως αποτέλεσμα της απόκλισης στο κόστος παραγωγής μεταξύ των χωρών παραγωγών saffron, υπογραμμίζουν την ανάγκη πιστοποίησης της γεωγραφικής προέλευσης του προϊόντος. Αν και εκτός του παραδοσιακού πλαισίου της νοθείας, η διαφοροποίηση του saffron βάσει του τύπου παραγωγής του είναι αναγκαία προκειμένου να ανιχνευθούν περιπτώσεις κατά τις οποίες saffron χαμηλότερης τιμής πωλείται ως saffron διαφορετικής προέλευσης με υψηλότερη τιμή, συνηθέστερα ως προϊόν που έχει κατοχυρωθεί με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης.

Η ανίχνευση της νοθείας του saffron είναι μείζονος σημασίας για την πιστοποίηση της ποιότητάς του, τη διασφάλιση της βιολογικής του δράσης, την προστασία της υγείας των καταναλωτών και τη θωράκιση καταναλωτών και παραγωγών έναντι της οικονομικής απάτης. Η ιδιαίτερα υψηλή τιμή του saffron σε συνδυασμό με την ένταση και την έκταση της νοθείας σε αυτό επιβάλλουν την ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης της νοθείας οι οποίες να απαιτούν τη χρήση μικρών ποσοτήτων δείγματος και να παρέχουν εύρωστα αποτελέσματα, ενώ παράλληλα το κόστος τους και οι απαιτήσεις σε χρόνο και εξειδικευμένο προσωπικό θα πρέπει να μπορούν να ικανοποιηθούν από τις, συχνά μικρές ή μεσαίου μεγέθους, μονάδες παραγωγής και συσκευασίας saffron.

## 1.8 Άλλα είδη του γένους *Crocus*

Το γένος *Crocus* περιλαμβάνει, πλέον του *C. sativus*, άλλα περίπου 85 είδη (Πίνακας 1) τα οποία απαντώνται ως ενδημικά κυρίως στη Μεσογειακή λεκάνη και δευτερευόντως στη δυτική Ασία (Carmona Delgado et al., 2006). Η Ελλάδα αναφέρεται ως τόπος καταγωγής περίπου του 40% της παγκόσμιας βιοποικιλότητας του γένους *Crocus* (Fernández et al., 2011).

Άγρια είδη *Crocus* που αναφέρονται ως αυτοφυή στην Ελλάδα είναι:

1. ***C. pelistericus*** (Petersen, Seberg, Thorsøe, Jørgensen & Mathew, 2008; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη του εσωτερικά είναι λιλά-μπλε ή μωβ (Πυλαρά, 2007). Αυτοφύεται στη Δυτική και Κεντρική Μακεδονία και θεωρείται σπάνιο είδος στη χώρα μας (Πυλαρά, 2007; Χρυσάνθη, 2010).

2. ***C. niveus*** (Petersen et al., 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη είναι συνήθως άσπρα, αλλά μερικές φορές φέρουν απαλό λιλά χρωματισμό ή το περιάνθιο είναι εσωτερικά λευκό και εξωτερικά λιλά. Ο στύλος φέρει τρεις διακλαδώσεις χρώματος πορτοκαλί ή ανοιχτού κόκκινου. Ανθίζει το φθινόπωρο (Πυλαρά, 2007). Αναφέρεται ως ενδημικό της Πελοποννήσου (Πυλαρά, 2007; Georghiou & Delipetrou, 2010).

3. ***C. goulimy*** (Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010).

***C. goulimy* subsp. *goulimy*** (Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-), ***C. goulimy* subsp. *leucanthus*** (Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη είναι αρωματικά, με χρώμα απαλό έως βαθύ μωβ. Ο στύλος φέρει τρεις, άσπρες έως πορτοκαλί διακλαδώσεις. Ανθίζει το φθινόπωρο (Πυλαρά, 2007). Αυτοφύεται στην Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα, τα Ιόνια Νησιά και την Ήπειρο (Georghiou & Delipetrou, 2010) και αναφέρεται ως απειλούμενο είδος (Χρυσάνθη, 2010).

4. ***C. pallasii* subsp. *pallasii*** (Mathew, 2003; Karamplianis, Tsiftsis & Constantinidis, 2013; Euro+Med, 2006-).

Έχει άνθη αρωματικά, ανοιχτά ροζ-λιλά έως σκούρα λιλά-μπλε ή ιώδη-μπλε, συχνά με σκουρότερες νευρώσεις. Ο στύλος διαχωρίζεται σε τρία μέρη και είναι κόκκινος ή, κατά περιπτώσεις, κίτρινος ή πορτοκαλί. Ανθίζει το φθινόπωρο (Mathew, 2003; Karamplianis et al., 2013). Αυτοφύεται στη Μακεδονία, τη Θεσσαλία, τη Στερεά Ελλάδα, την Αττική και τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου (Mathew, 2003; Karamplianis et al., 2013).

5. ***C. cartwrightianus*** (Καββάδας, 1956; Mathew, 2003; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη του είναι αρωματικά, χρώματος ανοιχτού έως σκούρου λιλά-μωβ ή λευκού, με έντονες, πιο σκούρες νευρώσεις. Σε αρκετές περιπτώσεις τα τέπαλα έχουν βαθύτερο χρωματισμό στη βάση τους, ενώ συχνά παρατηρούνται αλφικά άτομα με λευκά άνθη, χωρίς ορατές νευρώσεις. Ο στύλος είναι κόκκινος και φέρει τρεις διακλαδώσεις. Ανθίζει το φθινόπωρο (Mathew, 2003). Είναι ενδημικό φυτό της χώρας μας και αυτοφύεται στην Αττική, τις Κυκλάδες, την Κρήτη, τη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο (Mathew, 2003; Georghiou & Delipetrou, 2010).

6. ***C. oreocreticus*** (Mathew, 2003; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-).

Φέρει άνθη λιλά έως μωβ, με πιο βαθύχρωμες νευρώσεις. Ο στύλος είναι κόκκινος ή, σπανιότερα, κίτρινος και φέρει τρεις διακλαδώσεις. Ανθίζει το φθινόπωρο (Mathew, 2003). Είναι ενδημικό φυτό της Κρήτης (Mathew, 2003; Georghiou & Delipetrou, 2010) και αναφέρεται ως σπάνιο είδος (Χρυσάνθη, 2010).

7. ***C. hadriaticus*** (συν. ***C. peloponnesiacus***) (Καββάδας, 1956; Mathew, 2003; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-).

***C. hadriaticus* subsp. *hadriaticus*** (Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-), ***C. hadriaticus* subsp. *parnassicus*** (Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-), ***C. hadriaticus* subsp. *parnonicus*** (Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη του είναι αρωματικά, λευκά και συχνά φέρουν στο εξωτερικό τους καφετί, κίτρινωπά ή ιώδη στίγματα. Σε σπάνιες περιπτώσεις, παρατηρείται διάχυτος, ανοιχτός λιλά χρωματισμός στα τέπαλα. Ο στύλος φέρει τρεις μικρού πάχους διακλαδώσεις, λευκού ή κόκκινου χρώματος (Καββάδας, 1956; Mathew, 2003). Ανθίζει το φθινόπωρο (Mathew, 2003). Απαντάται στην Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα, τα νησιά του Ιονίου και την Ήπειρο (Georghiou & Delipetrou, 2010).

8. ***C. reticulatus*** (Karamplianis et. al., 2013).

Φέρει άνθη λευκά ή ανοιχτά λιλά, με τρεις πλατιές γραμμώσεις στα εξωτερικά τέπαλα και ιώδεις νευρώσεις. Ο στύλος διαχωρίζεται σε τρία μέρη και φέρει κίτρινο ή βαθύ πορτοκαλί χρωματισμό. Πληθυσμοί του είδους εντοπίστηκαν στο όρος Φαλακρό (Karamplianis et. al., 2013).

9. **C. veluchensis** (Καββάδας, 1956; 2010; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη έχουν χρώμα απαλό λιλά έως βαθύ πορφυρό. Ο στύλος είναι κίτρινος έως πορτοκαλί. Ανθίζει την άνοιξη (Πυλαρά, 2007). Αυτοφύεται στην Ήπειρο, τη Στερεά Ελλάδα, τη Μακεδονία, τη Θράκη και τη Θεσσαλία (Πυλαρά, 2007).

10. **C. cvijicii** (Petersen et al, 2008; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Έχει άνθη ανοιχτού κρεμ έως σκούρου πορτοκαλί χρώματος και στύλο πορτοκαλί, με τρεις διακλαδώσεις. Ανθίζει την άνοιξη. Στη χώρα μας αυτοφύεται στη Δυτική Μακεδονία, την ανατολική Θεσσαλία και το βορειότερο τμήμα της Ηπείρου (Πυλαρά, 2007).

11. **C. sieberi** (Καββάδας, 1956; Euro+Med, 2006-).

**C. sieberi subsp. atticus** (Καββάδας, 1956; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-), **C. sieberi subsp. nivalis** (Καββάδας, 1956; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-), **C. sieberi subsp. sieberi** (Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-), **C. sieberi subsp. sublimis** (Petersen et al, 2008; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Η μορφολογία των φυτών ποικίλλει μεταξύ των διάφορων υποειδών. Τα άνθη εμφανίζουν λευκό χρωματισμό στη βάση τους και ιώδη στο άκρο ή αντίστροφα. Σε άλλες περιπτώσεις, τα τέπαλα είναι λευκά στο εσωτερικό και εξωτερικά φέρουν μωβ χρωματισμό ή γραμμώσεις. Ο στύλος διαχωρίζεται σε τρία μέρη και είναι κίτρινος ή πορτοκαλί-κόκκινος. Ανθίζουν την άνοιξη. (Πυλαρά, 2007). Το υποείδος *atticus* αυτοφύεται στη Στερεά Ελλάδα, την Εύβοια, τα νησιά του βορειοδυτικού Αιγαίου και τις Κυκλάδες, ενώ το υποείδος *nivalis* αναφέρεται ως ενδημικό της Πελοποννήσου (Georghiou & Delipetrou, 2010). Το υποείδος *sieberi* αυτοφύεται στη Κρήτη, την Κάσο και την Κάρπαθο (Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-), ενώ, τέλος, πληθυσμοί του υποείδους *sublimis* εντοπίζονται στην Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα, την Εύβοια, τα νησιά του βορειοδυτικού Αιγαίου και του Ιονίου, την Ανατολική και Δυτική Μακεδονία, τη Θράκη και το ανατολικό τμήμα της Θεσσαλίας (Πυλαρά, 2007).

12. **C. robertianus** (Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-).

Έχει άνθη ωχρά έως λιλά και στύλο πορτοκαλί-κόκκινο που διακλαδίζεται σε τρία μέρη. Αυτοφύεται στην Ήπειρο και τη Στερεά Ελλάδα (Georghiou & Delipetrou, 2010) και χαρακτηρίζεται ως απειλούμενο είδος (Χρυσάνθη, 2010).

13. **C. cancellatus** (Καββάδας, 1956; Euro+Med, 2006-).

**C. cancellatus subsp. mazziaricus** (Petersen et al, 2008; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη είναι άσπρα, συχνά με γραμμώσεις ή μωβ χρωματισμό στο εξωτερικό, ενώ ο στύλος διακλαδίζεται σε τρία μέρη και είναι κίτρινος ή σκούρο πορτοκαλί. Ανθίζει το φθινόπωρο. Αυτοφύεται σε όλη τη χώρα, με εξαίρεση την Κρήτη, τα νησιά του βόρειου Αιγαίου, το ανατολικό τμήμα της Θεσσαλίας και τη περιοχή της βόρειας Πίνδου (Πυλαρά, 2007).

14. **C. biflorus** (Καββάδας, 1956; Euro+Med, 2006-).

**C. biflorus subsp. alexandri** (Petersen et al, 2008; Karamplianis et. al., 2013), **C. biflorus subsp. crewei** (Καββάδας, 1956; Euro+Med, 2006-), **C. biflorus subsp. melantherus** (Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-), **C. biflorus subsp. nubigena** (Petersen et al, 2008; Euro+Med, 2006-), **C.**

**sieberi subsp. punctatus** (Petersen et al, 2008), **C. biflorus subsp. stridii** (Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-).

Η μορφολογία των φυτών ποικίλλει μεταξύ των υποειδών. Τα άνθη ενδέχεται να είναι εσωτερικά λευκά και εξωτερικά ιώδη-μπλε στη βάση ή σε όλη τους την επιφάνεια. Ο στύλος φέρει τρεις διακλαδώσεις, κίτρινες ως πορτοκαλί-κόκκινες (Καββάδας, 1956; Πυλαρά, 2007; Karamplianis et al., 2013). Ανθίζει την άνοιξη (Καββάδας, 1956; Karamplianis et. al., 2013), με εξαίρεση το υποείδος *melantherus* που ανθοφορεί το φθινόπωρο (Πυλαρά, 2007). Το υποείδος *crewei* είναι ενδημικό των Κυκλάδων, το *melantherus* της Πελοποννήσου και το *stridii* της Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης (Πυλαρά, 2007; Georghiou & Delipetrou, 2010). Το υποείδος *alexandri* αναφέρεται ως ιδιαίτερα σπάνιο φυτό της Ανατολικής Μακεδονίας (Karamplianis et. al., 2013), ενώ το υποείδος *nubigena* απαντάται στα Δωδεκάνησα και την Κρήτη (Πυλαρά, 2007).

15. **C. chrysanthus** (Καββάδας, 1956; Petersen et al, 2008; Euro+Med, 2006-).

**C. chrysanthus subsp. chrysanthus** (Euro+Med, 2006-), **C. chrysanthus subsp. multifolius** (Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη είναι συνήθως ανοιχτά κίτρινα, ενώ ο στύλος διακλαδίζεται σε τρία μέρη και είναι πορτοκαλί-κόκκινος. Ανθίζει την άνοιξη. Αυτοφύεται στο μεγαλύτερο τμήμα της ηπειρωτικής Ελλάδας, ενώ δεν έχει καταγραφεί στην Κρήτη, τις Κυκλάδες, την Εύβοια, τις Σποράδες, τα νησιά του Ιονίου και την Πελοπόννησο (Καββάδας, 1956; Πυλαρά, 2007).

16. **C. olivieri** (Καββάδας, 1956; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

**C. olivieri subsp. olivieri** (Euro+Med, 2006-), **C. olivieri subsp. balansae** (Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη του είναι κίτρινα ή πορτοκαλί και εκπτύσσονται την άνοιξη (Καββάδας, 1957). Ο στύλος διακλαδίζεται σε έξι έως δέκα μέρη στο υποείδος *olivieri* και σε περισσότερα από δέκα στο υποείδος *balansae* (Πυλαρά, 2007), ενώ τα στίγματα είναι πορτοκαλί (Καββάδας, 1957). Το *C. olivieri* subsp. *olivieri* αυτοφύεται στην Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα, την Κεντρική και Ανατολική Μακεδονία, τη Θράκη, τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου και τα Δωδεκάνησα (Πυλαρά, 2007). Το *C. olivieri* subsp. *balansae* αυτοφύεται στα νησιά του ανατολικού Αιγαίου και τα Δωδεκάνησα και θεωρείται σπάνιο στη χώρα μας (Πυλαρά, 2007; Χρυσάνθη, 2010).

17. **C. pulchellus** (Καββάδας, 1956; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη του είναι κίτρινα ή πορτοκαλί και εκπτύσσονται το φθινόπωρο (Καββάδας, 1957). Ο στύλος διακλαδίζεται σε περισσότερα από τρία μέρη και είναι κίτρινος ή πορτοκαλί (Πυλαρά, 2007). Απαντάται στη Μακεδονία, τη Θράκη και τα νησιά του βορείου Αιγαίου (Πυλαρά, 2007).

18. **C. laevigatus** (Καββάδας, 1956; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη του είναι εσωτερικά λευκά ή λιλά, φέρουν συχνά βιολετί ραβδώσεις ή χρωματισμούς στο εξωτερικό τους και εκπτύσσονται κυρίως το φθινόπωρο (Πυλαρά, 2007; Χρυσάνθη, 2010). Ο στύλος διαχωρίζεται σε πολλά μέρη, κίτρινου ή πορτοκαλί χρώματος (Πυλαρά, 2007). Αυτοφύεται στην Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα, την Εύβοια, τις Σποράδες, τις Κυκλάδες και την Κρήτη (Χρυσάνθη, 2010; Georghiou & Delipetrou, 2010).

19. **C. boryi** (Καββάδας, 1956; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη είναι συνήθως λευκά, ενδέχεται να φέρουν σκούρες νευρώσεις στην εξωτερική επιφάνεια των τεπάλων και εκπτύσσονται το φθινόπωρο (Πυλαρά, 2007). Ο στύλος διαχωρίζεται σε περισσότερα των τριών μέρη, κίτρινου ή πορτοκαλί χρώματος (Πυλαρά, 2007). Απαντάται στην Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα, τα νησιά του Ιονίου, την Κρήτη, τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου και τα Δωδεκάνησα (Georghiou & Delipetrou, 2010).

20. **C. *tournefortii*** (Καββάδας, 1956; Petersen et al, 2008; Georghiou & Delipetrou, 2010; Fernández et al., 2011; Euro+Med, 2006-).

Τα άνθη είναι συνήθως λιλά ή μπλε, ενδέχεται να φέρουν σκούρες νευρώσεις στην εξωτερική επιφάνεια των τεπάλων και εκπτύσσονται το φθινόπωρο (Πυλαρά, 2007). Ο στύλος διαχωρίζεται σε περισσότερα των τριών μέρη και είναι κίτρινος ή πορτοκαλί (Πυλαρά, 2007). Αυτοφύεται στην Πελοπόννησο, τις Κυκλάδες, την Κρήτη, τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου και τα Δωδεκάνησα (Georghiou & Delipetrou, 2010).

Τα είδη του γένους *Crocus*, πέραν του *Crocus sativus*, αξιοποιούνται εμπορικά αποκλειστικά ως καλλωπιστικά φυτά. Η ποικιλομορφία των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους και η προσαρμογή τους σε ποικίλα περιβάλλοντα έχει οδηγήσει στη χρήση του συνόλου σχεδόν των ειδών στην κηποτεχνία και στη δημιουργία πολυάριθμων υβριδίων και εμπορικών ποικιλιών (Brickell, 2008).

Πέραν της χρήσης τους στην κηποτεχνία, τα άγρια είδη *Crocus* δεν αξιοποιούνται εμπορικά. Οι άλλες χρήσεις που αναφέρονται αφορούν σε μικρό αριθμό αυτοφυών ειδών και είναι έντονα συνδεδεμένες με τοπικές παραδόσεις και κοινωνίες. Στην Ελλάδα, τα στίγματα των αυτοφυών *C. cartwrightianus*, *C. cancellatus* και *C. tournefortii* συλλέγονται σε ορισμένες περιοχές και χρησιμοποιούνται, όπως το saffron, ως άρτυμα ή για φαρμακευτική και βαφική χρήση (Καββάδας, 1956; Χρυσάνθη, 2010). Παράλληλα, σε ορισμένες περιοχές, οι κόρμοι μερικών αυτοφυών ειδών, όπως τα *C. olivieri*, *C. hadriaticus*, *C. sieberi* και *C. cancellatus*, συλλέγονται και καταναλώνονται ως εδώδιμοι (Καββάδας, 1956; Χρυσάνθη, 2010).



## 1.9 Σκοπός

Η παρούσα εργασία φιλοδοξεί να προσεγγίσει το ζήτημα του προσδιορισμού της ποιότητας και της νοθείας στο saffron, επιχειρώντας τόσο να επανεξετάσει τις τεχνικές που σήμερα χαίρουν ευρείας αποδοχής και εφαρμογής, όσο και να προτείνει εναλλακτικές μεθόδους ενόργανης χημικής ανάλυσης, ώστε να υπερκερασθούν τα όποια μειονεκτήματα των υφιστάμενων.

Η ευρύτητα των ζητημάτων που άπτονται της ποιότητας του saffron, σε συνδυασμό με την ένταση, την έκταση και την πολυπλοκότητα της νοθείας σε αυτό δε μπορούν παρά να θέτουν ένα πλήθος αναλυτικών προβλημάτων προς επίλυση. Για το λόγο αυτό, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, κρίθηκε αναγκαίο να καθοριστούν επιμέρους στοχεύσεις και αυτές να υποστηριχθούν μέσω διακριτών πειραματικών προσεγγίσεων.

Ως αποτέλεσμα, ο γενικός σκοπός της εργασίας εξειδικεύεται:

1. Στην επανεξέταση και αξιολόγηση του υφιστάμενου προτύπου *ISO 3632* (2011) ως προς την ικανότητα εύρωστου προσδιορισμού της ποιότητας του ελληνικού saffron (Κεφάλαιο 2),
2. Στην ανάπτυξη και αξιολόγηση εναλλακτικής μεθόδου ποσοτικοποίησης των κροκινών του saffron, βασισμένης στη φασματοσκοπία Raman (Κεφάλαιο 3),
3. Στην ανάπτυξη και αξιολόγηση εναλλακτικής μεθόδου ανίχνευσης της νοθείας του saffron, βασισμένης στη φασματοσκοπία FT-IR (Κεφάλαιο 4) και
4. Στην ποιοτική διαφοροποίηση του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών μεταξύ του *Crocus sativus* και άλλων ειδών του γένους *Crocus* με χρήση μεθόδων βασισμένων στην HPLC και τη φασματοσκοπία FT-IR (Κεφάλαιο 5).

## 2. Προσδιορισμός της ποιότητας saffron σύμφωνα με το πρότυπο ISO και αξιολόγηση της ευρωστίας του

### 2.1 Θεωρητικό μέρος

Ο προσδιορισμός της ποιότητας του saffron αποτελεί διαχρονικά ένα από τα πλέον βασικά, αν όχι το βασικότερο, ζητούμενο τόσο για όσους εμπλέκονται στην παραγωγή και τη διάθεσή του, όσο και για τους καταναλωτές. Η χρήση του ως πρόσθετου τροφίμων και η ιδιαίτερα υψηλή τιμή του είναι δύο από τους κύριους λόγους που καθιστούν επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών εργαλείων ποιοτικού ελέγχου και κατηγοριοποίησης του προϊόντος.

Τα τελευταία χρόνια, παρά το μη δεσμευτικό χαρακτήρα του για τους εθνικούς φορείς πιστοποίησης, τους παραγωγούς και τους εμπόρους saffron και παρά την ύπαρξη εναλλακτικών εθνικών ή τοπικών προτύπων, αυτό του Διεθνούς Οργανισμού για την Τυποποίηση (ISO), με πλέον σύγχρονη έκδοση το πρότυπο *ISO 3632 (2011)*, χρησιμοποιείται ευρέως σε ευρωπαϊκό, αλλά και παγκόσμιο επίπεδο. Η αποδοχή που γνωρίζει το *ISO 3632 (2011)* βασίζεται στο γεγονός ότι αποτελεί το πλέον ολοκληρωμένο πρότυπο για την εκτίμηση της ποιότητας του saffron. Ωστόσο, παρουσιάζει αρκετές αδυναμίες που αποτελούν αντικείμενο προβληματισμού και έρευνας τόσο από την επιστημονική κοινότητα, όσο και από όσους εμπλέκονται στην οικονομική εκμετάλλευσή του.

Το βασικότερο ίσως πλεονέκτημα που παρουσιάζει η μέθοδος που προτείνεται από το πρότυπο *ISO 3632 (2011)* για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό του saffron μέσω του προσδιορισμού των βασικότερων χημικών χαρακτηριστικών του που σχετίζονται με τα κύρια συστατικά του (κροκίνες, πικροκροκίνη και σαφρανάλη) είναι το γεγονός ότι βασίζεται στη φασματοσκοπία UV-Vis. Η μέθοδος που περιλαμβάνεται στο πρότυπο είναι απλή τόσο στην εκτέλεση της ανάλυσης, όσο και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, σχετικά γρήγορη και οι απαιτήσεις της σε εξοπλισμό και τεχνικό προσωπικό μπορούν να ικανοποιηθούν ακόμη και σε μικρές ή μεσαίου μεγέθους μονάδες παραγωγής, τυποποίησης, συσκευασίας και εμπορίας saffron.

Ωστόσο, η μεθοδολογία για τον προσδιορισμό των κυριότερων χαρακτηριστικών του saffron σύμφωνα με το πρότυπο *ISO 3632 (2011)* παρουσιάζει και σημαντικές αδυναμίες. Ορισμένα από τα μειονεκτήματά της, όπως αυτά έχουν αναδειχτεί κατά καιρούς, είναι (α) η αδυναμία προσδιορισμού του περιεχομένου σε σαφρανάλη, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό, αλλά και της απορρόφησης των *cis*-κροκινών στην ίδια φασματική περιοχή (Tarantilis, Polissiou & Manfait, 1994b) και (β) η αδυναμία προσδιορισμού της συγκέντρωσης της πικροκροκίνης στα υδατικά διαλύματα saffron, λόγω της απορρόφησης του συνόλου των κροκινών στο ίδιο μήκος κύματος (Tarantilis et al., 1994b). Οι περιορισμοί αυτοί αίρουν την ικανοποιητική εφαρμογή του προτύπου για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό του saffron σε παγκόσμιο επίπεδο, αφού σε πολλές καταναλώτριες χώρες το άρωμα και η γεύση έχουν μεγαλύτερη σημασία από τη χρωστική δύναμη του saffron (Carmona Delgado et al., 2006).

