

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ



Νέες προσεγγίσεις στη Φυτοχημική Ανάλυση:

Ανάπτυξη μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού, ελέγχου αυθεντικότητας και εκτίμησης βιοδραστικότητας δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών ενόργανης ανάλυσης και χημειομετρίας

Ελευθέριος Α. Πετράκης

Γεωπόνος MSc

Επιβλέπων Καθηγητής: Μόσχος Γ. Πολυσίου

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ



Νέες προσεγγίσεις στη Φυτοχημική Ανάλυση:

Ανάπτυξη μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού, ελέγχου αυθεντικότητας και εκτίμησης βιοδραστικότητας δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών ενόργανης ανάλυσης και χημειομετρίας

Ελευθέριος Α. Πετράκης

Γεωπόνος MSc

Επιβλέπων Καθηγητής: Μόσχος Γ. Πολυσίου

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2016

Διδακτορική Διατριβή

Νέες προσεγγίσεις στη Φυτοχημική Ανάλυση:

Ανάπτυξη μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού, ελέγχου αυθεντικότητας και εκτίμησης βιοδραστικότητας δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών ενόργανης ανάλυσης και χημειομετρίας

Ελευθέριος Α. Πετράκης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Μ. Πολυσίου, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ

Μέλη: Β. Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Π. Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μ. Πολυσίου, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ

Β. Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Π. Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Α. Καλοκαιρινός, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Α. Κυμπάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΔΠΘ

Χ. Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Α. Μιχαηλάκης, Ερευνητής Β' ΜΦΙ

Αθήνα 2016

Αξιολογώντας τα ερευνητικά αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής του κ. Ε. Πετράκη, τα μέλη της Επιτροπής έκριναν ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης.

Η Εξεταστική Επιτροπή διαπίστωσε ότι κατά τη δημόσια ανάπτυξη της διατριβής του, ο κ. Ε. Πετράκης υποστήριξε το θέμα με σαφήνεια και επιστημονική ακρίβεια.

Η Εξεταστική Επιτροπή δέχθηκε ότι η διδακτορική διατριβή του κ. Ε. Πετράκη με τίτλο **«ΝΕΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ, ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑΣ»** πληροί τις προϋποθέσεις της κείμενης Πανεπιστημιακής Νομοθεσίας και του Εσωτερικού κανονισμού του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και τον κρίνει άξιο για να του απονεμηθεί ο τίτλος του Διδάκτορα των Γεωπονικών Επιστημών με βαθμό ΑΡΙΣΤΑ (10)

Η ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

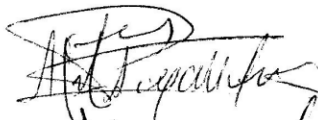
Μ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ, Ομ. Καθηγητής ΓΠΑ - Επιβλέπων



Β. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ-ΚΟΚΟΤΟΥ, Καθηγήτρια ΓΠΑ



Π. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ



Α. ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΟΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ



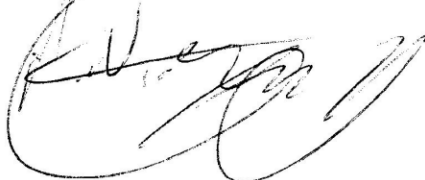
Α. ΚΥΜΠΑΡΗΣ, Αν. Καθηγητής ΔΠΘ



Χ. ΠΑΠΠΑΣ, Επ. Καθηγητής ΓΠΑ



Α. ΜΙΧΑΗΛΑΚΗΣ, Ερευνητής Β' ΜΦΙ



Στη Μνήμη του Πατέρα μου

Στη Μητέρα μου

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, στη Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διατριβής, Ομ. Καθηγητή Μόσχο Πολυσιού, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, είτε μέσω των σπουδών είτε μέσω των ερευνητικών προγραμμάτων που μου έδωσε τη δυνατότητα να συμμετάσχω. Ήταν μεγάλη μου τιμή να συνεργαστώ με έναν, δικαίως, διακεκριμένο επιστήμονα παγκοσμίως, αλλά κυρίως με έναν Άνθρωπο που έδειξε περίσσεια κατανόηση και συμπαραστάθηκε σε κάθε μεγάλη μου δυσκολία που προέκυψε στη διαδρομή αυτή.

Οφείλω, έπειτα, να ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Αν. Καθηγητή Αθανάσιο Κυμπάρη, ο οποίος αποτέλεσε τον εργαστηριακό μου “πατέρα” από τους πρώτους κιόλας μήνες των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Η διάθεσή του να μου μεταδίδει απλόχερα κάθε είδους γνώση ήταν αξιοσημείωτη και συγκινητική. Τον ευχαριστώ, επίσης, για τη δυνατότητα που μου χάρισε να συνεργαστούμε σε ερευνητικά προγράμματα. Θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στον Αν. Καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη για τις πάντοτε πολύτιμες συμβουλές του αλλά και για την καθοδήγησή του, ιδίως σε κρίσιμα σημεία της πορείας αυτής. Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Βιολέττα Κωνσταντίνου-Κόκοτου για τη συμβολή της και την παρότρυνσή της να φθάσει η διατριβή στην ολοκλήρωσή της. Ευχαριστώ πολύ, επίσης, τον Επ. Καθηγητή Χρήστο Παππά για την αρμονική συνεργασία και τις πάντοτε επικοινωνητικές συζητήσεις που είχαμε, επιστημονικού και μη περιεχομένου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή Αντώνιο Καλοκαιρινό για την τιμή να συμμετέχει ως μέλος στην Επταμελή Επιτροπή. Η συνεργασία μας, όποτε δόθηκε η ευκαιρία, με το μέλος της Επταμελούς Επιτροπής Δρ. Αντώνιο Μιχαηλάκη, Ερευνητή Β΄ του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, ήταν άριστη και τον ευχαριστώ για αυτό, όπως επίσης τον ευχαριστώ θερμά για τη συνεισφορά του και την παραχώρηση των αποτελεσμάτων από τις βιοδοκιμές προνυμφοκτόνου δράσης.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ. Roberto Consonni και στη Δρ. Laura Ruth Cagliani για την άψογη συνεργασία μας και τη ζεστή φιλοξενία τους στο Ινστιτούτο Μελέτης Μακρομορίων του Εθνικού Κέντρου Ερευνών στο Μιλάνο. Τους ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συμβολή τους στην καταγραφή, ερμηνεία και επεξεργασία των φασμάτων NMR. Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω επίσης στον Καθ. John Kalivas, για τη φιλοξενία στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου της Πολιτείας του Αϊντάχο, καθώς αποτέλεσε για εμένα σταθμό στον κόσμο της Χημειομετρίας. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Καθ. Κ. Γεωργίου για την υποστήριξη και το ενδιαφέρον του στο έργο μου και τους πάντοτε γόνιμους διαλόγους. Τα διαλείμματα για τσιγάρο ήταν απλά η αφορμή για ένα ενδιαφέρον επιστημονικό “ταξίδι”.

Ευχαριστώ θερμά τον Γιώργο Κόσσυφα και τη Ζαχαρούλα Θαλασσινού για τη βοήθειά τους όποτε χρειάστηκε εντός εργαστηρίου, καθώς και για τη φιλία τους. Στα χρόνια αυτά η συνεργασία με πολλούς ανθρώπους από το χώρο του εργαστηρίου οδήγησε σε μακρόχρονες φιλίες και οφείλω για αυτό να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους Στράτο Κωμαΐτη, Χάρη Κανάκη, Νάντια Ασπρακά, Ειρήνη Αναστασάκη, Δήμητρα Δαφερέρα και Μιχάλη Χριστοδούλου. Ευχαριστώ, επίσης, το προσωπικό που βρίσκεται ή πέρασε από το Εργαστήριο Χημείας για το ευχάριστο κλίμα και τις πολλές καλές στιγμές.

Ευχαριστώ το κληροδότημα Τριανταφυλλίδη για την παροχή υποτροφίας κατά τα πρώτα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, καθώς και τη δράση COST “Saffronomics” για τη δυνατότητα παραμονής μου για βραχύ χρονικό διάστημα στο Εργαστήριο NMR στο Μιλάνο.

Η διατριβή αυτή θα ήταν αδύνατο να εκπονηθεί χωρίς την υποστήριξη της οικογένειάς μου. Ευχαριστώ καθένα από τα αδέρφια μου ξεχωριστά για τη συμπαράσταση και την κάθε είδους συνδρομή όποτε χρειάστηκε. Ευχαριστώ και τον αδερφικό μου φίλο Στέλιο Ασκοξυλάκη για την καθοριστική συμβολή του. Η σύντροφός μου Ανδρομάχη υπήρξε, τέλος, το στήριγμά μου, προκειμένου να περατωθεί η διατριβή αυτή. Τα “ευχαριστώ” δεν αρκούν για την υπομονή, την επιμονή και την αγάπη της.

Ελευθέριος Α. Πετράκης

Αθήνα, Νοέμβριος 2016

Περίληψη

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αρχικά αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό επιλεγμένων δευτερογενών μεταβολιτών με βιολογικό ενδιαφέρον, όπως το μονοτερπένιο πουλεγόνη, που απαντά κυρίως στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Mentha pulegium* L. (κοινώς φλισκούνη), και οι οργανοθειούχες ενώσεις αλλίνη και μεθίνη, οι οποίες αποτελούν τα σημαντικότερα σουλφοξείδια της S-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης που εντοπίζονται στους βολβούς του φυτού *Allium sativum* L. (κοινώς σκόρδο).

Πιο αναλυτικά, η πουλεγόνη αποτελεί αμφιλεγόμενο συστατικό τροφίμων, ποτών και καλλυντικών, εξαιτίας της τοξικότητας που μπορεί να προκαλέσει στον άνθρωπο σε υψηλές συγκεντρώσεις. Για το λόγο αυτό, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει καθορίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια περιεκτικότητας σε πουλεγόνη για επιμέρους κατηγορίες τροφίμων και ποτών. Προκειμένου να καταστεί εφικτή η άμεση και γρήγορη ποσοτικοποίηση της πουλεγόνης στο φυσικό προϊόν που αποτελεί βασική της πηγή, το έλαιο από φλισκούνη, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) σε συνδυασμό με την παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της μεθόδου ήταν, κατά κύριο λόγο, αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν από ξηρή δρόγη φυτικών δειγμάτων διαφορετικών πληθυσμών της Ελλάδας με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης σε συσκευή Clevenger. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προτεινόμενη μέθοδος που βασίστηκε στα φασματοσκοπικά δεδομένα της περιοχής 1650-1260 cm^{-1} αποδείχθηκε ισοδύναμη, βάσει των στατιστικών ελέγχων F και t , με την αεριοχρωματογραφική μέθοδο αναφοράς (GC-FID) για εύρος συγκεντρώσεων πουλεγόνης από 157 έως 860 mg/mL .

Η αλλίνη και η μεθίνη αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πλήθους βιοδραστικών μορίων του σκόρδου. Για τον ποσοτικό τους προσδιορισμό αναπτύχθηκαν, σε πρώτη φάση, νέες μέθοδοι με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) συζευγμένης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) ή φασματομετρίας μαζών - ιονισμού με ηλεκτροψεκάσμο (ESI-MS). Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM), μέσω του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD), χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών των δύο

μεθόδων, με παράγοντες την τιμή pH και την αναλογία (%) ακετονιτριλίου/νερού στην κινητή φάση. Η ανάλυση σε δείγματα σκόρδου διαφορετικής προέλευσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μεθανολικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν. Με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) και της πολυμεταβλητής ανάλυσης φασματοσκοπικών δεδομένων αναπτύχθηκε μια εναλλακτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της αλλιλίνης και της μεθιλίνης στα μεθανολικά εκχυλίσματα από δείγματα σκόρδου. Για την ανάπτυξη των στατιστικών μοντέλων παλινδρόμησης με τη μέθοδο PLS, χρησιμοποιήθηκαν ως τιμές αναφοράς οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν με υγρή χρωματογραφία.

Στη συνέχεια της διατριβής πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος αυθεντικότητας στα στίγματα του κρόκου (*Crocus sativus* L.), που συνιστούν το ακριβότερο άρτυμα στην παγκόσμια αγορά και επομένως έναν από τους επικρατέστερους στόχους για νοθεία. Η πρώτη μελέτη βασίστηκε στη χημειομετρική ανάλυση του αποτυπώματος των μεταβολιτών που καταγράφηκε με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR), με σκοπό την ανίχνευση νοθείας του κρόκου με χαρακτηριστικά φυτικά υλικά, όπως οι στήμονες του φυτού *C. sativus*, τα πέταλα κάρθαμου (*Carthamus tinctorius* L.), ο κουρκουμάς (*Curcuma longa* L.) και το εκχύλισμα των καρπών γαρδένιας (*Gardenia jasminoides* Ellis). Για τη λήψη των φασμάτων ^1H NMR χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα αυθεντικών και νοθευμένων δειγμάτων κρόκου σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6). Τα μοντέλα επιβλεπόμενης ταξινόμησης που αναπτύχθηκαν μέσω διαχωριστικής ανάλυσης με ορθογώνια προβολή σε λανθάνουσες δομές (OPLS-DA, O2PLS-DA) υποδεικνύουν ότι μπορεί να γίνει αξιόπιστη εκτίμηση της ύπαρξης και του είδους νοθείας κατ' ελάχιστο στο επίπεδο του 20% (w/w), μέσω της μη στοχευόμενης διερεύνησης του συνολικού αποτυπώματος μεταβολιτών που προκύπτει με ^1H NMR. Με τη δεύτερη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν η φασματοσκοπική τεχνική DRIFTS και χημειομετρικές τεχνικές ταξινόμησης και ποσοτικοποίησης, επιτεύχθηκε μια ολοκληρωμένη αναλυτική προσέγγιση της νοθείας του κρόκου με φυτικά υλικά. Εκτός των προαναφερθέντων υλικών νοθείας ελέγχθηκαν, επίσης, τα πέταλα καλέντουλας (*Calendula officinalis* L.) και το εκχύλισμα από άνθη του φυτού *Buddleja officinalis* Maxim. Στο πρώτο στάδιο αναπτύχθηκε ένα μοντέλο ανίχνευσης νοθείας με τα έξι επιμέρους φυτικά υλικά, κάνοντας χρήση ολόκληρου του φασματοσκοπικού αποτυπώματος ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$). Για το δεύτερο μοντέλο ταξινόμησης αξιοποιήθηκαν τα δεδομένα της περιοχής

2000-600 cm^{-1} , όπου εντοπίστηκαν οι σημαντικότερες διαφοροποιήσεις λόγω των απορροφήσεων χαρακτηριστικών δευτερογενών μεταβολιτών των υλικών. Η αναγνώριση του υλικού νοθείας στα νοθευμένα δείγματα υλοποιήθηκε με μεγάλη ευαισθησία, σε ελάχιστο ποσοστό 5% (w/w). Και στις δύο περιπτώσεις έγινε επιβλεπόμενη αναγνώριση προτύπων με διαχωριστική ανάλυση μέσω παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους υλικών στα νοθευμένα δείγματα, τα βέλτιστα μοντέλα PLS που προέκυψαν, για εύρος νοθείας 0-20% (w/w), βασίστηκαν στην επιλογή μεταβλητών από τα φασματικά διαστήματα που εμφάνισαν μέγιστη συνέργεια (siPLS). Η συνολική επίδοση των μοντέλων PLS/siPLS καθώς και τα όρια ανίχνευσης, τα οποία κυμάνθηκαν από 1.0 έως 3.1% (w/w), αναδεικνύουν το ιδιαίτερο πρακτικό ενδιαφέρον της μεθοδολογίας για την αντιμετώπιση περιπτώσεων νοθείας με υλικά φυτικής προέλευσης.

Επιπλέον, μελετήθηκε η νοθεία του κρόκου με τις συνθετικές χρωστικές Sudan I-IV, οι οποίες είναι αζωχρώματα απαγορευμένα στις περισσότερες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ευρωπαϊκής Ένωσης, για χρήση σε τρόφιμα λόγω πιθανής καρκινογένεσης. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε μια νέα προσέγγιση με τη χρήση της φασματοσκοπίας ^1H NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Όπως αποδείχθηκε, διαφορετικά σήματα πρωτονίων (^1H) αρωματικών δακτυλίων μπορούν να ληφθούν υπόψη για τον εντοπισμό καθεμίας από τις χρωστικές Sudan I-IV σε ενδεχόμενη νοθεία αυτού του τύπου στον κρόκο, τα οποία ακολούθως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των χρωστικών με ^1H NMR (qHNMR). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτέλεσε η ποσοτικοποίηση του Sudan III που πραγματοποιήθηκε σε διάφορα επίπεδα νοθείας (0.14-7.1 g/kg), εξετάζοντας τη φασματική ταινία που εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση 8.064 ppm. Η υψηλή γραμμικότητα, ακρίβεια και ταχύτητα των αναλύσεων έδειξαν πως η μέθοδος με φασματοσκοπία ^1H NMR είναι ικανή για τον έλεγχο της νοθείας του κρόκου με χρωστικές ουσίες της οικογένειας Sudan.

Από τα ευρήματα της διατριβής προέκυψε, τέλος, ότι η φασματοσκοπία FT-IR μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική, μη καταστρεπτική τεχνική για τη διερεύνηση της βιοδραστικότητας τερπενοειδών ενώσεων σε προνύμφες κουνουπιών του είδους *Culex ripiens* L. Σύμφωνα με τα φάσματα FT-IR που καταγράφηκαν, συγκεκριμένες ταινίες απορρόφησης χαρακτηριστικής έντασης οφείλονται στην ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων που μπορούν να καθορίζουν τη δραστικότητα μορίων με ανάλογη δομή. Έπειτα από τον έλεγχο της τοξικής δράσης

Abstract

In this thesis, new methods were initially developed for the quantification of selected biologically active secondary metabolites, such as pulegone, a monoterpene ketone occurring primarily in the essential oil of the plant *Mentha pulegium* L. (pennyroyal), as well as the organosulfur compounds alliin and methiin, which represent the major *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides identified in bulbs of *Allium sativum* L. (garlic).

More specifically, pulegone constitutes a controversial ingredient in foods, beverages, or cosmetics mainly due to its relevance to human toxicity when present at high concentrations. As a matter of fact, the European Commission has set maximum permitted levels for pulegone content in different categories of foods and beverages. The direct and rapid quantification of pulegone in its key source, pennyroyal essential oil, was achieved by means of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy combined with partial least squares (PLS) regression. The samples used for evaluating the calibration model developed were mainly essential oils obtained from different Greek pennyroyal populations by hydrodistillation, using a Clevenger-type apparatus. The pulegone content ranged from 157 to 860 mg/mL. The proposed method that utilizes spectroscopic data from the region 1650-1260 cm^{-1} showed equivalent results to those obtained when using the standard gas chromatographic method (GC-FID), as demonstrated by the statistical *F* and *t* tests.

Alliin and methiin act as precursors for a wide range of bioactive molecules in garlic. For the determination of these compounds, new methods were developed at first using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with photodiode array (PDA) or mass spectrometry - electrospray ionization (ESI-MS) detection. Response surface methodology (RSM), through central composite design (CCD), was employed to optimize the conditions of both methods; the factors investigated were the pH value and the proportion (%) of acetonitrile/water in the mobile phase. The analysis of garlic samples of diverse origin was performed using the methanolic extracts obtained. Subsequently, a new method was developed using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and multivariate analysis of spectroscopic data, which appeared to be an alternative for the quantification of alliin and

methiin in methanolic garlic extracts. The reference values used to develop PLS calibration models were determined by using liquid chromatography.