Η υπερκέραση των μειονεκτημάτων αυτών έχει αποτελέσει το ζητούμενο των διάφορων αναθεωρήσεων του προτύπου αυτού, το οποίο δημιουργήθηκε αρχικά το

1975, ενώ αναθεωρημένες και συμπληρωμένες εκδόσεις του τέθηκαν σε ισχύ το 1980, το 1993 και το 2003, με πιο πρόσφατη την ισχύουσα σήμερα έκδοση *ISO 3632* (2011). Αν και οι αναθεωρημένες εκδόσεις σημείωσαν πρόοδο στον τρόπο προσδιορισμού της ποιότητας του saffron, οι αδυναμίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως δεν έχει καταστεί ακόμη δυνατό να ξεπεραστούν.

Στο πλαίσιο της επανεξέτασης της αποτελεσματικότητας του προτύπου *ISO 3632* (2011), το παρόν τμήμα της εργασίας έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό της ποιότητας ελληνικών δειγμάτων saffron σύμφωνα με τη σχετική μεθοδολογία που περιλαμβάνεται σε αυτό. Παράλληλα, και σε ότι αφορά στον προσδιορισμό των κυριότερων χαρακτηριστικών του saffron, στόχος είναι η αξιολόγηση του προτύπου μέσω: (α) της διερεύνησης των συσχετίσεων μεταξύ των αποτελεσμάτων του προτύπου και (β) της σύγκρισης των αποτελεσμάτων αυτών με αντίστοιχα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων με εφαρμογή μεθόδου βασισμένων στην HPLC.

## 2.2 Πειραματικό μέρος

Τα ελληνικά δείγματα saffron ( $n=58$ ) παραχωρήθηκαν από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης και προέρχονταν, στο σύνολό τους, από την εσοδεία του 2012.

### 2.2.1 Ανάλυση ελληνικού saffron σύμφωνα με το πρότυπο ISO

Η ανάλυση των δειγμάτων σύμφωνα με το πρότυπο *ISO 3632* (2011) αφορούσε στον προσδιορισμό i) της υγρασίας και των πτητικών συστατικών και ii) των κυριότερων χαρακτηριστικών του saffron με τη χρήση μεθόδου βασισμένης στη φασματοσκοπία UV-Vis. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται στις παραγράφους 7 και 14, αντίστοιχα, του προτύπου *ISO 3632-2* (2011), ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σύμφωνα με τις προδιαγραφές του *ISO 3632-1* (2011).

Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της υγρασίας και των πτητικών συστατικών που περιέχονταν σε κάθε δείγμα saffron, ζυγίστηκαν 2,5 g saffron σε νήματα και τοποθετήθηκαν σε πορσελάνινες κάψες, οι οποίες είχαν προηγουμένως ξηρανθεί και ζυγιστεί. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο θερμοστατούμενο στους 103 °C, όπου παρέμεινε για 16 ώρες. Τα δείγματα, στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα, ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζυγίστηκαν εκ νέου. Το περιεχόμενο του δείγματος σε υγρασία και πτητικά συστατικά ( $w_{MV}$ ) εκφράστηκε ως ποσοστό επί του αρχικού δείγματος, σύμφωνα με τον τύπο:

$$w_{MV} = (m_0 - m_4) * \frac{100}{m_0} \% \quad (1)$$

όπου  $m_0$  η αρχική μάζα (g) του δείγματος και  $m_4$  η μάζα (g) μετά την ξήρανση.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του saffron που προσδιορίζονται από το πρότυπο ISO είναι η ένταση της γεύσης, του αρώματος και η χρωστική δύναμη (*ISO 3632 -1*, 2011) και σχετίζονται με το περιεχόμενο του δείγματος σε πικροκροκίνη, σαφρανάλη και κροκίνες αντίστοιχα (*ISO 3632 -2*, 2011). Για τον προσδιορισμό τους, 500 mg κονιοποιημένου δείγματος saffron τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000

mL, στην οποία προστέθηκαν περίπου 900 mL απιονισμένου νερού. Η εκχύλιση έγινε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (1000 r/min) για μία ώρα. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο διάλυμα απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο και ομογενοποιήθηκε. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε και 20 mL του υπερκείμενου διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 200 mL. Το διάλυμα που προέκυψε ομογενοποιήθηκε και φωτομετρήθηκε στην περιοχή 200-700 nm. Για την καταγραφή του φάσματος UV-Vis χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Jasco UV-Vis V-550. Σε όλη τη διάρκεια της εκχύλισης και φωτομέτρησης, τα υδατικά διαλύματα παρέμειναν προστατευμένα από το φως. Ο προσδιορισμός των κυριότερων χαρακτηριστικών του saffron γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{D * 10000}{m * (100 - w_{MV})} \quad (2)$$

όπου  $D$  η απορρόφηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος ( $\lambda$ ),  $m$  η μάζα (g) του δείγματος saffron και  $w_{MV}$  το περιεχόμενο του δείγματος σε υγρασία και πτητικά συστατικά, όπως προσδιορίζεται από τον τύπο 1. Για τον προσδιορισμό της έντασης της γεύσης ( $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm), χρησιμοποιείται η απορρόφηση ( $D$ ) στα 257 nm, όπου σημειώνεται η μέγιστη απορρόφηση ( $\lambda_{max}$ ) της πικροκροκίνης. Αντίστοιχα, η ένταση του αρώματος ( $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm), προσδιορίζεται από την απορρόφηση ( $D$ ) στα 330 nm, όπου εμφανίζει  $\lambda_{max}$  η σαφρανάλη. Τέλος, η χρωστική δύναμη ( $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm), προκύπτει βάσει της απορρόφησης ( $D$ ) στα 440 nm, δηλαδή στο  $\lambda_{max}$  των κροκινών.

## 2.2.2 Αξιολόγηση του προτύπου ISO

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των δειγμάτων saffron σύμφωνα με το πρότυπο ISO 3632 (2011) βασίστηκε αφενός στη διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ των τιμών  $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm,  $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm,  $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm και των αντίστοιχων τιμών απορρόφησης για κάθε δείγμα ( $n=58$ ). Τα δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά με χρήση του λογισμικού JMP 8.0 της SAS Institute Inc.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του προτύπου ISO 3632 (2011) αξιολογήθηκαν μέσω της σύγκρισής τους με τα αντίστοιχα που προέκυψαν με εφαρμογή μεθόδου στηριγμένης στην HPLC. Για το σκοπό αυτό, 28 από τα 58 δείγματα που αναλύθηκαν σύμφωνα με το πρότυπο ISO, αναλύθηκαν, επίσης, ακολουθώντας τη μέθοδο που προτείνεται από τους Carmona, Zalacain, Sánchez, Novella και Alonso (2006b), με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 20 mg κονιοποιημένου δείγματος εκχυλίστηκαν σε 8 mL νερού καθαρότητας HPLC, εντός λουτρού υπερήχων, για 10 min. Η συχνότητα της πηγής υπερήχων ήταν 35 kHz και η εκχύλιση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς το δείγμα να εκτίθεται στο φως. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθήθηκε με φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0,45  $\mu$ m και έγινε η εισαγωγή 20  $\mu$ L του εκχυλίσματος σε υγρό χρωματογράφο HPLC Agilent 1100, εξοπλισμένο με στήλη Supelco Discovery HS C18 (250 mm x 4,6 mm, *i.d.* 5  $\mu$ m), θερμοστατούμενη στους 30 °C. Οι διαλύτες έκλουσης ήταν νερό με προσθήκη 0,25% φορμικού οξέος (A) και ακετονιτρίλιο (B). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή έκλυση της στήλης ως εξής: 80% A για 5 min, μείωση του A έως το 20% έως τα 15 min και επαναφορά σε 80% A έως τα 20 min, με ροή 0,8 mL/min. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV – Vis DAD, με ανίχνευση στα 250, 257, 330 και 440 nm. Η επεξεργασία των χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών δεδομένων έγινε με το λογισμικό Chemstation της Agilent, ενώ η

στατιστική επεξεργασία τους έγινε με χρήση του λογισμικού JMP 8.0 της SAS Institute Inc.

Παράλληλα, το πρότυπο *ISO 3632* (2011) αξιολογήθηκε και ως προς την ικανότητα ποσοτικού προσδιορισμού των κροκινών που περιέχονταν στο saffron. Για το σκοπό αυτό, παρελήφθησαν και καθαρίστηκαν, κατά το δυνατό, κροκίνες από ελληνικό saffron, οι οποίες, στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών, τόσο για τη διαδικασία που περιγράφεται από το πρότυπο *ISO* (φασματοσκοπία UV - Vis), όσο και για τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε με βάση την *HPLC*. Για την απομόνωση και τον καθαρισμό των κροκινών ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρεται από τους Tarantilis και Polissiou (2004) με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 15 g saffron, αφού κονιοποιήθηκαν, εκχυλίστηκαν διαδοχικά σε λουτρό υπερήχων (συχνότητα πηγής 35 kHz, θερμοκρασία δωματίου) για 15 min με: (i) πετρελαϊκό αιθέρα b.p. 40-60 °C (8 εκχυλίσεις x 100 mL), (ii) διαιθυλαιθέρα (6 εκχυλίσεις x 100 mL) και (iii) μεθανόλη (6 εκχυλίσεις x 100 mL). Το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα περιείχε μη γλυκοζιτικά καροτενοειδή και λιπίδια, ενώ αυτό του διαιθυλαιθέρα λιπίδια, πικροκροκίνη και σαφρανάλη. Μετά τη συμπύκνωση υπό κενό και σε θερμοκρασία δωματίου του μεθανολικού εκχυλίσματος, παρελήφθη στερεό υπόλειμμα, σε μορφή σκόνης σκούρου κόκκινου χρώματος, που αποτελεί μείγμα των περιεχόμενων στο saffron κροκινών. Η καθαρότητα των κροκινών προσδιορίστηκε περίπου στο 71,5%, ποσοστό σύμφωνα με το οποίο έγιναν οι απαραίτητες διορθώσεις για τη σχεδίαση των πρότυπων καμπυλών. Για να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, αυτής του προτύπου *ISO* και αυτής της *HPLC*, η συγκέντρωση κροκινών εκφράστηκε ως mg κροκινών/g saffron.

## **2.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση**

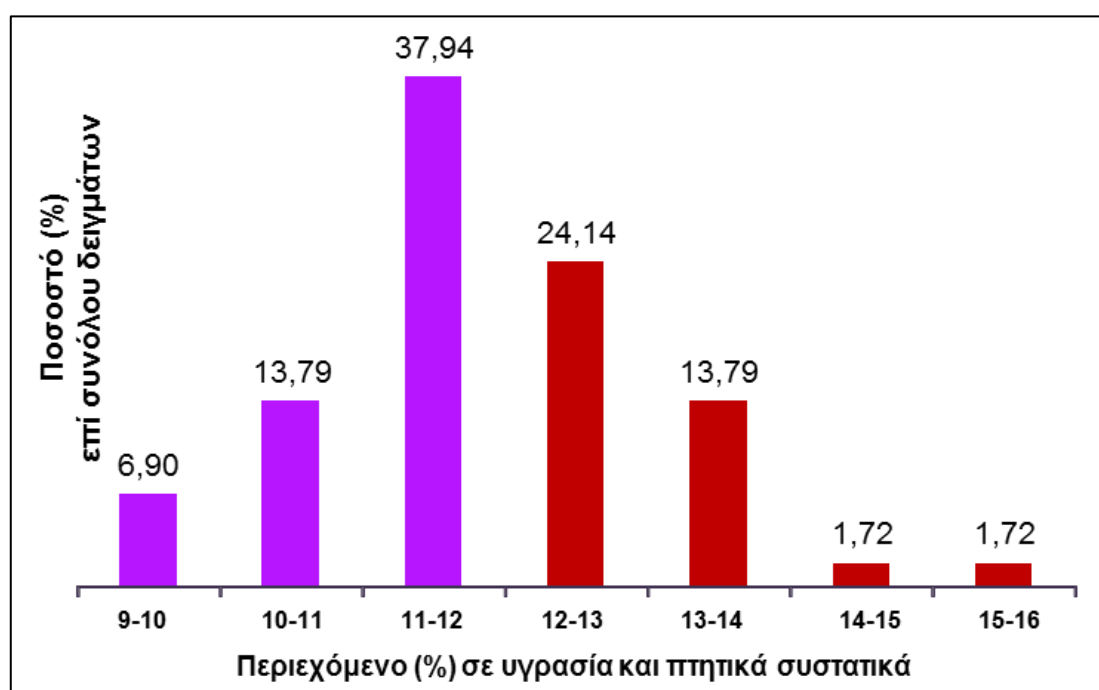
### **2.3.1 Ανάλυση ελληνικού saffron σύμφωνα με το πρότυπο ISO**

Το μέσο περιεχόμενο σε υγρασία και πτητικά συστατικά των ελληνικών δειγμάτων saffron που αναλύθηκαν βρέθηκε να είναι  $11,86\% \pm 1,19$ . Ωστόσο, όπως φαίνεται στο Γράφημα 3, ποσοστό 41,37% του συνολικού αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν παρουσιάζει τιμές περιεχομένου σε υγρασία και πτητικά συστατικά υψηλότερες από 12%, η οποία είναι η ανώτατη επιτρεπτή τιμή για saffron σε νήματα σύμφωνα με το πρότυπο *ISO 3632* (2011).

Το περιεχόμενο σε υγρασία είναι σημαντικό κριτήριο ποιότητας για όλα τα τρόφιμα, ενώ έχει ιδιαίτερες προεκτάσεις στην περίπτωση του saffron. Υψηλό περιεχόμενο σε υγρασία ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών, υποβαθμίζει τη χρωστική δύναμη και τη γεύση του λόγω του υδατοδιαλυτού χαρακτήρα των κροκινών και της πικροκροκίνης αντίστοιχα, ενώ ενδέχεται να επιδράσει αρνητικά στο σχηματισμό των συστατικών του αρώματος (Alonso, Varon, Gomez, Navarro & Salinas, 1990; Tsimidou & Biliaderis, 1997; Carmona Delgado et al., 2006). Το περιεχόμενο του saffron σε υγρασία και πτητικά συστατικά επηρεάζεται κυρίως από τη διαδικασία ξήρανσης, αλλά και από τις συνθήκες αποθήκευσης, αφού ως

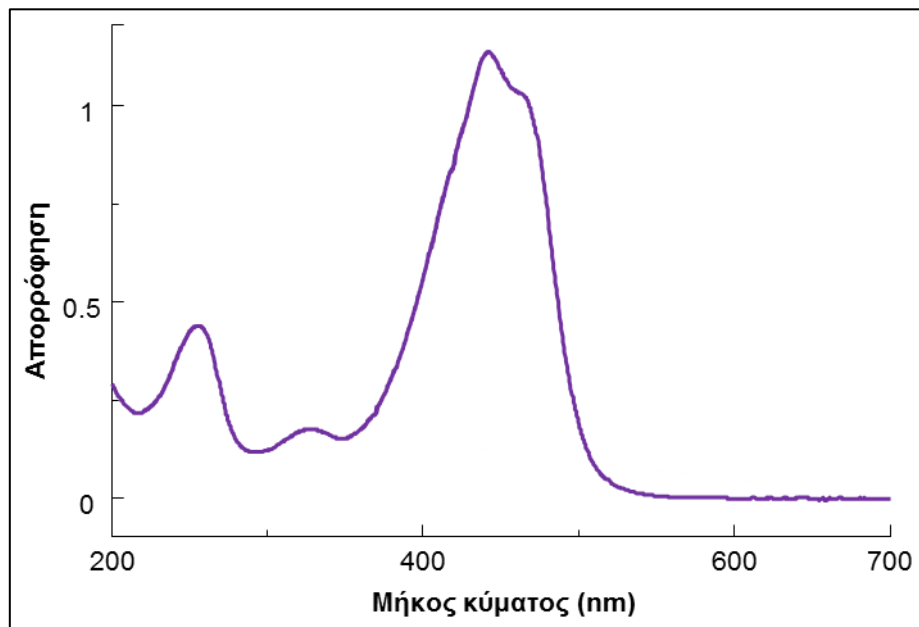
υγροσκοπικό υλικό, το saffron τείνει να απορροφά νερό έως ότου φθάσει σε ισορροπία με τη σχετική υγρασία του περιβάλλοντος (Kaminski & Kudra, 2000).

Λαμβάνοντας υπόψη την ιδιαίτερα υψηλή τιμή του saffron και το γεγονός ότι, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 3632 (2011), δείγματα με περιεχόμενο σε υγρασία και πτητικά συστατικά που υπερβαίνει το ανώτερο επιτρεπτό όριο δε γίνονται αποδεκτά εμπορικά ως saffron, το υψηλό ποσοστό δειγμάτων ελληνικού saffron που παρουσίασε τιμές ανώτερες του 12% (Γράφημα 3) υπογραμμίζει το οικονομικό αντίκτυπο που μπορεί να υπάρξει και καθίστα σημαντική τη στενότερη συνεργασία μεταξύ των παραγωγών και της επιστημονικής κοινότητας, προκειμένου να διερευνηθούν οι αιτίες και να βελτιστοποιηθεί η παραγωγική διαδικασία με σκοπό την εναρμόνιση του ελληνικού saffron με τα διεθνή πρότυπα.



**Γράφημα 3** Περιεχόμενο (%) σε υγρασία και πτητικά συστατικά των αναλυθέντων δειγμάτων saffron ως ποσοστά (%) επί του συνόλου ανά κλάση.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρεται στο ISO 3632 (2011) για τον προσδιορισμό των κυριότερων χαρακτηριστικών παρουσίασαν στο σύνολό τους το τυπικό φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος saffron (Γράφημα 4). Διακρίνονται τρία μέγιστα απορρόφησης: (α) στα 257 nm, (β) στα 330 nm και (γ) στα 440 nm, με το τελευταίο να αντιστοιχεί σε πλατιά περιοχή απορρόφησης με τη χαρακτηριστική των καροτενοειδών μορφή. Η εικόνα του φάσματος του υδατικού διαλύματος saffron αποτελεί χαρακτηριστικό του αυθεντικού προϊόντος, ενώ αλλοιώσεις της τυπικής του εικόνας σε διάφορες περιοχές απορρόφησης μπορούν να συνδεθούν με την παρουσία συνθετικών χρωστικών (Sánchez et al., 2011).



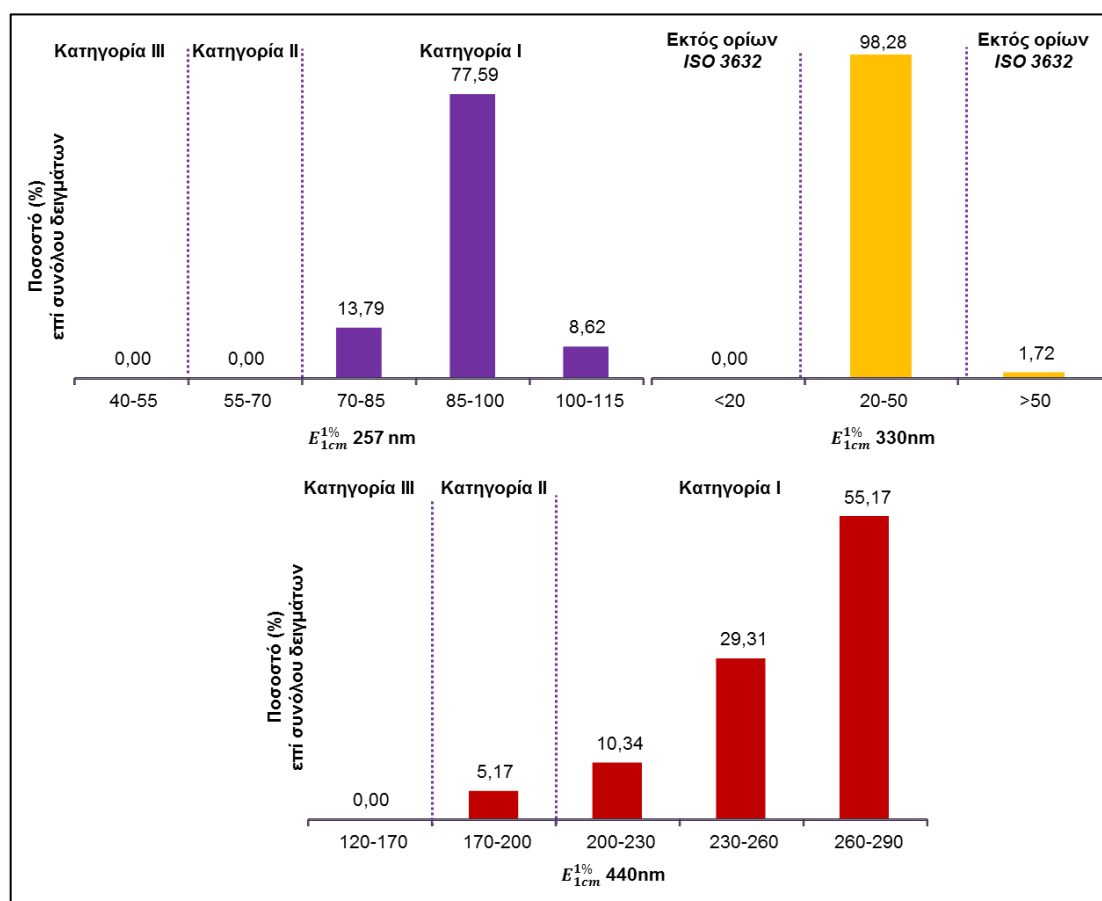
**Γράφημα 4** Αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis (220-700 nm) υδατικού εκχυλίσματος saffron.

Τα αποτελέσματα που αφορούν στον προσδιορισμό των κυριότερων χαρακτηριστικών του saffron μέσω των τιμών  $E_{1cm}^{1\%}$  δίνονται στο Γράφημα 5. Η ένταση της γεύσης, όπως αυτή προσδιορίστηκε από την τιμή  $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm, κατατάσσει το σύνολο των δειγμάτων στην ανώτερη ποιοτική κατηγορία (Κατηγορία I). Αντίστοιχα, για την ένταση του αρώματος ( $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm), η συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων βρίσκεται εντός των ορίων που τίθενται από το πρότυπο ISO 3632 (2011), με εξαίρεση ένα ποσοστό 1,72% των δειγμάτων για το οποίο η τιμή  $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm ήταν υψηλότερη της ανώτατης επιτρεπτής. Τέλος σε ότι αφορά στη χρωστική δύναμη, όπως αυτή προσδιορίζεται από την τιμή  $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm, μόνο ένα ποσοστό 5,17% των αναλυθέντων δειγμάτων κατατάσσεται στην ποιοτική Κατηγορία II, ενώ τα υπόλοιπα ανήκουν στην ανώτερη ποιοτική κατηγορία (Κατηγορία I).

Ωστόσο, η εικόνα που παρουσίασαν τα ελληνικά δείγματα εγείρει προβληματισμούς ως προς την ευρωστία του προτύπου ISO 3632 (2011) σχετικά με το εάν και κατά πόσο προσφέρει μια αντικειμενική εκτίμηση της ποιότητας ή εάν η εικόνα που παρουσιάζεται υποτιμά την αξία του ελληνικού προϊόντος. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερος αριθμός κλάσεων από τις προβλεπόμενες στο πρότυπο με σκοπό την περαιτέρω κατηγοριοποίηση των ελληνικών δειγμάτων εντός της ανώτερης ποιοτικής κατηγορίας, διατηρώντας το πλάτος των κλάσεων αυτών ίσο με εκείνο που προβλέπεται από το ISO 3632 (2011) για το διαχωρισμό μεταξύ των Κατηγοριών I και II. Με τον τρόπο αυτό, η Κατηγορία I διαιρέθηκε σε τρεις επιμέρους κλάσεις τόσο στην περίπτωση της έντασης της γεύσης, όσο και για τη χρωστική δύναμη (Γράφημα 5).

Το μηδενικό ποσοστό δειγμάτων κατατασσόμενων στην κατώτερη ποιοτική κατηγορία εγείρει αμφιβολίες για το αν θα έπρεπε να προβλέπεται από το πρότυπο

ISO 3632 (2011) ή αν θα έπρεπε να αναθεωρηθούν τα κατώτερα όρια των τιμών  $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm και  $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm που απαιτούνται για την κατάταξη στην κατηγορία αυτή, ούτως ώστε να περιγράφεται ακριβέστερα η ποιότητα των εμπορικών δειγμάτων saffron. Τέτοιες αναθεωρήσεις του προτύπου έχουν γίνει στο παρελθόν και κυρίως σε ότι αφορά στη χρωστική δύναμη. Έτσι, για παράδειγμα, τα ελάχιστα όρια των δύο κατώτερων κατηγοριών ήταν κατά 20 μονάδες χαμηλότερα, ενώ κατά 10 μονάδες χαμηλότερο ήταν αυτό της Κατηγορίας I στο προηγούμενο πρότυπο (ISO 3632-1, 2003).