The development of new methods for saffron authentication followed. Saffron, the dried red stigmas of *Crocus sativus* L., comprises the most expensive spice in the global market and thereby is among the major candidates for economically motivated adulteration. The first study was based on metabolite fingerprinting by ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy with a view to detecting saffron adulteration with characteristic plant-derived materials, including *C. sativus* stamens, *Carthamus tinctorius* L. petals (safflower), *Curcuma longa* L. powdered rhizomes (turmeric), and *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extract (gardenia). ^1H NMR spectra of pure and adulterated saffron samples were acquired from the corresponding DMSO- d_6 extracts. The supervised classification models built by using orthogonal projection to latent structures - discriminant analysis (OPLS-DA) and its bidirectional modification (O2PLS-DA) indicate that untargeted ^1H NMR metabolite fingerprinting and chemometrics enable the reliable detection and identification of plant-derived adulterants at a minimum level of 20% (w/w). In the next study, the use of DRIFTS in conjunction with multivariate classification and calibration techniques resulted in an integrated analytical approach for assessing saffron adulteration with bulking agents of plant origin. In addition to the aforementioned materials, *Calendula officinalis* L. petals (calendula) and *Buddleja officinalis* Maxim. flower bud extract (buddleja) were also examined. The first step was to develop a classification model capable of detecting saffron adulteration with the six plant-derived materials, by making use of mid-infrared fingerprints ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$). The second classification model was developed using spectroscopic data from the region $2000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, where most critical variations based on the absorptions of characteristic secondary metabolites of adulterants occur. This model allowed adulterant identification with high sensitivity down to levels of 5% (w/w). In both cases, the supervised pattern recognition method used was partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). For the quantification of each plant-derived adulterant in adulterated samples, PLS models were built in the concentration range 0-20% (w/w). The calibration models were optimized through variable selection by synergy interval PLS (siPLS) method. The overall performance of the PLS/siPLS models as well as the detection limits determined, which ranged from 1.0 to 3.1% (w/w), highlight the practical suitability of the proposed methodology for tackling fraud issues with adulterants of plant origin.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	i
Abstract	v
1. Γενική Εισαγωγή	1
1.1. Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά ως πηγή δευτερογενών μεταβολιτών	1
1.1.1. Κρόκος, <i>Crocus sativus</i> L. (Iridaceae)	1
1.1.2. Σκόρδο, <i>Allium sativum</i> L. (Liliaceae)	3
1.1.3. Φλισκούνη, <i>Mentha pulegium</i> L. (Lamiaceae)	4
1.2. Βιβλιογραφία	5
Στόχοι της Διατριβής	6
ΜΕΡΟΣ Α: ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	8
2. Ποσοτικός προσδιορισμός πουλεγόνης στο αιθέριο έλαιο από φλισκούνη με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR	9
2.1. Εισαγωγή	9
2.2. Πειραματικό μέρος	13
2.2.1. Φυτικό υλικό και πρότυπες ουσίες αναφοράς	13
2.2.2. Απομόνωση των αιθερίων ελαίων	13
2.2.3. Ανάλυση των αιθερίων ελαίων	14
2.2.4. Προετοιμασία των δειγμάτων	15
2.2.5. Ανάλυση με τη μέθοδο αναφοράς GC-FID	16
2.2.6. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR	16
2.2.7. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων	17
2.3. Αποτελέσματα - Συζήτηση	18
2.3.1. Χημική σύσταση αιθερίων ελαίων από δείγματα φλισκουιού	18
2.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο αναφοράς (GC-FID)	20
2.3.3. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR	21

2.3.4.	Ποσοτικός προσδιορισμός με FT-IR	22
2.4.	Συμπεράσματα - Προοπτικές	28
2.5.	Βιβλιογραφία	29
3.	Ποσοτικός προσδιορισμός αλλιλίνης και μεθίνης στο σκόρδο μέσω υγρής χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας FT-IR	33
3.1.	Εισαγωγή	33
3.2.	Ποσοτικός προσδιορισμός αλλιλίνης και μεθίνης στο σκόρδο μέσω HILIC-PDA/ESI-MS	38
3.2.1.	Πειραματικό μέρος	38
3.2.1.1.	Φυτικό υλικό και χημικά αντιδραστήρια	38
3.2.1.2.	Διαδικασία απομόνωσης	38
3.2.1.3.	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	39
3.2.1.4.	Υγροχρωματογραφική ανάλυση	39
3.2.1.5.	Βελτιστοποίηση των μεθόδων	40
3.2.2.	Αποτελέσματα - Συζήτηση	42
3.2.3.	Συμπεράσματα - Προοπτικές	54
3.3.	Ποσοτικός προσδιορισμός αλλιλίνης και μεθίνης στο σκόρδο μέσω φασματοσκοπίας	55
3.3.1.	Πειραματικό μέρος	55
3.3.1.1.	Φυτικό υλικό και χημικά αντιδραστήρια	55
3.3.1.2.	Διαδικασία απομόνωσης	55
3.3.1.3.	Χρωματογραφική ανάλυση με HILIC-ESI-MS	56
3.3.1.4.	Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR	57
3.3.1.5.	Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων	58
3.3.2.	Αποτελέσματα - Συζήτηση	58
3.3.3.	Συμπεράσματα - Προοπτικές	62
3.4.	Βιβλιογραφία	63
ΜΕΡΟΣ Β: ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ		67
4.	Έλεγχος νοθείας των σιγμάτων κρόκου με υλικά φυτικής προέλευσης μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών	68
4.1.	Εισαγωγή	68
4.2.	Ανίχνευση και ταυτοποίηση φυτικών υλικών νοθείας στα σίγματα κρόκου με χρήση της φασματοσκοπίας ^1H NMR	73
4.2.1.	Πειραματικό μέρος	73

4.2.1.1.	Προμήθεια υλικών	73
4.2.1.2.	Προετοιμασία δειγμάτων	73
4.2.1.3.	Φασματοσκοπική ανάλυση με ^1H NMR	74
4.2.1.4.	Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων	74
4.2.2.	Αποτελέσματα - Συζήτηση	75
4.2.3.	Συμπεράσματα - Προοπτικές	85
4.3.	Ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός φυτικών υλικών νοθείας στα στίγματα κρόκου με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR	87
4.3.1.	Πειραματικό μέρος	87
4.3.1.1.	Προμήθεια υλικών	87
4.3.1.2.	Προετοιμασία δειγμάτων	87
4.3.1.3.	Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR	88
4.3.1.4.	Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων	89
4.3.2.	Αποτελέσματα - Συζήτηση	92
4.3.2.1.	Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR	92
4.3.2.2.	Ανίχνευση και ταυτοποίηση νοθείας	96
4.3.2.3.	Ποσοτικός προσδιορισμός φυτικών υλικών νοθείας	106
4.3.3.	Συμπεράσματα - Προοπτικές	114
4.4.	Βιβλιογραφία	115
5.	Έλεγχος νοθείας των σιγμάτων κρόκου με χρωστικές Sudan μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR	121
5.1.	Εισαγωγή	121
5.2.	Πειραματικό μέρος	126
5.2.1.	Προμήθεια υλικών και χημικών αντιδραστηρίων	126
5.2.2.	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	126
5.2.3.	Προετοιμασία δειγμάτων	127
5.2.4.	Φασματοσκοπική ανάλυση με NMR	127
5.2.4.1.	Ποσοτικός προσδιορισμός με ^1H NMR (qHNMR)	127
5.2.4.2.	Φασματοσκοπία ^{13}C NMR	128
5.2.4.3.	Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων	129
5.2.4.4.	Επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR	129
5.3.	Αποτελέσματα - Συζήτηση	130
5.4.	Συμπεράσματα - Προοπτικές	138
5.5.	Βιβλιογραφία	139

ΜΕΡΟΣ Γ: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	143
6. Εκτίμηση της βιοδραστικότητας τερπENOειδών επί του <i>Culex pipiens</i> L. με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR	144
6.1. Εισαγωγή	144
6.2. Πειραματικό μέρος	146
6.2.1. Πρότυπες ουσίες αναφοράς	146
6.2.2. Εκτροφή του <i>Culex pipiens</i> L.	146
6.2.2.1. Ωα - προνύμφες	146
6.2.2.2. Νύμφες - ακμαία	147
6.2.3. Βιοδοκιμές προνυμφοκτόνου δράσης	147
6.2.4. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR	148
6.2.5. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων	149
6.3. Αποτελέσματα - Συζήτηση	150
6.4. Συμπεράσματα - Προοπτικές	154
6.5. Βιβλιογραφία	155
7. Γενικά Συμπεράσματα	157
8. Προοπτικές - Προτάσεις	161
Κατάλογος Εικόνων	164
Κατάλογος Πινάκων	165
Κατάλογος Σχημάτων	168
Συντμήσεις - Αρκτικόλεξα	173
Παράρτημα I	177
Παράρτημα II	184
Παράρτημα III	194

1. Γενική Εισαγωγή

1.1. Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά ως πηγή δευτερογενών μεταβολιτών

Η χρήση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είναι ευρέως γνωστή από την αρχαιότητα, τόσο για τις θεραπευτικές όσο και για τις αρωματικές τους ιδιότητες. Ο όρος "αρωματικά" αποδίδεται σε φυτά με ευχάριστη οσμή, η οποία οφείλεται στα πτητικά συστατικά των αιθερίων ελαίων και οι χρήσεις αυτών συνδέονται με την παρασκευή αρωμάτων και άλλων εύοσμων προϊόντων. Ένα ιδιαίτερο μορφολογικό γνώρισμα των αρωματικών φυτών είναι η παρουσία αδενωδών και μη τριχωμάτων σε όλα τα υπέργεια τμήματά τους, τα οποία εκκρίνουν αιθέρια έλαια. Σήμερα, η χρήση των αιθερίων ελαίων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είναι ευρέως διαδεδομένη. Το αιθέριο έλαιο αποτελεί ένα πολύπλοκο μίγμα πτητικών ουσιών που παράγεται από τα προαναφερθέντα φυτά. Κάθε αιθέριο έλαιο έχει χαρακτηριστική οσμή και ξεχωριστές ιδιότητες που οφείλονται στα επιμέρους συστατικά του και τη συγκέντρωσή τους. Ο όρος φαρμακευτικά αποδίδεται σε φυτά που παράγουν βιολογικά δραστικές ενώσεις με θεραπευτική δράση για τον άνθρωπο.

Η χρησιμότητα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών συνδέεται με παραδοσιακές χρήσεις και εθνοφαρμακολογικές αναφορές χιλιάδων ετών, ως χρωστικές ουσίες, πολυμερή, έλαια, φάρμακα, παράγοντες αρώματος και γεύσης. Οι ιδιότητες τους αποδίδονται σε χημικές ουσίες, τις οποίες παράγουν τα ίδια και είναι ευρέως διαδεδομένες με τον όρο δευτερογενείς μεταβολίτες.

1.1.1. Κρόκος, *Crocus sativus* L. (Iridaceae)

Ο κρόκος (*Crocus sativus* L.) καλλιεργείται και χρησιμοποιείται ως καρύκευμα εδώ και 3500 χρόνια, τουλάχιστον, τόσο στη Μέση Ανατολή όσο και στην Αίγυπτο. Αποτελεί ένα από τα πλέον σπουδαία αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της Ελληνικής χλωρίδας. Το φυτό του κρόκου ανήκει στην οικογένεια των Ιριδωδών. Πρόκειται περί πολυετούς πόας που φθάνει τα 10 έως 25 cm ύψος και αναπτύσσεται από τους βολβούς (κορμίδια) του. Ο βολβός, υπο-ωοειδούς σχήματος, είναι μικρός και χονδρός, ελαφρώς πεπλατυσμένος στη βάση του και μοιάζει με το

βολβό του κρεμμυδιού. Η δομή είναι μαζική και καλύπτεται από πολλούς ομόκεντρους χιτώνες. Αποτελεί υπόγειο όργανο που συγκεντρώνει τις απαραίτητες ουσίες που είναι απαραίτητες για την ανθοφορία και τη βλάστηση. Οι πολυάριθμες ρίζες του είναι λεπτές, λευκού χρώματος και παρουσιάζουν διάφορα μήκη (5-10 cm). Τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα του άνθους αποτελούν το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται ως άρτυμα. Στην παγκόσμια αγορά αναγνωρίζονται με την εμπορική ονομασία “saffron”, ενώ άλλες ονομασίες είναι το safran και η ζαφορά.

Όσον αφορά στα κύρια συστατικά των στιγμάτων του κρόκου, οι κροκίνες, η σαφρανάλη και η πικροκροκίνη είναι υπεύθυνα για το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση. Οι κροκίνες, οι γλυκοζίτες της κροκετίνης, είναι υδατοδιαλυτές και η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 32.4% (w/w) [1]. Αποτελούν τις σημαντικότερες χρωστικές ουσίες των στιγμάτων του κρόκου. Η πικροκροκίνη, γλυκοζίτης της σαφρανάλης, κυμαίνεται από 0.8 έως 26.6% (w/w) [1]. Η πικροκροκίνη έχει εντοπιστεί μόνο στο είδος *C. sativus*, για το λόγο αυτό αποτελεί δείκτη του εν λόγω αρτύματος, προσδίδοντας έτσι μια μοναδική γεύση που δεν μπορεί να μιμηθεί από άλλα αρτύματα. Η σαφρανάλη αποτελεί το κύριο πτητικό συστατικό του αιθερίου ελαίου και είναι μια μονοτερπενική αλδεΐδη, που προέρχεται από την υδρόλυση της πικροκροκίνης, κατά τη διαδικασία ξήρανσης των στιγμάτων [1].

Τα στίγματα του κρόκου είναι πιθανόν το άρτυμα που έχει υποστεί τις περισσότερες νοθείες στην ιστορία, λόγω της υψηλής του αξίας. Το προϊόν θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από οποιαδήποτε νοθεία, ήτοι προσθήκη φυτικών υλών, ελαίων ή μελάσας, που αυξάνουν το βάρος, ή ακόμη χρωστικών που βελτιώνουν την όψη του. Η νοθεία του κρόκου γίνεται συχνά με στίγματα ή στήμονες από άνθη άλλων φυτών, αλλά κυρίως με στήμονες του ίδιου του φυτού βαμμένους με εκχύλισμα από τα κόκκινα στίγματα [2]. Ωστόσο, η νοθεία του κρόκου ταυτίζεται χρονικά με την παραγωγή και τη χρήση του, με τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο να αναφέρει κιόλας από τον 1^ο μ.Χ. αιώνα στο έργο του *Naturalis Historia* ότι “τίποτα δε νοθεύεται τόσο όσο το saffron” [2].

1.1.2. Σκόρδο, *Allium sativum* L. (Liliaceae)

Το σκόρδο (*Allium sativum* L.) αποτελεί ένα από τα πρώτα στην ιστορία φυτά που χρησιμοποιήθηκαν εκτός από διατροφικό και με θεραπευτικό σκοπό, τόσο στην Ελλάδα όσο και σε άλλες χώρες. Εμφανίζει αποδεδειγμένη δράση στη βελτιστοποίηση του καρδιαγγειακού συστήματος, δράση κατά των λοιμώξεων και του καρκίνου, και χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, αντιδιαβητικό και ορμονορυθμιστικό [3,4]. Λόγω της επιβαλλόμενης κατάργησης ενός μεγάλου αριθμού συνθετικών εντομοκτόνων τα τελευταία χρόνια, είτε για λόγους τοξικότητας είτε για λόγους ανάπτυξης ανθεκτικότητας, διατίθενται στο εμπόριο, σε χώρες όπως η Μ. Βρετανία και οι Η.Π.Α., σκευάσματα που περιέχουν εκχυλίσματα ή συστατικά του αιθερίου ελαίου του σκόρδου. Τα προϊόντα αυτά, πολλές φορές σε συνδυασμό με συστατικά αιθερίων ελαίων από άλλα φυτά, παρουσιάζουν ισχυρή εντομοκτόνο δράση και συγχρόνως είναι φιλικότερα προς το περιβάλλον, εμφανίζοντας χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά και υψηλή ταχύτητα βιοδιάσπασης.

Το σκόρδο χρησιμοποιείται ευρέως στη μαγειρική για το άρωμα και τη γεύση που προσδίδει. Επίσης, το σκόρδο καλλιεργείται για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες, μια χρήση η οποία αυξάνεται με το πέρασμα των χρόνων. Ως εκ τούτου, στο εμπόριο διατίθεται μια μεγάλη ποικιλία από συμπληρώματα διατροφής και φαρμακευτικά σκευάσματα.

Οι μορφές με τις οποίες καταναλώνεται ή διατίθεται εμπορικά είναι οι εξής:

- Σκελίδες σκόρδου
- Φρέσκα υδατικά και αλκοολικά εκχυλίσματα
- Φρέσκος χυμός
- Αλκοολικά εκχυλίσματα σκόρδου, κυρίως με την τεχνική της βραδείας ωρίμανσης (περίπου 20 μήνες, Kyolic ή Aged garlic)
- Λυοφιλοποιημένες σκόρες (αφυδατωμένο προϊόν σε χαμηλή θερμοκρασία)
- Αποσταγμένα έλαια (σκορδέλαιο)

1.1.3. Φλισκούνι, *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)

Το φλισκούνι (*Mentha pulegium* L.) είναι φυτό πολυετές, που φθάνει σε ύψος μέχρι 20 cm. Ο βλαστός του είναι όρθιος ή πλαγιαστός, τετραεδρικός, λίγο τριχωτός ή σχεδόν λείος, αρκετά διακλαδιζόμενος, πρασινωπός ή σχετικά μωβ. Τα φύλλα του είναι μικρά, οβάλ ή προμήκη (ελλειπτικά), 6-20 mm σε μήκος και 0.5-10 mm σε πλάτος, με μικρό μίσχο. Και οι δύο επιφάνειες των φύλλων είναι ευδιάκριτα χνουδωτές. Τα άνθη απαντούν σε πολυάριθμες ταξιανθίες, αρχίζοντας από τη μέση και άνω του μίσχου. Βρίσκονται σε μασχαλιαίους σπονδύλους και έχουν χρώμα ρόδινο ή ιώδες. Όσον αφορά στις ιδιότητές του, το φλισκούνι συνιστά φυτό αρωματικό, φαρμακευτικό και μελισσοτροφικό [5]. Η ονομασία *pulegium* αναφέρεται στην ιδιότητα του φυτού να απωθεί τους ψύλλους που στα λατινικά ονομάζονται *pulex*. Το φλισκούνι μπορεί να απαντά σε όλη τη νοτιοδυτική και κεντρική Ευρώπη, ενώ σε αφθονία μπορεί να εντοπιστεί κυρίως σε χώρες της Ιβηρικής Χερσονήσου και της Βόρειας Αφρικής που βρέχονται από τη Μεσόγειο, όπως η Αλγερία, το Μαρόκο και η Τυνησία. Το αιθέριο έλαιο από το φλισκούνι παράγεται, κατά κύριο λόγο, από φυτά αυτοφυών πληθυσμών που συγκομίζονται όταν βρίσκονται σε πλήρη άνθηση. Οι χώρες όπου παράγεται το αιθέριο έλαιο είναι κυρίως η Ισπανία και το Μαρόκο, όπου η ετήσια παραγωγή εκτιμάται στους 3 τόνους και από 7 έως 16 τόνους, αντίστοιχα.

1.2. Βιβλιογραφία

- [1] Sánchez, A.M., Maggi, L., Carmona, M., Alonso, G.L. (2011). Authentication of saffron spice (*Crocus sativus* L.). In S.E. Ebeler et al. (Eds.), *Progress in authentication of food and wine. ACS symposium series* (Vol. 1081, pp. 309–331). Washington, DC: American Chemical Society.
- [2] Bostock, J., Riley, H.T. (1855). *The Natural History. Pliny the Elder*. London: Taylor and Francis.
- [3] Block, E. (2010). *Garlic and other Alliums: The Lore and the Science*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- [4] Σκρουμπής, Β. (1998). *Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοτροφικά φυτά της Ελλάδας*. Αθήνα: ΑγροΤύπος ΑΕ.
- [5] Lawrence, B.M. (2007). *Mint: The genus Mentha* (pp. 462–477). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Στόχοι της Διατριβής

Το αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη αξιόπιστων και γρήγορων μεθόδων, με τις οποίες να μπορούν εύκολα να προσδιορίζονται οι βιοενεργοί δευτερογενείς μεταβολίτες στις κύριες φυτικές πηγές προέλευσης, αποτέλεσε τη βάση για τον πρώτο στόχο της παρούσας διατριβής. Στο πλαίσιο αυτό επιδίωξη ήταν:

- να αναπτυχθεί μέθοδος προσδιορισμού του μονοτερπενίου πουλεγόνη στο αιθέριο έλαιο φλισκουνιού (*Mentha pulegium* L.) με χρήση της φασματοσκοπίας υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) σε συνδυασμό με τη μέθοδο παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS)
- να αναπτυχθούν μέθοδοι προσδιορισμού των οργανοθειούχων ενώσεων αλλιίνη και μεθίνη στο σκόρδο (*Allium sativum* L.) με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας και FT-IR. Στην πρώτη περίπτωση επιλέχθηκε η τεχνική υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) και ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών - ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS). Για τη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) σε συνδυασμό με τη μέθοδο παλινδρόμησης PLS.

Στη συνέχεια, η μελέτη επικεντρώθηκε στον έλεγχο αυθεντικότητας των φυσικών προϊόντων και συναφών τροφίμων, ένα πεδίο που έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία τα τελευταία χρόνια. Προκειμένου να γίνεται εκτίμηση της αυθεντικότητας του πολύτιμου αρτύματος των σιγμάτων κρόκου (*Crocus sativus* L.) με γρήγορες φασματοσκοπικές τεχνικές, ικανές για υψηλής απόδοσης αναλύσεις, στους στόχους της διατριβής ήταν:

- να αναπτυχθούν μέθοδοι ανίχνευσης της νοθείας με υλικά φυτικής προέλευσης, χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR), τη φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS), καθώς και χημειομετρικές τεχνικές
- να αναπτυχθεί μέθοδος εκτίμησης της νοθείας με τις συνθετικές χρωστικές Sudan I-IV μέσω της φασματοσκοπίας ^1H NMR.

Τέλος, με γνώμονα το σημαντικό ρόλο που μπορεί να επιτελέσει για την ανάπτυξη νέων προϊόντων η ποσοτική συσχέτιση της βιολογικής δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης με τη δομή τους, σκοπός ήταν:

- να αναπτυχθεί μέθοδος εκτίμησης της βιοδραστικότητας τερπενοειδών ενώσεων σε προνύμφες κουνουπιών του είδους *Culex pipiens* L., χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία FT-IR σε συνδυασμό με πολυμεταβλητή βαθμονόμηση.

ΜΕΡΟΣ Α

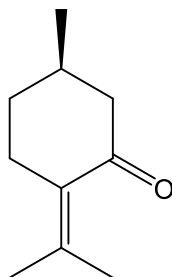
Ποσοτικός Προσδιορισμός Δευτερογενών Μεταβολιτών

2. Ποσοτικός προσδιορισμός πουλεγόνης στο αιθέριο έλαιο από φλισκούνι με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR

2.1. Εισαγωγή

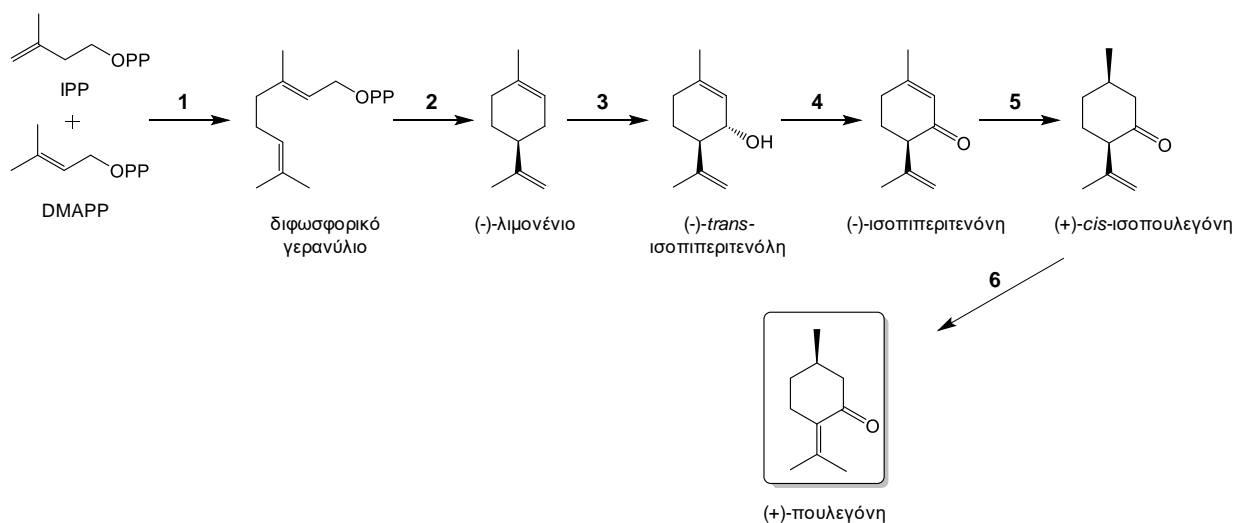
Το αιθέριο έλαιο που είναι ευρύτερα γνωστό ως "έλαιο φλισκουνιού" συνιστά πτητικό έλαιο που παραλαμβάνεται μέσω απόσταξης με υδρατμούς ή μέσω υδροαπόσταξης κυρίως από τα φύλλα και τα άνθη των ειδών *Mentha pulegium* L. (Ευρωπαϊκό φλισκούνι) και *Hedeoma pulegioides* (L.) Pers. (Αμερικάνικο φλισκούνι) [1]. Το φλισκούνι χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα ως άρτυμα καθώς και για την παρασκευή αφεψήματος, γνωστού σε αρκετές περιοχές της Ισπανίας ως «té» [2,3]. Στην Αρχαία Ελλάδα, μάλιστα, ήταν γνωστό με το όνομα "βλήχων" και αποτελούσε κύριο συστατικό του "κυκεώνα", ηδύποτου των Ελευσίνιων Μυστηρίων [4]. Το αιθέριο έλαιο έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό για ιλίγγους ή ως καταπραϋντικό και αντισπασμωδικό [5], ενώ σύμφωνα με την παραδοσιακή ιατρική έχει, επίσης, χορηγηθεί για αμβλώσεις και πρόκληση εμμηνόρροιας [2,6]. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα εγκεκριμένες φαρμακευτικές χρήσεις του ελαίου φλισκουνιού από επίσημους φορείς [1]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, μεταξύ άλλων, ότι το αιθέριο έλαιο από φλισκούνι παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή [7-9], αντιοξειδωτική [9,10] και εντομοκτόνο [11] δράση, ενώ δείχνει να εμφανίζει δράση κατά της ακετυλο-χολινεστεράσης [10].

Λόγω της έντονα αρωματικής, δριμείας μυρωδιάς που προσομοιάζει στο άρωμα της μέντας, το αιθέριο έλαιο φλισκουνιού αποτελεί, συχνά, συστατικό για αρωματικές ύλες καθώς επίσης και συστατικό αλκοολούχων ποτών, ζαχαρωδών παρασκευασμάτων και καλλυντικών [1,2]. Όπως έχει αναφερθεί [5], η δριμύτητα του αρώματος του φλισκουνιού αποδίδεται, κυρίως, στην παρουσία της (*R*)-(+)-πουλεγόνης. Η ένωση αυτή (Εικόνα 2.1) αναφέρεται πιο συχνά ως πουλεγόνη και αποτελεί μονοτερπενική κετόνη που βρίσκεται στους φυτικούς ιστούς αρκετών ειδών αρωματικών φυτών, ενώ συνήθως αποτελεί κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου από φλισκούνι [2,12]. Πιο συγκεκριμένα, τα αιθέριο έλαιο από φλισκούνι εμφανίζει περιεκτικότητα (%) σε πουλεγόνη που εξαρτάται από το χημειότυπο του φυτού και κυμαίνεται από ίχνη (<0.1%) έως και 90.7% [2,13]. Για τα έλαια που προέρχονται από φλισκούνι με χημειότυπο πουλεγόνης, έχει αναφερθεί πως η συνήθης περιεκτικότητα είναι 60-90% [1,2].



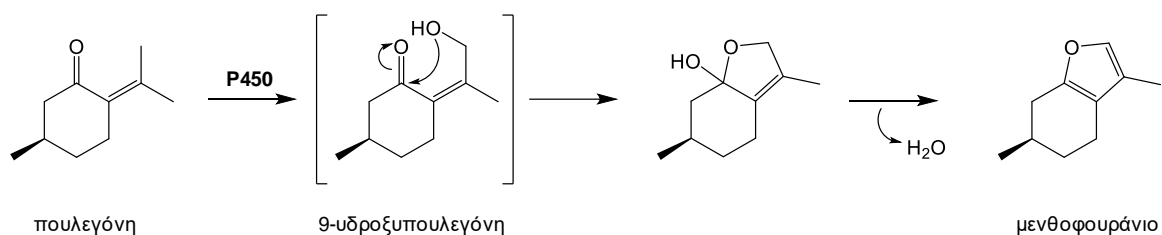
Εικόνα 2.1. Δομή της (R)-(+)-πουλεγόνης.

Η πουλεγόνη, όπως και άλλα χαρακτηριστικά μονοτερπένια του γένους *Mentha*, σχηματίζεται από τα C₅ μόρια διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και διφωσφορικό διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP) (Εικόνα 2.2). Όπως διευκρινίζεται σε σχετικά πρόσφατη έρευνα, οι πρόδρομες αυτές ενώσεις βιοσυντίθενται κυρίως στα πλαστίδια των φυτικών κυττάρων από το πυροσταφυλικό οξύ και την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη μέσω της οδού της φωσφορικής μεθυλοερυθριτόλης (MEP), και όχι μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος (MVA) που ακολουθείται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων [14].



Εικόνα 2.2. Πορεία βιοσύνθεσης της πουλεγόνης στο φλισκούνη και σε άλλα είδη του γένους *Mentha*, σύμφωνα με τους Turner & Croteau [14]. Οι επιμέρους ενζυματικές αντιδράσεις καταλύονται από: (1) τη συνθετάση του διφωσφορικού γερανυλίου (GPPS), (2) τη συνθετάση του (-)-λιμονένιου, (3) την υδροξυλάση του (-)-λιμονένιου (L3OH), (4) την αφυδρογονάση της ισοπιπεριτενόλης ((-)-*trans*-IPD), (5) την αναγωγή της (-)-ισοπιπεριτενόνης, και (6) την ισομεράση της (+)-*cis*-ισοπουλεγόνης.

Η πουλεγόνη αποτελεί νευροτοξίνη σε έντομα, όπως έχει αποδειχθεί από σχετική μελέτη [15]. Σε πολυάριθμες αναφορές έχει υποστηριχθεί ότι η πουλεγόνη παρουσιάζει ηπατοτοξική δράση στον άνθρωπο, με τα τοξικολογικά δεδομένα να σχετίζονται κατά κύριο λόγο με το (*R*)-(+)-εναντιομερές της [16-18]. Το (*S*)-(-)-εναντιομερές απαντά σπάνια ως φυσικό συστατικό αιθερίων ελαίων [19]. Η ηπατοτοξική δράση της πουλεγόνης έχει παρατηρηθεί ύστερα από κατανάλωση του αιθερίου ελαίου φλισκουνιού για πρόκληση έκτρωσης ή για θεραπεία των κωλικών σε παιδιά [1]. Όπως έχουν δείξει σχετικές έρευνες με *in vitro* και *in vivo* πειράματα [19-22], η τοξικότητα έγκειται, κυρίως, στη δράση του κύριου μεταβολίτη της πουλεγόνης, το μενθοφουράνιο (Εικόνα 2.3), το οποίο διαδοχικά βιοενεργοποιείται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 στο ήπαρ και προκύπτει μια δραστική γ -κετοενάλη, ικανή να αντιδράσει με πρωτεΐνες και τη γλουταθειόνη.



Εικόνα 2.3. Μετατροπή της πουλεγόνης σε μενθοφουράνιο [20].

Πρόσφατα, μάλιστα, η πουλεγόνη εντάχθηκε από το Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC) στην κατηγορία των πιθανώς καρκινογόνων ουσιών για τον άνθρωπο (ομάδα 2B) [23]. Για τους παραπάνω λόγους έχουν καθοριστεί μέγιστα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης πουλεγόνης σε ποικίλες κατηγορίες προϊόντων. Τα όρια αυτά, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή [17], είναι: 20 mg/kg για τρόφιμα και μη αλκοολούχα ποτά, 100 mg/kg για αλκοολούχα ποτά που περιέχουν είδη μέντας και 250 mg/kg για ζαχαρώδη προϊόντα μέντας. Για την περίπτωση μικροπροϊόντων ζαχαρωδών δροσερής αναπνοής, όπως π.χ. μασώμενες τσίχλες, το μέγιστο όριο είναι 350 mg/kg και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φθάσει τα 2000 mg/kg. Η πουλεγόνη, επίσης, δε θα πρέπει να προστίθεται αυτούσια σε τρόφιμα [16,17]. Το συνιστώμενο

όριο περιεκτικότητας σε πουλεγόνη για τα καλλυντικά σκευάσματα είναι $\leq 1\%$ [1]. Αναφορικά με τα φαρμακευτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης, το προτεινόμενο όριο ημερήσιας πρόσληψης πουλεγόνης που συνίσταται είναι 0.75 mg/kg σωματικού βάρους [24]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση των ΗΠΑ, η πουλεγόνη δε συγκαταλέγεται στις εγκεκριμένες για χρήση συνθετικές αρωματικές ουσίες από το 2012 [23].

Μέχρι σήμερα, η περιεκτικότητα αιθερίων ελαίων φλισκουιού, καθώς επίσης και σχετικών προϊόντων, σε πουλεγόνη προσδιορίζεται κατά κύριο λόγο με μεθόδους χρωματογραφίας [12,25,26]. Η αέρια χρωματογραφία (GC) έχει καθιερωθεί ως η κύρια τεχνική για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων που συνιστούν τα αιθέρια έλαια [27], και δεδομένου ότι μπορεί να είναι χρονοβόρα, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει πρόσφατα για την ανάπτυξη εναλλακτικών αναλυτικών επιλογών. Στο πλαίσιο αυτό, φασματοσκοπικές τεχνικές όπως η φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (MIR) ή η φασματοσκοπία εγγύς υπερύθρου (NIR), σε συνδυασμό με τη χρήση κατάλληλων χημειομετρικών τεχνικών, έχουν δείξει ότι μπορούν να εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς την ταχεία αξιολόγηση των αιθερίων ελαίων και άλλων φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης [28-34]. Από σχετική έρευνα φάνηκε ότι μπορεί να γίνει έλεγχος σε παραμέτρους ποιότητας και χημειοταξινόμηση ειδών του γένους *Mentha* με τη χρήση φασματοσκοπικών δεδομένων NIR και χημειομετρικών μεθόδων [32]. Ωστόσο, οι κορυφές στην περιοχή NIR είναι συνήθως πλατιές και μικρής έντασης, καθώς αποτελούν υπέρτονες ή ταινίες συνδυασμού των χαρακτηριστικών ομάδων του δείγματος [33]. Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), σε συνδυασμό με πολυμεταβλητή ταξινόμηση, εφαρμόστηκε επιτυχώς σε πρόσφατη μελέτη για τη γεωγραφική διαφοροποίηση δειγμάτων από ελληνικό φλισκούνι, με βάση το αποτύπωμα των κύριων πτητικών συστατικών [34].

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την ανάπτυξη μια άμεσης και ταχείας μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης που είναι συνήθως χαρακτηριστική για το αιθέριο έλαιο φλισκουιού, της πουλεγόνης. Η μέθοδος αυτή βασίστηκε στη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και της χημειομετρίας. Για την αξιοπιστία της μεθόδου, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που προέκυψαν από τη χρήση αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID) ως μεθόδου αναφοράς.

2.2. Πειραματικό μέρος

2.2.1. Φυτικό υλικό και πρότυπες ουσίες αναφοράς

Για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων χρησιμοποιήθηκαν τα υπέργεια τμήματα φυτών φλισκουινίου από έξι διαφορετικούς πληθυσμούς, που βρίσκονταν σε πλήρη ανθοφορία κατά το χρόνο συλλογής. Οι περιοχές από όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα ήταν: (1) Σάμος (P1), (2) Άργος (P2), (3) Εύβοια (P3), (4) Σαμοθράκη (P4), (5) Καλαμάτα (P5) και (6) Κρήτη (Ηράκλειο) (P6). Η συλλογή όλων των δειγμάτων από φλισκούνη πραγματοποιήθηκε τα έτη 2007-2008, κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών, και η προμήθειά τους έγινε από καταστήματα λιανικής πώλησης (π.χ. καταστήματα υγιεινής διατροφής και καταστήματα μπαχαρικών). Χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες ουσίες (R)-(+)-πουλεγόνη, α -πινένιο, β -πινένιο και (-)-μινθόλη της εταιρείας Aldrich (Steinheim, Germany), καθώς επίσης η (+)-μινθόνη της εταιρείας Fluka (Steinheim, Germany). Οι ουσίες ευκαλυπτόλη και λιμονένιο ήταν της εταιρείας Sigma (St. Louis, MO, USA), ενώ η προμήθεια της πιπεριτόνης και της ισομινθόνης έγινε από την εταιρεία Extrasynthese (Genay, France). Ο βαθμός καθαρότητας όλων των προτύπων ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν άνω του 98%.

2.2.2. Απομόνωση των αιθερίων ελαίων

Από την ξηρή δρόγη κάθε πληθυσμού φλισκουινίου (P1-P6) λήφθηκε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα, το οποίο λειοτριβήθηκε με χρήση ομογενοποιητή (blender). Στη συνέχεια ζυγίστηκε ποσότητα 200 g και τοποθετήθηκε εντός εσφυρισμένης σφαιρικής φιάλης 5 L, όπου ακολούθησε προσθήκη απιονισμένου νερού τουλάχιστον μέχρι καλύψεως του δείγματος. Μετά από επιστάμενη ανάδευση του περιεχομένου, η σφαιρική φιάλη μεταφέρθηκε σε θερμομανδύα και προσαρμόστηκε η βαθμονομημένη συσκευή τύπου Clevenger [35], στην οποία διαδοχικά έγινε προσαρμογή του ψυκτήρα διπλών τοιχωμάτων τύπου Davies. Η κλασική διαδικασία υδροαπόσταξης (HD) με χρήση της συσκευής Clevenger (Εικόνα 2.4) είχε διάρκεια 4 ώρες [36] για κάθε επιμέρους δείγμα.

Τα αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν από τα φυτικά υλικά P1-P6 ονομάστηκαν, αντίστοιχα, PO1-PO6. Ακολούθησε ξήρανση με άνυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και έπειτα διήθηση με χρήση φίλτρου πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE), πορώδους 0.45 μm και διαμέτρου 25 mm (Agilent). Τα έλαια αποθηκεύθηκαν στους $-22\text{ }^{\circ}C$ μέχρι να αναλυθούν, εντός αποστειρωμένων φιαλιδίων με πώμα και κάλυψη με φιλμ παραφίνης (parafilm).



Εικόνα 2.4. Συσκευή τύπου Clevenger για την παραλαβή αιθερίου ελαίου από φλίσκουνι με υδροαπόσταξη (HD).

2.2.3. Ανάλυση των αιθερίων ελαίων

Όλα τα απομονωμένα αιθέρια έλαια φλίσκουνιού (PO1-PO6) αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τον αέριο χρωματογράφο (GC) Hewlett-Packard 5890 Series II, ο οποίος ήταν εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη HP-5ms (μήκος: 30 m, εσωτ. διάμετρος: 0.25 mm, πάχος υμένα: 0.25 μm). Ο χρωματογράφος ήταν συζευγμένος με τον εκλεκτικό ανιχνευτή μαζών (MSD) Hewlett-Packard 5972, για λειτουργία με την τεχνική ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) στα 70 eV. Οι θερμοκρασίες του συστήματος εισαγωγής του δείγματος (εγχυτή) και του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στους 220 και 290 $^{\circ}C$, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της στήλης σταδιακά αυξήθηκε από τους 60 στους 240 $^{\circ}C$ με ρυθμό 3 $^{\circ}C/min$ και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή για 10 λεπτά.

Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He), με ροή 1 mL/min. Ύστερα από διάλυση των αιθερίων ελαίων σε διαιθυλαιθέρα (1/100, v/v), πραγματοποιήθηκε χειροκίνητη εισαγωγή όγκου 1.0 μ L για κάθε δείγμα, χωρίς διαμοιρασμό (splitless). Για τον έλεγχο του συστήματος GC-MS καθώς και για τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Η εκατοστιαία αναλογία των ενώσεων σε κάθε δείγμα υπολογίστηκε ηλεκτρονικά από το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος και την αναγωγή του σε ποσοστό (%). Η ταυτοποίηση των κύριων πτητικών ουσιών των αιθερίων ελαίων έγινε με βάση το δείκτη κατακράτησής τους και τα φάσματα μάζας τους, σε σύγκριση με αυτά που παρατηρήθηκαν για τις πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν. Οι δείκτες κατακράτησης (RI) των ουσιών υπολογίστηκαν με γραμμική παρεμβολή βάσει των χρόνων κατακράτησης (RT) των *n*-αλκανίων C₈-C₂₀, χρησιμοποιώντας την εξίσωση των Van Den Dool & Kratz [37]. Τα συστατικά που βρέθηκαν σε μικρότερα ποσοστά ταυτοποιήθηκαν ενδεικτικά έπειτα από σύγκριση των φασμάτων μάζας και της σειράς έκλουσης με τα δεδομένα που περιλαμβάνονται στις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες NIST 98, Wiley 275 και Adams 2007, καθώς και σύμφωνα με στοιχεία από τη βιβλιογραφία [38].

2.2.4. Προετοιμασία των δειγμάτων

Προκειμένου να αναπτυχθεί η μέθοδος για τον προσδιορισμό της πουλεγόνης με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR, προετοιμάστηκαν δύο διαφορετικά σύνολα δειγμάτων. Το πρώτο σύνολο αφορούσε το μοντέλο βαθμονόμησης και περιλάμβανε 31 δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις πουλεγόνης σε EtOH (46.8-889.2 mg/mL), ενώ 10 δείγματα από αιθέρια έλαια φλισκουιού χρησιμοποιήθηκαν ως σύνολο ελέγχου (πρόβλεψης) με σκοπό την επικύρωση του μοντέλου. Σχετικά με το δεύτερο σύνολο δειγμάτων, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα απομονωμένα αιθέρια έλαια φλισκουιού PO1-PO5. Στη συνέχεια, τα έλαια αυτά εμπλουτίστηκαν με καθαρή πουλεγόνη ή με το αιθέριο έλαιο PO6, έτσι ώστε να επεκταθεί το εύρος συγκεντρώσεων πουλεγόνης. Με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιήθηκαν πέντε ακόμη δείγματα (SPO1-SPO5) για να αξιολογηθεί η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου.

2.2.5. Ανάλυση με τη μέθοδο αναφοράς GC-FID

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια PO1-PO5 και τα εμπλουτισμένα έλαια SPO1-SPO5 πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID), λαμβάνοντας υπόψη το εμβαδόν της κορυφής. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα GC Hewlett-Packard 5890 series II με τριχοειδή στήλη HP-5ms (μήκος: 30 m, εσωτ. διάμετρος: 0.25 mm, πάχος υμένα: 0.25 μm), συνδεδεμένο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Οι θερμοκρασίες στον εγχυτή και τον ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στους 220 και 290 °C, αντίστοιχα. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο (He), με ροή 1 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για κάθε σύνολο δειγμάτων καθορίστηκε ως εξής:

α) Για τα πρότυπα διαλύματα, από αρχική θερμοκρασία 60 °C άνοδο στους 140 °C με ρυθμό 3 °C/min και στη συνέχεια αύξηση στους 240 °C με ρυθμό 25 °C/min και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 2 min.

β) Για τα αιθέρια έλαια, από αρχική θερμοκρασία 60 °C άνοδο στους 160 °C με ρυθμό 3 °C/min και στη συνέχεια αύξηση στους 240 °C με ρυθμό 25 °C/min και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 2 min.

Ύστερα από αραίωση των δειγμάτων σε EtOH (1/100, v/v), πραγματοποιήθηκε χειροκίνητη εισαγωγή όγκου 1.0 μL για κάθε δείγμα με την τεχνική splitless. Ο έλεγχος του συστήματος GC-FID καθώς και η συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων έγιναν με χρήση του λογισμικού ChemStation. Για την καμπύλη βαθμονόμησης λήφθηκε υπόψη το εμβαδόν της κορυφής της πουλεγόνης από συνολικά 8 πρότυπα διαλύματα πουλεγόνης σε EtOH. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων κυμάνθηκαν από 55 έως 890 mg/mL. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε ανάλυση εις τριπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

2.2.6. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR

Όλες οι μετρήσεις FT-IR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός φασματόμετρου FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειικής τριγλυκίνης (DTGS), πηγή Nichrome και διαχωριστή δέσμης KBr. Τα φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή του μέσου υπερύθρου ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) με την τεχνική της

διέλευσης (transmission), σε ελεγχόμενες συνθήκες (25 °C). Κάθε δείγμα προς ανάλυση τοποθετήθηκε μεταξύ δύο στρογγυλών κρυστάλλινων παραθύρων ZnSe (25 mm × 2 mm). Το μήκος της διαδρομής μεταξύ των παραθύρων καθορίστηκε στα 15 μm με χρήση περιμετρικά δακτυλίου από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE). Τα παράθυρα τοποθετούνταν σε κατάλληλο αποσπώμενο υποδοχέα (Thermo Scientific), ο οποίος στη συνέχεια προσαρμοζόταν σε ειδικό πλαίσιο εντός του φασματόμετρου. Για τη λήψη κάθε φάσματος πραγματοποιήθηκαν 100 διαδοχικές σαρώσεις, με τη διαχωριστική ικανότητα του οργάνου να έχει καθοριστεί στα 4 cm^{-1} και την ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου στο συμβολόμετρο να είναι 0.316 cm s^{-1} . Το φάσμα των καθαρών παραθύρων ZnSe χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μέτρηση ως υπόβαθρο (background). Για τη λειτουργία του φασματόμετρου, τη συλλογή των δεδομένων και τη βασική επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Omnic 7.3 (Thermo Scientific) που συνοδεύει το όργανο. Η μέτρηση όλων των δειγμάτων με FT-IR έγινε εις τριπλούν και έπειτα προσδιορίστηκαν οι μέσοι όροι των φασμάτων. Η εξομάλυνση του σήματος (smoothing) σε όλα τα φάσματα FT-IR πραγματοποιήθηκε με την αυτόματη λειτουργία του λογισμικού, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Savitzky-Golay. Ακολούθησε η διόρθωση της βασικής γραμμής με την αυτόματη λειτουργία του λογισμικού, η οποία γίνεται πολυωνυμικά.

2.2.7. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων

Για την ανάπτυξη του μοντέλου βαθμονόμησης, με σκοπό την ποσοτικοποίηση της πουλεγόνης από τα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR των ελαίων από φλισκούνι, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Ο αλγόριθμος που εφαρμόστηκε περιλαμβάνεται στο λογισμικό TQ Analyst 8.0 (Thermo Scientific). Ύστερα από κεντροποίηση (mean centering) των τιμών των μεταβλητών, έγινε αξιολόγηση των μοντέλων PLS βάσει επιλεγμένων φασματικών περιοχών ή ολόκληρου του φάσματος. Το βέλτιστο μοντέλο PLS προέκυψε με επιλογή της φασματικής περιοχής από τα 1650 έως τα 1260 cm^{-1} . Έπειτα από τον έλεγχο του συνόλου δειγμάτων βαθμονόμησης για δείγματα που αποκλίνουν (outliers), το μοντέλο βαθμονόμησης αναπτύχθηκε τελικά χρησιμοποιώντας δεδομένα από 30 δείγματα. Η ακρίβεια του μοντέλου βαθμονόμησης περιγράφηκε από τις τιμές των συντελεστών συσχέτισης r_c και r_{cv} , ενώ εκτιμήθηκαν επίσης οι τιμές των σφαλμάτων RMSEC,

RMSECV και RMSEP για τη βαθμονόμηση, τη διασταυρωμένη επικύρωση και την πρόβλεψη, αντίστοιχα. Για τη διασταυρωμένη επικύρωση του μοντέλου βαθμονόμησης εφαρμόστηκε η επαναληπτική διαδικασία μιας παράλειψης (LOO). Ο βέλτιστος αριθμός λανθανουσών μεταβλητών (LVs) για την ποσοτικοποίηση της πουλεγόνης προσδιορίστηκε σύμφωνα με την ελάχιστη τιμή του RMSECV και το ελάχιστο προβλεπόμενο σφάλμα υπολοίπου του αθροίσματος τετραγώνων (PRESS). Οι τιμές PRESS υποδεικνύουν το βαθμό προσαρμογής του μοντέλου βαθμονόμησης στα δεδομένα [39]. Η μέθοδος με FT-IR αξιολογήθηκε περαιτέρω ως προς την ακρίβεια και την επαναληψιμότητά της με σύγκριση των τιμών που εκτιμήθηκαν και των τιμών αναφοράς που προσδιορίστηκαν με GC-FID. Επιπλέον, με χρήση του λογισμικού SPSS 14.0 (IBM), πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (HCA) για τον έλεγχο διαφοροποίησης της πουλεγόνης και των υπολοίπων συστατικών των ελαίων, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα της επιλεγμένης φασματικής περιοχής.