**Γράφημα 5** Ένταση της γεύσης ( $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm), ένταση του αρώματος ( $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm) και χρωστική δύναμη ( $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm) των αναλυθέντων δειγμάτων saffron ως ποσοστά (%) επί του συνόλου ανά κλάση.

Η σκοπιμότητα περαιτέρω αναθεωρήσεων και αύξησης των απαιτήσεων του προτύπου υπογραμμίζεται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (Γράφημα 5), αλλά και από τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία. Ενδεικτικό αποτελεί το γεγονός ότι η εφαρμογή του προτύπου ISO 3632-1 (2003) σε δείγματα saffron από όλον τον κόσμο έδειξε ότι κανένα δείγμα ελληνικού saffron δε βρέθηκε να ανήκει στην Κατηγορία III, ενώ στην Κατηγορία II κατατάχθηκε μόλις το 8,2% του συνόλου των δειγμάτων (Maggi et al., 2009). Αντίστοιχη εικόνα παρουσίασαν και δείγματα άλλων



χωρών, με μηδενικά ποσοστά στην Κατηγορία III για δείγματα saffron από την Ινδία, την Ιταλία και το Μαρόκο, ενώ μόλις το 11,0% των ισπανικών και το 5,1% των ιρανικών δειγμάτων ανήκε στην κατώτερη ποιοτική κατηγορία. Αν και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αντίστοιχα της παρούσας εργασίας δε μπορεί να είναι άμεση, λόγω της εφαρμογής από τους Maggi et al. (2009) της προηγούμενης έκδοσης του προτύπου (ISO 3632-1, 2003), ωστόσο μπορεί να εξαχθεί ως κοινό συμπέρασμα ότι είναι αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση του κατά πόσο στην κατώτατη ποιοτική κατηγορία που προβλέπεται από το ISO 3632 (2011) κατατάσσεται τέτοιος αριθμός δειγμάτων που να επιβάλλει ή να επιτρέπει την ενσωμάτωση της στο πρότυπο.

Ένα άλλο στοιχείο που θεωρείται ότι χρήζει να σημειωθεί και να μελετηθεί περαιτέρω είναι το γεγονός ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων που αναλύθηκαν κατατάσσεται στην ανώτερη ποιοτική κατηγορία με τιμές έντασης γεύσης και χρωστικής δύναμης σημαντικά υψηλότερες (κατά 15-30 και 60-90 μονάδες, αντίστοιχα) από το ελάχιστο όριο που απαιτείται για το saffron της Κατηγορίας I (Γράφημα 5). Το γεγονός αυτό είναι προφανές ότι, δεδομένης της υψηλής τιμής του saffron, μπορεί να έχει σημαντικό θετικό αντίκτυπο για τους Έλληνες παραγωγούς, εφόσον αναδειχτεί επαρκώς. Παράλληλα, θεωρείται σκόπιμο να αποτελέσει ζητούμενο των εμπλεκομένων στην παραγωγή και τυποποίηση του ελληνικού saffron η περαιτέρω ποιοτική –και επομένως, εμπορική- διάκριση των δειγμάτων που κατατάσσονται στην ανώτερη κατηγορία.

### 2.3.2 Αξιολόγηση του προτύπου ISO

Η διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ των τιμών  $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm,  $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm,  $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm, όπως υπολογίστηκαν βάσει του ISO 3632 (2011), και των αντίστοιχων τιμών απορρόφησης έγινε με τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Pearson ( $\alpha=0.05$ ).

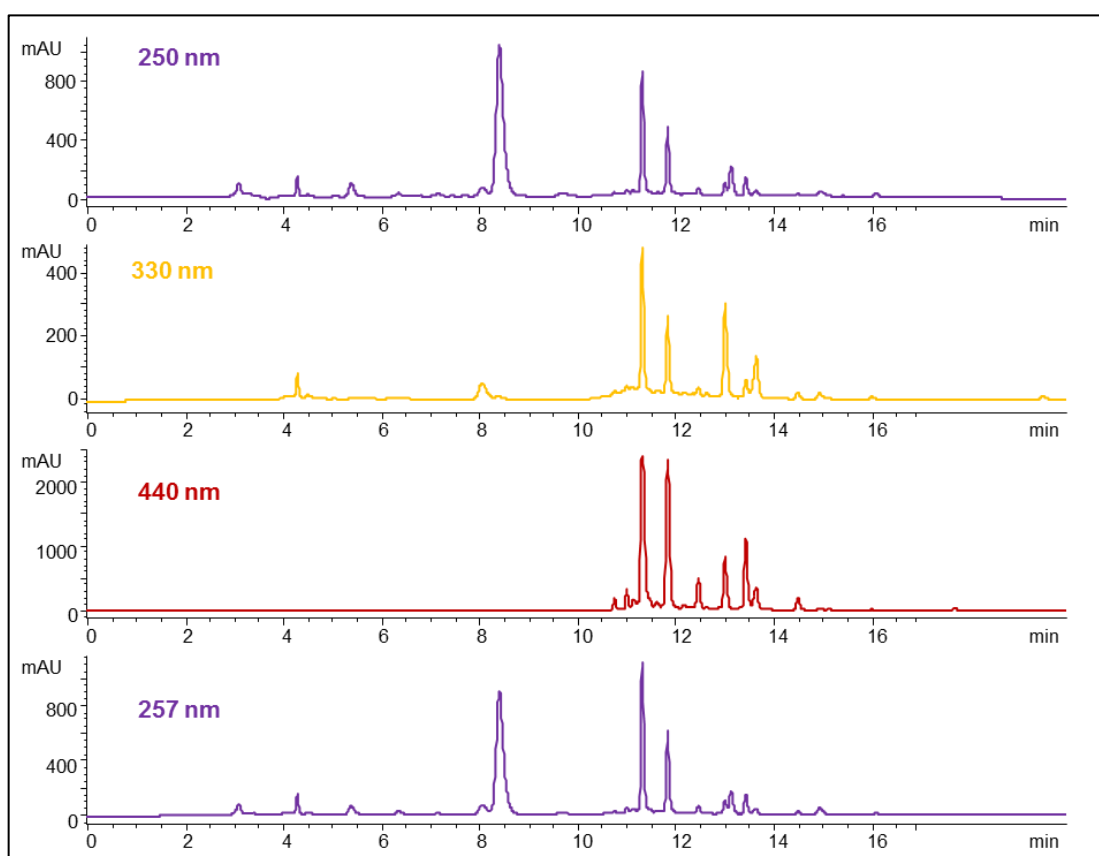
**Πίνακας 5** Τιμές του συντελεστή συσχέτισης Pearson μεταξύ των τιμών των απορροφήσεων ( $D$ ) και των τιμών  $E_{1cm}^{1\%}$  ( $E$ ) για τα μήκη κύματος 257, 330 και 440 nm. Στην παρένθεση δίνεται το διάστημα εμπιστοσύνης 95%. *ns*: συσχέτιση μη στατιστικά σημαντική.

	$D_{440}$	$D_{330}$		$E_{440}$	$E_{330}$
$D_{257}$	0,847 (0,754, 0,907)	<i>ns</i>	$E_{257}$	0,846 (0,752, 0,906)	<i>ns</i>
$D_{330}$	<i>ns</i>		$E_{330}$	<i>ns</i>	

Σύμφωνα με την τιμή του συντελεστή αυτού, υπάρχει ιδιαίτερα ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ τόσο των απορροφήσεων, όσο και των τιμών  $E_{1cm}^{1\%}$  για τα μήκη κύματος των 257 και 440 nm (Πίνακας 5). Η συσχέτιση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην απορρόφηση των κροκινών και στα δύο αυτά μήκη κύματος (Tarantilis et al.,

1994b) και αναδεικνύει, ως εκ τούτου, την αδυναμία εύρωστου προσδιορισμού της πικροκροκίνης ( $\lambda_{\max}=257$  nm) σε υδατικά διαλύματα saffron με τη μεθοδολογία του προτύπου *ISO 3632* (2011). Αντίθετα, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της απορρόφησης και της τιμής για τα 330 nm με τις αντίστοιχες για τα υπόλοιπα μήκη κύματος. Το γεγονός ότι δεν αναδεικνύεται η επίδραση της απορρόφησης των *cis*-κροκινών στην περιοχή των 330 nm (Tarantilis et al., 1994b) να επηρεάζει την απορρόφηση και την τιμή  $E_{1cm}^{1\%}$  σε αυτό το μήκος κύματος ενδέχεται να σχετίζεται με πιθανό χαμηλό ποσοστό των *cis*-κροκινών επί του συνόλου των κροκινών στα δείγματα ελληνικού saffron που αναλύθηκαν.

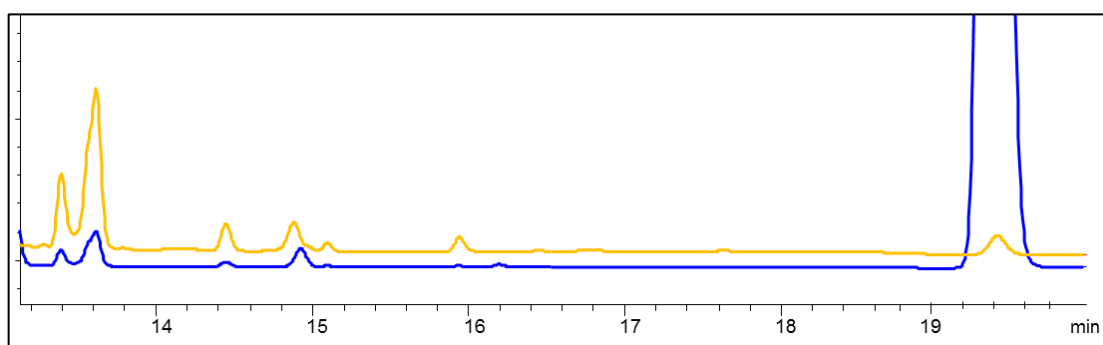
Το σύνολο των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron που αναλύθηκαν παρουσίασαν όμοιο χρωματογραφικό προφίλ σε όλα τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση (Γράφημα 6), ενώ οι όποιες διαφορές παρατηρήθηκαν ήταν ποσοτικές.



**Γράφημα 6** Χρωματογραφικό προφίλ του υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.

Τα συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα Π1 του Παραρτήματος, όπου δίνονται και τα φάσματα UV-Vis κάθε συστατικού. Η απόδοση των κορυφών έγινε βάσει των φασμάτων UV-Vis και μέσω σύγκρισης με βιβλιογραφικά δεδομένα (Tarantilis, Tsoupras & Polissiou, 1995; Carmona et al., 2006b; Carmona Delgado et al., 2006). Ειδικά για την περίπτωση της

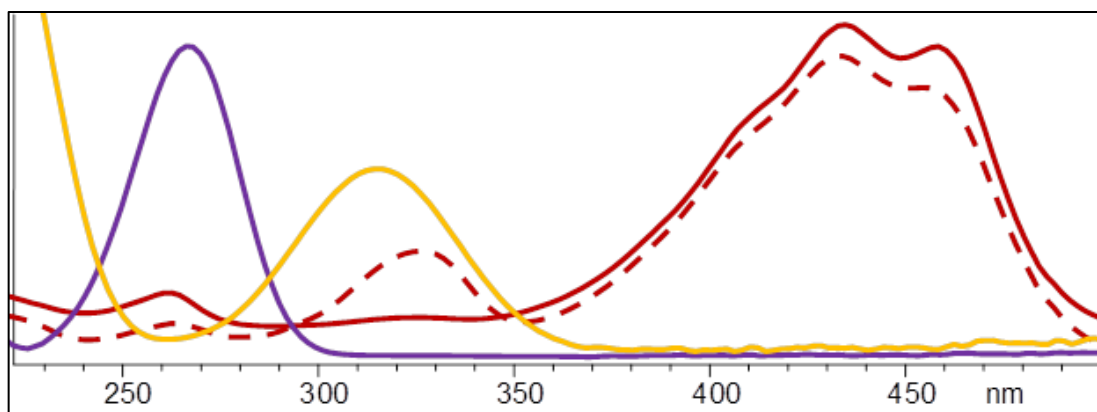
σαφρανάλης, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό, η κορυφή της εμφάνισε μικρή απορρόφηση και μη ευδιάκριτο φάσμα UV-Vis. Για το λόγο αυτό, η ταυτοποίησή της έγινε μετά την προσθήκη πρότυπης σαφρανάλης σε υδατικό εκχύλισμα saffron (Γράφημα 7), ενώ και το φάσμα της σαφρανάλης που δίνεται στον Πίνακα Π1 του Παραρτήματος προέρχεται από το δείγμα αυτό μετά την προσθήκη του εσωτερικού προτύπου. Η ονοματολογία των κροκινών ακολουθεί την πρόταση των Carmona et al. (2006b), σύμφωνα με την οποία, το πρώτο τμήμα του ονόματος περιγράφει την ισομερική μορφή του άγλυκου τμήματος, ακολουθεί ο συνολικός αριθμός των τμημάτων σακχάρων του μορίου και τέλος δίνεται ο τύπος του σακχάρου σε κάθε άκρο της κροκίνης: (t) τριγλυκοζίτης, (n) νεαπολιτανοζίτης, (G) γεντοβιοζίτης ή (g) γλυκοζίτης.



**Γράφημα 7** Λεπτομέρεια των χρωματογραφημάτων στα 330 nm υδατικού εκχυλίσματος saffron (κίτρινο) και το ίδιου δείγματος μετά την προσθήκη εσωτερικού προτύπου (μπλε) σαφρανάλης ( $t_R= 19,6$  min).

Το γεγονός ότι οι *cis*-κροκίνες εμφανίζουν χαμηλή συγκέντρωση στα ελληνικά δείγματα saffron (Πίνακας Π1, Γράφημα 6) ως ποσοστό τόσο επί του συνολικού αριθμού, όσο και επί της συνολικής απορρόφησης των κροκινών, πιθανά εξηγεί την έλλειψη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης των τιμών που αφορούν τις κροκίνες ( $D_{440}$ ,  $E_{440}$ ) με τις αντίστοιχες που αναφέρονται στην περιοχή των 330 nm (Πίνακας 5).

Η εικόνα των φασμάτων UV-Vis των *cis*- και *trans*-κροκινών, της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης (Γράφημα 8) επιβεβαιώνει τα συμπεράσματα προηγούμενων ερευνητών που αναφέρουν ότι το σύνολο των κροκινών απορροφά στα 257 nm, όπου εμφανίζεται και το μέγιστο της απορρόφησης της πικροκροκίνης, ενώ για τις *cis*-κροκίνες καταγράφεται σχετικά έντονη απορρόφηση στα 330 nm, περιοχή της μέγιστης απορρόφησης της σαφρανάλης (Tarantilis et al., 1994b). Η εικόνα αυτή θέτει υπό αμφισβήτηση της χρήση μιας μη εκλεκτικής μεθόδου, όπως αυτής της φασματοσκοπίας UV-Vis για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συστατικών αυτών σε υδατικά διαλύματα saffron.



**Γράφημα 8** Λεπτομέρεια φασμάτων UV-Vis της πικροκροκίνης (μωβ), της σαφρανάλης (κίτρινο), μιας *cis* (κόκκινο διακεκομμένο) και μιας *trans* (κόκκινο) κροκίνης.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού των κυριότερων συστατικών του saffron βάσει του προτύπου *ISO 3632* (2011) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την ανάλυση με HPLC έγινε, αρχικά, μέσω της διερεύνησης των μεταξύ τους συσχετίσεων μέσω των συντελεστών Pearson ( $\alpha=0.05$ ) (Πίνακας 6). Το εμβαδόν των απορροφήσεων ( $A$ ) κάθε συστατικού βρέθηκε να έχει θετική συσχέτιση με την αντίστοιχη τιμή  $E_{1cm}^{1\%}$ , όπως αυτή προέκυψε από την εφαρμογή του προτύπου. Ωστόσο, με εξαίρεση την περίπτωση της πικροκροκίνης για την οποία ο συντελεστής εμφάνισε υψηλή τιμή (83,3%), η ένταση των συσχετίσεων ήταν χαμηλή τόσο για τη σαφρανάλη (50,2%), όσο και για τις κροκίνες (57,3%). Αναφορικά στη σαφρανάλη, η ένταση αυτής της συσχέτισης μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι, λόγω του μη εκλεκτικού χαρακτήρα της φασματοσκοπίας UV-Vis, η τιμή  $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm στην πραγματικότητα δεν αντιστοιχεί αποκλειστικά στη σαφρανάλη, αλλά και σε άλλες ουσίες, όπως οι *cis*-κροκίνες (Γράφημα 8), αλλά και στα φλαβονοειδή του saffron (Carmona, Sánchez, Ferreres, Zalacain, Tomás-Barberán & Alonso, 2007). Σε ότι αφορά στις κροκίνες, η θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε έρχεται σε συμφωνία με την εκτίμηση των Sánchez et al. (2011) ότι η μεθοδολογία που περιλαμβάνεται στο πρότυπο *ISO 3632* (2011) οδηγεί σε εκτίμηση της χρωστικής δύναμης των υδατικών διαλυμάτων saffron η οποία είναι αντιπροσωπευτική της συγκέντρωσης κροκινών. Ωστόσο, η χαμηλή ένταση της συσχέτισης αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω με σκοπό να εξακριβωθεί κατά πόσο η τιμή  $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm που προκύπτει από το πρότυπο αποτυπώνει με ακρίβεια τη συγκέντρωση των κροκινών σε ένα υδατικό εκχύλισμα saffron.

Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της απορρόφησης ( $A$ ) της πικροκροκίνης και της απορρόφησης της σαφρανάλης ή της τιμής  $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm (Πίνακας 6) μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η πρώτη αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση της δεύτερης (Iborra et al., 1992; Carmona Delgado et al., 2006; Sánchez et al., 2011). Παράλληλα, η πικροκροκίνη και η κροκετίνη, το άγλυκο δηλαδή τμήμα των κροκινών, προκύπτουν ως προϊόντα της οξειδωτικής διάσπασης της ζεαξανθίνης (Carmona Delgado et al., 2006). Το κοινό αυτό βιοσυνθετικό μονοπάτι ενδέχεται να ευθύνεται για τις θετικές συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών που αφορούν στις

κροκίνες ( $A_{\text{κροκινών}}$ ,  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  440 nm) και αυτών που σχετίζονται με την πικροκροκίνη ( $A_{\text{πικροκροκίνης}}$ ,  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  257 nm) (Πίνακας 6).

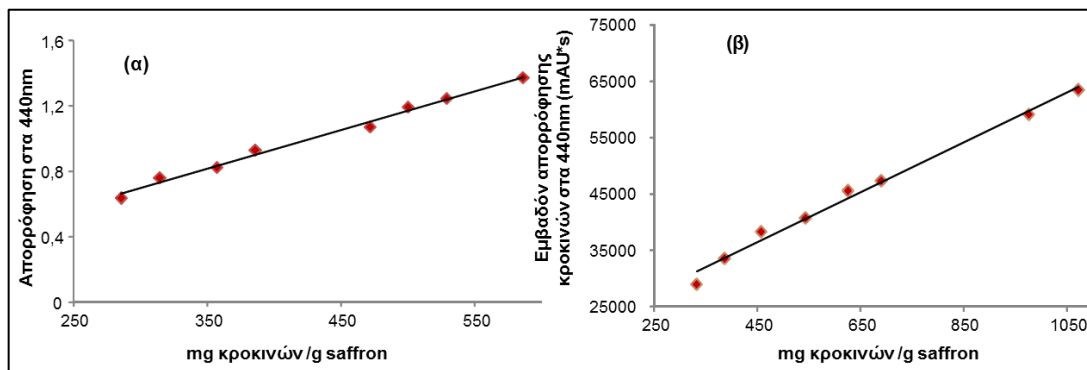
**Πίνακας 6** Τιμές του συντελεστή συσχέτισης Pearson μεταξύ του εμβαδού των απορροφήσεων (A) των κροκινών, της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης σύμφωνα με την μέθοδο της HPLC και των αντίστοιχων τιμών  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  (E) που προέκυψαν από την εφαρμογή του ISO 3632 (2011).

Στην παρένθεση δίνεται το διάστημα εμπιστοσύνης 95%. *ns*: συσχέτιση μη στατιστικά σημαντική.

<b><math>A_{\text{κροκινών}}</math> (440 nm)</b>			
<b><math>A_{\text{πικροκροκίνης}}</math> (257 nm)</b>	0,576 (0,259, 0,781)		
<b><math>A_{\text{σαφρανάλης}}</math> (330 nm)</b>	-0,414 (-0,682, -0,048)	-0,526 (-0,752, -0,191)	
<b><math>E_{1\text{cm}}^{1\%}</math> 440 nm</b>	0,573 (0,254, 0,780)	0,668 (0,393, 0,833)	-0,511 (-0,743, -0,171)
<b><math>E_{1\text{cm}}^{1\%}</math> 257 nm</b>	0,521 (0,183, 0,748)	0,833 (0,667, 0,920)	<i>ns</i>
<b><math>E_{1\text{cm}}^{1\%}</math> 330 nm</b>	<i>ns</i>	-0,601 (-0,800, -0,293)	0,502 (0,159, 0,737)
	<b><math>A_{\text{κροκινών}}</math> (440 nm)</b>	<b><math>A_{\text{πικροκροκίνης}}</math> (257 nm)</b>	<b><math>A_{\text{σαφρανάλης}}</math> (330 nm)</b>

Η απορρόφηση των κροκινών στα 440 nm, όπως προσδιορίστηκε μέσω της HPLC, δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την τιμή  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  330 nm (Πίνακας 6), γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στα χαμηλά ποσοστά *cis*-κροκινών στο ελληνικό saffron (Πίνακας Π1, Γράφημα 6). Ωστόσο, κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί περαιτέρω το περιεχόμενο του ελληνικού saffron σε φλαβονοειδή, καθώς και ο βαθμός επίδρασης που αυτά μπορεί να έχουν, λόγω της απορρόφησής τους στην ίδια φασματική περιοχή, στην τιμή  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  330 nm.

Τέλος, αρνητική συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ της απορρόφησης της σαφρανάλης (330 nm) και της απορρόφησης των κροκινών (440 nm) ή της τιμής  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  440 nm. Το γεγονός ότι η σαφρανάλη και οι κροκίνες δε συνδέονται με σχέση πρόδρομου και προϊόντος μορίου δεν υποστηρίζει την ερμηνεία της αρνητικής συσχέτισης που εμφανίστηκε μέσω κάποιας βιοσυνθετικής οδού. Παρόλο που η αιτιολόγηση της συσχέτισης αυτής υπερβαίνει το σκοπό και τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας, μια πιθανή αιτία ενδέχεται να είναι η συμπεριφορά των ουσιών αυτών κατά την εκχύλισή τους. Συγκεκριμένα, η αρνητική συσχέτιση που παρατηρήθηκε πιθανά συνδέεται με το γεγονός ότι η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης κροκινών, ως μορίων σε αφθονία στο saffron και με υψηλή διαλυτότητα στο νερό, στο υδατικό εκχύλισμα ενδέχεται να επιδρά αρνητικά στη διαλυτότητα της σαφρανάλης στο δεδομένο υδατικό εκχύλισμα λόγω των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Ωστόσο, κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση αυτή προκειμένου να εξεταστούν οι αιτίες, αλλά και οι πιθανές επιδράσεις της στην ανάλυση του saffron και τον προσδιορισμό των κύριων συστατικών του.



**Γράφημα 9** Πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού της συγκέντρωσης κροκινών (mg κροκινών/g saffron) μέσω (α) της φασματοσκοπίας UV-Vis (ISO 3632, 2011) και (β) της HPLC.

Η ικανότητα της μεθοδολογίας που προβλέπεται από το πρότυπο ISO 3632 (2011) να προσφέρει εύρωστη ποσοτική εκτίμηση των κροκινών του saffron αξιολογήθηκε μέσω της ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της και της σύγκρισής τους με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων με τη βασιζόμενη στην HPLC μέθοδο. Οι καμπύλες αναφοράς που προέκυψαν από την ανάλυση υδατικών διαλυμάτων κροκινών (Γράφημα 9) ήταν:

$$(\alpha) y = 0,0024 (9,12e-5) x - 0,0147 (0,0401)$$

για την περίπτωση της μεθόδου που περιλαμβάνεται στο ISO 3632 (2011) και βασίζεται στη φασματοσκοπία UV-Vis, όπου y η απορρόφηση στα 440 nm και x η συγκέντρωση κροκινών σε mg/g saffron και

$$(\beta) y = 44,263 (1,813) x + 16442 (1238,9)$$

για τη μέθοδο βάσει της HPLC, όπου y το εμβαδόν της απορρόφησης των κροκινών (440 nm) και x η συγκέντρωση κροκινών σε mg/g saffron. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα των όρων που προηγούνται. Οι συντελεστές γραμμικότητας ( $R^2$ ) είναι (α) 99,1% και (β) 99,0% για τη φασματοσκοπία UV-Vis και την HPLC, αντίστοιχα.