2.3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

2.3.1. Χημική σύσταση αιθερίων ελαίων από δείγματα φλισκουνιού

Από την ανάλυση των αιθερίων ελαίων φλισκουνιού (PO1-PO6) με αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (GC-MS), καθορίστηκε η σχετική (%) σύστασή τους, η οποία λήφθηκε υπόψη προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα εμβολιασμού για τα αιθέρια έλαια τύπου πουλεγόνης. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ελαίων PO1-PO6 με GC-MS. Όσον αφορά στα αιθέρια έλαια με κωδικούς PO1-PO5, ως κύριο συστατικό τους βρέθηκε να είναι η πουλεγόνη (61.3–77.9%). Ακολούθησαν σε ποσοστά η ισομινθόνη (10.6–18.5%), η μινθόνη (0.6–8.3%), η πιπεριτενόνη (0.3–3.2%) και η *cis*-ισοπουλεγόνη (0.0–1.7%). Στην περίπτωση του αιθερίου ελαίου με κωδικό PO6, το κύριο συστατικό ήταν η πιπεριτόνη (69.3%), ακολουθούμενη από την ισομινθόνη (24.8%). Σε μικρότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν το λιμονένιο (1.8%) και η μινθόνη (1.6%).

Πίνακας 2.1. Χημική σύσταση (%) των αιθερίων ελαίων PO1-PO6 που παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη από τα αντίστοιχα δείγματα ξηρής δρόγης φλισκουιού (*Mentha pulegium* L.).

Συστατικά	RI ^α	Χημική σύσταση (%) ^β					
		PO1 Σάμος	PO2 Άργος	PO3 Εύβοια	PO4 Σαμοθράκη	PO5 Καλαμάτα	PO6 Κρήτη
α-Πινένιο ^γ	902	0.4	0.2	0.2	-	0.3	0.2
β-Πινένιο ^γ	942	0.6	0.2	0.2	-	0.2	0.2
3-Οκτανόλη ^δ	955	0.2	0.9	0.6	0.3	0.6	0.6
Λιμονένιο ^γ	993	0.5	0.2	0.2	-	0.4	1.8
Ευκαλυπτόλη (1,8-κινέολη) ^γ	995	2.2	0.2	0.3	-	-	-
Μινθόνη ^γ	1141	5.8	8.3	4.0	0.6	2.0	1.6
Ισομινθόνη ^γ	1155	10.6	18.5	16.8	14.9	16.0	24.8
cis-Ισοπουλεγόνη ^δ	1167	-	1.5	1.7	0.8	0.9	-
Μινθόλη ^γ	1171	12.9	-	-	-	-	-
Πουλεγόνη ^γ	1254	62.4	61.3	66.4	77.9	77.3	-
Πιπεριτόνη ^γ	1262	-	0.9	0.5	0.8	0.6	69.3
(E)-Ανηθόλη ^δ	1292	-	-	0.1	-	-	-
Πιπεριτενόνη ^δ	1361	0.3	1.9	2.3	3.2	1.4	0.4
β-Μπουρμπονένιο ^δ	1412	-	-	-	-	-	0.2
Γερμακρένιο D ^δ	1519	0.7	-	-	-	-	-
Φουρανόνη μέντας ^δ	1538	-	-	0.5	-	-	-
Συνολικά ταυτοποιήθηκαν (%)		96.6	94.1	93.8	98.5	99.7	99.1
Απόδοση σε έλαιο, % (v/w)		1.9	1.8	2.1	2.2	2.2	2.1

^α RI: Δείκτης κατακράτησης (retention index) κάθε επιμέρους συστατικού ως προς τα *n*-αλκάνια C₈-C₂₀ σε μη πολική στήλη HP-5ms.

^β Εκατοστιαία αναλογία κάθε συστατικού σύμφωνα με το λόγο του εμβαδού κάθε αντίστοιχης κορυφής προς το συνολικό εμβαδόν των κορυφών στο χρωματογράφημα (TIC).

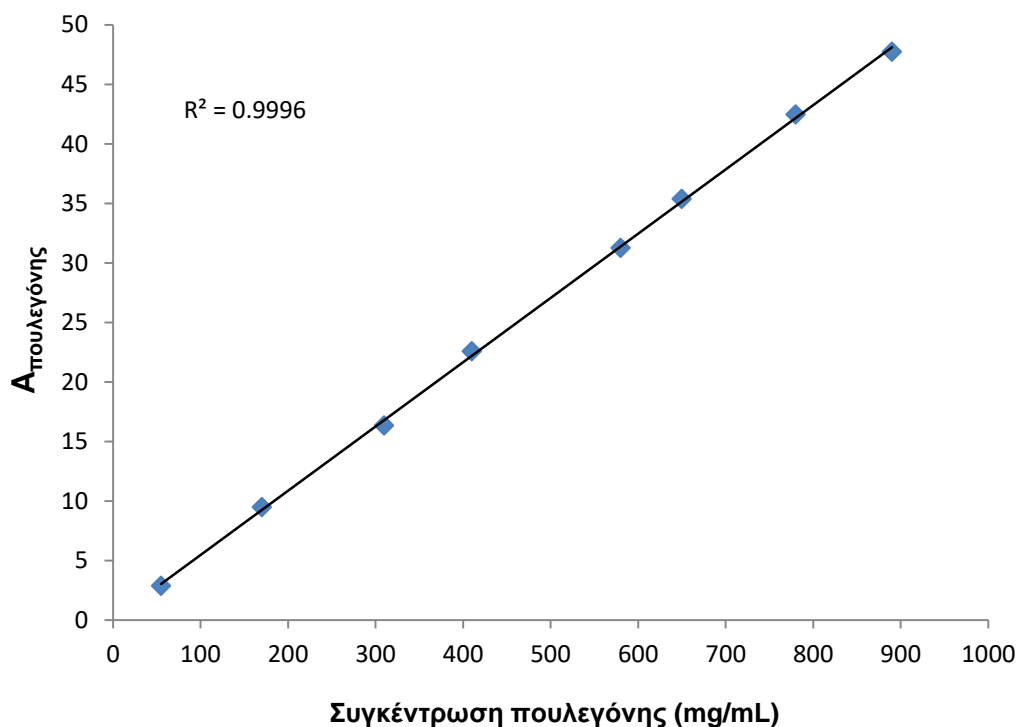
^γ Πραγματοποιήθηκε σύγκριση με το δείκτη κατακράτησης και το φάσμα μάζας της πρότυπης ουσίας.

^δ Η ταυτοποίηση βασίστηκε στη σύγκριση του δείκτη κατακράτησης και του φάσματος μάζας του συστατικού με τα αντίστοιχα δεδομένα που περιλαμβάνονται στις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες NIST 98, Wiley 275 και Adams 07, καθώς και στη βιβλιογραφία [38].

Επισημαίνεται ότι τα αποτελέσματα για τη χημική σύσταση των ελαίων που παραλήφθηκαν από τους συγκεκριμένους πληθυσμούς φλισκουιού βρέθηκαν να είναι σε συμφωνία με αυτά που έχουν αναφερθεί για πληθυσμούς που εντοπίζονται στις ίδιες κλιματικές ζώνες της Ελλάδας [13].

2.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο αναφοράς (GC-FID)

Η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID) χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς λόγω της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητάς της, ιδιότητες που παρέχουν αξιοπιστία στον προσδιορισμό πτητικών συστατικών όπως η πουλεγόνη [5, 12]. Η καμπύλη βαθμονόμησης δημιουργήθηκε με βάση τα πρότυπα διαλύματα πουλεγόνης ως συνάρτηση του εμβαδού της κορυφής της πουλεγόνης ($A_{\text{πουλεγόνης}} = \text{εμβαδόν κορυφής της πουλεγόνης}/10^6$ στα χρωματογραφήματα από GC-FID) και της περιεκτικότητας σε πουλεγόνη (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1. Καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια από φλισκούνι, όπως προέκυψε για τη μέθοδο αναφοράς με GC-FID.

Η εμπειρική εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης για την πουλεγόνη περιγράφηκε ως εξής: $A_{\text{πουλεγόνης}} = (0.0539 \pm 0.0004) \times (\text{mg πουλεγόνης})$, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης ήταν $r = 0.9998$. Για τα δείγματα αιθερίων ελαίων φλισκουιού PO1–PO5, η περιεκτικότητα σε πουλεγόνη κυμάνθηκε από 482 έως 728 mg/mL. Με προσθήκη των εμβολιασμένων δειγμάτων αιθερίου

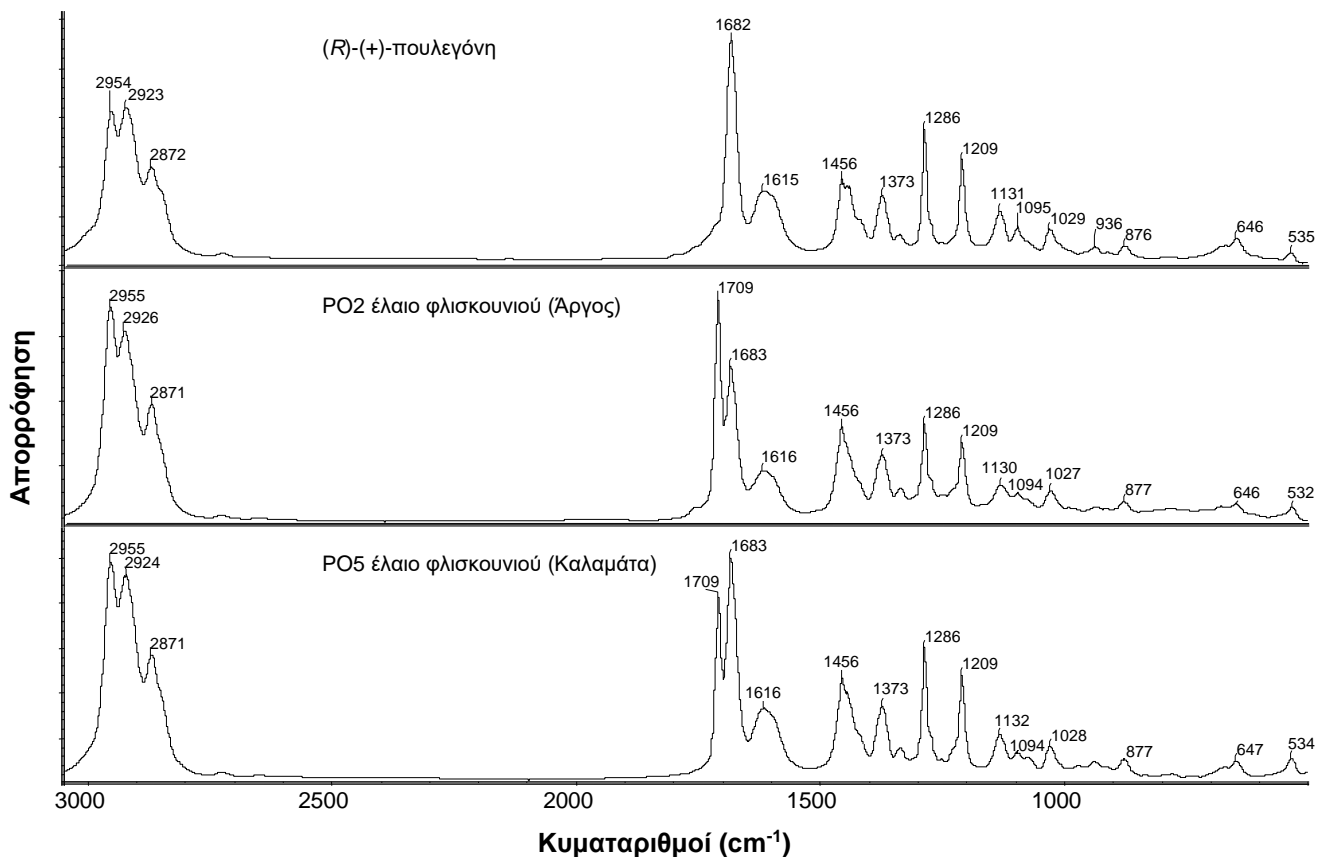
ελαίου από φλισκούνη (SPO1–SPO5) το ανώτατο όριο αυξήθηκε στα 860 mg/mL, ενώ το κατώτερο όριο μειώθηκε στα 157 mg/mL.

2.3.3. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR

Το τυπικό φάσμα FT-IR της πουλεγόνης (Σχήμα 2.2) περιλαμβάνει χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης στα $\sim 2954\text{ cm}^{-1}$ (ασύμμετρη τάση C–H, $-\text{CH}_3$), 2923 cm^{-1} (ασύμμετρη τάση $-\text{CH}_2-$, συμμετρική τάση $-\text{CH}_3$ λόγω $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) και 2872 cm^{-1} (συμμετρική τάση $-\text{CH}_2-$, συμμετρική τάση $-\text{CH}_3$ λόγω $>\text{CH}-\text{CH}_3$) που συνδέονται με την ύπαρξη μεθυλο- και μεθυλενο-ομάδων [40]. Η ισχυρή έντασης κορυφή που εμφανίζεται στα $\sim 1682\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στη δόνηση τάσης του κετονικού καρβονυλίου (C=O), ενώ η πλατιά ταινία απορρόφησης με ένταση μεσαίας ισχύος στα $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στη δόνηση τάσης του διπλού δεσμού C=C, ο οποίος βρίσκεται σε συζυγία με την καρβονυλική ομάδα (C=O) [40]. Η περιοχή «δακτυλικών αποτυπωμάτων» μεταξύ 1500 και 500 cm^{-1} παρέχει σύνθετες αλλά σημαντικές πληροφορίες που συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό ενός οργανικού μορίου [40]. Η φασματική ταινία στα 1456 cm^{-1} αντιπροσωπεύει την ψαλιδωτή δόνηση του $-\text{CH}_2-$ καθώς και τις ασύμμετρες δονήσεις παραμόρφωσης των $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ και $-\text{CH}_3$. Οι χαρακτηριστικές ταινίες στα 1373 και 1286 cm^{-1} αποδίδονται στις συμμετρικές δονήσεις παραμόρφωσης του δεσμού C–H των $>\text{CH}-\text{CH}_3$ και $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, αντίστοιχα [40]. Η ταινία στα 1209 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση παραμόρφωσης των δεσμών C–H και πιθανώς στη δόνηση κάμψης του C=O (C–CO–C), ενώ οι κορυφές ασθενών εντάσεων στην περιοχή $1131-936\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται κυρίως στις δονήσεις κλυδωνισμού των CH_3 στο μόριο της πουλεγόνης [40,41]. Η ταινία στα 876 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση σεισης του C–H και τη δόνηση του δακτυλίου. Η δόνηση παραμόρφωσης στο επίπεδο για την ομάδα C–CO–C συνδέεται με την ταινία απορρόφησης στα 646 cm^{-1} [28,40]. Η φασματική ταινία που εμφανίζει η πουλεγόνη στα 535 cm^{-1} αποδίδεται στις επιμέρους δονήσεις κλυδωνισμού του $-\text{CH}_2-$ και παραμόρφωσης του C–C=O, καθώς και στη C=C δόνηση σκελετού [40].

Δεδομένης της σημαντικά υψηλής συγκέντρωσης πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια φλισκουνηίου PO1-PO5, τα αντίστοιχα φάσματα FT-IR των ελαίων χαρακτηρίζονται, κυρίως, από τις κορυφές του φάσματος της πουλεγόνης (Σχήμα 2.2). Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια από

φλισκούνι παρουσιάζουν άλλη μία χαρακτηριστική κορυφή στα 1709 cm^{-1} (Σχήμα 2.2), που οφείλεται στη δόνησης τάσης C=O [40] της ισομινθόνης και της μινθόνης.

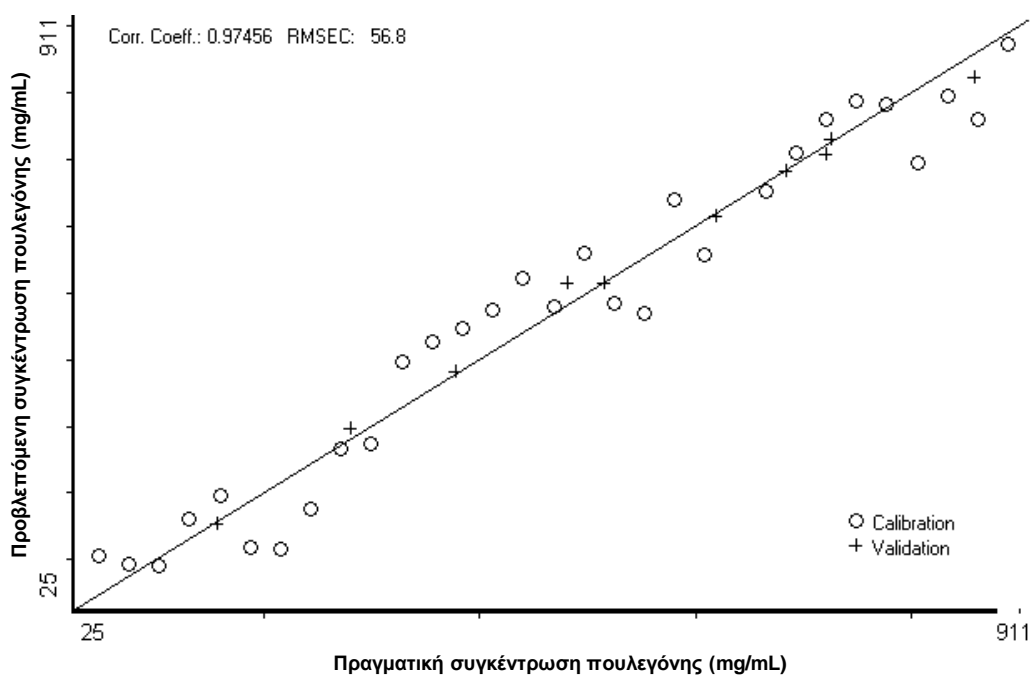


Σχήμα 2.2. Φάσματα FT-IR της πουλεγόνης και χαρακτηριστικών αιθερίων ελαίων από δείγματα φλισκουνιού με χημειότυπο πουλεγόνης στη φασματική περιοχή $3050\text{-}500\text{ cm}^{-1}$.

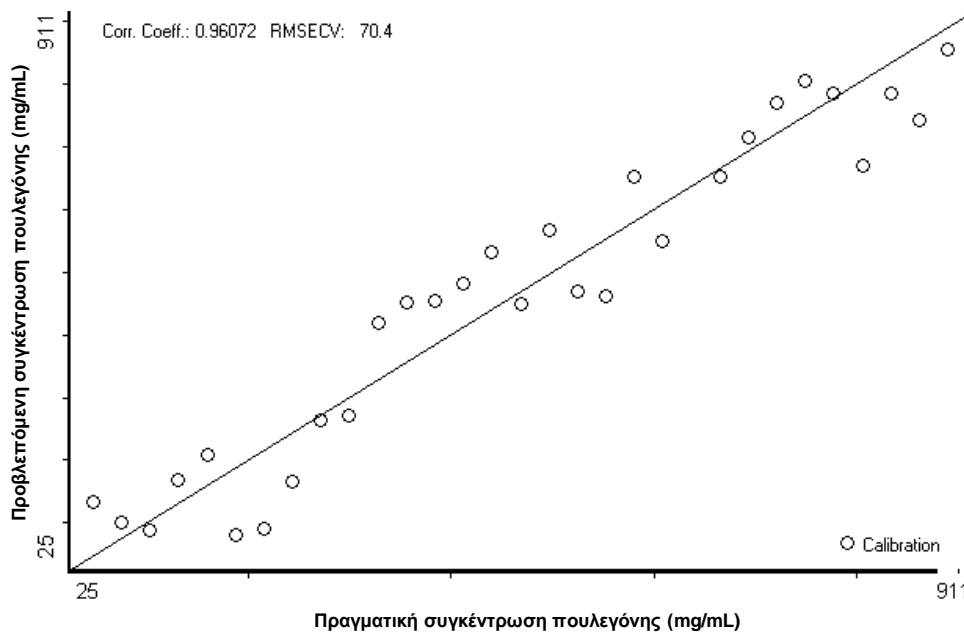
2.3.4. Ποσοτικός προσδιορισμός με FT-IR

Για την ανάπτυξη του μοντέλου βαθμονόμησης με εφαρμογή του αλγορίθμου PLS στα φασματοσκοπικά δεδομένα, λήφθηκαν υπόψη μόνο δεδομένα από τις φασματικές περιοχές με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Με τον τρόπο αυτό έγινε, ταυτόχρονα, χρήση λιγότερων μεταβλητών και

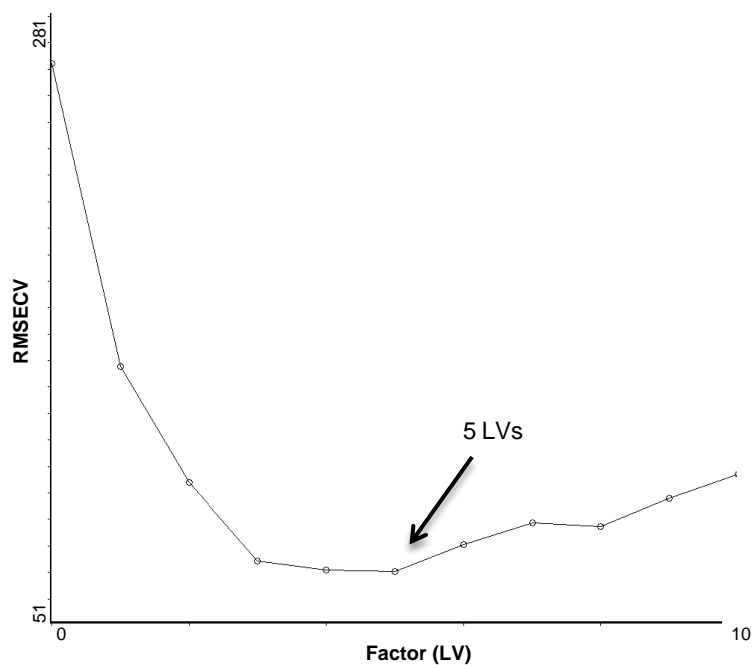
τα πρότυπα βαθμονόμησης ήταν περισσότερο αντιπροσωπευτικά των υπό μέτρηση δειγμάτων [42]. Τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την πρόβλεψη των δειγμάτων προέκυψαν χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικά δεδομένα από το εύρος κυματαριθμών $1650\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$. Ο συντελεστής συσχέτισης r_c για το μοντέλο βαθμονόμησης παρουσίασε, επίσης, την υψηλότερη τιμή (0.97) με χρήση των δεδομένων της συγκεκριμένης περιοχής, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιήθηκαν τα σφάλματα βαθμονόμησης (RMSEC) και πρόβλεψης (RMSEP), λαμβάνοντας τιμές 56.8 και 17.1, αντίστοιχα (Σχήμα 2.3). Για τη διασταυρωμένη επικύρωση, οι τιμές των r_{cv} και RMSECV ήταν 0.96 και 70.4, αντίστοιχα (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.3. Μοντέλο βαθμονόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό πουλεγονής με χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR. Τα δείγματα βαθμονόμησης και επικύρωσης του μοντέλου απεικονίζονται με τα σύμβολα (○) και (+), αντίστοιχα.



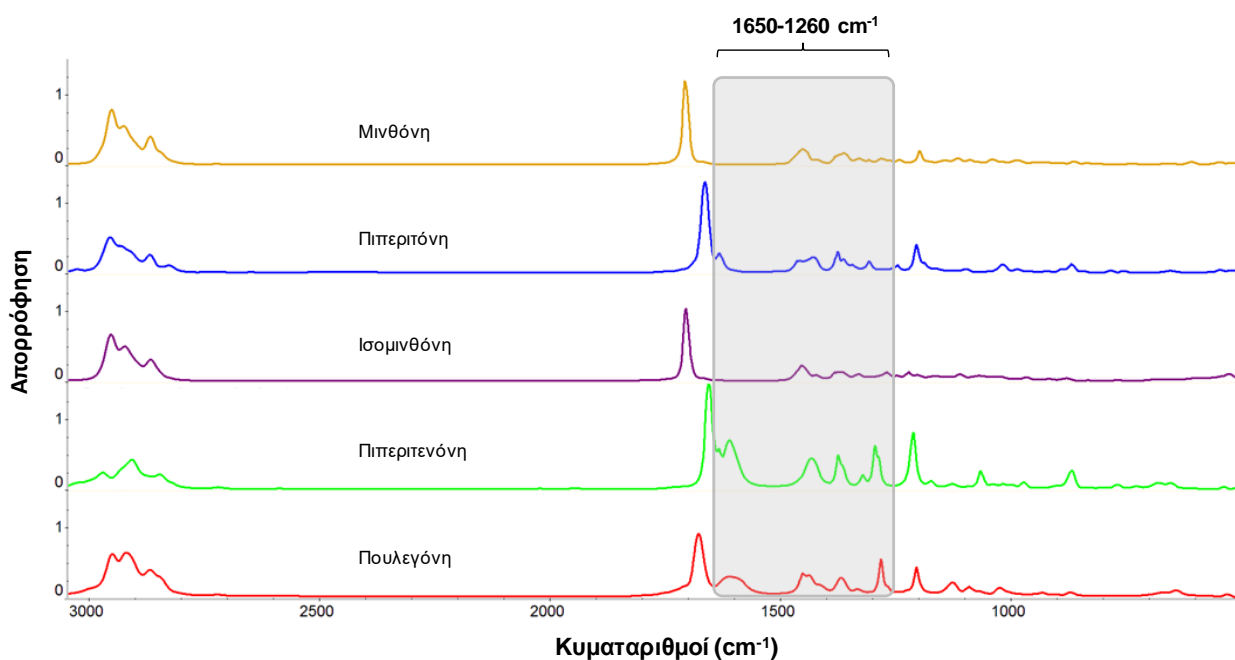
Σχήμα 2.4. Επίδοση του μοντέλου βαθμονόμησης κατά τη διασταυρωμένη επικύρωση με την επαναληπτική διαδικασία μιας παράλειψης (LOO).



Σχήμα 2.5. Διάγραμμα μεταβολής των τιμών RMSECV σύμφωνα με τον αριθμό των λανθανουσών μεταβλητών/παραγόντων PLS (LVs) στη διασταυρωμένη επικύρωση και στη βαθμονόμηση του μοντέλου PLS για τον προσδιορισμό της πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια φλισκουιού. Ο βέλτιστος αριθμός παραγόντων που συνετέλεσαν στο να ελαχιστοποιηθεί η τιμή RMSECV και ακολούθως η τιμή PRESS ήταν 5.

Επιπλέον, ο μέγιστος αριθμός λανθανουσών μεταβλητών (παραγόντων PLS, LVs) που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της βέλτιστης τιμής PRESS ήταν 10, ενώ ο βέλτιστος αριθμός LVs που οδήγησε στην ελάχιστη τιμή PRESS ήταν 5, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.5. Με χρήση των 5 LVs ερμηνεύτηκε το 99.9% της διακύμανσης στον πίνακα X (φασματοσκοπικά δεδομένα) και το 95.0% της διακύμανσης στον πίνακα Y (συγκέντρωση).

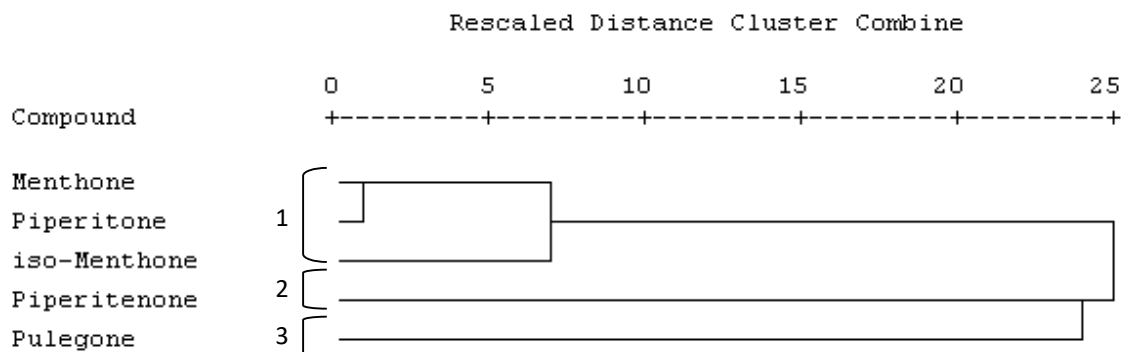
Η περιοχή που επιλέχθηκε για το μοντέλο ποσοτικοποίησης ($1650-1260\text{ cm}^{-1}$) δείχνει να διαφοροποιεί την πουλεγόνη από τα άλλα πτητικά συστατικά των ελαίων φλισκουιού, λόγω της ετερογένειας των φασμάτων FT-IR που καταγράφηκαν στις αντίστοιχες περιπτώσεις (Σχήμα 2.6).



Σχήμα 2.6. Φάσματα FT-IR της πουλεγόνης και των υπολοίπων βασικών πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου από φλισκούνι, όπου επισημαίνεται η επιλεγμένη φασματική περιοχή $1650-1260\text{ cm}^{-1}$.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες, εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο του Ward, έδειξαν πως στην φασματική περιοχή $1650-1260\text{ cm}^{-1}$ γίνεται σαφής διάκριση μεταξύ της πουλεγόνης και των άλλων βασικών συστατικών των ελαίων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.7, η πουλεγόνη και η πιπεριτενόνη ανήκουν σε ξεχωριστές ομάδες,

σε αντίθεση με την πρώτη ομάδα που περιλαμβάνει τις ουσίες μινθόνη, πιπεριτόνη και ισομινθόνη.



Σχήμα 2.7. Ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες σύμφωνα με τον αλγόριθμο του Ward για τα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR της περιοχής $1650\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ που προέκυψαν από τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων από φλισκούνι.

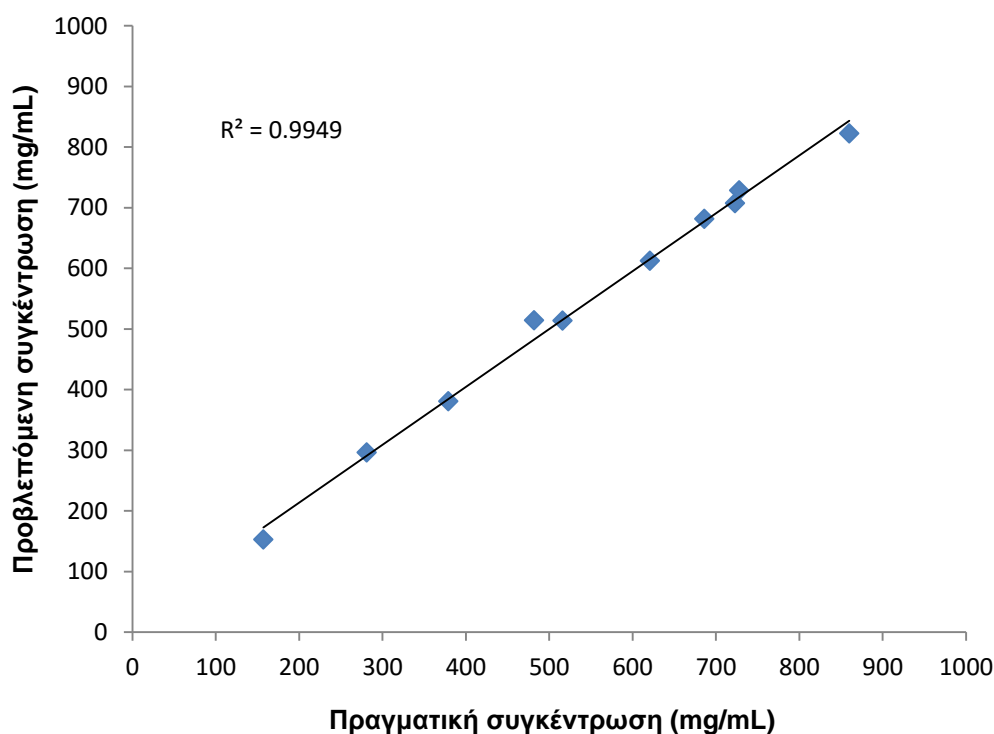
Πίνακας 2.2. Συγκέντρωση πουλεγόνης (\pm SD) στα αιθέρια έλαια από φλισκούνι, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αναφοράς GC-FID και τη νέα μέθοδο που βασίστηκε στη φασματοσκοπία FT-IR. Παρατίθενται, επίσης, οι τιμές που προέκυψαν από τους στατιστικούς ελέγχους F και t .

Δείγμα ελαίου	Συγκέντρωση πουλεγόνης (mg/mL)		Έλεγχος F^{α}	Έλεγχος t^{α}
	GC-FID	FT-IR		
SPO1 $^{\gamma}$	157 \pm 4	153 \pm 32	64.0	0.2
SPO2 $^{\gamma}$	281 \pm 8	297 \pm 16	4.0	1.3
SPO3 $^{\gamma}$	379 \pm 31	381 \pm 42	1.8	0.1
PO1 $^{\beta}$	482 \pm 33	515 \pm 53	2.6	0.7
PO2 $^{\beta}$	516 \pm 28	514 \pm 81	8.4	0.0
PO3 $^{\beta}$	621 \pm 18	613 \pm 9	4.0	0.6
SPO4 $^{\gamma}$	686 \pm 22	682 \pm 25	1.3	0.2
PO4 $^{\beta}$	723 \pm 51	708 \pm 37	1.9	0.3
PO5 $^{\beta}$	728 \pm 57	729 \pm 14	16.6	0.0
SPO5 $^{\gamma}$	860 \pm 24	823 \pm 22	1.2	1.6

$^{\alpha}$ Επίπεδο εμπιστοσύνης: 99%. $^{\beta}$ PO1-PO5: Απομονωμένα αιθέρια έλαια από φλισκούνι. $^{\gamma}$ SPO1-SPO5: Εμπλουτισμένα έλαια από φλισκούνι.

Τα αποτελέσματα για όλα τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων πρόβλεψης συνοψίζονται στον Πίνακα 2.2. Ο στατιστικός έλεγχος F που εφαρμόστηκε έδειξε ότι για επίπεδο εμπιστοσύνης 99% δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στην επαναληψιμότητα των δύο μεθόδων. Επιπλέον, από τον έλεγχο t υποδεικνύεται η ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου, με δεδομένο ότι δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών που εκτιμήθηκαν από τη μέθοδο και των τιμών αναφοράς, για επίπεδο εμπιστοσύνης 99% (Πίνακας 2.2).

Το Σχήμα 2.8 απεικονίζει γραφικά τη γραμμική συσχέτιση των συγκεντρώσεων πουλεγόνης στα δείγματα PO1-PO5 και SPO1-SPO5, όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο αναφοράς GC-FID και την προτεινόμενη μέθοδο με FT-IR και PLS. Η κλίση της ευθείας ήταν 0.95, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης r ήταν 0.997.



Σχήμα 2.8. Σύγκριση τιμών αναφοράς (GC-FID) και τιμών που προέκυψαν με χρήση του μοντέλου PLS, βάσει των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR, για τη συγκέντρωση πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια από φλισκούνι.

2.4. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η φασματοσκοπία FT-IR βρέθηκε να είναι ένα πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο για τον ακριβή και γρήγορο ποσοτικό προσδιορισμό της πουλεγόνης στο αιθέριο έλαιο από φλισκούνι. Σε σύγκριση με τις καθιερωμένες αεριοχρωματογραφικές μεθόδους, οι οποίες είναι πολύ υψηλότερου κόστους και χρονοβόρες, η μέθοδος που αναπτύχθηκε με την τεχνική FT-IR σε συνδυασμό με τη χρήση χημειομετρίας φάνηκε πως είναι υποσχόμενη. Για την εφαρμογή τέτοιων μεθόδων υψηλής απόδοσης σε εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου απαιτείται ελάχιστη εκπαίδευση του προσωπικού, αφού τα φασματοσκοπικά δεδομένα καταγράφονται με απλό τρόπο. Επίσης, μετά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου βαθμονόμησης, οι προβλέψεις μπορούν να πραγματοποιηθούν άμεσα.

Τα πλεονεκτήματα της παρούσας μεθόδου δείχνουν πως θα μπορούσε να αποτελέσει ενδεδειγμένη εναλλακτική μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πουλεγόνης σε αιθέρια έλαια από φλισκούνι, όπως αναφέρει και σχετική μονογραφία του Διεθνούς Οργανισμού Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC) [23].

2.5. Βιβλιογραφία

- [1] Barceloux, D.G. (2008). Pennyroyal and pulegone (*Mentha pulegium* L.). In *Medical toxicology of natural substances: Foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animals* (pp. 563–567). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- [2] Hayes, J.R., Stavanja, M.S., Lawrence, B.M. (2007). Biological and toxicological properties of mint oils and their major isolates: Safety assessment. In B.M. Lawrence (Ed.), *Mint: The genus Mentha* (pp. 462–477). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- [3] Pardo de Santayana, M., Blanco, E., Morales, R. (2005). Plants known as té in Spain: an ethno-pharmaco-botanical review. *J. Ethnopharmacol.* 98, 1–19.
- [4] Delatte, A. (1956). *Le cycéon, breuvage rituel des mystères d'Éleusis*. In De Strycker E. (Ed.), *L'antiquité classique* (Vol. 25, Numéro 2, pp. 536–538). Brussels, Belgium: Association L'Antiquité classique.
- [5] Karousou, R., Balta, M., Hanlidou, E., Kokkini, S. (2007). “Mints”, smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries. *J. Ethnopharmacol.* 109, 248–257.
- [6] Khojasteh-Bakht, S.C., Chen, W., Koenigs, L.L., Peter, R.M., Nelson, S.D. (1999). Metabolism of (*R*)-(+)-pulegone and (*R*)-(+)-menthofuran by human liver cytochrome P-450s: Evidence for formation of a furan epoxide. *Drug Metab. Dispos.* 27, 574–580.
- [7] Mahboubi, M., Haghi, G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 119, 325–327.
- [8] Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Res. Int.* 45, 313–319.
- [9] Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind. Crop Prod.* 36, 81–87.
- [10] Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* 103, 778–786.
- [11] Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Ind. Crop Prod.* 34, 802–817.

- [12] Ravid, U., Putievsky, E., Katzir, I. (1994). Chiral GC analysis of (1*R*)(+)-pulegone with high enantiomeric purity in essential oils of some Lamiaceae aromatic plants. *Flavour Fragrance J.* 9, 205–207.
- [13] Kokkini, S., Hanlidou, E., Karousou, R. (2004). Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *J. Essent. Oil Res.* 16, 588–593.
- [14] Turner, G.W., Croteau, R. (2004). Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiol.* 136, 4215–4227.
- [15] Grundy, D.L., Still, C.C. (1985). Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 23, 383–388.
- [16] Council Directive 88/388/EEC of 22 June 1988 on the approximation of the laws of the Member States relating to flavorings for use in foodstuffs and to source materials for their production. Official Journal L 184 (July 15, 1988).
- [17] European Commission (2008). Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC. *Off. J. Eur. Union* L 354, 34–50.
- [18] Gordon, P., Khojasteh, S.C. (2015). A decades-long investigation of acute metabolism-based hepatotoxicity by herbal constituents: a case study of pennyroyal oil. *Drug Metab. Rev.* 47, 12–20.
- [19] Engel, W. (2003). In vivo studies on the metabolism of the monoterpene pulegone in humans using the metabolism of ingestion-correlated amounts (MICA) approach: Explanation for the toxicity differences between (S)-(-)- and (R)-(+)-pulegone. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6589–6597.
- [20] Kalgutkar, A.S., Dalvie, D., Obach, R.S., Smith, D.A. (2012). Bioactivation and natural products. In A.S. Kalgutkar et al. (Eds.), *Reactive drug metabolites. Methods and principles in medicinal chemistry series* (Vol. 55, pp. 203–224). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- [21] Chen, X.-W., Serag, E.S., Sneed, K.B., Zhou, S.-F. (2011). Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. *Chem. Biol. Interact.* 192, 161–176.
- [22] Stickel, F., Shouval, D. (2015). Hepatotoxicity of herbal and dietary supplements: an update. *Arch. Toxicol.* 89, 851–865.

- [23] IARC (2016). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some drugs and herbal products* (Vol. 108, pp. 141–154). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [24] EMA (2016). *Public statement on the use of herbal medicinal products containing pulegone and menthofuran*. (Final, July 12, 2016). London, UK: European Medicines Agency - HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products).
- [25] Siano, F., Catalfamo, M., Cautela, D., Servillo, L., Castaldo, D. (2005). Analysis of pulegone and its enantiomeric distribution in mint-flavoured food products. *Food Addit. Contam.* 22, 197–203.
- [26] Bicchi, C., Frattini, C. (1980). Quantitative determination of minor components in essential oils: determination of pulegone in peppermint oils. *J. Chromatogr. A* 190, 471–474.
- [27] Marriott, P.J., Shellie, R. Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A* 936, 1–22.
- [28] Schulz, H., Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 43, 13–25.
- [29] Mirghani, M.E.S., Che Man, Y.B. (2003). A new method for determining gossypol in cottonseed oil by FTIR spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 625–628.
- [30] Wilson, N.D., Ivanova, M.S., Watt, R.A., Moffat, A.C. (2002). The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1257–1263.
- [31] De Nardo, T., Shiroma-Kian, C., Halim, Y., Francis, D., Rodríguez-Saona, L.E. (2009). Rapid and simultaneous determination of lycopene and β -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1105–1112.
- [32] Schulz, H., Drews, H.H., Krüger, H. (1999). Rapid NIRS determination of quality parameters in leaves and isolated essential oils of *Mentha* species. *J. Essent. Oil Res.* 11, 185–190.
- [33] Bombarda, I., Dupuy, N., Le Van Da, J.-P., Gaydou, E.M. (2008). Comparative chemometric analyses of geographic origins and compositions of lavandin var. Grosso essential oils by mid infrared spectroscopy and gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* 613, 31–39.
- [34] Kanakis, C.D., Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Pappas, C., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. (2012). Classification of Greek *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) samples, according to geographical location by Fourier transform infrared spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 23, 34–43.
- [35] Clevenger, J.F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.* 17, 345–349.

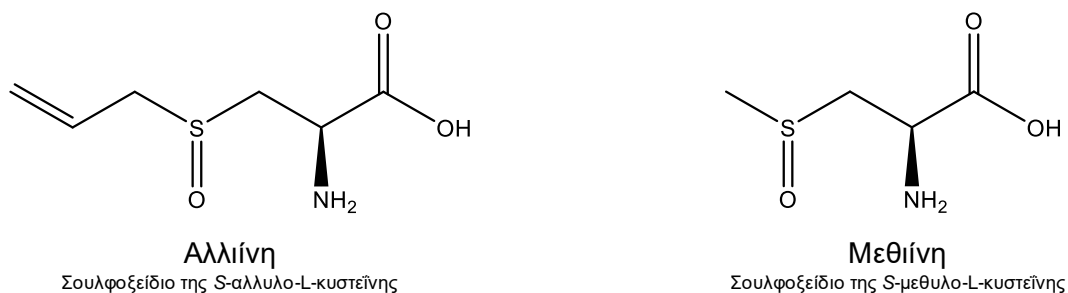
-
- [36] Golmakani, M.-T., Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.* 109, 925–930.
- [37] Van Den Dool, H., Kratz, P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 11, 463–471.
- [38] Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry*. (4th ed.). Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- [39] Haaland, D.M., Thomas, E.V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.* 60, 1193–1202.
- [40] Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts*. (3rd ed.). England: John Wiley & Sons Ltd.
- [41] Debie, E., Bultinck, P., Herrebout, W., van der Veken, B. (2008). Solvent effects on IR and VCD spectra of natural products: an experimental and theoretical VCD study of pulegone. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 3498–3508.
- [42] Fuller, M.P., Ritter, G.L., Draper, C.S. (1988). Partial least-squares quantitative analysis of infrared spectroscopic data. Part II: Application to detergent analysis. *Appl. Spectrosc.* 42, 228–236.