Η μέση συγκέντρωση κροκινών όπως υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου UV-Vis ήταν  $468,0 \pm 41,4$  mg κροκινών/g saffron, ενώ η αντίστοιχη που προέκυψε από την ανάλυση με HPLC ήταν  $598,0 \pm 146,8$  κροκινών/g saffron. Η σύγκριση των τιμών αυτών με βιβλιογραφικές αναφορές είναι επισφαλής, λόγω της διαφοράς στο είδος ή την καθαρότητα των κροκινών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Το εύρος των τιμών συγκέντρωσης των κροκινών ανά γραμμάριο saffron που αναφέρεται στη βιβλιογραφία ποικίλλει από 0,5 ως 32,4% (5-324 mg κροκινών/g saffron) (Sánchez et al., 2011). Τόσο η διαφοροποίηση μεταξύ των βιβλιογραφικών τιμών, όσο και μεταξύ αυτών και των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας μπορεί ωστόσο να αποδοθεί στην ποικιλομορφία του αρχικού υλικού, καθώς η συγκέντρωση των κροκινών επηρεάζεται από τη γεωγραφική προέλευση, τον τρόπο παραγωγής και ξήρανσης και την ποιότητα του saffron, ενώ τα αποτελέσματα είναι δύσκολα συγκρίσιμα μεταξύ τους τόσο λόγω των διαφορετικών τρόπων προετοιμασίας και ανάλυσης των δειγμάτων, όσο και εξαιτίας της έλλειψης εμπορικών προτύπων ουσιών ικανοποιητικής καθαρότητας για το

σύνολο των κροκινών (Carmona Delgado et al., 2006; Sánchez et al., 2011). Βάσει αυτών, θεωρείται σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη για την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής μεθοδολογίας απομόνωσης των κροκινών του saffron, η οποία θα επιτρέψει τον ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό τους στο αρχικό φυτικό υλικό, ως ομάδας συστατικών αλλά και μεμονωμένα.

Σε ότι αφορά στη σύγκριση των ποσοτικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, η συσχέτιση μεταξύ των τιμών συγκέντρωσης κροκινών όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο που προτείνεται από το πρότυπο *ISO 3632* (2011) και των αντίστοιχων της HPLC βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ( $\alpha=0.05$ ) με την τιμή του αντίστοιχου συντελεστή συσχέτισης Pearson να ισούται με 0,61 [δ.ε.<sub>.95%</sub>=(0,301, 0,801)]. Ωστόσο, η τιμή αυτή του συντελεστή αναδεικνύει τη σχετικά χαμηλή ένταση συσχέτισης των δύο χαρακτηριστικών.

Εν κατακλείδι, η μη αντιπροσωπευτική κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ελληνικού saffron σε ποιοτικές κατηγορίες, η ύπαρξη περιοχών κοινής απορρόφησης των συστατικών του saffron σε συνδυασμό με την απουσία εκλεκτικότητας της φασματοσκοπίας UV-Vis και η ασθενής συσχέτιση μεταξύ χαρακτηριστικών που αναφέρονται στη συγκέντρωση του ίδιου συστατικού εγείρουν αμφιβολίες για την καταλληλότητα του *ISO 3632* (2011) και υπογραμμίζουν τη σημασία ανάπτυξης συμπληρωματικών ή εναλλακτικών μεθόδων που να ξεπερνούν τις αδυναμίες αυτών που περιέχονται στο πρότυπο.

### 3. Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικοποίησης των κροκινών βασισμένης στη φασματοσκοπία Raman

#### 3.1 Θεωρητικό μέρος

Το χρώμα του saffron αποτελεί ίσως το σημαντικότερο κριτήριο της ποιότητάς του, ενώ η χρωστική δύναμη των υδατικών εκχυλισμάτων του είναι καθοριστική για την κατάταξή του στις επιμέρους κατηγορίες ποιότητας, όπως αυτές καθορίζονται από το πρότυπο *ISO 3632 (2011)*. Τα χαρακτηριστικά αυτά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν την έκφραση της συγκέντρωσης κροκινών σε ένα δείγμα saffron, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων που να μπορούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια τη συγκέντρωση αυτή.

Η μεθοδολογία που περιλαμβάνεται στο πρότυπο *ISO 3632 (2011)* χρησιμοποιεί τη χρωστική δύναμη ως μέτρο της συγκέντρωσης των κροκινών στα υδατικά διαλύματα του saffron, προσφέροντας έτσι μια έμμεση εκτίμηση και όχι μια απόλυτη τιμή του περιεχομένου σε κροκίνες. Η χρωστική δύναμη, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, εμφανίζει θετική συσχέτιση με την απορρόφηση των κροκινών, όπως προσδιορίστηκαν με χρήση της HPLC. Ωστόσο, η χαμηλή ένταση της συσχέτισης αυτής αναδεικνύει την αναγκαιότητα ανάπτυξης ευέλικτων μεθοδολογιών οι οποίες να συνδυάζουν, κατά το δυνατό, τα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας του *ISO 3632 (2011)*, επιτρέποντας ταυτόχρονα τον ποσοτικό προσδιορισμό των κροκινών με υψηλότερη ακρίβεια.

Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί μία από τις μεθόδους που έχουν προταθεί για τον προσδιορισμό των κροκινών σε δείγματα saffron (Anastasaki et al., 2010b). Στην εργασία αυτή, παρουσιάζεται μια μεθοδολογία η οποία μπορεί να ποσοτικοποιήσει τις κροκίνες που περιέχονται σε ξηρά στίγματα saffron με ικανοποιητική ακρίβεια μέσω της καταγραφής των φασμάτων Raman απευθείας από τα στίγματα και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με χημειομετρικές μεθόδους. Με τον τρόπο αυτό, η μεθοδολογία που προτείνεται από τους Anastasaki et al. (2010b) συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της ακριβούς και ταχείας ανάλυσης, χωρίς να απαιτείται προκατεργασία του δείγματος. Ωστόσο, κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της ικανότητας της φασματοσκοπίας Raman να εφαρμοστεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κροκινών σε υδατικά εκχυλίσματα saffron, σε ένα περιβάλλον, δηλαδή, που προσομοιάζει με αυτό των τροφίμων, λαμβάνοντας υπόψη την κύρια χρήση του ως πρόσθετου.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός του παρόντος τμήματος ήταν η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας βασισμένης στη φασματοσκοπία Raman η οποία να επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των κροκινών που περιέχονται σε υδατικά εκχυλίσματα saffron. Η αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας έγινε μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων της με αντίστοιχα που προέκυψαν από αναλύσεις με χρήση της HPLC.



### 3.2 Πειραματικό μέρος

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κροκινών σε υδατικά εκχυλίσματα saffron, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 53 δείγματα, συγκεκριμένα 28 δείγματα ελληνικού saffron εσοδείας 2012, ένα δείγμα ισπανικού saffron της ίδιας χρονιάς και 24 δείγματα saffron τα οποία προέρχονταν από φυτά *Crocus sativus* με καταγωγή από την Ελλάδα που μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν για ένα χρόνο στις εγκαταστάσεις της παγκόσμιας Τράπεζας Γενετικού Υλικού του γένους *Crocus* (CrocusBank - Centro Agrario de Albaladejito, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Cuenca, Ισπανία).

Για την παρασκευή των υδατικών εκχυλισμάτων, 20 mg κονιοποιημένου saffron εκχυλίστηκαν σε 8 mL H<sub>2</sub>O καθαρότητας HPLC, εντός λουτρού υπερήχων, για 10 min. Η συχνότητα της πηγής υπερήχων ήταν 35 kHz, η εκχύλιση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς το δείγμα να εκτίθεται στο φως, ενώ, τέλος, το διάλυμα διηθήθηκε με φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

Η καταγραφή των φασμάτων έγινε σε φασματοόμετρο Raman DeltaNu Advantage 785 (εγγύς υπέρυθρο). Η διέγερση της πηγής Laser ήταν 785 nm και η έντασή της 120 mW (μέγιστη ένταση στο δείγμα 80 mW). Η ανάλυση του οργάνου ήταν 5 cm<sup>-1</sup>. Για την καταγραφή του φάσματος Raman, 0,7 mL του υδατικού εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε γυάλινο, διαφανή σωλήνα 1mL, ο οποίος εισήχθη στην υποδοχή δείγματος του οργάνου έτσι ώστε η ακτίνα Laser να διέρχεται από το μέσο του σωλήνα. Το τελικό φάσμα Raman κάθε δείγματος αντιστοιχεί στο μέσο 10 φασμάτων με χρόνο ολοκλήρωσης (integration time) 10 sec/φάσμα στη φασματική περιοχή 2000-200 cm<sup>-1</sup>. Η καταγραφή των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού NuSpec του οργάνου, με ταυτόχρονη διόρθωση της βασικής γραμμής. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού OMNIC 7.3 της Thermo Fisher Scientific Inc., αφορούσε στη φασματική περιοχή 2000-400 cm<sup>-1</sup> και περιλάμβανε την εφαρμογή, στο σύνολο των φασμάτων, των αυτοματοποιημένων διεργασιών της εξομάλυνσης (automatic smooth) και της διόρθωσης της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) των φασμάτων που προσφέρει το συγκεκριμένο λογισμικό.

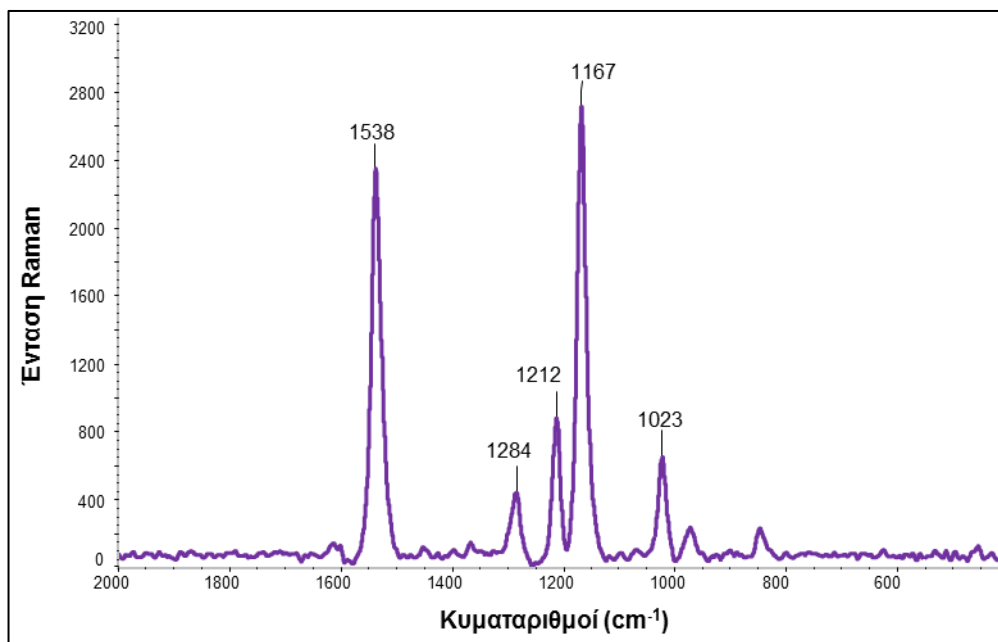
Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Raman έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης για την οποία χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα κροκινών, οι οποίες παρελήφθησαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.2. Για την αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθόδου, τα υδατικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή των φασμάτων Raman αναλύθηκαν, επίσης, με χρήση της HPLC, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.2. Με τον ίδιο τρόπο αναλύθηκαν και τα υδατικά εκχυλίσματα κροκινών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης για την προτεινόμενη μέθοδο Raman, με σκοπό τη χάραξη αντίστοιχης καμπύλης για τη μέθοδο της HPLC.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά με χρήση του λογισμικού JMP 8.0 της SAS Institute Inc.

### 3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Τα υδατικά εκχυλίσματα saffron που αναλύθηκαν παρουσίασαν φάσματα Raman όπως αυτό του Γραφήματος 10. Η κορυφή στα 1538 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται στις δονήσεις

τάσης του διπλού δεσμού C=C ( $\nu_{C=C}$ ), ενώ αυτή στα  $1167\text{ cm}^{-1}$  στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-C ( $\nu_{C-C}$ ). Η κορυφή στα  $1212\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται κυρίως στις δονήσεις τάσης ( $\nu_{C-C}$ ) και τις δονήσεις κάμψης ( $\delta_{C-H}$ ) του απλού δεσμού. Οι εντός του επιπέδου δονήσεις αιώρησης των ομάδων  $\text{CH}_3$  οι οποίες συνδέονται με άνθρακες της πολυενικής αλυσίδας σε απλό δεσμό (C-C) προκαλούν την εμφάνιση κορυφής Raman στα  $1023\text{ cm}^{-1}$  ( $\rho_{C-C}$ ), ενώ η κορυφή στα  $1284\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις εντός του επιπέδου δονήσεις παραμόρφωσης του δεσμού C-H (Tarantilis, Beljebbar, Manfait & Polissiou, 1998).



Γράφημα 10 Φάσμα Raman υδατικού εκχυλίσματος saffron.

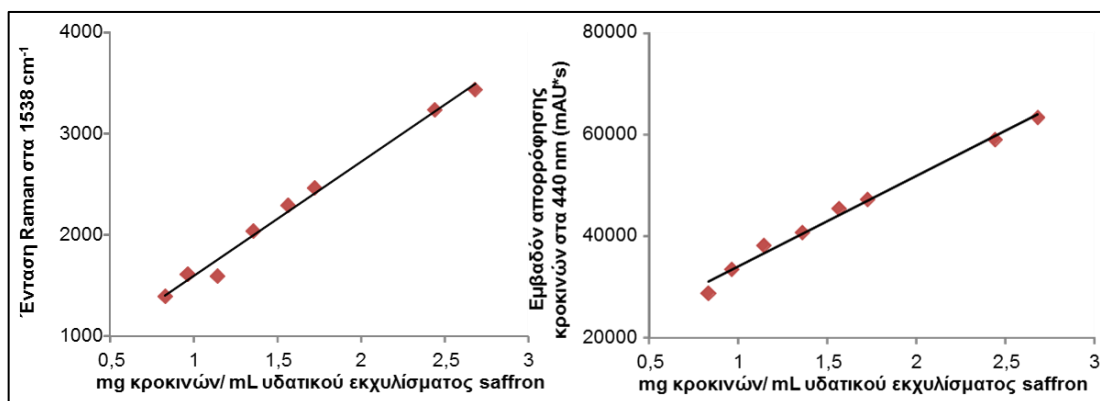
Οι κορυφές αυτές είναι χαρακτηριστικές των καροτενοειδών του saffron, γεγονός που δικαιολογεί ότι τα φάσματα Raman των εκχυλισμάτων saffron της Ισπανίας, αλλά και αυτά που προέρχονταν από την Ελλάδα και καλλιεργήθηκαν στην Ισπανία δεν παρουσίασαν ποιοτικές διαφορές σε σύγκριση με αυτά του ελληνικού saffron. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν τα συμπεράσματα των Anastasaki et al. (2010b), οι οποίοι αναφέρουν ότι τα φάσματα Raman στιγμάτων saffron από την Ελλάδα, το Ιράν, την Ιταλία και την Ισπανία παρουσίασαν διαφορές μόνο στην ένταση Raman των κορυφών και όχι στο προφίλ.

Παράλληλα, το γεγονός ότι το νερό προκαλεί ιδιαίτερα ασθενή σκέδαση Raman (McCreery, 2000), ερμηνεύει το γεγονός ότι τα φάσματα των υδατικών εκχυλισμάτων saffron που καταγράφηκαν είναι όμοια με αυτά που προέκυψαν από ξηρά στίγματα saffron (Tarantilis et. al, 1998; Schulz, Baranska & Baranski, 2005).

Δεδομένου ότι σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός του συνόλου των κροκινών που περιέχονται σε υδατικά εκχυλίσματα saffron, κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο η ένταση Raman της κορυφής στα  $1538\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τμημάτων των μορίων των κροκινών και δε μεταβάλλεται λόγω πιθανών μεταβολών μεταξύ των *cis* και *trans* διαμορφώσεων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μη διορθωμένη ένταση Raman στα  $1538\text{ cm}^{-1}$ ,

δηλαδή το ύψος της κορυφής όπως αυτό ορίζεται από τη γραμμή που διέρχεται από την κορυφή και είναι κάθετη στον οριζόντιο άξονα.

Η αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθόδου Raman έγινε, αρχικά, μέσω της διερεύνησης της συσχέτισης της μη διορθωμένης έντασης Raman στα  $1538\text{ cm}^{-1}$  με το εμβαδόν των απορροφήσεων των κροκινών, όπως προσδιορίστηκαν μέσω της HPLC. Ο συντελεστής Pearson ( $\alpha=0.05$ ) βρέθηκε να είναι ίσος με 0,666 [δ.ε.<sub>.95%</sub>=(0,483, 0,794)], αναδεικνύοντας στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών. Δεδομένου ότι η τιμή του συντελεστή συσχέτισης μεταξύ του εμβαδού των απορροφήσεων των κροκινών και της τιμής  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  440 nm που προκύπτει από το πρότυπο ISO 3632 (2011) βρέθηκε να ισούται με 0,573 [δ.ε.<sub>.95%</sub>=(0,254, 0,780)] (κεφάλαιο 2.3.2), αναδεικνύεται ότι η προτεινόμενη μέθοδος Raman, μέσω της μη διορθωμένης έντασης Raman στα  $1538\text{ cm}^{-1}$ , προσφέρει ένα περισσότερο ακριβές μέτρο εκτίμησης των κροκινών που περιέχονται σε υδατικό εκχύλισμα saffron από αυτό της απορρόφησης UV-Vis στα 440 nm που χρησιμοποιείται από το πρότυπο.



**Γράφημα 11** Πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού της συγκέντρωσης κροκινών (mg κροκινών/mL υδατικού διαλύματος saffron) μέσω (α) της φασματοσκοπίας Raman και (β) της HPLC.

Η ικανότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας Raman ως προς την ποσοτικοποίηση των κροκινών σε ένα υδατικό εκχύλισμα saffron αξιολογήθηκε μέσω της σύγκρισής της με τη βασιζόμενη στην HPLC μέθοδο. Οι πρότυπες καμπύλες που προέκυψαν από την ανάλυση υδατικών διαλυμάτων κροκινών με τις δυο μεθόδους (Γράφημα 11) ήταν:

$$(\alpha) y = 1130,7 (46,7) x + 463,79 (79,83)$$

για την περίπτωση της μεθόδου που βασίζεται στη φασματοσκοπία Raman, όπου  $y$  η μη διορθωμένη ένταση Raman στα  $1538\text{ cm}^{-1}$  και  $x$  η συγκέντρωση κροκινών σε mg/mL υδατικού εκχυλίσματος saffron και

$$(\beta) y = 17705 (725,3) x + 16442 (1238,9)$$

για τη μέθοδο βάσει της HPLC, όπου  $y$  το εμβαδόν της απορρόφησης των κροκινών (440 nm) και  $x$  η συγκέντρωση κροκινών σε mg/mL υδατικού εκχυλίσματος saffron. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα των όρων που προηγούνται. Οι συντελεστές γραμμικότητας ( $R^2$ ) είναι 99,0% τόσο για τη φασματοσκοπία Raman, όσο και για την HPLC.

Η μέση συγκέντρωση κροκινών στα υδατικά εκχυλίσματα saffron που αναλύθηκαν παρουσιάζεται στον Πίνακα 7. Οι συγκρίσεις τόσο μεταξύ των εκχυλισμάτων για κάθε μια από τις μεθόδους, όσο και μεταξύ των δύο μεθόδων για κάθε τύπο εκχυλίσματος δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ( $\alpha=0.05$ ). Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να συμφωνεί με τα συμπεράσματα των Anastasaki et al. (2010b), στην εργασία των οποίων η ανάλυση ξηρών σιγμάτων saffron με χρήση της φασματοσκοπίας Raman ανέδειξε παρόμοιες συγκεντρώσεις κροκινών στα δείγματα από την Ελλάδα, το Ιράν, την Ιταλία και την Ισπανία. Ωστόσο, δεν είναι εφικτή η άμεση σύγκριση με τα αποτελέσματα αυτά κυρίως λόγω του διαφορετικού τρόπου καταγραφής των φασμάτων και του γεγονότος ότι η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε από τους Anastasaki et al. (2010b) με χρήση υπολογιστικών μεθόδων και όχι μέσω πρότυπης καμπύλης κροκινών.

**Πίνακας 7** Μέση συγκέντρωση κροκινών (mg /mL υδατικού εκχυλίσματος) στα δείγματα που εξετάστηκαν βάσει της μεθόδου Raman και βάσει της HPLC.

Υδατικά εκχυλίσματα	n	mg κροκινών /mL υδατικού εκχυλίσματος (Raman)	mg κροκινών /mL υδατικού εκχυλίσματος (HPLC)
Ελληνικό saffron	28	1,46 ±0,23	1,50 ± 0,37
Saffron CrocusBank (GR→SP)	24	1,51 ± 0,23	1,64 ± 0,25
Ισπανικό saffron	1	1,47	1,20

Προκειμένου να αξιολογηθεί το εάν και κατά πόσο η προτεινόμενη μέθοδος Raman επιτυγχάνει να ξεπεράσει, έστω και μερικώς, ορισμένες από τις αδυναμίες της μεθόδου που περιλαμβάνεται στο πρότυπο ISO 3632 (2011), κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η συσχέτιση των ποσοτικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο Raman και από αυτή της HPLC για τα δείγματα ελληνικού saffron που αναλύθηκαν και με το ISO 3632 (2011) ( $n=28$ ). Η συσχέτιση μεταξύ των τιμών συγκέντρωσης κροκινών όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Raman και των αντίστοιχων της HPLC βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ( $\alpha=0,05$ ) με την τιμή του συντελεστή συσχέτισης Pearson να ισούται με 0,714 [δ.ε.<sub>.95%</sub>=(0,464, 0,858)]. Από τη σύγκριση με τον αντίστοιχο συντελεστή μεταξύ των συγκεντρώσεων που υπολογίστηκαν από το πρότυπο και αυτών από την HPLC και ο οποίος είναι 0,61 [δ.ε.<sub>.95%</sub>=(0,301, 0,801)] (κεφάλαιο 2.3.2), αναδεικνύεται ότι η προτεινόμενη μεθοδολογία Raman για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κροκινών σε υδατικά εκχυλίσματα saffron καταφέρνει, σε ορισμένο βαθμό, να ξεπεράσει το μειονέκτημα της χαμηλής συσχέτισης των ποσοτικών αποτελεσμάτων του ISO 3632 (2011) με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από την HPLC.

Συνοψίζοντας, εκτιμάται ότι η προτεινόμενη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των κροκινών σε υδατικά διαλύματα saffron βάσει της φασματοσκοπίας Raman μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική εναλλακτική ή συμπληρωματική του προτύπου ISO 3632 (2011) μέθοδο. Η προτεινόμενη μεθοδολογία οδηγεί σε ποσοτικά αποτελέσματα που εμφανίζουν υψηλότερη συσχέτιση με αυτά που προκύπτουν από την HPLC, ενώ, παράλληλα, συνδυάζει όλα τα πλεονεκτήματα της μεθόδου του προτύπου ISO 3632 (2011). Συγκεκριμένα, η προτεινόμενη μέθοδος:

- α) προβλέπει τη χρήση του νερού ως εκχυλιστή διαλύτη

β) είναι χαμηλού κόστους, αφού πέραν της αρχικής και σχετικά μικρής επένδυσης για την απόκτηση του οργάνου, δεν απαιτεί επιπλέον δαπάνες για αναλώσιμα

γ) τα αποτελέσματα μπορούν να αξιοποιηθούν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, πέραν του υπολογισμού της συγκέντρωσης μέσω της πρότυπης καμπύλης κροκινών.

Τέλος, η προτεινόμενη μέθοδος κρίνεται οικονομικότερη της αντίστοιχης που προβλέπεται από το πρότυπο *ISO 3632* (2011), καθώς:

α) προβλέπει τη χρήση σημαντικά μικρότερης ποσότητας δείγματος (20 mg saffron έναντι 500 mg)

β) απαιτεί μόλις 8 mL νερού σε αντίθεση με τα περίπου 1200 mL που προβλέπονται από το *ISO 3632* (2011)

γ) απαιτεί μικρότερη δαπάνη ενέργειας και χρόνου για την εκχύλιση (10 min σε λουτρό υπερήχων έναντι των 60 min υπό μαγνητική ανάδευση και ακόλουθη αραίωση του εκχυλίσματος).