3. Ποσοτικός προσδιορισμός αλλιλίνης και μεθιλίνης στο σκόρδο μέσω υγρής χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας FT-IR

3.1. Εισαγωγή

Το σκόρδο (*Allium sativum* L.) αποτελεί αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό που ανά τους αιώνες καλλιεργείται, κυρίως, για το βολβό του. Θεωρείται, επίσης, βολβώδες λαχανικό, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως τρόφιμο και άρτυμα, λόγω της γεύσης και του αρώματος που προσδίδει. Οι ποικίλες φαρμακευτικές του ιδιότητες το καθιστούν, παράλληλα, σημαντική πηγή για ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό συμπληρωμάτων διατροφής σε όλον τον κόσμο [1]. Σύμφωνα με πολυάριθμες αναφορές, το σκόρδο παρουσιάζει ένα ευρύτατο φάσμα βιολογικής δραστηριότητας, όπου περιλαμβάνεται η αντιοξειδωτική, η αντικαρκινική, η αντιφλεγμονώδης και η αντιμικροβιακή δράση, καθώς και η ευεργετική επίδραση σε καρδιοαγγειακές παθήσεις και στο διαβήτη [1,2]. Η βιοδραστηριότητα του σκόρδου συνδέεται με τις οργανοθειούχες ενώσεις που περιέχει [1,2].

Η διαφοροποίηση του σκόρδου από άλλα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έγκειται στο γεγονός ότι τα πτητικά συστατικά του δεν προϋπάρχουν στο βολβό του, αλλά αντιθέτως σχηματίζονται αφού προκληθεί η δράση του ενζύμου αλλινάση [3,4]. Τα πτητικά συστατικά του σκόρδου σχηματίζονται κατά την κοπή ή σύνθλιψη της σκελίδας, έπειτα από ενζυματική διάσπαση πρόδρομων ενώσεων όπως, κυρίως, η αλλιλίνη και η μεθιλίνη (Εικόνα 3.1), οι οποίες αποτελούν σουλφοξείδια της S-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης.



Εικόνα 3.1. Δομές της αλλιλίνης και της μεθιλίνης.

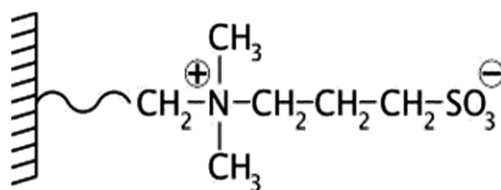
Οι πρόδρομες ενώσεις αυτές ανήκουν στα μη πρωτεϊνικά θειούχα αμινοξέα του σκόρδου, όπου αντιστοιχεί το 1-5% του ξηρού βάρους [5]. Η αλλίνη αποτελεί την κυριότερη πρόδρομη ένωση των συστατικών του αρώματος του σκόρδου [6] και η βιοσύνθεση της μπορεί να συντελεστεί έπειτα από μια σειρά αντιδράσεων είτε μέσω της γλουταθειόνης είτε μέσω της σερίνης [7]. Η μεθίνη συναντάται σε διάφορους εκπροσώπους των γενών *Allium* και *Brassica* [8,9], και ειδικότερα για την περίπτωση του σκόρδου έχει αναφερθεί ότι βιοσυντίθεται μέσω της γλουταθειόνης [7]. Όπως έχει αναφερθεί, τα σουλφοξείδια της S-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης απαντούν κατά κύριο λόγο ως (+)-ισομερή, καθώς η οξειδάση της S-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης παρουσιάζει εκλεκτικότητα για το σχηματισμό τους, ενώ επίσης η αλλιινάση αντιδρά κατά βάση με (+)-ισομερή των σουλφοξειδίων [10].

Με δεδομένο τη σχετική θερμική αστάθεια των σουλφοξειδίων της S-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης [9], η υγρή χρωματογραφία αποτελεί μέχρι και σήμερα την κύρια τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, εξασφαλίζοντας ήπιες συνθήκες διαχωρισμού. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι με χρήση υγρής χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για τον προσδιορισμό της αλλίνης και άλλων σουλφοξειδίων της S-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης στο σκόρδο. Από τις πρώτες μεθόδους που δημοσιεύθηκαν κατά τα έτη 1988-1989 για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλίνης στο σκόρδο [11,12], οι οποίες στηρίχθηκαν στη χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης κυρίως έπειτα από παραγωγοποίηση της ουσίας, οι περισσότερες μέθοδοι που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν το σχηματισμό παραγώγων για τη βελτίωση του χρόνου κατακράτησης ή για να διευκολύνεται η ανίχνευση με UV-Vis ή φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FLD) [3,8,13-18]. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλλίνης και της μεθίνης έπειτα από παραγωγοποίηση έχει, επίσης, επιτευχθεί με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID) [5,9,18], ή με μικυλλιακή ηλεκτροκινητική τριχοειδή χρωματογραφία [19].

Η παραγωγοποίηση, ωστόσο, παρουσιάζει μειονεκτήματα όπως το ότι απαιτεί χρόνο, αντιδραστήρια και θα μπορούσε να οδηγήσει σε σφάλμα κατά την ποσοτικοποίηση εάν η αντίδραση δεν έχει ολοκληρωθεί [20]. Σε δύο από τις πρώτες μεθόδους που έχουν αναφερθεί και αφορούν τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλίνης στο σκόρδο και σε συναφή προϊόντα χωρίς παραγωγοποίηση, περιλαμβάνεται η χρήση βιοαισθητήρων με την τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή (FIA) [21-22], ενώ για τον προσδιορισμό της αλλίνης και της μεθίνης έχει,

επίσης, αναπτυχθεί μέθοδος με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση [23]. Στις ερευνητικές εργασίες όπου αναπτύχθηκαν υδροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλιλίνης, της μεθιλίνης και άλλων οργανοθειούχων ενώσεων του σκόρδου χωρίς παραγωγοποίηση, χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις στατική φάση με αμινο- ομάδες και ανίχνευση με UV-Vis [20, 24-26]. Σε πρόσφατη μελέτη, επίσης, χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία - συζευγμένη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό αλλιλίνης στο σκόρδο [27].

Για τον προσδιορισμό πολικών μορίων με υγρή χρωματογραφία, τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται ως εναλλακτική η χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) [28-31]. Ως τρόπος διαχωρισμού συνδυάζει τις υδροχρωματογραφικές τεχνικές κανονικής και αντίστροφης φάσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κινητή φάση συνίσταται κυρίως από έναν πολικό οργανικό διαλύτη που είναι συνήθως το ακετονιτρίλιο, ενώ επίσης περιέχεται έως 30% νερό [30]. Οι μηχανισμοί διαχωρισμού της HILIC στηρίζονται στην προσρόφηση και στην κατανομή λόγω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (ηλεκτροστατικής φύσης, δεσμών υδρογόνου, αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου και ασθενών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων) [30]. Ανάμεσα στις δημοφιλέστερες στήλες που προσφέρονται για αναλύσεις με HILIC βρίσκονται αυτές με στατική φάση διοντικής σουλφοβεταΐνης [31] (Εικόνα 3.2). Πρόκειται για στατική φάση ειδική για υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις που επιτρέπει τη γρήγορη και αποτελεσματική ανάλυση πολικών ουσιών χωρίς να έχει προηγηθεί παραγωγοποίησή τους [32].



Εικόνα 3.2. Η ομάδα της διοντικής σουλφοβεταΐνης στη στατική φάση της στήλης ZIC-HILIC.

Κατά την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων, οι πειραματικές παράμετροι τεχνικών όπως η υγρή χρωματογραφία είναι δυνατό να βελτιστοποιηθούν χρησιμοποιώντας πολυμεταβλητές τεχνικές πειραματικού σχεδιασμού [33]. Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM) συνιστά

χαρακτηριστική τεχνική, όπου τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται σε μια πολυωνυμική εξίσωση που περιγράφει τη σχέση μεταξύ μιας εξαρτημένης μεταβλητής (απόκρισης) και των ανεξάρτητων μεταβλητών (παραγόντων), καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Το μοντέλο που προκύπτει εντοπίζει τις σημαντικές πειραματικές παραμέτρους και ταυτόχρονα βελτιστοποιεί τα επίπεδά τους, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη απόκριση, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιείται ο αναγκαίος αριθμός πειραματικών δοκιμών που θα πρέπει να εκτελεστούν. Μεταξύ των πιο δεδομένων μεθόδων πειραματικού σχεδιασμού που εφαρμόζονται στη βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων βρίσκεται ο κεντρικός σύνθετος συνδυασμός (CCD) [33]. Στην περίπτωση του σκόρδου, η τεχνική RSM έχει εφαρμοστεί για την βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής της αλλίνης από δείγμα σκόρδου σε σκόνη [34].

Στο πλαίσιο ανάπτυξης γρήγορων μεθόδων για την εκτίμηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σκόρδου δύναται, επίσης, να χρησιμοποιηθούν τεχνικές δονητικής φασματοσκοπίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μια μέθοδος που αναπτύχθηκε με χρήση της φασματοσκοπίας Raman με μετασχηματισμό Fourier (FT-Raman) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των άκυκλων, ακόρεστων θειούχων συστατικών στο αιθέριο έλαιο σκόρδου [35]. Τα πτητικά συστατικά αυτά έχουν ιδιαίτερη σημασία για το άρωμα του σκόρδου, καθώς βρέθηκε ότι περιέχονται σε ποσοστό 33.3-75.3% του αιθερίου ελαίου. Σε άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία εγγύς υπερύθρου για τον χαρακτηρισμό δειγμάτων σκόρδου από διαφορετικές καλλιεργούμενες ποικιλίες, είτε βιολογικής είτε συμβατικής παραγωγής [36]. Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR-IR) σε συνδυασμό με τη μέθοδο παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα για την εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων σκόρδου από τέσσερις πολιτείες των ΗΠΑ. Επιπλέον, η χρήση ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) και διαχωριστικής ανάλυσης οδήγησαν στην ανάπτυξη μοντέλων ταξινόμησης βάσει γεωγραφικής προέλευσης [37]. Η τεχνική ATR-IR σε συνδυασμό με τη μέθοδο PLS εφαρμόστηκε, επίσης, πρόσφατα για την ανίχνευση νοθείας του σκόρδου σε μορφή σκόνης με άμυλο καλαμποκιού (corn flour) [38].

Στην παρούσα μελέτη ο στόχος ήταν η ανάπτυξη νέων μεθόδων για τον απλούστερο, όσο το δυνατόν πιο άμεσο και γρήγορο ποσοτικό προσδιορισμό της αλλίνης και της μεθίνης. Οι ενώσεις αυτές συνιστούν τις σημαντικότερες πρόδρομες ενώσεις για πλήθος βιοδραστικών

μορίων του σκόρδου. Στο πρώτο μέρος παρουσιάζονται οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) συζευγμένης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) και ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών - ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS). Για τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών έγινε εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης (RSM) μέσω του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD). Ακολούθως, γίνεται περιγραφή της εναλλακτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και συγκεκριμένα την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS), σε συνδυασμό με την πολυμεταβλητή ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων.

3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός αλλιΐνης και μεθΐνης στο σκόρδο μέσω HILIC-PDA/ESI-MS

3.2.1. Πειραματικό μέρος

3.2.1.1. Φυτικό υλικό και χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια των δειγμάτων σκόρδου που χρησιμοποιήθηκαν ($n = 5$), εσοδείας 2011 και 2012, πραγματοποιήθηκε από τοπικούς παραγωγούς των περιοχών Ν. Βύσσας (Β. Έβρος) και Χαλκίδας (Εύβοια), καθώς και από καταστήματα τροφίμων. Τα δείγματα, αρχικά, παρέμειναν για χρονικό διάστημα επτά ημερών σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας και στη συνέχεια αποθηκεύθηκαν σε συνθήκες ψύξης ($-22\text{ }^{\circ}\text{C}$) μέχρι να αναλυθούν. Οι πρότυπες ουσίες L-αλλιΐνη (ACSO, καθαρότητα $\geq 98\%$) και L-μεθΐνη (MCSO, $\geq 98\%$) προμηθεύθηκαν από την εταιρεία LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA), ενώ η S-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνη (CMC) ήταν της εταιρείας Sigma (St. Louis, MO, USA). Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο (ACN) υψηλής καθαρότητας για LC-MS και υπερκαθαρό νερό που παραλήφθηκε μέσω της συσκευής MilliQ plus (ειδική αντίσταση $18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$), της εταιρείας Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

3.2.1.2. Διαδικασία απομόνωσης

Για την εκχύλιση των μη πτητικών συστατικών του σκόρδου, κυρίως αλλιΐνη και μεθΐνη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που έχει αναφερθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία [18,25], με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά, σκελίδες σκόρδου από κάθε δείγμα αποφλοιώθηκαν προσεκτικά, ακολούθησε ζύγιση ποσότητας 10 g περίπου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση σε υδατικό διάλυμα MeOH 90% (v/v) που περιείχε 10 mM HCl. Ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας, προκειμένου να παρεμποδιστεί η δράση του ενζύμου αλλινάση [9,27,39]. Σε κάθε δείγμα, έπειτα, έγινε προσθήκη 150 mL του διαλύματος MeOH και στη συνέχεια το δείγμα τεμαχίστηκε και ομογενοποιήθηκε με ομογενοποιητή (blender) χειρός για 1 λεπτό. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε υπό βρασμό για 5 λεπτά και ακολούθησε διήθηση με ηθμό Gooch υπό κενό. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές, χρησιμοποιώντας για κάθε εκχύλιση 150 mL του διαλύματος MeOH υπό

βρασμό. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους δείγμα συνενώθηκαν και το συνολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε μέχρι όγκου 15 mL με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή στους 40 °C. Ακολούθησε αποθήκευση των εκχυλισμάτων στους -22 °C για τουλάχιστον 12 ώρες. Στη συνέχεια, λήφθηκε όγκος 100 mL από το υπερκείμενο κάθε εκχυλίσματος και αναμίχθηκε με 400 mL διαλύτη αραιώσης ακετονιτρίλιο/νερό 75:25 (v/v) (2 mM μυρμηκικού οξέος, pH 3.5) και 500 mL του προτύπου διαλύματος αναφοράς (CMC, 1 mg/mL) με χρήση vortex για 1 λεπτό. Το τελικό δείγμα για χρωματογραφική ανάλυση παραλήφθηκε έπειτα από διήθηση με χρήση φίλτρου πορώδους 0.20 μm και διαμέτρου 15 mm (Chromafil Xtra PET-20/15).

3.2.1.3. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 5 mg/mL και 2 mg/mL για την αλλίνη και τη μεθίνη, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη υπερκαθαρό νερό (pH 3.5). Ακολούθως, προετοιμάστηκε διάλυμα εργασίας με συγκέντρωση αλλίνης 2 mg/mL και συγκέντρωση μεθίνης 0.16 mg/mL, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη αραιώσης ακετονιτρίλιο/νερό 75:25 (v/v) (2 mM μυρμηκικού οξέος, pH 3.5). Το διάλυμα εργασίας της S-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνης (CMC), συγκέντρωσης 1 mg/mL, προετοιμάστηκε με χρήση υπερκαθαρού νερού (pH 3.5). Σε όλες τις περιπτώσεις λήφθηκε υπόψη ο βαθμός καθαρότητας των ουσιών, ενώ για καλύτερη διαλυτοποίησή τους στα διαλύματα έγινε χρήση υδατόλουτρου υπερήχων για 1 λεπτό. Τα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας αποθηκεύθηκαν στους 4 °C.

Για τον έλεγχο γραμμικότητας των υγροχρωματογραφικών μεθόδων χρησιμοποιήθηκε σειρά προτύπων διαλυμάτων για επτά συγκεντρώσεις αλλίνης (100-200-350-500-650-800-1000 μg/mL) και μεθίνης (8-16-28-40-52-64-80 μg/mL), με χρήση του CMC ως προτύπου αναφοράς [4] σε συγκέντρωση 500 μg/mL.

3.2.1.4. Υγροχρωματογραφική ανάλυση

Για τον προσδιορισμό των παραληφθέντων μη πτητικών συστατικών του σκόρδου, αλλίνη και μεθίνη, εφαρμόστηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδίοδων (PDA) ή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό - φασματομετρίας μαζών (ESI-

MS). Χρησιμοποιήθηκε το όργανο LC/MS-2010A της εταιρείας Shimadzu, το οποίο είναι εξοπλισμένο με το σύστημα αντλίας δύο καναλιών LC-10ADvp, απαερωτή τύπου DGU-14A, σύστημα ανάμιξης διαλυτών FQV-10ALvp, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp, φούρνο στήλης CTO-10Avp, σύστημα ελέγχου SCL-10Avp, ενώ επίσης είναι εφοδιασμένο με τον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M10Avp. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς ήταν η ZIC-HILIC της εταιρείας Merck-Sequant (Umeå, Sweden), μήκους 150 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm, πορώδους 100Å και μεγέθους σωματιδίων 3.5 μm. Η θερμοκρασία στον κλίβανο της στήλης ήταν στους 30 °C [20].

Όγκος 5 μL από κάθε δείγμα εισήχθη και αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ισοκρατικό πρόγραμμα έκλουσης στις ακόλουθες χρωματογραφικές συνθήκες: ακετονιτρίλιο/νερό 75:25 (v/v) με 2 mM μυρμηκικού οξέος (pH 3.5), σε ροή 0.5 mL/min. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 210 nm [20,25], ενώ ο χρόνος ανάλυσης ήταν 30 min. Η ανάλυση με MS πραγματοποιήθηκε υπό συνθήκες θετικού ιονισμού, με την πηγή ηλεκτροψεκασμού σε ESI⁺ και τη θερμοκρασία στους 250 °C. Ως αέριο ξήρανσης και εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο υψηλής καθαρότητας. Η ροή του αερίου εκνέφωσης ήταν 1.5 L/min, ενώ η πίεση και η ροή του αερίου ξήρανσης ήταν 0.1 MPa και 10 L/min, αντίστοιχα, με τη θερμοκρασία αερίου ξήρανσης στους 300 °C. Το δυναμικό στην περιοχή εκνέφωσης ήταν 3.5 kV και η τάση του ανιχνευτή ήταν 1.88 kV. Η συλλογή των δεδομένων έγινε αρχικά με την τεχνική πλήρους σάρωσης, ενώ για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλιλίνης και της μεθίνης επιλέχθηκε η παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων (SIM). Η ταυτοποίηση των υπό εξέταση μη πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης, των φασμάτων UV και των φασμάτων μάζας με αυτά των αντίστοιχων προτύπων ουσιών. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του CMC (500 μg/mL) ως εσωτερικού (ESI-MS) ή εξωτερικού (PDA) προτύπου. Το λογισμικό LCMSsolution 3.4 της εταιρείας Shimadzu χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του συστήματος, τη συλλογή και την επεξεργασία των δεδομένων.

3.2.1.5. Βελτιστοποίηση των μεθόδων

Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM) μέσω του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD) εφαρμόστηκε με σκοπό τη βελτιστοποίηση των μεθόδων προσδιορισμού της αλλιλίνης και

μεθιίνης στο σκόρδο. Οι μεταβλητές που λήφθηκαν υπόψη ήταν το % ποσοστό νερού (x_1) και η τιμή του pH (x_2) στην κινητή φάση, ενώ οι αποκρίσεις που ελέγχθηκαν αφορούσαν τους λόγους μονομερούς/διμερούς, το εύρος κορυφών και τη διαχωριστικότητα (resolution, R) της αλλιίνης και της μεθιίνης. Κάθε μεταβλητή εξετάστηκε σε πέντε επίπεδα τιμών, τα οποία κωδικοποιούνται ως εξής: $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$, όπου $\alpha = 2^{n/4}$, $n = 0$ αριθμός των μεταβλητών, ενώ οι τιμές -1 , $+1$ και 0 αντιστοιχούν στο κατώτερο, το ανώτερο και το κεντρικό σημείο κάθε επιμέρους μεταβλητής. Η εξίσωση μετασχηματισμού των πραγματικών τιμών (z_i) σε κωδικοποιημένες τιμές περιγράφεται ως εξής [33]:

$$\text{Κωδικοποιημένη τιμή} = \frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \quad (1)$$

όπου z^0 η πραγματική τιμή στο κεντρικό σημείο και Δz_i η διαφορά της πραγματικών τιμών στο μέγιστο ή το ελάχιστο επίπεδο της μεταβλητής και το κεντρικό σημείο.

Ο αριθμός των πειραμάτων ορίστηκε σύμφωνα με τη σχέση $l = n^2 + 2n + c_p$ [33], όπου c_p είναι ο αριθμός των επαναλήψεων (3) στο κεντρικό σημείο. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 11 πειράματα (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Πειραματικός πίνακας για τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD) δύο μεταβλητών.

	x_1 (% H ₂ O)	x_2 (τιμή pH)
Παραγοντικός σχεδιασμός	-1	-1
	1	-1
	-1	1
	1	1
Αξονικά σημεία	$-\alpha$ (-1.41)	0
	α (1.41)	0
	0	$-\alpha$ (-1.41)
	0	α (1.41)
Κεντρικό σημείο ($n = 3$)	0	0
	0	0
	0	0

Η αξιολόγηση του μοντέλου που προέκυψε για κάθε απόκριση έγινε σύμφωνα με το συντελεστή προσδιορισμού (R^2), ενώ κάθε απόκριση κρίθηκε σημαντική με βάση τον έλεγχο F .

Επίσης, σημαντικοί θεωρήθηκαν οι συντελεστές με τιμή $p < 0.05$. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Design-Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

3.2.2. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Για την προετοιμασία των δειγμάτων σκόρδου με σκοπό την υγροχρωματογραφική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με όξινο διάλυμα MeOH προκειμένου να παρεμποδιστεί η δράση της αλλινάσης, η οποία όπως έχει αναφερθεί αδρανοποιείται σε τιμές pH κάτω από 3.6. [39]. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση MeOH στον εκχυλιστή διαλύτη προστατεύει τη στήλη, καθώς μειώνεται η διαλυτότητα των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών που περιέχονται στο σκόρδο [25].