## 4. Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου ανίχνευσης της νοθείας του saffron βασισμένης στη φασματοσκοπία FT-IR

### 4.1 Θεωρητικό μέρος

Η νοθεία του saffron αποτελεί ένα φαινόμενο τόσο διαδεδομένο, ώστε να μην είναι υπερβολή να ειπωθεί ότι συνοδεύει την παραγωγή και την εμπορία του από την αρχαιότητα. Τα κυριότερα κίνητρα για τη νοθεία του saffron αποτελούν οι μικρές ποσότητες που διατίθενται στην αγορά και η ιδιαίτερα υψηλή τιμή του, χαρακτηριστικά κοινά τόσο στην αρχαιότητα, όσο και σήμερα, χαρακτηριστικά που δεν προβλέπεται να διαφοροποιηθούν στο μέλλον.

Η ένταση και η έκταση της νοθείας στο saffron έχει οδηγήσει στη χρήση μιας πλειάδας υλικών προκειμένου να επιτευχθούν διάφοροι τρόποι αλλοίωσης του αυθεντικού προϊόντος (Πίνακας 3). Στον αντίποδα αυτού, αλλά με κοινή αφετηρία την ένταση του φαινομένου της νοθείας, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και των εμπλεκόμενων στην παραγωγή, τυποποίηση και εμπορία του saffron εστιάζεται στην ανάπτυξη και εφαρμογή βελτιωμένων τεχνικών που να επιτρέπουν την πιστοποίηση της αυθεντικότητας του saffron και την ανίχνευση τυχόν νοθευμένων προϊόντων, αξιοποιώντας, μεταξύ άλλων, το σύνολο των σύγχρονων μεθοδολογικών εργαλείων της ενόργανης χημικής ανάλυσης (Πίνακας 4).

Το πρότυπο του Διεθνούς Οργανισμού για τη Τυποποίηση ISO 3632 (2011) αποτελεί σήμερα το πλέον διαδεδομένο μέσο προσδιορισμού της ποιότητας του saffron. Παράλληλα, περιλαμβάνει και μεθόδους που επιτρέπουν την ανίχνευση ορισμένων τύπων νοθείας και συγκεκριμένα (α) προσδιορισμού της νοθείας με ξένες ύλες που βασίζονται στην απευθείας ή μικροσκοπική παρατήρηση των σιγμάτων, (β) ανίχνευσης νιτρικών σε δείγματα saffron σε σκόνη βάσει χρωματομετρικών αντιδράσεων και (β) ανίχνευσης συνθετικών, υδατοδιαλυτών χρωστικών όξινης αντίδρασης με χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας ή/και της HPLC (ISO 3632 – 2, 2011). Η ενσωμάτωση των δοκιμασιών αυτών στο πρότυπο συμβάλλει στην αποδοχή του ως του πλέον ολοκληρωμένου για τον έλεγχο του saffron (Carmona Delgado et al., 2006). Ωστόσο, το γεγονός ότι η προσθήκη ξένων φυτικών υλικών βασίζεται στην παρατήρηση εισάγει ορισμένο βαθμό υποκειμενικότητας στις αναλύσεις αυτές, υποβαθμίζοντας την ακρίβειά τους, ειδικά για την περίπτωση δειγμάτων σε σκόνη. Παράλληλα, στις περιπτώσεις όπου η νοθεία συνίσταται στην προσθήκη μερών από το ίδιο το *Crocus sativus* και κυρίως όταν η νοθεία έγκειται στην ανάμιξη με saffron παλιότερης εσοδείας, οι προτεινόμενες από το ISO 3632 (2011) μέθοδοι αναμένεται να παρουσιάσουν χαμηλότερη ή και μηδενική αποτελεσματικότητα.

Η ιδιαίτερη δυσκολία που παρουσιάζει η ανίχνευση της νοθείας στο saffron όταν αυτή γίνεται με την προσθήκη μερών από άλλα φυτά, με φυσικές χρωστικές όμοιες με αυτές του saffron, με μέρη του φυτού *Crocus sativus* ή ακόμη και με saffron παλαιάς εσοδείας, σε συνδυασμό με την απουσία καθιερωμένου προτύπου για την ανίχνευσή τους, καθιστά επιτακτική την ανάπτυξη εύρωστων μεθόδων ανίχνευσης αυτών των τύπων νοθείας.

Οι μέθοδοι ενόργανης χημικής ανάλυσης που έχουν προταθεί για την ανίχνευση της νοθείας με την προσθήκη υλικού φυτικής προέλευσης βασίζονται στην αέρια (Alonso, Salinas & Garijo, 1998; Maggi et al., 2010) και την υγρή χρωματογραφία (Carmona et al., 2006b; Haghghi, Feizy & Kakhki, 2007; Sabatino, Scordino, Gargano, Belligno, Traulo & Gagliano, 2011) και τη φασματοσκοπία NMR (Yilmaz, Nyberg, Mølgaard, Asili & Jaroszewski, 2010). Οι μέθοδοι αυτές, παρά την υψηλή ακρίβειά τους, παρουσιάζουν στο σύνολό τους αυξημένο κόστος για την αγορά των οργάνων και των απαιτούμενων αναλωσίμων και είναι σχετικά απαιτητικές σε χρόνο και εξειδικευμένο τεχνικό προσωπικό, δυσχεραίνοντας την ενσωμάτωσή τους στην καθημερινή πρακτική των μικρών ή μεσαίου μεγέθους μονάδων παραγωγής, τυποποίησης, συσκευασίας και εμπορίας του saffron. Παράλληλα, οι απαιτήσεις που παρουσιάζουν ενδεχομένως να περιορίζουν το πεδίο εφαρμογής τους σε στοχευμένες αναλύσεις δειγμάτων και να τις καθιστούν μη ιδανικές για την προκαταρκτική αξιολόγηση (screening) μεγάλου όγκου δειγμάτων.

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία θα μπορούσε να αποτελεί μια ικανοποιητική εναλλακτική, παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει μικρότερη ακρίβεια. Το χαμηλότερο κόστος αγοράς, χρήσης και συντήρησης των οργάνων, οι μικρές ή μηδενικές απαιτήσεις σε αναλώσιμα και η ταχύτητα των αναλύσεων έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη πολυάριθμων μεθόδων βασιζόμενων στην υπέρυθρη φασματοσκοπία και κατάλληλων για άμεση εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων (Downey, 1998; Tay, Singh, Krishnan & Gore 2002; Pappas, Tarantilis, Moschopoulou, Moatsou, Kandarakis & Polissiou, 2008; Tarantilis, Troianou, Pappas, Kotseridis & Polissiou, 2008). Στην περίπτωση του saffron, η υπέρυθρη φασματοσκοπία έχει προταθεί για την ανίχνευση της νοθείας με προϊόν παλαιάς εσοδείας (Ordoudi, de los Mozos Pascual & Tsimidou, 2014) και για τη γεωγραφική διαφοροποίηση δειγμάτων (Zalacain et al., 2005b; Anastasaki et al., 2010a).

Σκοπός του παρόντος τμήματος της εργασίας είναι η διερεύνηση της ικανότητας της φασματοσκοπίας FT-IR να εφαρμοστεί για την ανίχνευση και άλλων τύπων νοθείας του saffron, μέσω της ανάπτυξης μιας μεθόδου για τη διάκριση της νοθείας στις περιπτώσεις όπου ως παράγοντες νόθευσης έχουν χρησιμοποιηθεί υλικά φυτικής προέλευσης.

## 4.2 Πειραματικό μέρος

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε: 29 δείγματα ελληνικού saffron εσοδείας 2012, ένα δείγμα ισπανικού saffron εσοδείας 2012 και τέσσερα εμπορικά δείγματα τα οποία πωλούνταν ως 'saffron' ή με σχετιζόμενη ονομασία και η μακροσκοπική τους εικόνα απέκλινε από αυτή του αυθεντικού saffron. Παράλληλα, κρίθηκε σκόπιμο να συμπεριληφθούν στις αναλύσεις δύο δείγματα γαρδένιας σε σκόνη, λόγω της συχνής χρήσης εκχυλισμάτων γαρδένιας για τη νοθεία του saffron (Carmona et al., 2006b). Επιπλέον, αναλύθηκαν 24 δείγματα saffron τα οποία προέρχονταν από φυτά *Crocus sativus* με καταγωγή από την Ελλάδα που μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν για ένα χρόνο στις εγκαταστάσεις της παγκόσμιας Τράπεζας Γενετικού Υλικού του γένους *Crocus* (CrocusBank - Centro Agrario de Albaladejito, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Cuenca, Ισπανία).

Για την παρασκευή των υδατικών εκχυλισμάτων, 20 mg κονιοποιημένου φυτικού υλικού εκχυλίστηκαν σε 8 mL H<sub>2</sub>O καθαρότητας HPLC, εντός λουτρού υπερήχων, για 10 min. Η συχνότητα της πηγής υπερήχων ήταν 35 kHz, η εκχύλιση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς το δείγμα να εκτίθεται στο φως, ενώ, τέλος, το διάλυμα διηθήθηκε με φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

Η καταγραφή των φασμάτων έγινε σε φασματόμετρο FT-IR Thermo Nicolet 6700. Η καταγραφή του φάσματος FT-IR έγινε με χρήση της τεχνικής ATR, τοποθετώντας 0,7 mL του υδατικού εκχυλίσματος στον υποδοχέα του δείγματος, φροντίζοντας το υγρό να δημιουργήσει μια στοιβάδα ομοιόμορφου πάχους σε όλη την επιφάνεια του κρυστάλλου ZnSe του υποδοχέα. Η φύση των διαλυμάτων δεν επέτρεπε την απευθείας καταγραφή του φάσματος FT-IR, καθώς η παρουσία του νερού είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας πλατιάς κορυφής στην περιοχή 3400-2400 cm<sup>-1</sup> η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του υδροξυλίου (Stuart, 2004) και η οποία προκαλούσε αλλοιώσεις και υποβάθμιση της φασματικής πληροφορίας του συνόλου του φάσματος. Για το λόγο αυτό, πριν την καταγραφή του φάσματος, το εκχύλισμα αφέθηκε να ξηραθεί, σχηματίζοντας μια λεπτή μεμβράνη πάνω στον κρύσταλλο του υποδοχέα. Η ξήρανση έγινε σε ήπια θερμοκρασία (~40°C) και χωρίς το δείγμα να εκτίθεται στο φως. Το φάσμα καταγράφηκε στην περιοχή 4000-650 cm<sup>-1</sup>, προέκυψε από 100 σαρώσεις, με την ανάλυση του οργάνου να είναι 4 cm<sup>-1</sup>. Η καταγραφή και επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού OMNIC 7.3 της Thermo Fisher Scientific Inc. Η επεξεργασία των φασμάτων περιλάμβανε την εφαρμογή, στο σύνολο των φασμάτων, των αυτοματοποιημένων διεργασιών της εξομάλυνσης (automatic smooth) και της διόρθωσης της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) των φασμάτων. Επιπλέον, από το σύνολο των φασμάτων, αφαιρέθηκε η κορυφή του CO<sub>2</sub> (~2385-2285 cm<sup>-1</sup>), η οποία οφείλεται σε μεταβολές του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> κατά την καταγραφή των φασμάτων.

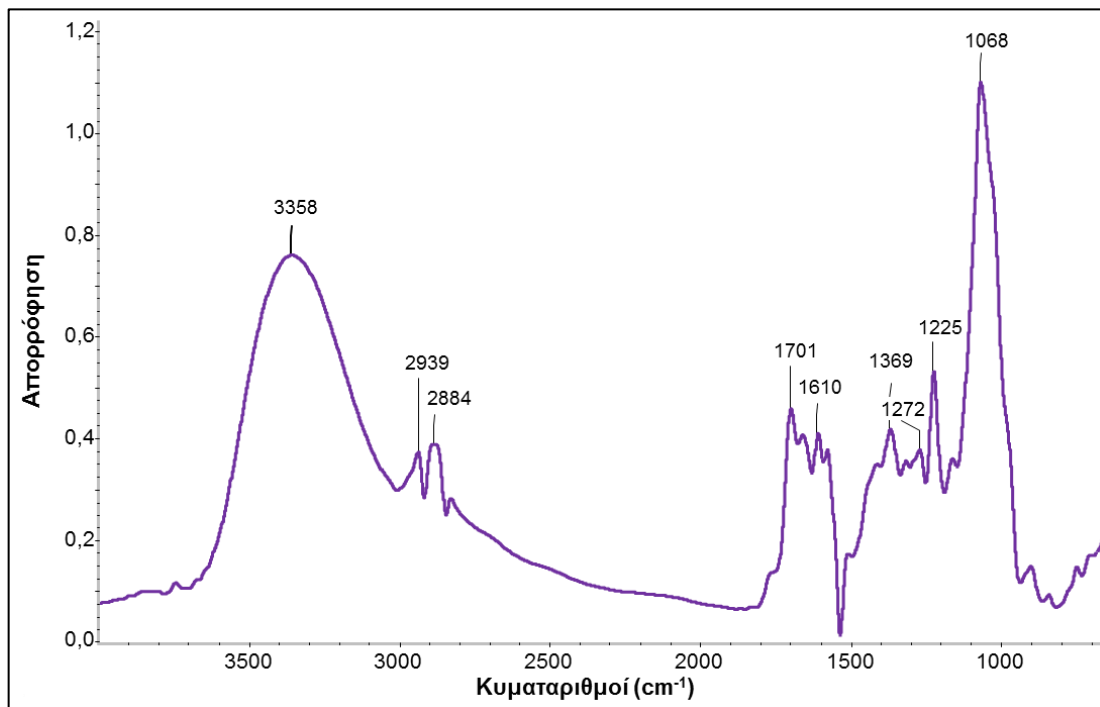
Τα φάσματα των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron ( $n=29$ ) χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του μέσου φάσματος. Η αντιπροσωπευτικότητα του μέσου φάσματος ελέγχθηκε με τη σύγκριση κάθε φάσματος ελληνικού saffron με αυτό και στη συνέχεια, το μέσο φάσμα των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά για τον έλεγχο της συσχέτισης των υπολοίπων φασμάτων με αυτό. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value) που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση των δεδομένων με χρήση του λογισμικού JMP 8.0 της SAS Institute Inc.

### 4.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στο Γράφημα 12 παρουσιάζεται το μέσο φάσμα των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron, όπως προέκυψε μέσω της προτεινόμενης τεχνικής FT-IR. Η πλατιά κορυφή στην περιοχή των 3358 cm<sup>-1</sup> οφείλεται στις υδροξυλικές ομάδες των σακχάρων της πικροκροκίνης και των κροκινών, αλλά και σε μόρια διαλύτη που τυχόν δεν απομακρύνθηκαν κατά την ξήρανση (Socrates, 2001). Οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή 2940-2880 cm<sup>-1</sup> αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-H ( $\nu_{C-H}$ ) (Socrates, 2001). Η κορυφή στα 1701 cm<sup>-1</sup> οφείλεται στις δονήσεις τάσης του καρβονυλίου ( $\nu_{C=O}$ ) των εστερικών ομάδων των κροκινών (Tarantilis et. al, 1998), ενώ αυτή στα 1610 cm<sup>-1</sup> στις δονήσεις τάσης του διπλού δεσμού ( $\nu_{C=C}$ ) του



συζυγιακού συστήματος των κροκινών (Socrates, 2001). Η κορυφή στα  $1369\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης του δεσμού C-H ( $\delta_{C-H}$ ) (Socrates, 2001), ενώ αυτή στα  $1225\text{ cm}^{-1}$  στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-O ( $\nu_{C-O}$ ) των εστερικών ομάδων των κροκινών (Tarantilis et. al, 1998). Τέλος, η απορρόφηση στα  $1068\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις δονήσεις του δεσμού C-O των σακχάρων της πικροκροκίνης και των κροκινών (Tarantilis et. al, 1998).



Γράφημα 12 Μέσο φάσμα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron.

Όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των φασμάτων αφορούσαν στη φασματική περιοχή  $1800-700\text{ cm}^{-1}$ , η οποία, όπως προκύπτει, περιλαμβάνει τις απορροφήσεις που οφείλονται στις λειτουργικές ομάδες των συστατικών των εκχυλισμάτων και την περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Τα 29 φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron βρέθηκαν να έχουν μέσο συντελεστή συσχέτισης (correlation match value)  $98,98\% \pm 0,71$  με το μέσο φάσμα τους. Η τιμή αυτή αναδεικνύει την υψηλή ομοιομορφία των υδατικών εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν, υποστηρίζοντας αφ' ενός την ομοιομορφία του ελληνικού saffron ως συνόλου και αφ' ετέρου επιτρέποντας τη χρήση του μέσου φάσματος ως αναφοράς για τις συγκρίσεις του ελληνικού saffron με saffron διαφορετικής προέλευσης και με πιθανά νοθευμένα είδη.

Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης των υπολοίπων υδατικών εκχυλισμάτων με το μέσο φάσμα των δειγμάτων ελληνικού saffron δίνονται στον Πίνακα 8, ενώ, λόγω της έντονης απόκλισής τους από το μέσο φάσμα του ελληνικού saffron, κρίθηκε σκόπιμη η συγκριτική παρουσίαση του φάσματος κάθε εμπορικού δείγματος ή δείγματος γαρδένιας που αναλύθηκε και του φάσματος από ελληνικό saffron (Γράφημα Π1 - Γράφημα Π6 του Παραρτήματος). Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (Πίνακας 8) αναδεικνύουν ότι τα αυθεντικά δείγματα saffron με διαφορετική προέλευση από τα

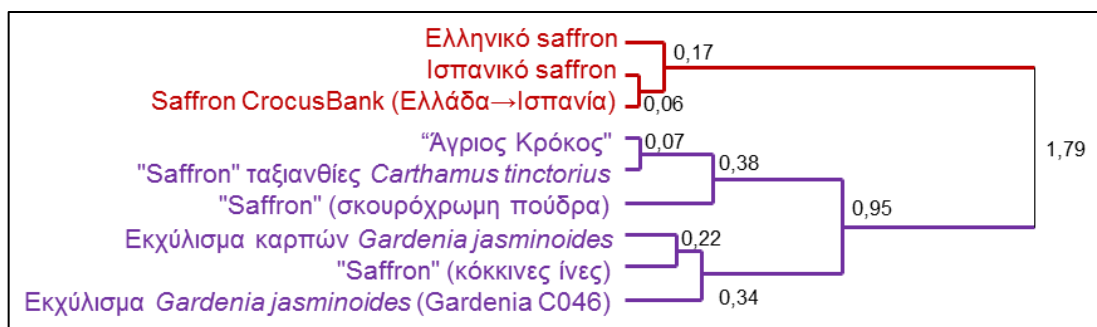
ελληνικά παρουσιάζουν υψηλή μεν συσχέτιση (~>95%) με το μέσο φάσμα των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron, ωστόσο οι τιμές του μέσου συντελεστή συσχέτισης είναι χαμηλότερες από την αντίστοιχη για τα επιμέρους ελληνικά δείγματα (98,98% ± 0,71).

Οι σημαντικά χαμηλότερες τιμές του συντελεστή συσχέτισης (~<70%) για τα υπόλοιπα δείγματα επιβεβαιώνει το μακροσκοπικό χαρακτηρισμό τους ως νοθευμένων, καθώς και την έκταση της νοθείας στο saffron, αφού το σύνολο των νοθευμένων δειγμάτων αποτελούνταν από εμπορικά προϊόντα. Επιπλέον, αναδεικνύεται η ικανότητα της προτεινόμενης μεθόδου να διακρίνει επιτυχώς νοθευμένα δείγματα στα οποία η νοθεία συνίσταται στην προσθήκη ή την αντικατάσταση των σιγμάτων του *Crocus sativus* από άλλα υλικά φυτικής προέλευσης. Για την επιβεβαίωση της ευρωστίας της προτεινόμενης μεθόδου, θεωρείται σκόπιμη η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, καθώς και μιγμάτων όπου το αυθεντικό saffron θα βρίσκεται σε γνωστή και σχετικά υψηλή αναλογία.

**Πίνακας 8** Μέσος συντελεστής συσχέτισης (%) των αναλυθέντων δειγμάτων με το μέσο φάσμα FT-IR των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron.

Δείγματα	Μακροσκοπική εικόνα αρχικού υλικού	Αριθμός δειγμάτων	Μέσος συντελεστής συσχέτισης (%)
Ισπανικό saffron	στίγματα <i>Crocus sativus</i>	1	94,69
Saffron από CrocusBank (Ελλάδα → Ισπανία)	στίγματα <i>Crocus sativus</i>	24	95,98 ± 4,16
Προϊόν με ονομασία "saffron" (Τουρκία)	ταξιδιανθίες <i>Carthamus tinctorius</i>	1	71,52
Προϊόν με ονομασία "saffron" (Τουρκία)	σκουρόχρωμη πούδρα	1	62,57
Προϊόν με ονομασία "Άγιος Κρόκος" (Ελλάδα)	πορτοκαλί στίγματα, σαφώς διάφορα του <i>Crocus sativus</i>	1	70,11
Προϊόν με ονομασία "saffron" (Ισπανία)	κόκκινες ίνες	1	47,56
Εμπορικό προϊόν εκχυλίσματος καρπών <i>Gardenia jasminoides</i>	κίτρινη πούδρα	1	52,36
Εκχύλισμα <i>Gardenia jasminoides</i> (Gardenia C046)	πορτοκαλί πούδρα	1	42,72

Ωστόσο, αναφορικά στα δείγματα που εξετάστηκαν, η ικανότητα διάκρισης της νοθείας μέσω της προτεινόμενης μεθόδου επιβεβαιώνεται και από το δένδρογραμμα που προέκυψε από την ιεραρχική ανάλυση συστάδων (Γράφημα 13). Η ύπαρξη πιθανά νοθευμένων ειδών μεταξύ των αναλυθέντων δειγμάτων τα οποία εμφάνισαν ισχυρές αποκλίσεις από τα υπόλοιπα (Πίνακας 8) οδήγησε στην επιλογή της μεθόδου Centroid ως καταλληλότερης για την ανάλυση, λόγω της συγκριτικά χαμηλότερης ευαισθησίας της στην ύπαρξη ακραίων τιμών (SAS Institute Inc., 2010.). Οι τρεις ομάδες αυθεντικού saffron ομαδοποιούνται σε σαφώς διακριτή συστάδα από αυτή των νοθευμένων δειγμάτων.



**Γράφημα 13** Δενδρόγραμμα των εξεταζόμενων δειγμάτων βάσει του συντελεστή συσχέτισής τους με το μέσο φάσμα FT-IR ελληνικού saffron και αποστάσεις σύνδεσης των επιμέρους συσταδών.

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι τα δείγματα saffron από την CrocusBank, αν και είχαν καταγωγή από την Ελλάδα, εμφανίζουν μικρότερη απόσταση σύνδεσης με το ισπανικό από ότι με το ελληνικό saffron (Γράφημα 13). Η στενότερη σύνδεση των δειγμάτων της CrocusBank με το ισπανικό saffron μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα πρώτα καλλιεργήθηκαν για ένα χρόνο στην ίδια περιοχή (Castilla-La Mancha, Ισπανία) με το δεύτερο, υπογραμμίζοντας την ισχυρή επίδραση των εδαφοκλιματικών παραγόντων στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του saffron. Παράλληλα, η παρατήρηση αυτή αποτελεί πιθανά ένδειξη της καταλληλότητας της προτεινόμενης μεθόδου για τη διάκριση της γεωγραφικής προέλευσης του saffron. Η φασματοσκοπία FT-IR αναφέρεται ότι μπορεί επιτυχώς να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης του saffron (Anastasaki et al., 2010a). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η εφαρμογή μεθόδου βασισμένη στη φασματοσκοπία FT-IR σε αιθερικά εκχυλίσματα saffron οδήγησε στην επιτυχή διάκρισή τους βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης, αν και κάτι τέτοιο δεν ήταν δυνατό κατά τη φασματοσκοπική εξέταση των ακέραιων σιγμάτων saffron. Αντίθετα, οι Zalacain et al. (2005b) αναφέρουν ότι με χρήση φασματοσκοπικής μεθόδου βασιζόμενης στη φασματοσκοπία NIR ήταν επιτυχής ο διαχωρισμός δειγμάτων saffron σε μορφή ακέραιων σιγμάτων βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης.

Γενικά, τα αιθερικά εκχυλίσματα του saffron περιέχουν κυρίως τα πτητικά συστατικά του αρώματος, τα οποία αναφέρεται ότι επηρεάζονται από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες στην περιοχή παραγωγής και μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες της γεωγραφικής προέλευσης (Anastasaki et al., 2009; Anastasaki et al., 2010a). Ωστόσο, η διερεύνηση της ικανότητας της παρούσας μεθόδου να διακρίνει τα υδατικά εκχυλίσματα saffron βάσει της προέλευσής τους προτείνεται ως αντικείμενο μελλοντικής μελέτης, καθώς μια μέθοδος προσδιορισμού της γεωγραφικής προέλευσης βασισμένη σε υδατικά εκχυλίσματα saffron είναι περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον, μπορεί να συνδυαστεί με τις μεθόδους προσδιορισμού της ποιότητας που αναλύουν κυρίως τις κροκίνες και την πικροκροκίνη και ενδέχεται να οδηγήσει σε νέα συμπεράσματα αναφορικά στην επίδραση των εδαφοκλιματικών παραγόντων στο προφίλ των υδατοδιαλυτών συστατικών του saffron.

## 5. Ποιοτική διαφοροποίηση του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών μεταξύ *Crocus sativus* και άλλων ειδών του γένους με χρήση HPLC και FT-IR

### 5.1 Θεωρητικό μέρος

Το γένος *Crocus* περιλαμβάνει, πλέον του *C. sativus*, άλλα περίπου 85 φυτικά είδη. Σε αντίθεση με τις πολυάριθμες αναφορές σχετικά με το *C. sativus* στην επιστημονική βιβλιογραφία, τα υπόλοιπα είδη του γένους έχουν μελετηθεί σε σημαντικά μικρότερη έκταση.

Η σημαντικότερη μελέτη της μορφολογίας των διαφόρων ειδών εντός του γένους *Crocus* έγινε από το Mathew (1982) και είχε ως αποτέλεσμα τη συστηματική ταξινόμησή τους σε υπογένη και μικρότερα βοτανικά taxa (Πίνακας 1). Στη μελέτη αυτή βασίστηκαν και μελλοντικές έρευνες που είχαν ως αποτέλεσμα την αναγνώριση και συστηματική ταξινόμηση και άλλων ειδών του γένους *Crocus* (Mariotti, 1988; Randjelović, Hill, Stamenković & Randjelović, 1990; Kerndorff, 1993; Pasche, 1993; Kerndorff & Pasche, 1994; Mathew, 1995; Mathew, 2000; Al-Eisawi, 2001; Yüzbaşıoğlu & Varol, 2004). Πέραν των μορφολογικών μελετών των άγριων ειδών του γένους *Crocus*, οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών που περιλαμβάνει έχουν μελετηθεί και μέσω γονιδιωματικών προσεγγίσεων (Caiola, Caputo & Zanier, 2004; Frello, Ørgaard, Jacobsen & Heslop-Harrison, 2004; Petersen et al, 2008).

Ωστόσο, η επιστημονική βιβλιογραφία είναι ιδιαίτερα περιορισμένη σε ότι αφορά στη μελέτη των άγριων ειδών του γένους *Crocus* βάσει σύγχρονων μεθόδων ενόργανης χημικής ανάλυσης (Nørbæk, Brandt, Nielsen, Ørgaard & Jacobsen, 2002). Η εργασία αυτή είχε ως στόχο τη χημειοταξινόμηση ειδών, υποειδών και μικρότερων ταξονομικών αθροισμάτων του γένους *Crocus* βάσει του προφίλ των ανθοκυανών και φλαβονοειδών των τεπάλων, όπως αυτό προέκυψε μέσω της ανάλυσης με HPLC. Τα ευρήματα των Nørbæk et al. (2002) υπογραμμίζουν τις διαφοροποιήσεις που προκύπτουν από τη χημειοτυπική διαφοροποίηση των άγριων ειδών *Crocus* σε σύγκριση με τη συστηματική τους ταξινόμηση βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών, αναδεικνύοντας την ανάγκη περαιτέρω μελέτης του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των ειδών αυτών.

Επιπλέον της ταξινόμησης των άγριων ειδών *Crocus* βάσει χημειοτυπικών χαρακτηριστικών, η περαιτέρω μελέτη των ειδών αυτών κρίνεται αναγκαία λόγω της σημασίας που έχουν ως γονιδιακό απόθεμα του καλλιεργούμενου *C. sativus*. Η στειρότητα του *C. sativus* αποτελεί την αιτία της περιορισμένης γενετικής του βάσης, η οποία μειώνεται περαιτέρω λόγω της γενετικής διάβρωσης που προκαλείται ως αποτέλεσμα του περιορισμού των καλλιεργούμενων εκτάσεων του σε παγκόσμιο επίπεδο (Fernández et al., 2011). Έτσι, η εμπάθυνση της μελέτης των άγριων ειδών του γένους *Crocus* αποτελεί απαραίτητο βήμα για να διερευνηθεί εάν και κατά πόσο αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή πολύτιμης γενετικής παραλλακτικότητας σε βελτιωτικά προγράμματα του *C. sativus*.

Τέλος, η μελέτη του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των άγριων συγγενών του *C. sativus* κρίνεται απαραίτητη προκειμένου, αφ' ενός να διερευνηθεί η δυνατότητα εμπορικής αξιοποίησής τους για χρήσεις παρόμοιες με αυτές του saffron και αφ' ετέρου να καταγραφεί το χημικό δακτυλικό τους αποτύπωμα, ώστε να

καταστεί δυνατή η διάκριση πιθανής νοθείας του saffron με προσθήκη φυτικού υλικού από τα άγρια συγγενικά του είδη.

Βάσει των ανωτέρω, στο παρόν τμήμα της εργασίας επιχειρήθηκε η ποιοτική διαφοροποίηση του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών μεταξύ του *Crocus sativus* και άλλων ειδών του γένους *Crocus* μέσω ανάλυσης των υδατικών εκχυλισμάτων τους με μεθόδους βασισμένες στην HPLC και τη φασματοσκοπία FT-IR.

## 5.2 Πειραματικό μέρος

Το φυτικό υλικό *Crocus sativus* που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε 29 δείγματα ελληνικού saffron εσοδείας 2012 που παραχωρήθηκε από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Αναφορικά στα άλλα είδη του γένους *Crocus*, μελετήθηκαν τα 32 δείγματα που παραχωρήθηκαν από την παγκόσμια Τράπεζα Γενετικού Υλικού του γένους *Crocus* (CrocusBank - Centro Agrario de Albaladejito, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Cuenca, Ισπανία) και τα οποία περιλαμβάνονται στον Πίνακα Π2 του Παραρτήματος.

Η ποιοτική διαφοροποίηση μεταξύ *Crocus sativus* και άλλων ειδών βασίστηκε στο προφίλ των υδατικών τους εκχυλισμάτων. Για την παρασκευή των υδατικών εκχυλισμάτων, 20 mg κονιοποιημένου φυτικού υλικού εκχυλίστηκαν σε 8 mL H<sub>2</sub>O καθαρότητας HPLC, εντός λουτρού υπερήχων, για 10 min. Η συχνότητα της πηγής υπερήχων ήταν 35 kHz, η εκχύλιση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς το δείγμα να εκτίθεται στο φως, ενώ, τέλος, το διάλυμα διηθήθηκε με φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

Η σύγκριση του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των υδατικών εκχυλισμάτων βασίστηκε τόσο στην HPLC, όσο και στη φασματοσκοπία FT-IR. Τα υδατικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με χρήση της HPLC, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.2, ενώ για την καταγραφή και επεξεργασία των φασμάτων FT-IR ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.2. Τα φάσματα FT-IR των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτήν την περίπτωση για τη δημιουργία του μέσου φάσματος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά για τον έλεγχο της συσχέτισης των υπολοίπων φασμάτων με αυτό βάσει των τιμών του συντελεστή συσχέτισης (correlation match value). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου FT-IR επεξεργάστηκαν στατιστικά μέσω Ανάλυσης Συστάδων (Cluster Analysis) με χρήση του λογισμικού JMP 8.0 της SAS Institute Inc. Για την κατασκευή των δένδρογραμμάτων βάσει της φασματοσκοπίας FT-IR, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές του πίνακα (33 x 33) των συντελεστών συσχέτισης μεταξύ των φασμάτων των άγριων δειγμάτων και του μέσου φάσματος του ελληνικού saffron.

## 5.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

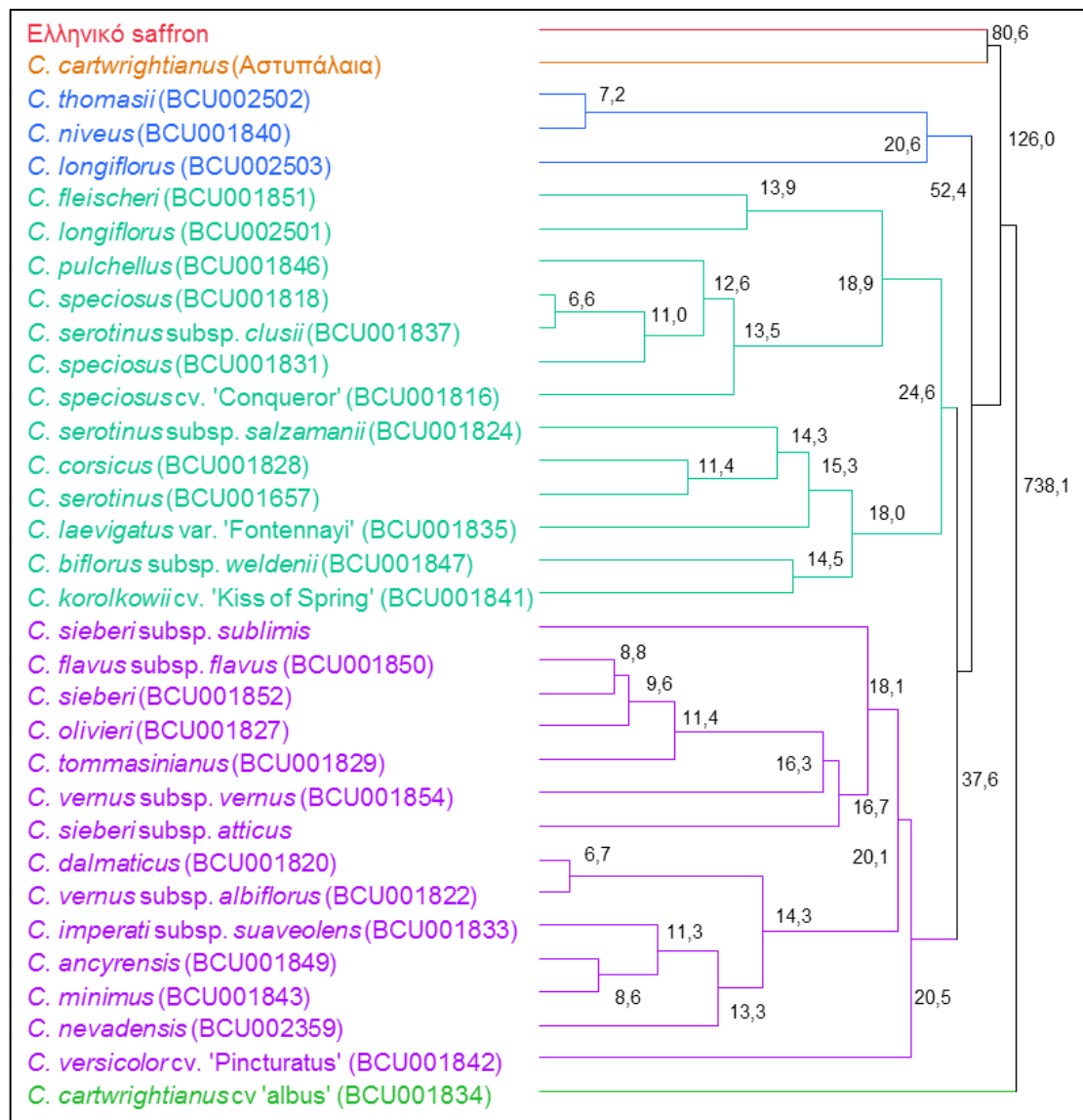
Η ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron μέσω της HPLC έδειξε ότι το μέσο εμβασό της κορυφής της πικροκροκίνης ( $t_R=8,6$  min), όπως αυτή ανιχνεύτηκε στα 257 nm, ήταν  $8778 \pm 1802,7$  mAU\*s. Η πικροκροκίνη είναι, επίσης,

παρούσα στα υδατικά εκχυλίσματα των: *C. thomasii* (3993,4 mAU\*s), *C. cartwrightianus* cv 'albus' (3136,3 mAU\*s), *C. niveus* (3012,1 mAU\*s), *C. cartwrightianus* από την Αστυπάλαια (2457,2 mAU\*s), *C. korolkowii* cv. 'Kiss of Spring' (256,2 mAU\*s), *C. dalmaticus* (151,3 mAU\*s), *C. longiflorus* - BCU002503 (112,8 mAU\*s) και *C. versicolor* cv. 'Pincturatus' (94,7 mAU\*s). Επομένως, η παρουσία ή μη της πικροκροκίνης μπορεί να αποτελεί δείκτη διάκρισης μεταξύ των ειδών που προαναφέρθηκαν και των υπολοίπων του γένους *Crocus* που εξετάστηκαν. Επιπλέον, κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων των ειδών που βρέθηκαν να περιέχουν πικροκροκίνη, προκειμένου να εξεταστεί η συγκέντρωσή της συγκριτικά με αυτή του saffron, ώστε να διαπιστωθεί εάν η ποσότητα της πικροκροκίνης στα υδατικά εκχυλίσματά τους είναι κατάλληλος δείκτης διάκρισης μεταξύ του saffron και των άγριων συγγενικών ειδών στα οποία εντοπίστηκε σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Σε ότι αφορά στη σαφρανάλη ( $t_R=19,6$  min), το μέσο εμβαδό της κορυφής της στα 330 nm βρέθηκε να είναι  $224,6 \pm 74,7$  mAU\*s στα εκχυλίσματα saffron. Από τα άγρια είδη που εξετάστηκαν, η σαφρανάλη ανιχνεύθηκε μόνο στα *C. cartwrightianus* από την Αστυπάλαια (30,3 mAU\*s), *C. cartwrightianus* cv 'albus' (16,3 mAU\*s) και *C. niveus* (14,5 mAU\*s). Ομοίως όπως στην περίπτωση της πικροκροκίνης, η παρουσία της σαφρανάλης μπορεί να αποτελέσει δείκτη διάκρισης μεταξύ των ειδών που αναφέρθηκαν και των υπολοίπων που αναλύθηκαν και στα οποία βρέθηκε να απουσιάζει, ενώ ενδέχεται η ποσότητά της να μπορεί να διακρίνει το saffron από τα τρία άγρια είδη στα οποία η συγκέντρωσή της ήταν πολύ χαμηλότερη.

Το μέσο εμβαδό των απορροφήσεων των κροκινών στα 440 nm για τα υδατικά εκχυλίσματα saffron ήταν  $44689,6 \pm 6802,5$  mAU\*s. Αξιόλογη ήταν η απορρόφηση των κροκινών και για τα υδατικά εκχυλίσματα των *C. cartwrightianus* από την Αστυπάλαια (41721 mAU\*s), *C. thomasii* (32566,2 mAU\*s), *C. cartwrightianus* cv 'albus' (30728,4 mAU\*s), *C. longiflorus* - BCU002503 (22512,8 mAU\*s), *C. niveus* (16811,5 mAU\*s) και *C. longiflorus* -BCU002501 (16778 mAU\*s). Για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, το εμβαδό των απορροφήσεων των κροκινών κινήθηκε σε τιμές χαμηλότερες των 10000 mAU\*s, με χαρακτηριστική την περίπτωση του *C. nevadensis* το οποίο παρουσίασε μηδενική απορρόφηση κροκινών και το υδατικό του εκχύλισμα ήταν άχρωμο. Σε ότι αφορά στη μελέτη των μεμονωμένων κροκινών που αποτελούσαν συστατικά κάθε εκχυλίσματος, η ταυτοποίησή τους δεν ήταν εφικτή λόγω έλλειψης φασμάτων μαζών, αλλά και βιβλιογραφικών δεδομένων. Ωστόσο, κρίνεται ότι η διερεύνηση των κροκινών που παρουσιάζονται στα εκχυλίσματα των άγριων ειδών *Crocus*, καθώς και η ποσοτική τους εκτίμηση θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο περαιτέρω μελέτης, προκειμένου να αποτυπωθεί με ακρίβεια το προφίλ των κροκινών κάθε είδους και να αναδειχθούν πιθανά κατάλληλοι δείκτες διάκρισής τους.

Η ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR και η μεταξύ τους σύγκριση στη φασματική περιοχή  $1800-700$   $\text{cm}^{-1}$  ανέδειξε την εικόνα που παρουσιάζεται στο Γράφημα 14. Η δημιουργία του δένδρογράμματος έγινε μέσω της μεθόδου Centroid, η οποία έχει συγκριτικά χαμηλότερη ευαισθησία στην ύπαρξη ακραίων τιμών (SAS Institute Inc., 2010.) και επομένως, κρίθηκε καταλληλότερη για την περιγραφή του εξεταζόμενου πληθυσμού λόγω της ύπαρξης μεγάλου αριθμού διαφορετικών ειδών.



**Γράφημα 14** Δενδροδιάγραμμα των εξεταζόμενων δειγμάτων βάσει των συντελεστών συσχέτισης των φασμάτων FT-IR των υδατικών τους εκχυλισμάτων και αποστάσεις σύνδεσης των επιμέρους συστάδων.

Αξίζει αρχικά να σημειωθεί ότι, όπως και στην περίπτωση της HPLC, η ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει του συντελεστή συσχέτισης των φασμάτων FT-IR των υδατικών τους εκχυλισμάτων διαφοροποιείται έντονα από τη διάκρισή τους βάσει βοτανικής ταξινόμησης (Πίνακας 1). Σε αντίστοιχα συμπεράσματα έχουν καταλήξει και ερευνητές μετά από γενετικές μελέτες (Petersen et al, 2008), γεγονός που υπογραμμίζει την αναγκαιότητα πολύπλευρου χαρακτηρισμού των φυτικών ειδών. Η ανάγκη αυτή είναι, προφανώς, εντονότερη στις περιπτώσεις φυτών που αξιοποιούνται εμπορικά για τους δευτερογενείς τους μεταβολίτες, όπως είναι τα φαρμακευτικά, αρωματικά και αρτυματικά φυτά, για τα οποία είναι επιτακτικός ο καθορισμός του χημειοτυπικού προφίλ και η διερεύνηση των παραγόντων που το επηρεάζουν.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σαφής απόκλιση του *C. cartwrightianus* cv 'albus' από το σύνολο των υπολοίπων εξεταζόμενων δειγμάτων, παρά το γεγονός ότι

τα αποτελέσματα της ανάλυσης με HPLC το κατέταξαν σε μια ομάδα ειδών με όμοιο, ως ένα βαθμό, χημικό προφίλ με το saffron. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανά να οφείλεται στο γεγονός ότι η προτεινόμενη μεθοδολογία FT-IR χρησιμοποιεί κατά τον υπολογισμό των συντελεστών συσχέτισης το σύνολο της φασματικής περιοχής 1800-700  $\text{cm}^{-1}$ , αξιοποιώντας με τον τρόπο αυτό μεγαλύτερο όγκο χημικών πληροφοριών από αυτόν που εξετάστηκε στην περίπτωση της HPLC. Παράλληλα, το γεγονός ότι το συγκεκριμένο είδος αποτελεί καλλιεργούμενη ποικιλία για καλλωπιστική χρήση (Brickell, 2008), ενδέχεται να συντελεί στην απομάκρυνση του συγκεκριμένου υβριδίου από την τυπική εικόνα του είδους και να έχει οδηγήσει στη ανάπτυξη παραλλακτικότητας και σε επίπεδο χημικού προφίλ.

Ένα ακόμη στοιχείο που κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί περαιτέρω είναι η απομακρυσμένη σύνδεση μεταξύ της κοινής συστάδας του ελληνικού saffron και του *C. cartwrightianus* από την Αστυπάλαια με τις συστάδες των υπολοίπων δειγμάτων που εξετάστηκαν. Δεδομένης της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων στη σύσταση των δευτερογενών μεταβολιτών, αλλά και της στενής γενετικής σύνδεσης των *C. sativus* και *C. cartwrightianus*, η απομακρυσμένη σύνδεσή τους με τα είδη της *CrocusBank* πιθανά οφείλεται στη διαφορετική καταγωγή και τόπο παραγωγής τους. Η υπόθεση αυτή κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθεί περαιτέρω τόσο από πλευράς χημειοτυπικής ταξινόμησης των ειδών, αλλά και με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση του τόπου παραγωγής, ως αθροίσματος εδαφικών και κλιματικών παραγόντων, στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του saffron και των άγριων συγγενικών του ειδών.

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει από την ανάλυση με χρήση της HPLC και της φασματοσκοπίας FT-IR, η βοτανική ταξινόμηση των ειδών του γένους *Crocus* δεν είναι επαρκής για τον προσδιορισμό του χημικού τους προφίλ. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη χρήση του saffron ως αρτυματικού και φαρμακευτικού φυτού, υπογραμμίζει την ανάγκη χημειοτυπικού χαρακτηρισμού του *C. sativus* και των συγγενικών του ειδών.

Μεταξύ των ειδών που εξετάστηκαν, αυτά που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ομοιότητα με το ελληνικό saffron ήταν, κατά κύριο λόγο, το *C. cartwrightianus* από την Αστυπάλαια και δευτερευόντως τα *C. thomasii*, *C. cartwrightianus* cv 'albus', *C. longiflorus* - BCU002503 και *C. niveus*. Η ομοιότητα αυτή θα πρέπει να εξετασθεί υπό το πρίσμα πιθανής χρήσης τους για νοθεία του saffron, υπογραμμίζοντας την ανάγκη μελέτης μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων που θα επιτρέπει τον ακριβή χαρακτηρισμό του χημικού τους προφίλ. Ωστόσο, η ομοιότητα τους αυτή με το saffron είναι, επίσης, ένα στοιχείο που αναδεικνύει τις δυνατότητες εμπορικής αξιοποίησής τους ως πρόσθετα τροφίμων και χρήσης τους ως πιθανές πηγές ουσιών με αξιολογη βιολογική δράση, ανάλογη με αυτή του καλλιεργούμενου συγγενή τους.



## 6. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν τα εξής:

1. Σε ότι αφορά στον προσδιορισμό των κύριων συστατικών του saffron, η πλειοψηφία των ελληνικών δειγμάτων κατατάσσεται στην ανώτερη ποιοτική κατηγορία (Κατηγορία I) του προτύπου *ISO 3632* (2011), με υψηλές τιμές έντασης γεύσης και χρωστικής δύναμης, ενώ στην κατώτερη κατηγορία του πρότυπου (Κατηγορία III) κατατάσσεται μηδενικός αριθμός δειγμάτων. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσίασε και για τα δύο αυτά χαρακτηριστικά τιμές σημαντικά υψηλότερες από τις ελάχιστες που απαιτούνται για την ένταξη στην Κατηγορία I, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εφαρμογή του προτύπου δεν επιτυγχάνει αντιπροσωπευτική ποιοτική κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ελληνικού saffron και οδηγεί πιθανά σε υποτίμηση των ποιοτικών του χαρακτηριστικών.

2. Η μέθοδος που περιλαμβάνεται στο πρότυπο *ISO 3632* (2011) δεν επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της πικροκροκίνης σε υδατικά διαλύματα saffron, λόγω της απορρόφησης του συνόλου των κροκινών στα 257 nm, όπου εμφανίζεται το μέγιστο της απορρόφησης της πικροκροκίνης. Επιπρόσθετα, στην περιοχή της μέγιστης απορρόφησης της σαφρανάλης (330 nm) παρατηρείται έντονη απορρόφηση των *cis*-κροκινών, δημιουργώντας πρόβλημα στον ακριβή προσδιορισμό της σαφρανάλης. Παράλληλα, η υψηλή συγκέντρωση κροκινών στα υδατικά εκχυλίσματα saffron είναι πιθανό να επηρεάζει αρνητικά τη διαλυτότητα της σαφρανάλης σε αυτά. Η απουσία εκλεκτικότητας της φασματοσκοπίας UV-Vis σε συνδυασμό με την ασθενή συσχέτιση μεταξύ χαρακτηριστικών που αναφέρονται στη συγκέντρωση του ίδιου συστατικού, υποδηλώνουν μια πιθανή αδυναμία του προτύπου *ISO 3632* (2011) στον ακριβή ποιοτικό χαρακτηρισμό των δειγμάτων saffron.