Σύμφωνα με τα προκαταρκτικά πειράματα φάνηκε ότι η τιμή του pH στην κινητή φάση επηρεάζει σημαντικά τόσο το χρόνο κατακράτησης όσο και την εμφάνιση ιόντων διμερών, ιδίως της αλλιλίνης, στα φάσματα μάζας. Η οξίνιση της κινητής φάσης συχνά ενδείκνυται για υγροχρωματογραφικές αναλύσεις, καθώς η πρωτονίωση των ουσιών επιδρά στην κατακράτησή τους [20]. Το % ποσοστό νερού, επίσης, επηρεάζει το χρόνο κατακράτησης και την εμφάνιση ιόντων διμερών. Οι δύο αυτοί παράγοντες εξετάστηκαν ταυτόχρονα έτσι ώστε να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης και να ελαχιστοποιηθούν τυχόν σφάλματα στη μέθοδο με ESI-MS. Στον πίνακα 3.2 εμφανίζονται τα επίπεδα των δύο μεταβλητών που ελέγχθηκαν σύμφωνα με τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό. Οι αποκρίσεις που λήφθηκαν υπόψη ήταν ο λόγος μονομερούς/διμερούς, το εύρος κορυφής και η διαχωριστικότητα (R) για την αλλιλίνη και τη μεθιλίνη. Για τους προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/mL αλλιλίνης, μεθιλίνης και CMC, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αναφοράς. Η σημαντικότητα ($P > 0.05$) κάθε επιμέρους όρου στις εξισώσεις που περιγράφονται στον πίνακα 3.3 ελέγχθηκε με ανάλυση διασποράς (ANOVA).

Πίνακας 3.2. Πειραματικός πίνακας κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD) με τα επίπεδα των μεταβλητών και τις αποκρίσεις που μελετήθηκαν.

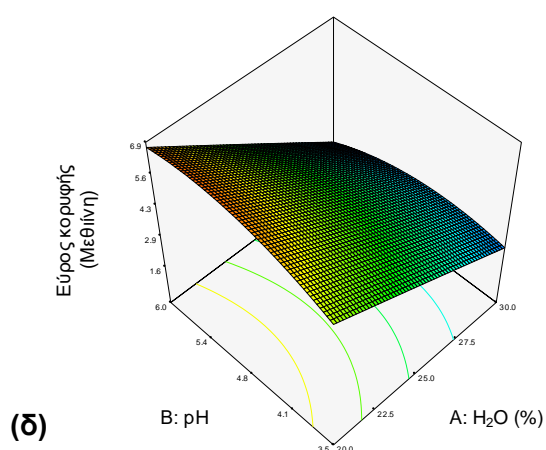
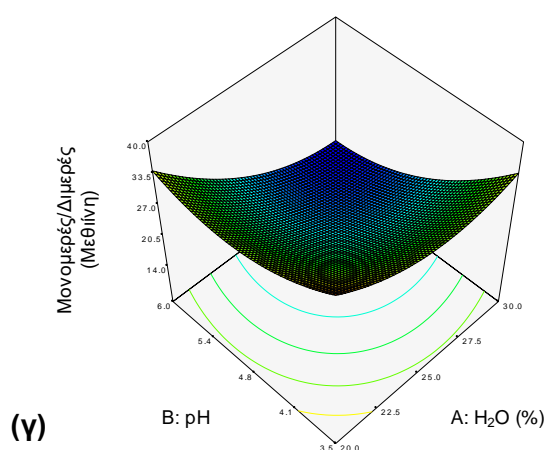
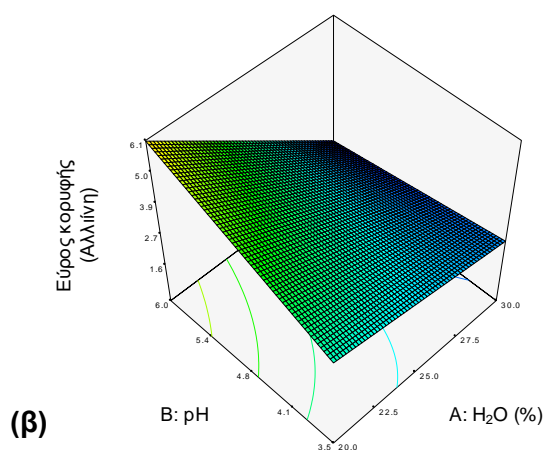
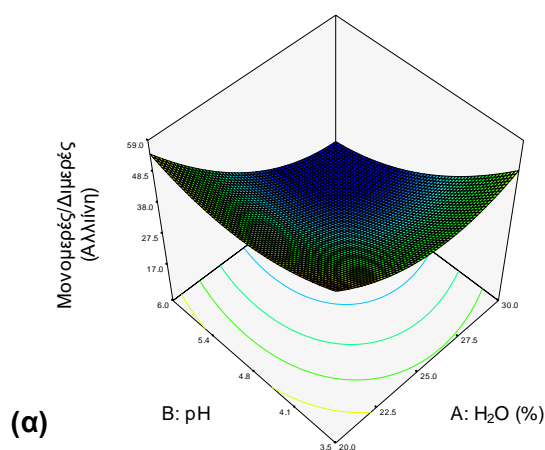
Πρότυπο διάλυμα	Σειρά έγχυσης	Μεταβλητές		Αποκρίσεις				
		A:H ₂ O % (x ₁)	B:pH (x ₂)	M/Δ (Αλλιλίνη)	Εύρος κορυφής (Αλλιλίνη)	M/Δ (Μεθιλίνη)	Εύρος κορυφής (Μεθιλίνη)	Διαχωριστικότητα R
1	11	20.0	3.5	56.3	3.8	41.7	5.9	2.0
2	2	30.0	3.5	47.9	2.0	37.6	2.4	1.1
3	4	20.0	6.1	60.3	7.2	40.7	7.4	1.4
4	9	30.0	6.1	23.3	1.9	22.0	2.0	1.3
5	7	18.0	4.8	62.2	4.5	35.1	7.0	2.4
6	1	32.0	4.8	27.0	1.8	15.5	1.8	1.1
7	5	25.0	3.0	58.4	2.9	37.1	3.5	1.5
8	6	25.0	6.6	23.4	3.0	15.1	2.8	1.6
9	3	25.0	4.8	29.4	3.5	20.5	4.4	1.3
10	10	25.0	4.8	30.5	3.9	21.4	5.3	1.2
11	8	25.0	4.8	29.7	3.6	21.6	4.6	1.2

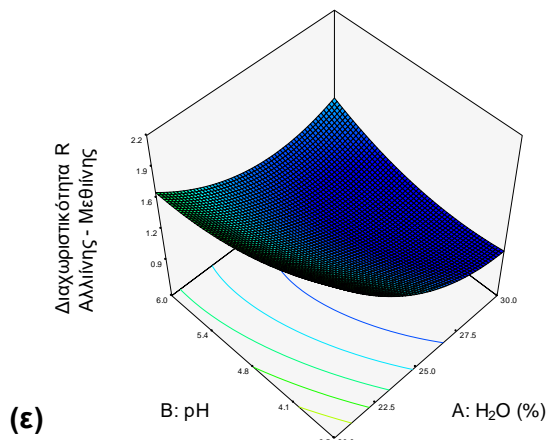
M/Δ: Λόγος μονομερούς/διμερούς για κάθε επιμέρους αναλύτη.

Πίνακας 3.3. Εξισώσεις παλινδρόμησης και στατιστικές παράμετροι των αποκρίσεων που εξετάστηκαν μέσω του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD).

Απόκριση	Εξίσωση παλινδρόμησης	R ²	R ² προσαρμογής	Πιστότητα
Μονομερές/διμερές (Αλλιλίνη)	$29.89 - 11.89x_1 - 8.79x_2 - 7.16x_1x_2 + 8.42x_1^2 + 6.54x_2^2$	0.95	0.89	11.8
Εύρος κορυφής (Αλλιλίνη)	$3.45 - 1.36x_1 + 0.44x_2 - 0.88x_1x_2$	0.83	0.76	10.2
Μονομερές/διμερές (Μεθιλίνη)	$21.15 - 6.32x_1 - 5.95x_2 - 3.67x_1x_2 + 4.54x_1^2 + 4.91x_2^2$	0.79	0.59	5.0
Εύρος κορυφής (Μεθιλίνη)	$4.74 - 2.03x_1 + 0.041x_2 - 0.48x_1x_2 - 0.015x_1^2 - 0.64x_2^2$	0.94	0.88	12.0
Διαχωριστικότητα R	$1.11 - 0.37x_1 - 0.049x_2 + 0.23x_1x_2 + 0.27x_1^2 + 0.16x_2^2$	0.89	0.78	7.8

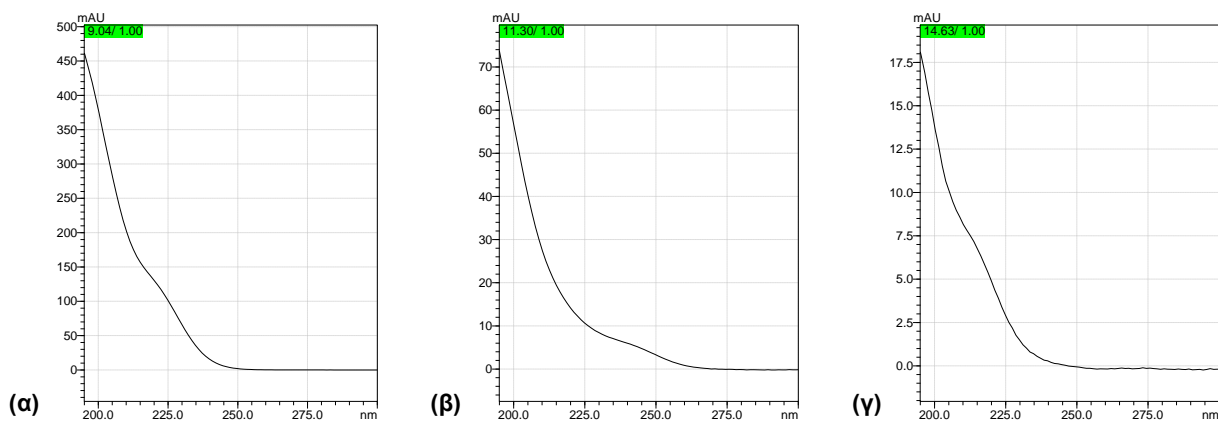
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τιμή του pH και το % ποσοστό νερού στην κινητή φάση είχαν σημαντική επίδραση σε όλες τις αποκρίσεις που μελετήθηκαν. Τα Σχήματα 3.1(α)-(ε) δείχνουν πως επηρεάζεται η κάθε απόκριση από τη μεταβολή των τιμών των δύο μεταβλητών. Η συνολική προτιμηση (desirability), όπως προέκυψε από το βέλτιστο συνδυασμό των προτιμήσεων των αντίστοιχων αποκρίσεων (μεγιστοποίηση του λόγου μονομερούς/διμερούς, ελαχιστοποίηση του εύρους κορυφής και $R > 1.5$) βρέθηκε ίση με 0.85 για 25% H₂O και pH 3.0 στην κινητή φάση. Λόγω, όμως, των προδιαγραφών της στήλης (pH 3-8) επιλέχθηκε η τιμή pH 3.5.



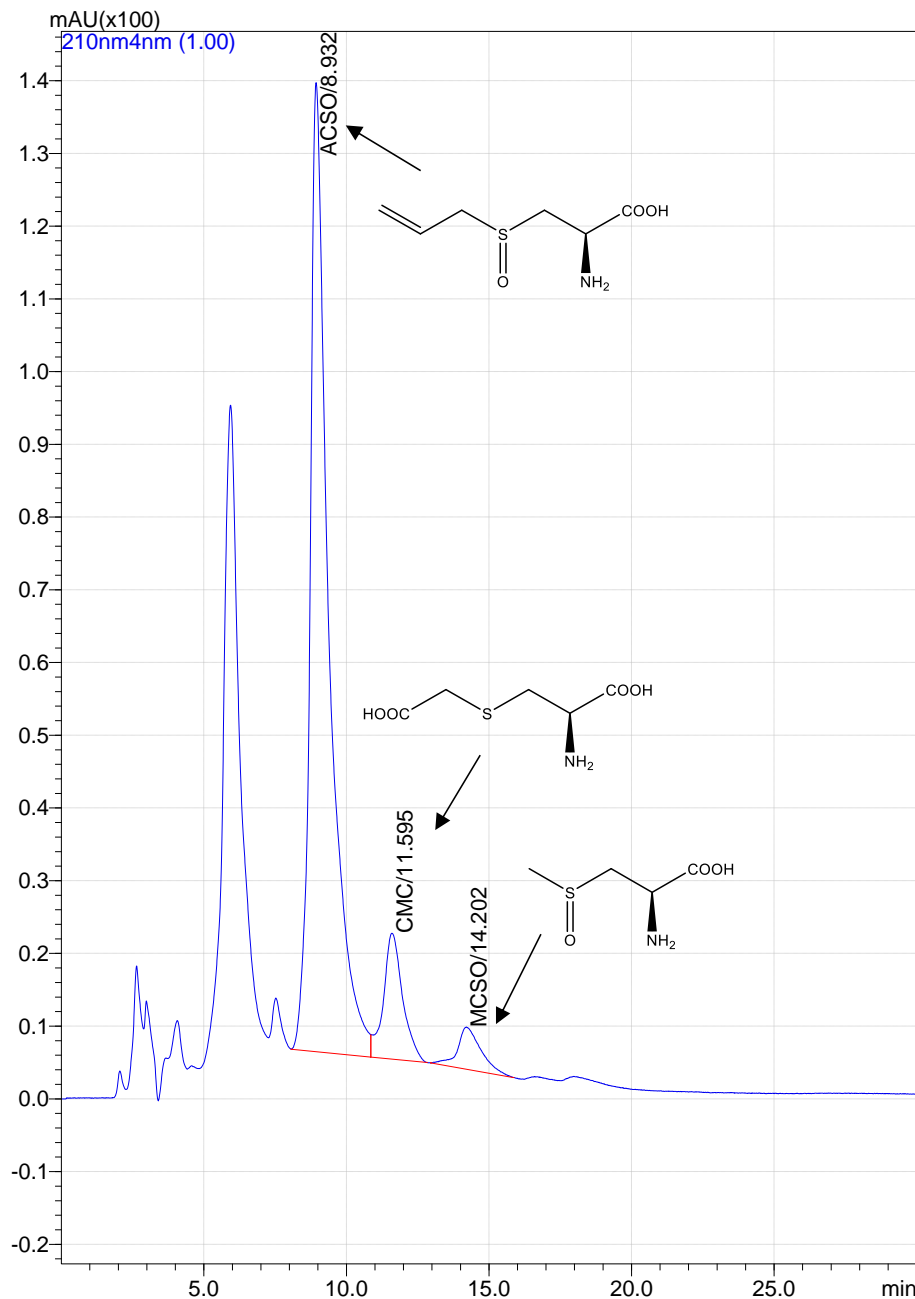


Σχήμα 3.1. Διαγράμματα επιφάνειας απόκρισης που απεικονίζουν το λόγο μονομερούς/διμερούς (βάσει εμβαδού κορυφής) και το εύρος κορυφής ως συνάρτηση της τιμής του pH και του % ποσοστού νερού στην κινητή φάση για την αλλιίνη (α, β) και τη μεθιίνη (γ, δ), αντίστοιχα. Στο διάγραμμα (ε) απεικονίζεται η διαχωριστικότητα για τις κορυφές αλλιίνης και μεθιίνης σε συνάρτηση της τιμής του pH και του % ποσοστού νερού στην κινητή φάση.

Τα φάσματα UV της αλλιίνης, της μεθιίνης και της *S*-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνης (CMC), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ουσία αναφοράς, απεικονίζονται στο Σχήμα 3.2. Για την ανάλυση με HILIC-PDA η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 210 nm. Στο Σχήμα 3.3 απεικονίζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα δείγματος σκόρδου με στήλη ZIC-HILIC.



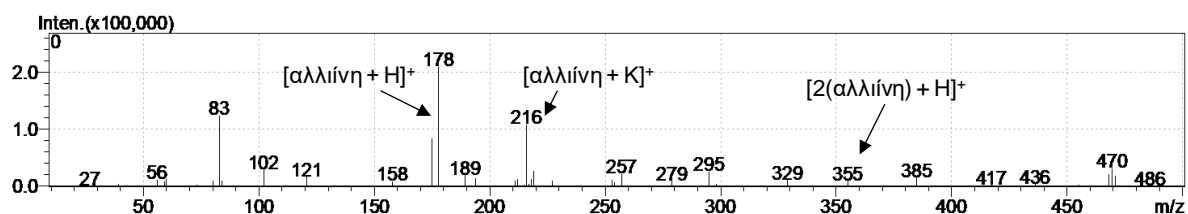
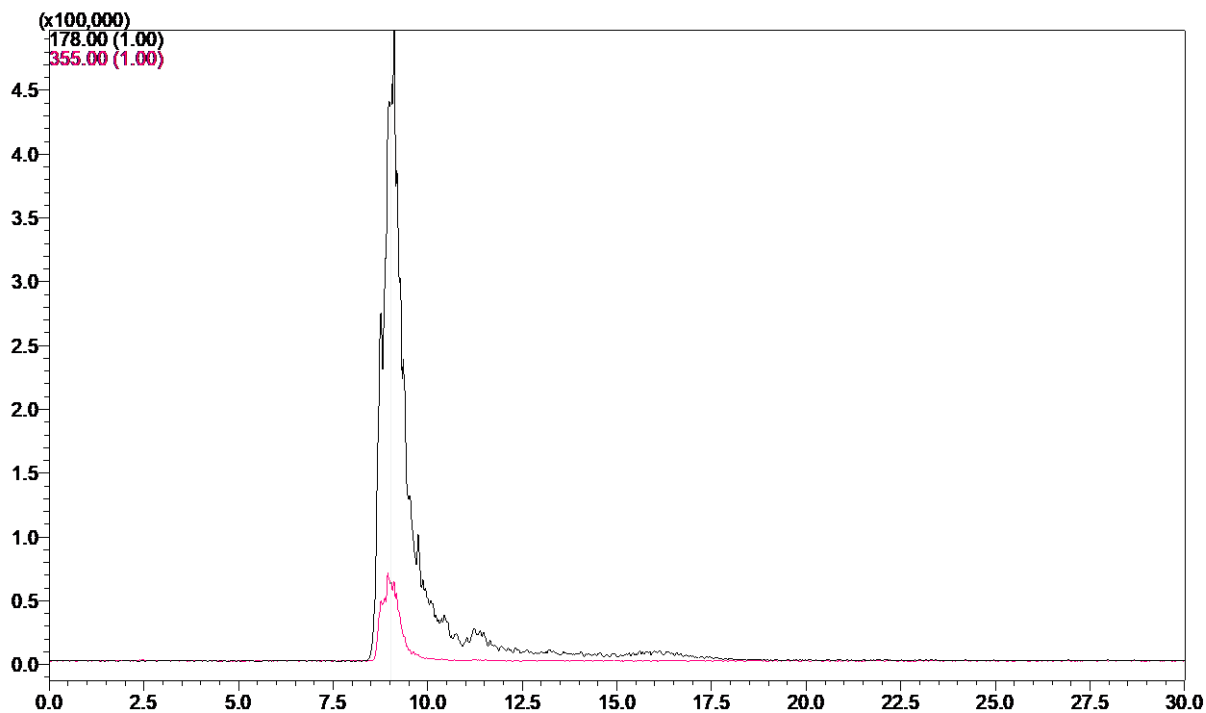
Σχήμα 3.2. Φάσματα UV (α) της αλλιίνης, (β) της πρότυπης ουσίας αναφοράς (CMC) και (γ) της μεθιίνης.



Σχήμα 3.3. Τυπικό χρωματογράφημα δείγματος σκόρδου σε σύστημα LC με στήλη ZIC-HILIC και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) σε μήκος κύματος 210 nm. Η αλλίνη (ACSΟ), η πρότυπη ουσία αναφοράς (CMC) και η μεθίνη (MCSO) παρουσιάζουν χρόνους κατακράτησης 8.93, 11.59 και 14.20 min, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.4, το ιόν διμερούς της αλλίνης εμφανίζει κορυφή στον ίδιο χρόνο κατακράτησης με ιόν μονομερούς. Η κύρια κορυφή που εμφανίζεται στο φάσμα μάζας

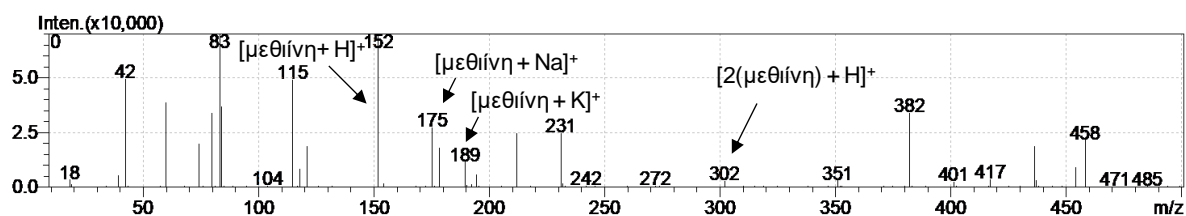
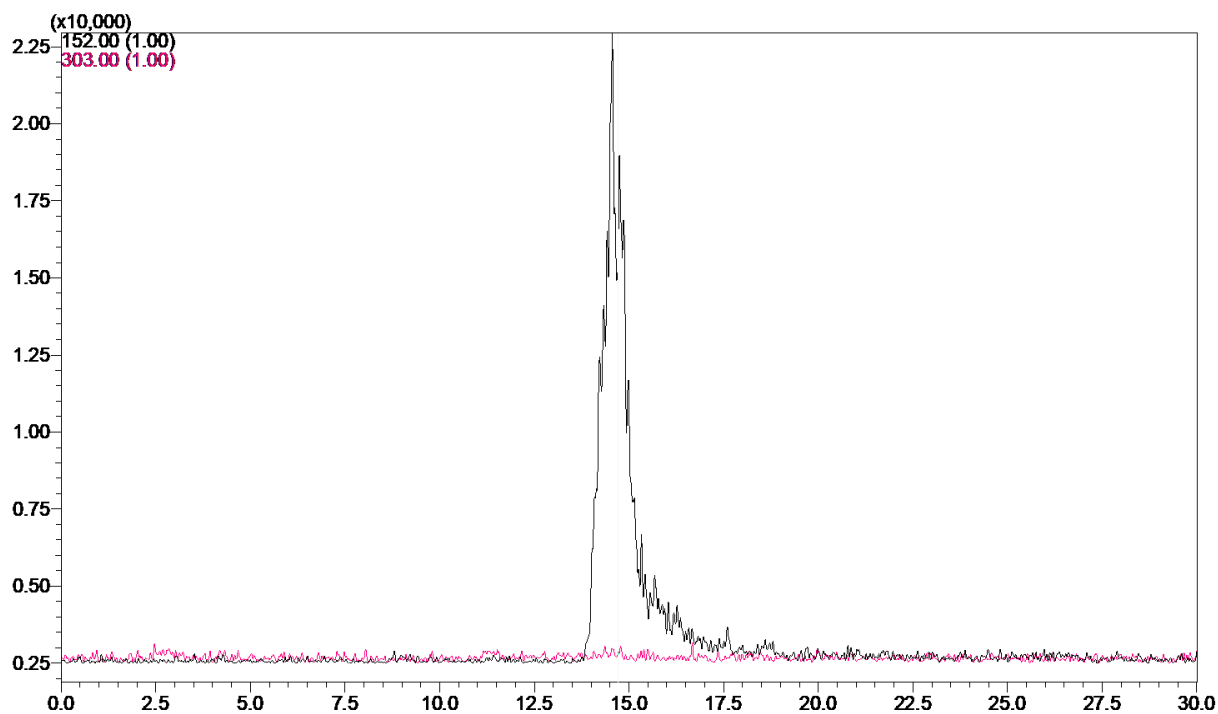
πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό αντιστοιχεί στο ιόν (m/z 178 [αλλιλίνη + H]⁺), ενώ επίσης εμφανίζονται τα ιόντα προσθήκης (m/z 216 [αλλιλίνη + K]⁺) και (m/z 355 [2(αλλιλίνη) + H]⁺).