3. Σε ότι αφορά στην ανάπτυξη και αξιολόγηση εναλλακτικής μεθόδου ποσοτικοποίησης των κροκινών του saffron βασισμένης στη φασματοσκοπία Raman, συμπεραίνεται ότι αυτή οδηγεί σε ποσοτικά αποτελέσματα που εμφανίζουν αρκετά υψηλή συσχέτιση με αυτά που προκύπτουν από την HPLC και επιτρέπει την εκτίμηση της συγκέντρωσης των κροκινών σε υδατικό διάλυμα saffron με μεγαλύτερη ακρίβεια από αυτή που επιτυγχάνεται μέσω της UV-Vis, η οποία χρησιμοποιείται στο πρότυπο *ISO 3632* (2011). Επιπρόσθετα, αυτή η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των κροκινών σε υδατικά διαλύματα saffron μέσω της φασματοσκοπίας Raman συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της μεθόδου του προτύπου (χρήση νερού ως εκχυλιστή διαλύτη, χαμηλό κόστος, μηδενική απαίτηση επεξεργασίας των αποτελεσμάτων), ενώ είναι, παράλληλα, πιο οικονομική και θα μπορούσε να αποτελέσει μια εναλλακτική ή συμπληρωματική του προτύπου *ISO 3632* (2011) μέθοδο.

4. Η ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron με την προτεινόμενη μέθοδο ανίχνευσης της νοθείας η οποία βασίζεται στη φασματοσκοπία FT-IR έδειξε ότι το ελληνικό saffron χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ομοιομορφίας (98,98% σε σύγκριση με περίπου 95% για τα αυθεντικά δείγματα saffron που είχαν διαφορετική προέλευση), γεγονός που αναδεικνύει την ομοιομορφία του ελληνικού προϊόντος.

5. Από την αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθόδου ανίχνευσης της νοθείας του saffron με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR συμπεραίνεται ότι αυτή επιτρέπει τη χρήση του μέσου φάσματος ως αναφορά για τις συγκρίσεις του ελληνικού saffron με

saffron διαφορετικής προέλευσης και με πιθανά νοθευμένα δείγματα στα οποία η νοθεία συνίσταται στην προσθήκη ή την αντικατάσταση των στιγμάτων του *Crocus sativus* από άλλα υλικά φυτικής προέλευσης. Η ικανότητα διάκρισης μεταξύ αυθεντικού saffron και νοθευμένων εμπορικών δειγμάτων μέσω της προτεινόμενης μεθόδου επιβεβαιώθηκε και από το δένδρογράμμο που προέκυψε από την ιεραρχική ανάλυση συστάδων. Επιπρόσθετα, αναδεικνύεται ότι η μέθοδος αυτή είναι πιθανό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη διάκριση της γεωγραφικής προέλευσης του saffron.

6. Με βάση τη μελέτη της ποιοτικής διαφοροποίησης του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των υδατικών εκχυλισμάτων του *Crocus sativus* και άλλων ειδών του γένους *Crocus* με χρήση μεθόδου βασισμένης στην HPLC, συμπεραίνεται ότι η παρουσία ή μη πικροκροκίνης ή σαφρανάλης μπορεί να αποτελέσει δείκτη διάκρισης μεταξύ ειδών του γένους *Crocus* και προτείνεται να εξεταστεί εάν η συγκέντρωση των δύο αυτών ενώσεων στα υδατικά εκχυλίσματα είναι κατάλληλος δείκτης διάκρισης μεταξύ του saffron και των άγριων συγγενικών ειδών στα οποία αυτές εντοπίστηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Αν και δεν ήταν δυνατό να γίνει ταυτοποίηση των μεμονωμένων κροκινών, λόγω έλλειψης φασμάτων μαζών και βιβλιογραφικών δεδομένων, είναι πιθανό η αποτύπωση με ακρίβεια του προφίλ των κροκινών κάθε είδους να επιτρέψει τη χρήση τους ως δείκτες για τη μεταξύ τους διάκριση.

7. Σύμφωνα με τη μελέτη της ποιοτικής διαφοροποίησης του προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών μεταξύ του *Crocus sativus* και άλλων ειδών του γένους *Crocus* με χρήση μεθόδου βασισμένης στη φασματοσκοπία FT-IR, συμπεραίνεται ότι η ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει του συντελεστή συσχέτισης των φασμάτων FT-IR των υδατικών τους εκχυλισμάτων διαφοροποιείται έντονα από τη διάκρισή τους βάσει βοτανικής ταξινόμησης, υποδηλώνοντας την αναγκαιότητα χημειοτυπικού χαρακτηρισμού των φυτικών ειδών, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις αυτών που αξιοποιούνται εμπορικά για τους δευτερογενείς τους μεταβολίτες (φαρμακευτικά, αρωματικά και αρτυματικά φυτά).

8. Ο ακριβής χαρακτηρισμός του χημικού προφίλ των άγριων ειδών του γένους *Crocus* αναμένεται να παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης πιθανής νοθείας του saffron με αυτά, αλλά και να αναδείξει τη δυνατότητα εμπορικής αξιοποίησης ορισμένων άγριων ειδών ως πρόσθετων τροφίμων και χρήσης τους ως πιθανών πηγών ουσιών με αξιόλογη βιολογική δράση. Μεταξύ των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, αξιόλογη ομοιότητα με το ελληνικό saffron παρουσίασε το υδατικό εκχύλισμα του *C. cartwrightianus* από την Αστυπάλαια και δευτερευόντως αυτά των *C. thomasi*, *C. cartwrightianus* cv 'albus', *C. longiflorus* - BCU002503 και *C. niveus*.

Αν και είναι αναγκαία η προσπάθεια βελτιστοποίησης ορισμένων παραμέτρων, καθώς και η περαιτέρω μελέτη μεγαλύτερου αριθμού και ποικιλίας δειγμάτων προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν περιορισμοί στην ικανότητα των μεθόδων που προτάθηκαν και αξιολογήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, αυτές κρίνεται ότι, στο σύνολο τους, μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στη βελτίωση των σύγχρονων μεθόδων για τον προσδιορισμό της ποιότητας, την πιστοποίηση της αυθεντικότητας και τη διάκριση της νοθείας στο saffron.

## Βιβλιογραφία

- Καββάδας, Δ.Σ. (1956). *Εικονογραφημένον Βοτανικόν – Φυτολογικόν Λεξικόν*. (σελ. 2148-2154). Αθήνα.
- Κουτσός, Θ.Β. (2006). *Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά*. (σελ. 181-186). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη.
- Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (2011). Μέρος Α. Τρόφιμα και Ποτά - IV. Αρτυματικές ύλες και αιθέρια έλαια – Άρθρο 42. Είδη Κυρίως Αρτυμάτων. Διεύθυνση Τροφίμων, Γενικό Χημείο του Κράτους.
- Πυλαρά, Α. (2007). *Συμβολή στην κυτταρολογία, μορφομετρία και χημική ανάλυση των στύλων ενδημικών ειδών του γένους *Crocus* L. από την Πελοπόννησο*. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- ΥΠΑΑΤ (2014). *Στατιστικά Δεδομένα – Χρονολογικές Σειρές. Εξέλιξη της καλλιέργειας του κρόκου*. <[http://www.minagric.gr/greek/agro\\_pol/krokos.htm](http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/krokos.htm)> (16 May 2014).
- Χρυσάνθη, Δ. (2010). *Συμβολή στο χαρακτηρισμό και στη διερεύνηση βιολογικών ιδιοτήτων των στύλων ειδών γένους *Crocus**. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Abdullaev, F.I., Riveron-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Manuel Hernández, J., Perez-Lopez, I., Pereda-Miranda, R., & Espinosa-Aguirre, J.J. (2003). Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in Vitro*, 17(5-6), 731-736.
- Abe, K., & Saito, H. (2000). Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytotherapy Research*, 14(3), 149-152.
- Alavizadeh, S.H., & Hosseinzadeh, H. (2014). Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 65-80.
- Al-Eisawi, D. (2001). Two new species of *Iridaceae*, *Crocus naqabensis* and *Romulea petraea*, from Jordan. *Arab Gulf Journal of Scientific Research*, 19(3), 167-169.
- Alonso, G.L., Varon, R., Gomez, R., Navarro, F., & Salinas, M.R. (1990). Auto-oxidation in saffron at 40° C and 75% relative humidity. *Journal of Food Science*, 55(2), 595-596.
- Alonso, G.L., Salinas, M.R., & Garijo, J. (1998). Method to determine the authenticity of aroma of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Food Protection*, 61(11), 1525-1528.
- Alonso, G.L., Salinas, M.R., Sánchez-Fernández, M.A., & Garijo, J. (2000). Note. Physical parameters in controlling saffron quality. *Food Science and Technology International*, 6(1), 59-65.
- Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C. P., Carmona, M., ... & Polissiou, M.G. (2009). Geographical differentiation of saffron by GC-MS/FID and chemometrics. *European Food Research and Technology*, 229(6), 899-905.
- Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., Del Campo, C.P., Carmona, M., ... & Polissiou, M.G. (2010a). Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, 230(4), 571-577.

- Anastasaki, E.G., Kanakis, C.D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., ... & Polissiou, M.G. (2010b). Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 6011-6017.
- Babaei, S., Talebi, M., & Bahar, M. (2014). Developing an SCAR and ITS reliable multiplex PCR-based assay for safflower adulterant detection in saffron samples. *Food Control*, *35*(1), 323-328.
- Basker, D., & Negbi, M. (1983). Uses of saffron. *Economic Botany*, *37*(2), 228-236.
- Berzas Nevado, J.J., Guiberteau Cabanillas, C., & Contento Salcedo, A.M. (1999). Method development and validation for the simultaneous determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, *378*(1), 63-71.
- Bostock J., & Riley H.T. (Eds.) (1855). *The natural history of Pliny the Elder* (Book XXI, Chapter 17). London: Taylor and Francis. <<http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0137%3Abook%3D21%3Achapter%3D17>> (21 March 2014).
- Bown, D. (2008). *The Royal Horticultural Society Encyclopedia of Herbs* (pp. 183-184). London, Great Britain: Dorling Kindersley Limited.
- Brickell, C. (Ed.) (2008). *The Royal Horticultural Society AZ Encyclopedia of Garden Plants* (Vol.1, pp.324-327). London, Great Britain: Dorling Kindersley Limited.
- Caiola, M.G., & Canini, A. (2010). Looking for saffron's (*Crocus sativus* L.) parents. *Functional Plant Science and Biotechnology*, *4*, 1-14.
- Carmona, M., Martinez, J., Zalacain, A., Rodriguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A., & Alonso, G.L. (2006a). Analysis of saffron volatile fraction by TD-GC-MS and e-nose. *European Food Research and Technology*, *223*(1), 96-101.
- Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A.M., Novella, J.L., & Alonso, G.L. (2006b). Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 973-979.
- Carmona, M., Sánchez, A.M., Ferreres, F., Zalacain, A., Tomás-Barberán, F., & Alonso, G.L. (2007). Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food Chemistry*, *100*(2), 445-450.
- Carmona Delgado, M., Zalacain Aramburu, A., & Alonso Díaz-Marta, G.L. (2006). *The chemical composition of saffron: Color, taste and aroma*. Albacete, Spain: Editorial Bomarzo.
- del Campo, C.P., Garde-Cerdán, T., Sánchez, A.M., Maggi, L., Carmona, M., & Alonso, G.L. (2009). Determination of free amino acids and ammonium ion in saffron (*Crocus sativus* L.) from different geographical origins. *Food Chemistry*, *114*(4), 1542-1548.
- Downey, G. (1998). Food and food ingredient authentication by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *Trends in Analytical Chemistry*, *17*(7), 418-424.
- Escribano, J., Alonso, G.L., Coca-Prados, M., & Fernández, J.A. (1996). Crocin, safranin and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer letters*, *100*(1), 23-30.

- Euro+Med (2006-): Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. <<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>> (27 March 2014).
- Fernández, J.A., Santana, O., Guardiola, J.L., Molina, R.V., Heslop-Harrison, P., Borbely, G., ... & De-Los-Mozos-Pascual, M. (2011). The World Saffron and *Crocus* collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilisation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58, 125-137.
- Frello, S., Ørgaard, M., Jacobsen, N. & Heslop-Harrison, J.S. (2004). The genomic organization and evolutionary distribution of a tandemly repeated DNA sequence in the genus *Crocus* (Iridaceae). *Hereditas*, 141: 81–88
- Georghiou, K., & Delipetrou, P. (2010). Patterns and traits of the endemic plants of Greece. *Botanical journal of the Linnean Society*, 162(2), 130-422.
- Georgiadou, G., Grivas, V., Tarantilis, P.A., & Pitsikas, N. (2013). Crocins, the active constituents of *Crocus sativus* L., counteracted ketamine-induced behavioural deficits in rats. *Psychopharmacology*, 1-10.
- Caiola, M.G., Caputo, P. & Zanier, R. (2004). RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biologia Plantarum*, 48(3), 375-380.
- Haghighi, B., Feizy, J., & Kakhki, A.H. (2007). LC determination of adulterated saffron prepared by adding styles colored with some natural colorants. *Chromatographia*, 66(5-6), 325-332.
- Hosseinzadeh, H., & Younesi, H.M. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology*, 2(1), 7.
- Iborra, J.L., Castellar, M.R., Cánovas, M., & Manjón, A. (1992). Picrocrocin hydrolysis by immobilized  $\beta$ -glucosidase. *Biotechnology Letters*, 14(6), 475-480.
- ISO 3632-1 (2003). Saffron (*Crocus sativus* L.) - Specification. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 3632-1 (2011). Saffron (*Crocus sativus* L.) - Specification. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 3632-2 (2011). Saffron (*Crocus sativus* L.) - Test methods. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Javanmardi, N., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Sharifi, A., & Hemati Kakhki, A. (2012). Identification of Safflower as a fraud in commercial Saffron using RAPD/SCAR. *Journal of Cell and Molecular Research*, 3(1), 31-37.
- Kaminski, W., & Kudra, T. (2000). Equilibrium moisture relations for foods and biomaterials (pp. 1-34). In Mujumdar, A.S. (Ed.) *Drying technology in agriculture and food sciences*. Plymouth, UK: Science Publishers Inc.
- Karamplianis, T., Tsiftsis, S., & Constantinidis, T. (2013). The genus *Crocus* (Iridaceae) in Greece: some noteworthy floristic records and karyotypes. *Phytologia Balcanica*, 19 (1), 53-66.
- Kerndorff, H. (1993). Two new taxa in Turkish *Crocus* (Iridaceae). *Herbertia*, 49, 76-86.
- Kerndorff, H. & Pasche, E. (1994). *Crocus mathewii* a new autumn flowering crocus from Turkey. *New Plantsman*, 1, 102–106.
- Maggi, L., Carmona, M., del Campo, C.P., Kanakis, C.D., Anastasaki, E., Tarantilis, P.A., ... & Alonso, G.L. (2009). Worldwide market screening of saffron volatile composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1950-1954.

- Maggi, L., Carmona, M., Zalacain, A., Kanakis, C.D., Anastasaki, E., Tarantilis, P.A., ... & Alonso, G.L. (2010). Changes in saffron volatile profile according to its storage time. *Food Research International*, 43(5), 1329-1334.
- Marieschi, M., Torelli, A., & Bruni, R. (2012). Quality control of saffron (*Crocus sativus* L.): Development of SCAR markers for the detection of plant adulterants used as bulking agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10998-11004.
- Mariotti, M.G. (1988). *Crocus ligusticus* n. sp., a well known species. *Candollea*, 43, 667–680.
- Mathew, B. (1982). *The Crocus. A revision of the genus Crocus (Iridaceae)*. Portland: Timber Press.
- Mathew, B. (1995). An interesting new autumn-flowering *Crocus* from Turkey. *New Plantsman*, 2, 183–183.
- Mathew, B. (2000). *Crocus* L.. In Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. & Başer, K.H.C. (Eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 11 (pp. 271–274). Edinburgh: University Press Edinburgh.
- Mathew, B. (2003). Botany, taxonomy and cytology of *C. Sativus* L. and its allies. In Negbi, M. (Ed.), *Saffron: Crocus Sativus L.* (pp. 19-30). CRC Press.
- McCreery, R.L. (2000). Raman spectroscopy for chemical analysis. In Winefordner, J.D. (Ed.), *Chemical analysis, a series of monographs of analytical chemistry and its applications*, vol. 157. United States of America: John Wiley & Sons Inc.
- Melnyk, J.P., Wang, S., & Marcone, M.F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International*, 43(8), 1981-1989.
- Negbi, M. (2003). Saffron cultivation: past, present and future prospects. In Negbi, M. (Ed.), *Saffron: Crocus Sativus L.* (pp. 1-17). CRC Press.
- Noorbala, A.A., Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., & Jamshidi, A.H. (2005). Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 281-284.
- Nørbæk, R., Brandt, K., Nielsen, J.K., Ørgaard, M., & Jacobsen, N. (2002). Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochemical systematics and ecology*, 30(8), 763-791
- Official Journal of the European Communities* (1999). Commission Regulation (EC) No 378/1999 of 19 February 1999 [L46/13, 19.2.1999].
- Official Journal of the European Communities* (2001). Commission Regulation (EC) No 464/2001 of 7 March 2001 [L66/29, 8.3.2001].
- Official Journal of the European Communities* (2005). Commission Regulation (EC) No 205/2005 of 4 February 2005 [L33/6, 5.2.2005].
- Official Journal of the European Communities* (2009). Commission Regulation (EC) No 98/2009 of 2 February 2009 [L33/8, 3.2.2009].
- Ordoudi, S.A., & Tsimidou, M.Z. (2004). Saffron quality: Effect of agricultural practices, processing and storage. In Dris, R., & Jain, S.M. (Eds.), *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops, Vol. 1, "Preharvest Practice"*, (pp. 209-260). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Ordoudi, S.A., & Tsimidou, M.Z. (2011). Consideration of fluorescence properties for the direct determination of erythrosine in saffron in the presence of other synthetic dyes. *Food Additives and Contaminants*, 28(4), 417-422.

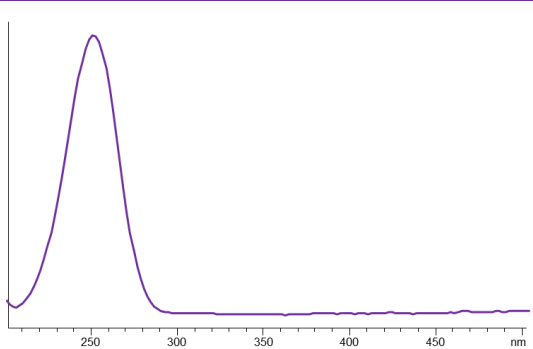
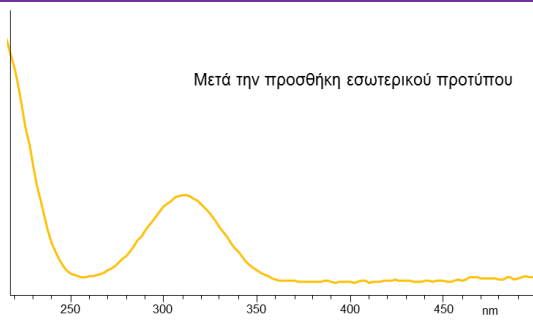
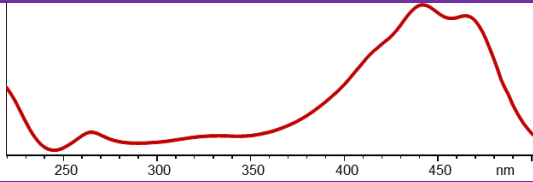
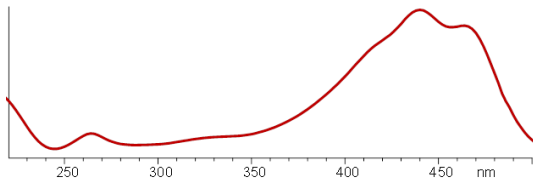
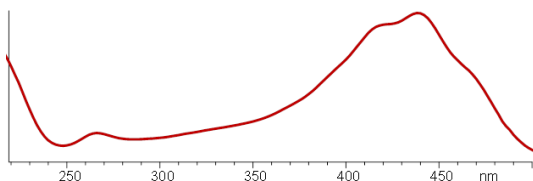
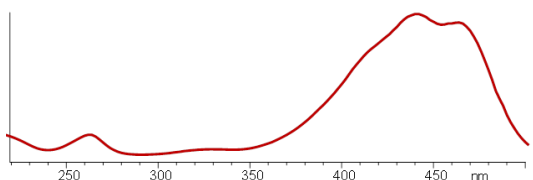
- Ordoudi, S.A., de los Mozos Pascual, M., & Tsimidou, M.Z. (2014). On the quality control of traded saffron by means of transmission Fourier-transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 150, 414-421.
- Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Moschopoulou, E., Moatsou, G., Kandarakis, I., & Polissiou, M.G. (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry*, 106(3), 1271-1277.
- Pasche, E. (1993). A new *Crocus* (*Iridaceae*) from Turkey. *Herbertia*, 49, 67-75.
- Petersen, G., Seberg, O., Thorsøe, S., Jørgensen, T., & Mathew, B. (2008). A phylogeny of the genus *Crocus* (*Iridaceae*) based on sequence data from five plastid regions. *Taxon*, 57(2), 487-499.
- Pitsikas, N., Bouladakis, A., Georgiadou, G., Tarantilis, P.A., & Sakellaridis, N. (2008). Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine*, 15(12), 1135-1139.
- Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T., & Ramesh, A. (2003). Protective effects of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytotherapy Research*, 17(6), 614-617.
- Proyecto SAFFRON (2007). *Libro Blanco, Azafrán en Europa, Problemas y estrategias para valorizar la calidad y mejorar la competitividad*. Unión Europea, INTERREG IIIC.
- Randjelović, N., Hill, D. A., Stamenković, V., & Randjelović, V. (1990). A new species of *Crocus* from Yugoslavia. *Curtis's Botanical Magazine*, 7(4), 182-186.
- Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M., Belligno, A., Traulo, P., & Gagliano, G. (2011). HPLC/PDA/ESI-MS evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration. *Natural Product Communications*, 6(12), 1873-1876.
- Sánchez, A.M., Maggi, L., Carmona, M., & Alonso, G.L. (2011). Authentication of saffron spice (*Crocus sativus* L.) (pp. 309-331). In Ebeler, S.E., Takeoka, G.R., & Winterhalter, P. (Eds.), *Progress in authentication of food and wine - American Chemical Society Symposium Series 1081*. American Chemical Society.
- Sarpaki, A. (2013). *The archaeology of the saffron crocus*. COST Action FA 1101. Saffronomics, WG2 Interim meeting on Phytochemistry and Metabolomics and WG1/WG3/WG4 Looking for Synergy and Dissemination Capacity Building. Chania, Crete, Greece, 30<sup>th</sup> May-1<sup>st</sup> June 2013.
- SAS Institute Inc. (2010). *JMP® 9 Modeling and Multivariate Methods*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schulz, H., Baranska, M., & Baranski, R. (2005). Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers*, 77, 212-221.
- Schuster, R., & Gratzfeld-Hüsgen, A. (1995). *Analysis of synthetic dyes in food samples by capillary zone electrophoresis*. Application Note, Agilent Technologies.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Table and Charts* (3<sup>rd</sup> ed.). West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Tarantilis, P.A. & Polissiou, M.G. (2004). Chemical analysis and antitumor activity of natural and semi-natural carotenoids of saffron. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 650, 447-461.

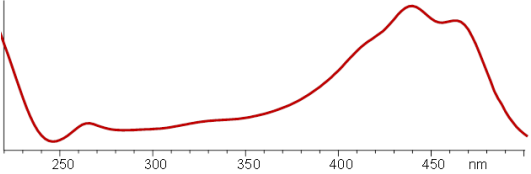
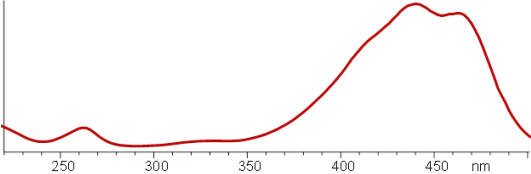
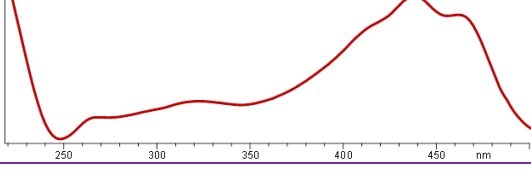
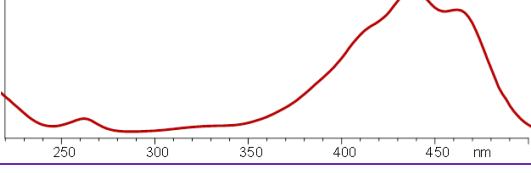
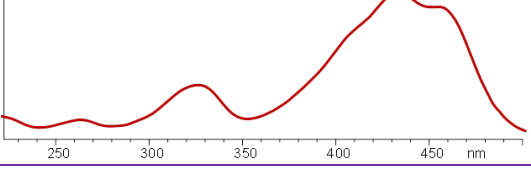
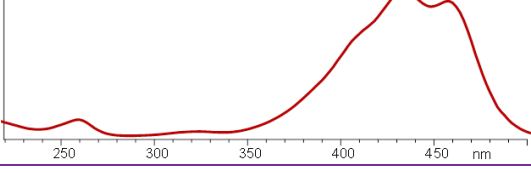
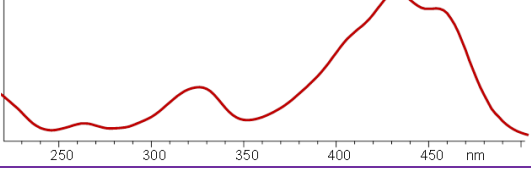
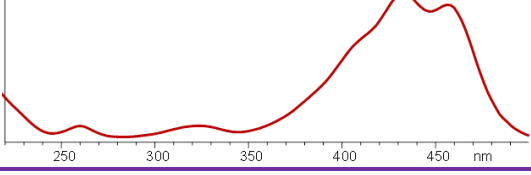
- Tarantilis, P.A., Morjani, H., Polissiou, M., & Manfait, M. (1994a). Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Research* 14, 1913-1918.
- Tarantilis, P.A., Polissiou, M., & Manfait, M. (1994b). Separation of picrocrocin, *cis-trans*-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode - array detection. *Journal of Chromatography A*, 664(1), 55-61.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G., & Polissiou, M. (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 699(1), 107-118.
- Tarantilis, P.A., Beljebbar, A., Manfait, M., & Polissiou, M. (1998). FT-IR, FT-Raman spectroscopic study of carotenoids from saffron (*Crocus sativus* L.) and some derivatives. *Spectrochimica Acta Part A*, 54, 651-657.
- Tarantilis, P.A., Troianou, V.E., Pappas, C.S., Kotseridis, Y.S., & Polissiou, M.G. (2008). Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 111(1), 192-196.
- Tay, A., Singh, R.K., Krishnan, S.S., & Gore, J.P. (2002). Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier transform infrared spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 35(1), 99-103.
- Torelli, A., Marieschi, M., & Bruni, R. (2014). Authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) in different processed, retail products by means of SCAR markers. *Food Control*, 36(1), 126-131.
- Tsimidou, M., & Biliaderis, C.G. (1997). Kinetic studies of saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2890-2898.
- van Wyk, B.E., & Wink, M. (2004). *Medicinal plants of the world* (p. 116). London, United Kingdom, Timber Press.
- WHO (2007). *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants* (Vol. III, pp. 126-135). Geneva, Switzerland, WHO Press.
- Yilmaz, A., Nyberg, N.T., Mølgaard, P., Asili, J., & Jaroszewski, J.W. (2010). <sup>1</sup>H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts. *Metabolomics*, 6(4), 511-517.
- Yüzbaşıoğlu, S., & Varol, Ö. (2004). A new autumn-flowering *Crocus* from SW Turkey. *Plantsman*, 3, 104-106.
- Zalacain, A., Ordoudi, S A., Blázquez, I., Díaz-Plaza, E.M., Carmona, M., Tsimidou, M.Z., & Alonso, G.L. (2005a). Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin. *Food additives and contaminants*, 22(7), 607-615.
- Zalacain, A., Ordoudi, S.A., Díaz-Plaza, E.M., Carmona, M., Blázquez, I., Tsimidou, M.Z., & Alonso, G.L. (2005b). Near-infrared spectroscopy in saffron quality control: determination of chemical composition and geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9337-9341.
- Zougagh, M., Ríos, A., & Valcárcel, M. (2005). An automated screening method for the fast, simple discrimination between natural and artificial colorants in commercial saffron products. *Analytica Chimica Acta*, 535(1), 133-138.

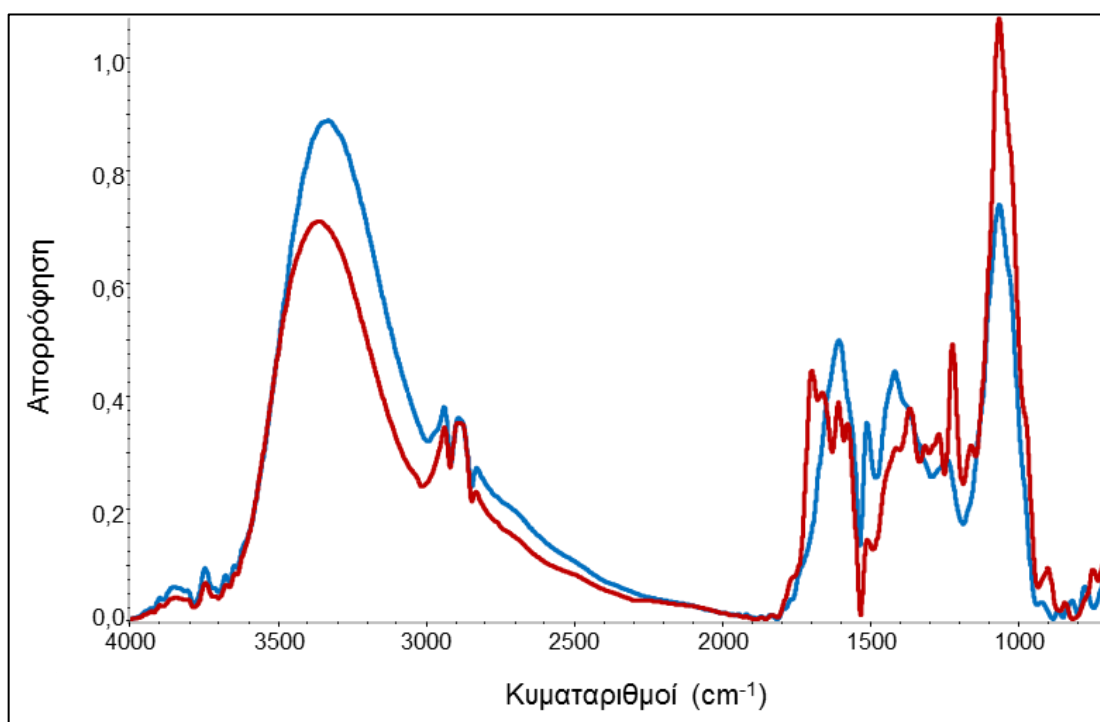


## Παράρτημα

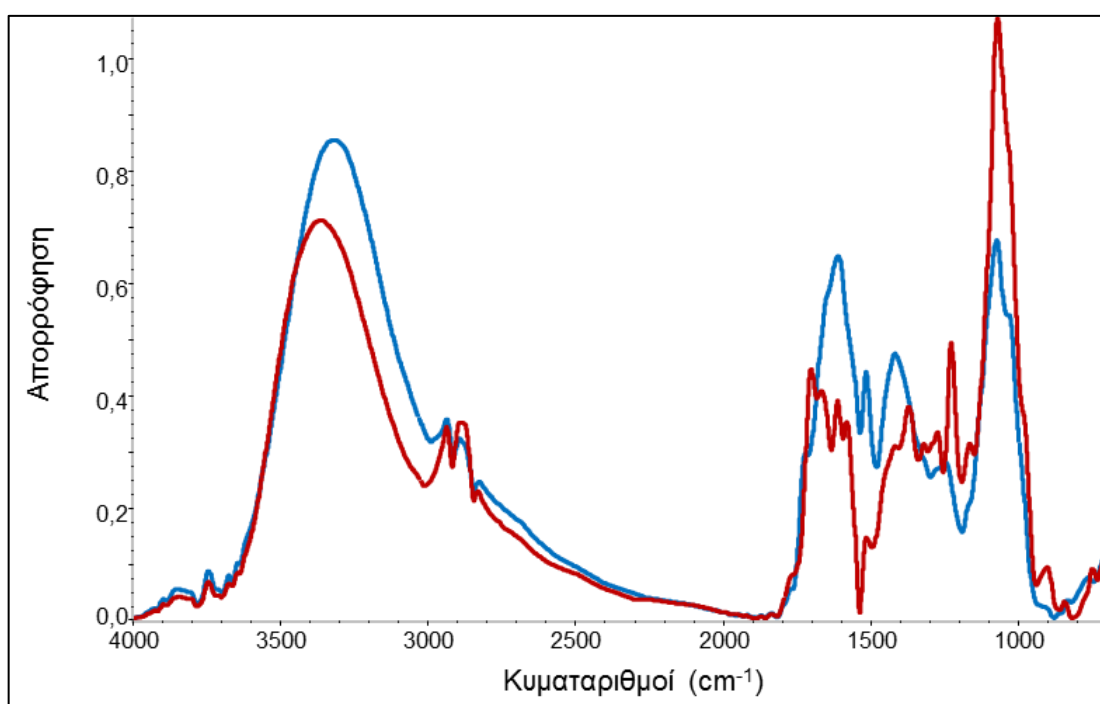
**Πίνακας Π1** Συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων saffron που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με χρήση της HPLC, ο χρόνος έκλουσης ( $t_R$ ) και το φάσμα UV-Vis που παρουσίασαν.

	Χρόνος έκλουσης ( $t_R$ )	Φάσμα UV-Vis
Πικροροκίνη	8,6 min	
Σαφρανάλη	19,6 min	Μετά την προσθήκη εσωτερικού προτύπου 
<i>trans</i> -5-tG	10,7 min	
<i>trans</i> -5-nG	11,0 min	
<i>cis</i> -5-tG	11,2 min	
<i>trans</i> -4-GG	11,3 min	

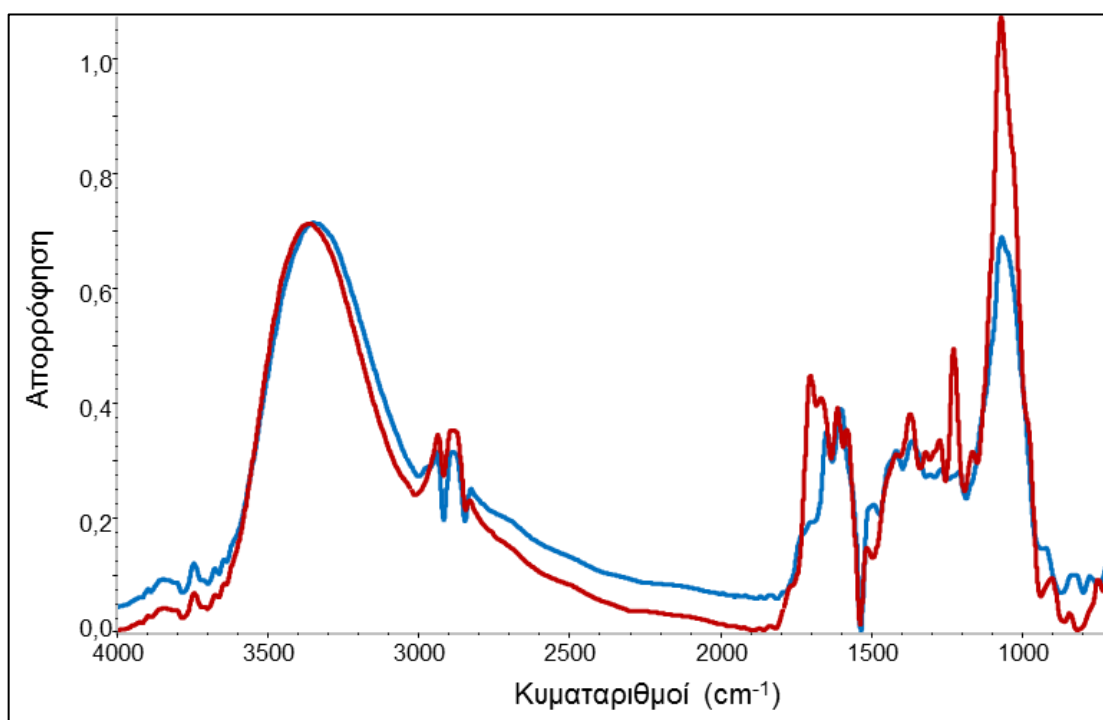
	Χρόνος έκλουσης ( $t_R$ )	Φάσμα UV-Vis
<i>trans</i> -4-ng	11,6 min	
<i>trans</i> -3-Gg	11,8 min	
Μη ταυτοποιημένη <i>cis</i> κροκίνη	12,1 min	
<i>trans</i> -2-gg	12,5 min	
<i>cis</i> -4-GG	13,0 min	
<i>trans</i> -2-G	13,4 min	
Μη ταυτοποιημένη <i>cis</i> κροκίνη	13,6 min	
Μη ταυτοποιημένη <i>cis</i> κροκίνη	14,5 min	



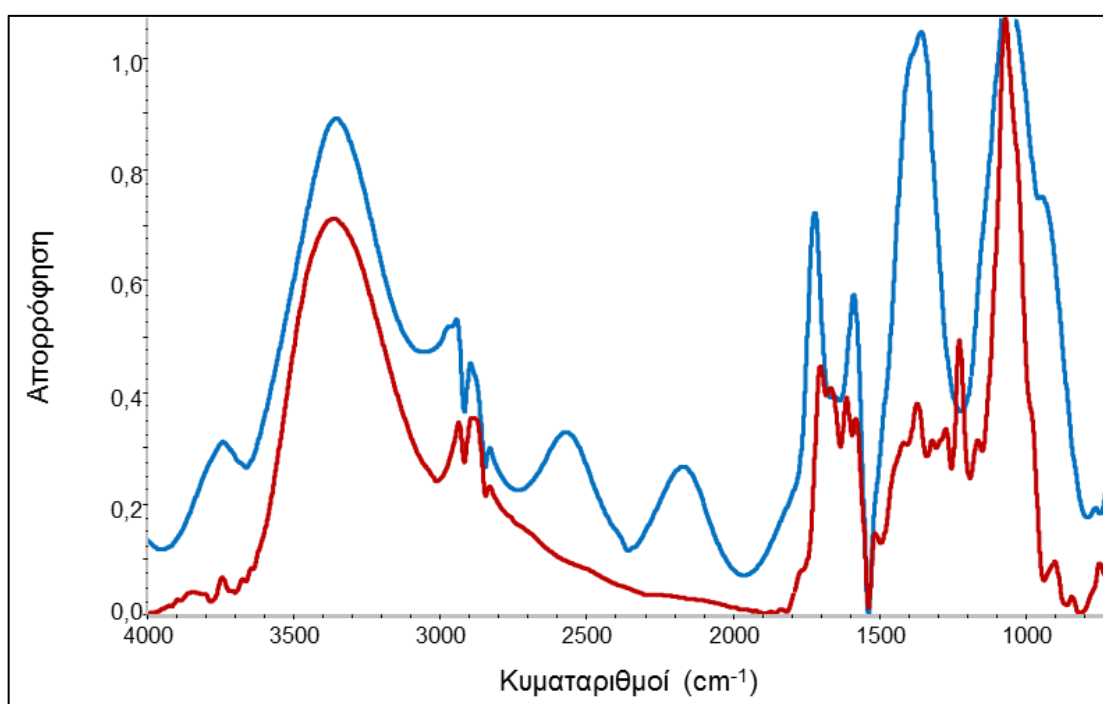
**Γράφημα Π1** Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την ονομασία “saffron” (Τουρκία) και μορφή ταξιανθιών του *Carthamus tinctorius* (μπλε).



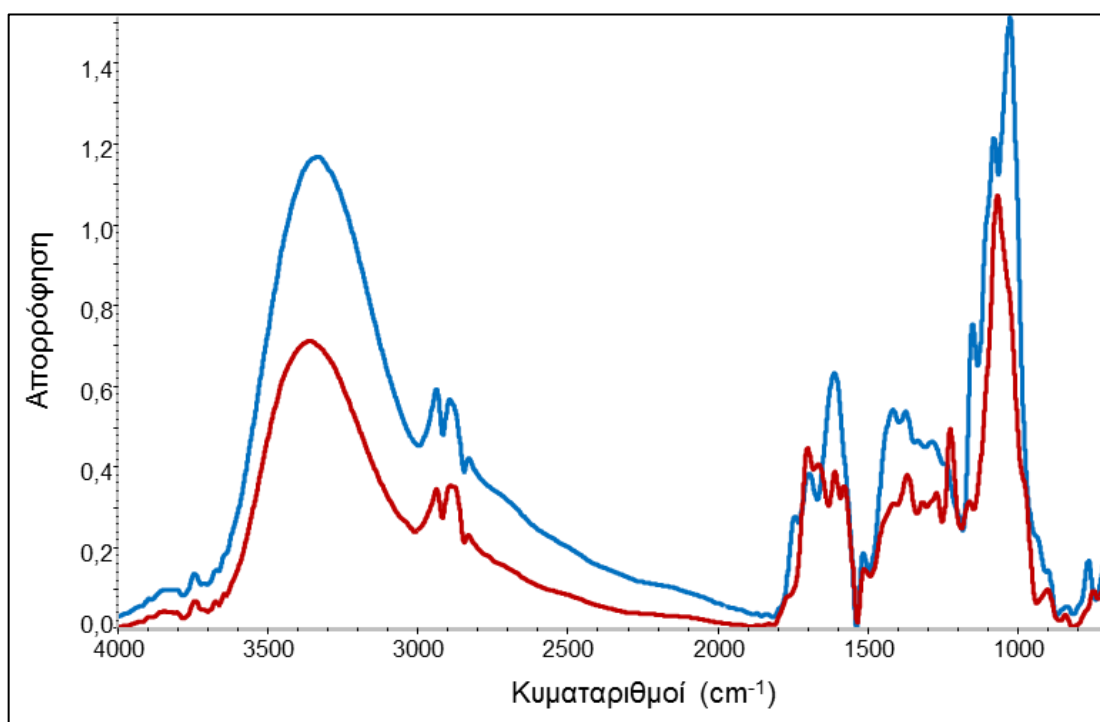
**Γράφημα Π2** Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την ονομασία “saffron” (Τουρκία) και μορφή σκουρόχρωμης πούδρας (μπλε).



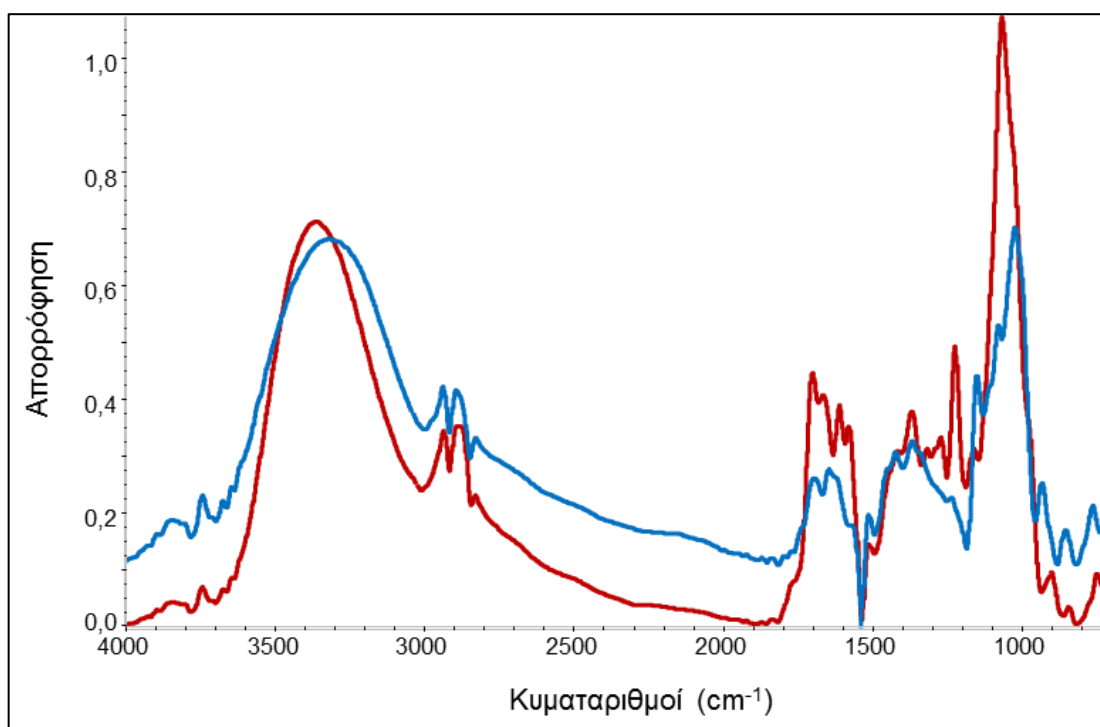
**Γράφημα Π3** Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την με ονομασία “Άγιος Κρόκος” (Ελλάδα) και μορφή πορτοκαλί στιγμάτων σαφώς διάφορων του *Crocus sativus* (μπλε).



**Γράφημα Π4** Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού προϊόντος με την ονομασία “saffron” (Ισπανία) και μορφή κόκκινων ινών (μπλε).



**Γράφημα Π5** Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εμπορικού εκχυλίσματος καρπών *Gardenia jasminoides* με μορφή κίτρινης πούδρας (μπλε).



**Γράφημα Π6** Φάσματα FT-IR υδατικών εκχυλισμάτων ελληνικού saffron (κόκκινο) και εκχυλίσματος *Gardenia jasminoides* (*Gardenia C046*) με μορφή πορτοκαλί πούδρας (μπλε).

Πίνακας Π2 Άγρια είδη του γένους *Crocus* που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία.

α/α*	Κωδικός δείγματος	Είδος	Υπο-τάχα	Προέλευση
1	BCU001657	<i>C. serotinus</i> Salisb.	-	Jaén, Ισπανία
2	BCU001816	<i>C. speciosus</i> M. Bieg.	cv. 'Conqueror'	Άγνωστη
3	BCU001818	<i>C. speciosus</i> M. Bieg.	-	Άγνωστη
4	BCU001820	<i>C. dalmaticus</i> Vis.	-	Άγνωστη
5	BCU001822	<i>C. vernus</i>	subsp. <i>albiflorus</i>	Άγνωστη
6	BCU001824	<i>C. serotinus</i> Salisb.	subsp. <i>salzamanii</i> (J. Gay)	Άγνωστη
7	BCU001827	<i>C. olivieri</i> J. Gay	-	Άγνωστη
8	BCU001828	<i>C. corsicus</i> Maw	-	Άγνωστη
9	BCU001829	<i>C. tommasinianus</i> Herb.	-	Άγνωστη
10	BCU001831	<i>C. speciosus</i> M. Bieg.	-	Άγνωστη
11	BCU001833	<i>C. imperati</i> Ten.	subsp. <i>suaveolens</i> (Bertol.) B. Mathew	Άγνωστη
12	BCU001834	<i>C. cartwrightianus</i> Herb.	cv. 'Albus', συν. <i>Crocus sativus</i> var. <i>cartwrightianus</i>	Άγνωστη
13	BCU001835	<i>C. laevigatus</i> Bory & Chaub.	var. <i>Fontenay</i>	Άγνωστη
14	BCU001837	<i>C. serotinus</i> Salisb.	subsp. <i>clusii</i> (J. Gay) B. Mathew	Άγνωστη
15	BCU001840	<i>C. niveus</i> Bowles	-	Άγνωστη
16	BCU001841	<i>C. korolkowii</i> Maw & Regel	cv. 'Kiss of Spring'	Άγνωστη
17	BCU001842	<i>C. versicolor</i> Ker Gawl.	cv. 'Picturatus'	Άγνωστη
18	BCU001843	<i>C. minimus</i> DC.	-	Άγνωστη
19	BCU001846	<i>C. pulchellus</i> Herb.	-	Άγνωστη
20	BCU001847	<i>C. biflorus</i> Mill.	subsp. <i>weldenii</i> 'Albus' Hoppe & Furnr.	Άγνωστη
21	BCU001849	<i>C. ancyrensis</i> (Herb.) Maw	-	Άγνωστη
22	BCU001850	<i>C. flavus</i> Weston	subsp. <i>flavus</i>	Άγνωστη
23	BCU001851	<i>C. fleischeri</i> Gay	-	Άγνωστη
24	BCU001852	<i>C. sieberi</i> J. Gay	-	Άγνωστη
25	BCU001854	<i>C. vernus</i> (L.) Hill	subsp. <i>vernus</i> (= <i>heuffelianus</i> Herbert)	Άγνωστη
26	BCU002359	<i>C. nevadensis</i> Amo	-	Cuenca, Ισπανία
27	BCU002501	<i>C. longiflorus</i> Rafin	-	Catania, Ιταλία
28	BCU002502	<i>C. thomasii</i> Ten	-	Bari, Ιταλία
29	BCU002503	<i>C. longiflorus</i> Rafin	-	Vibo Valentia, Ιταλία
30	-	<i>C. cartwrightianus</i> Herb.	-	Αστυπάλαια, Ελλάδα
31	-	<i>C. sieberi</i> J. Gay	subsp. <i>sublimis</i> (Herb.) B. Mathew	Πελοπόννησος, Ελλάδα
32	-	<i>C. sieberi</i> J. Gay	subsp. <i>atticus</i> (Boiss. & Orph.) B. Mathew	Αττική, Ελλάδα

\* Τα δείγματα 1-29 ανήκουν στη συλλογή της Παγκόσμιας Τράπεζας Γενετικού Υλικού του γένους *Crocus* (CrocusBank - Centro Agrario de Albaladejito, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Cuenca, Ισπανία). Τα δείγματα 30-32 προέρχονται από τη συλλογή του Εργαστηρίου Χημείας του ΓΠΑ.