Σχήμα 3.4. (α) Χρωματογράφημα LC-MS όπου εμφανίζονται οι κορυφές των επιλεγμένων ιόντων (SIM) της αλλιλίνης [αλλιλίνη + H]⁺ και του διμερούς της [2(αλλιλίνη) + H]⁺. (β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό, όπου απεικονίζεται το ιόν της αλλιλίνης μαζί με άλλα ιόντα προσθήκης.

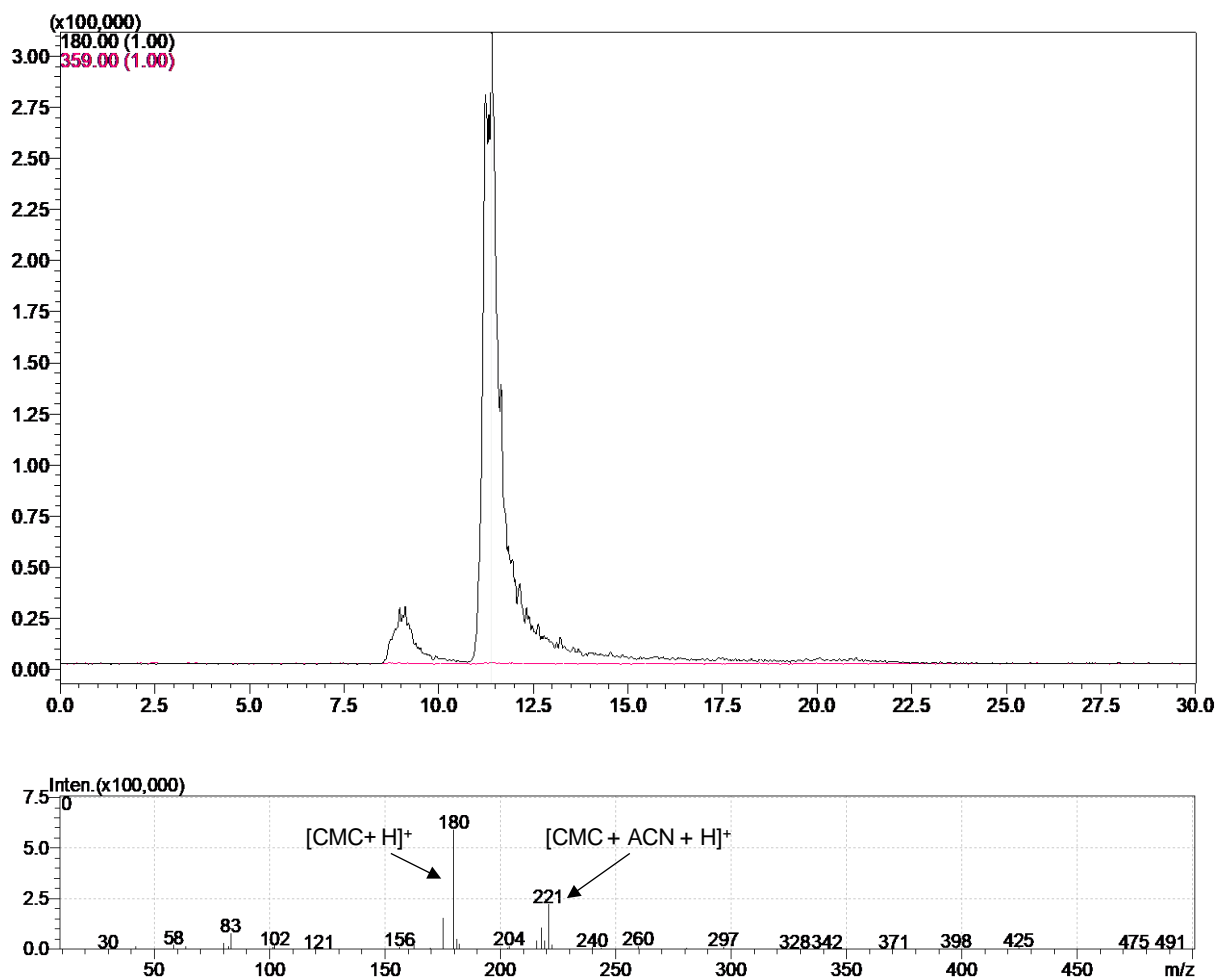
Στο Σχήμα 3.5 φαίνεται η κορυφή του ιόντος μονομερούς της μεθίνης, ενώ για τον ίδιο χρόνο κατακράτησης, η κορυφή του επιλεγμένου ιόντος του διμερούς δε διακρίνεται. Η κύρια κορυφή που εμφανίζεται στο φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό, αντιστοιχεί στο

ίον (m/z 152 [μεθίνη + H]⁺). Τα ιόντα προσθήκης που διακρίνονται στο φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης του Σχήματος 3.5 αντιστοιχούν στα (m/z 175 [μεθίνη + Na]⁺), (m/z 189 [μεθίνη + K]⁺) και (m/z 302 [2(αλλίνη) + H]⁺).



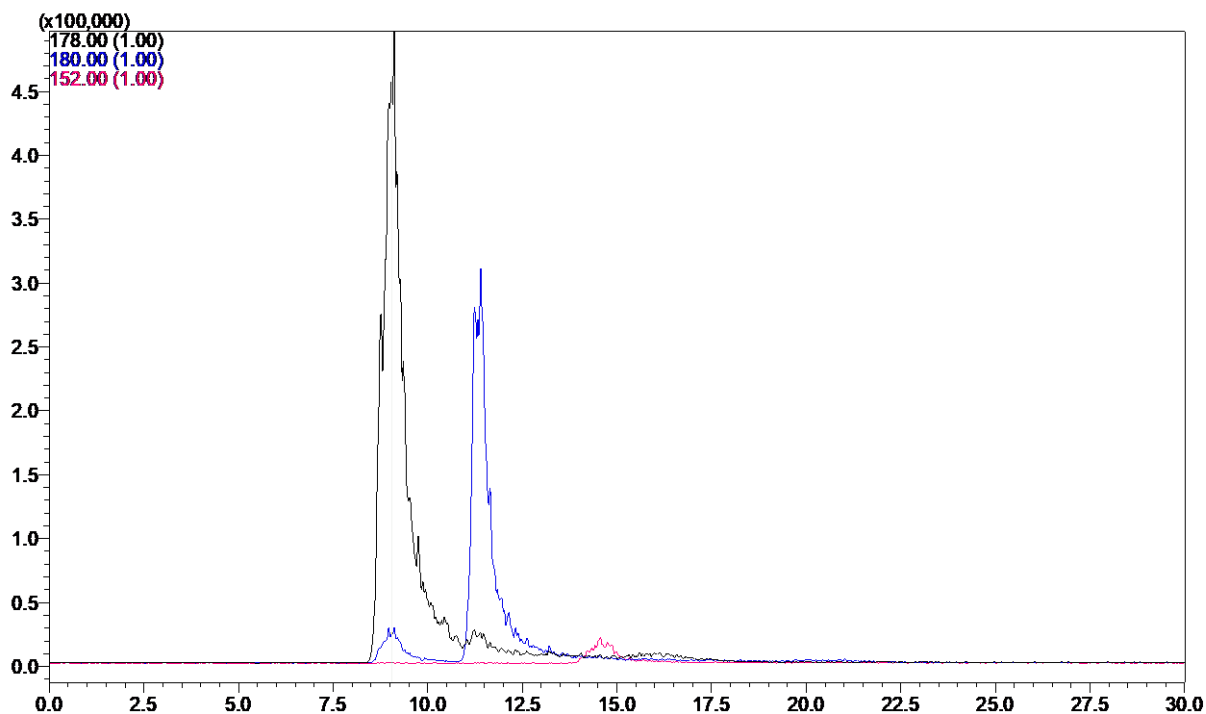
Σχήμα 3.5. (α) Χρωματογράφημα LC-MS όπου εμφανίζονται οι κορυφές των επιλεγμένων ιόντων (SIM) της μεθίνης [μεθίνη + H]⁺ και του διμερούς της [2(μεθίνη) + H]⁺. (β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό, όπου απεικονίζεται το ιόν της μεθίνης μαζί με άλλα ιόντα προσθήκης.

Από το Σχήμα 3.6 φαίνεται ότι η *S*-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνη (CMC) δεν παρουσιάζει ιόν διμερούς. Στο φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης διακρίνεται το ιόν $[CMC + H]^+$, καθώς και το ιόν προσθήκης (m/z 221 $[CMC + ACN + H]^+$).



Σχήμα 3.6. (α) Χρωματογράφημα LC-MS όπου έχουν επιλεγθεί τα ιόντα της *S*-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνης $[CMC + H]^+$ και του διμερούς της $[2(CMC) + H]^+$. (β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό, όπου απεικονίζεται το ιόν του CMC μαζί με άλλα ιόντα προσθήκης.

Στο Σχήμα 3.7 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα LC-MS δείγματος σκόρδου, όπου έχουν επιλεγθεί τα ιόντα της αλλιλίνης $[αλλιλίνη + H]^+$, της *S*-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνης $[CMC + H]^+$ και της μεθίνης $[μεθίνη + H]^+$.



Σχήμα 3.7. Χρωματογράφημα LC-MS όπου εμφανίζονται οι κορυφές των επιλεγμένων ιόντων (SIM) της αλλιίνης [αλλιίνη + H]⁺, του CMC [CMC + H]⁺ και της μεθιίνης [μεθιίνη + H]⁺.

Για την επικύρωση των μεθόδων ελέγχθηκαν η ειδικότητα, η γραμμικότητα, το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για καθέναν από τους δύο αναλύτες, η ορθότητα και η πιστότητα. Η ειδικότητα των δύο μεθόδων επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση 5 δειγμάτων σκόρδου διαφορετικής προέλευσης. Όπως φαίνεται και στα χρωματογραφήματα (Σχήματα 3.3 και 3.7), οι κορυφές της αλλιίνης και της μεθιίνης διαχωρίζονται από τις κορυφές άλλων συστατικών του σκόρδου. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης και τα φάσματα UV και MS των δειγμάτων με τους χρόνους και τα φάσματα, αντίστοιχα, των προτύπων ουσιών.

Η γραμμικότητα των μεθόδων εξετάστηκε χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων αλλιίνης και μεθιίνης (Παράρτημα Ι). Ο Πίνακας 3.4 συνοψίζει τα στοιχεία που προέκυψαν από την καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε μέθοδο. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) για την αλλιίνη και τη μεθιίνη ήταν σε κάθε περίπτωση > 0.998 . Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το λόγο

σήματος/θόρυβο (S/N). Για τον υπολογισμό του LOD χρησιμοποιήθηκε η σχέση $S/N = 3$, ενώ για το LOQ η σχέση $S/N = 10$ (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4. Στοιχεία γραμμικότητας, όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης για την αλλιίνη και τη μεθίνη με τις δύο μεθόδους.

Συστατικό	Μέθοδος	Εξίσωση παλινδρόμησης	r	Εύρος συγκεντρώσεων (μg/mL)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Αλλιίνη	HILIC-PDA	$y = 8464.697x - 78486.7$	0.999	100-1000	0.82	2.73
	HILIC-ESI-MS	$y = 0.9486591x + 0.0351650$	0.998	100-1000	2.73	9.10
Μεθίνη	HILIC-PDA	$y = 2659.246x - 6014.537$	0.999	8-80	2.33	7.80
	HILIC-ESI-MS	$y = 0.5440764x - 0.0012135$	0.998	8-80	2.29	7.63

Για την εκτίμηση της ορθότητας πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανάκτησης ($n = 6$) με εμβολιασμό ενός δείγματος σκόρδου, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων αλλιίνης και μεθίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης της αλλιίνης και της μεθίνης για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε δείγμα σκόρδου ($n = 6$).

Συστατικό	Μέθοδος	Αρχική συγκέντρωση (mg/g)	Προστέθηκαν (mg/g)	Βρέθηκαν (mg/g)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
Αλλιίνη	HILIC-ESI-MS	9.0	4.5	13.8	102.2	3.0
			9.0	17.8	99.0	1.5
	HILIC-PDA	9.1	4.5	13.7	100.2	1.1
			9.0	17.8	98.0	0.9
Μεθίνη	HILIC-ESI-MS	0.94	0.50	1.47	101.9	1.8
			1.00	1.93	99.5	2.3
	HILIC-PDA	0.98	0.50	1.49	100.4	3.1
			1.00	1.97	99.3	1.4

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι μέσες ανακτήσεις στο χαμηλότερο επίπεδο κυμάνθηκαν μεταξύ και 100.2 και 102.2%, ενώ οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης ήταν μικρότερες από 3.1%. Για το υψηλότερο επίπεδο οι ανακτήσεις βρέθηκαν να είναι από 98 έως 99.5%, με τις τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης να είναι μικρότερες από 2.3% (Πίνακας 3.5).

Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις αναφορικά με την επαναληψιμότητα, την ενδιάμεση πιστότητα και την αναπαραγωγικότητα της έγχυσης. Η επαναληψιμότητα και η ενδιάμεση πιστότητα εξετάστηκαν με 6 διαφορετικά δείγματα εντός της ημέρας και σε τρεις διαδοχικές ημέρες, αντίστοιχα. Οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης ήταν χαμηλότερες από 7.4 και 7.8%, αντίστοιχα. Η αναπαραγωγικότητα της έγχυσης ελέγχθηκε με έξι διαδοχικές εγχύσεις ενός δείγματος. Οι τιμές σχετικής απόκλισης για την αλλιίνη και τη μεθίνη ήταν χαμηλότερες από 1.9 και 1.4%, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.6. Επαναληψιμότητα, ενδιάμεση πιστότητα και αναπαραγωγικότητα της έγχυσης για τις δύο μεθόδους.

Συστατικό	Μέθοδος	RSD (%)		
		Επαναληψιμότητα (n = 6)	Ενδιάμεση πιστότητα (n = 3)	Αναπαραγωγικότητα έγχυσης (n = 6)
Αλλιίνη	HILIC-ESI-MS	1.1-5.1	3.3-7.8	1.9
	HILIC-PDA	0.5-2.5	2.4-7.2	1.5
Μεθίνη	HILIC-ESI-MS	0.3-7.4	0.9-6.2	1.4
	HILIC-PDA	0.5-3.9	1.6-3.8	1.1

Τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση (mg/g) των δειγμάτων σκόρδου σε αλλιίνη και μεθίνη συνοψίζονται στον Πίνακα 3.7. Τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε αλλιίνη παρουσιάζουν τα δείγματα με προέλευση από τη Ν. Βύσσα και τη Χαλκίδα, ενώ η μεθίνη βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα δείγματα Ν. Βύσσας, Χαλκίδας και Αργεντινής.

Πίνακας 3.7. Συγκέντρωση αλλιίνης και μεθιίνης στα δείγματα σκόρδου που εξετάστηκαν.

Δείγμα	Συγκέντρωση ^α (mg/g)			
	Αλλιίνη		Μεθιίνη	
	HILIC-PDA	HILIC-ESI-MS	HILIC-PDA	HILIC-ESI-MS
N. Βύσσας	13.41 ± 0.05	13.61 ± 0.22	2.27 ± 0.06	2.34 ± 0.03
Χαλκίδας	11.53 ± 0.02	11.51 ± 0.17	1.72 ± 0.09	1.78 ± 0.02
Θήβας	10.25 ± 0.02	10.00 ± 0.12	0.44 ± 0.02	0.41 ± 0.03
Αργεντινής	10.69 ± 0.05	10.09 ± 0.04	1.84 ± 0.02	1.72 ± 0.01
Κίνας	9.12 ± 0.04	9.04 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.95 ± 0.02

^α Μέσοι όροι ± SD ($n = 3$).

3.2.3. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Στη μελέτη αυτή αναπτύχθηκαν νέες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλιίνης και της μεθίνης στο σκόρδο, οι οποίες βασίστηκαν στη χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) και ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών - ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS). Η συγκέντρωση των δύο κύριων αυτών μη πρωτεϊνικών θειούχων αμινοξέων αποτελεί σημαντική παράμετρο για την ποιότητα του σκόρδου. Η βελτιστοποίηση των μεθόδων πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων τιμών για τις παραμέτρους της κινητής φάσης. Στα πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών συμπεριλαμβάνεται ο μικρός χρόνος ανάλυσης (20 λεπτά), ενώ επίσης δε χρειάζεται να προηγηθεί παραγωγοποίηση των ουσιών πριν από την ανάλυση του δείγματος. Οι νέες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, όπου γίνεται αξιολόγηση της πρώτης ύλης από την οποία προκύπτουν συναφή τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής ή σκευάσματα. Με επέκταση της μεθοδολογίας είναι δυνατό να προκύψει μέθοδος που να χρησιμοποιείται γενικότερα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σουλφοξειδίων της *S*-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης στο σκόρδο και σε συναφή προϊόντα, καθώς επίσης και σε άλλα υποστρώματα. Τέλος, ο έλεγχος και άλλων στατικών φάσεων HILIC μπορεί να συμβάλει στην περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου.

3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός αλλιίνης και μεθίνης στο σκόρδο μέσω φασματοσκοπίας FT-IR

3.3.1. Πειραματικό μέρος

3.3.1.1. Φυτικό υλικό και χημικά αντιδραστήρια

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 45 δείγματα σκόρδου, εσοδείας 2011 και 2012. Η προμήθεια των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τοπικούς παραγωγούς των περιοχών Ν. Βύσσας (Β. Έβρος) ($n = 12$), Χαλκίδας (Εύβοια) ($n = 6$) και Τεγέας (Αρκαδία) ($n = 3$), καθώς και από καταστήματα τροφίμων ($n = 24$). Τα δείγματα, αρχικά, παρέμειναν για χρονικό διάστημα επτά ημερών σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας και στη συνέχεια αποθηκεύθηκαν σε συνθήκες ψύξης ($-22\text{ }^{\circ}\text{C}$) μέχρι να αναλυθούν. Οι πρότυπες ουσίες L-αλλιίνη (ACSO, καθαρότητα $\geq 98\%$) και L-μεθίνη (MCSO, $\geq 98\%$) προμηθεύθηκαν από την εταιρεία LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA), ενώ η S-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνη (CMC) ήταν της εταιρείας Sigma (St. Louis, MO, USA). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την υγροχρωματογραφική ανάλυση αναφοράς ήταν ακετονιτρίλιο (ACN) υψηλής καθαρότητας για LC-MS και υπερκαθαρό νερό που παραλήφθηκε μέσω της συσκευής MilliQ plus (ειδική αντίσταση $18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$), της εταιρείας Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Τέλος, για τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιήθηκε η κατιοανταλλακτική ρητίνη Dowex 50WX4-100 της εταιρείας Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.3.1.2. Διαδικασία απομόνωσης

Η παραλαβή του κλάσματος των μη πτητικών συστατικών του σκόρδου, κυρίως αλλιίνη και μεθίνη, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 3.2.1.2) ελαφρώς τροποποιημένη, βάσει σχετικών αναφορών [9,18]. Πιο αναλυτικά, σκελίδες σκόρδου από κάθε δείγμα αποφλοιώθηκαν προσεκτικά, ακολούθησε ζύγιση ποσότητας 10 g περίπου και ακολούθησε εμβάπτιση σε διάλυμα υδατικό διάλυμα MeOH 90% (v/v) που περιείχε 10 mM HCl. Αφού τα δείγματα παρέμειναν στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας, στη συνέχεια έγινε προσθήκη 150 mL του διαλύματος MeOH σε κάθε δείγμα και ακολούθησε τεμαχισμός και

ομογενοποίηση με ομογενοποιητή (blender) χειρός για 1 λεπτό. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε υπό βρασμό για 5 λεπτά και ακολούθησε διήθηση με ηθμό Gooch υπό κενό. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές, χρησιμοποιώντας για κάθε εκχύλιση 150 mL του διαλύματος MeOH υπό βρασμό. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους δείγμα συνενώθηκαν και το τελικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε μέχρι όγκου 15 mL με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή στους 40 °C.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση του εκχυλίσματος από πτυχωτό ηθμό και ακολούθησε οξίνιση του διηθήματος με προσθήκη 10 mL υδατικού διαλύματος 3% HCl. Από το συνολικό όγκο (25 mL) λήφθηκαν 6 mL, τα οποία ακολούθως διήλθαν από στήλη (1×10 cm) πληρωμένη με κατιοανταλλακτική ρητίνη Dowex 50WX4-100, η οποία είχε προηγουμένως ενεργοποιηθεί με 20 mL 3% HCl. Στο υλικό πλήρωσης έγινε διαδοχικά έκπλυση με 20 mL 3% HCl και 40 mL απιονισμένου νερού προκειμένου να απομακρυνθούν οι μη κατιοντικές ουσίες που υπήρχαν στο μεθανολικό εκχύλισμα σκόρδου. Τα συγκεκριμένα κλάσματα απορρίφθηκαν, ενώ στη συνέχεια τα μη πτητικά συστατικά παραλήφθηκαν από τη στήλη με 120 mL υδατικού διαλύματος 1M NH₄OH. Με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή (45-50 °C) έγινε συμπύκνωση έως ξηρού και το απομονωμένο κλάσμα αμινοξέων τοποθετήθηκε εντός ξηραντήρα κενού υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου για 24 h. Αφού προσδιορίστηκε το βάρος του στερεού εκχυλίσματος, ακολούθησε αποθήκευση στους -22 °C μέχρι την ανάλυσή του.

3.3.1.3. Χρωματογραφική ανάλυση με HILIC-ESI-MS

Για τον προσδιορισμό των τιμών αναφοράς για τη συγκέντρωση αλλιλίνης και μεθίνης στα δείγματα σκόρδου, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό - φασματομετρίας μαζών (ESI-MS). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (παράγραφος 3.2.1.4). Για την προετοιμασία των δειγμάτων για χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 2.0 mg στερεού εκχυλίσματος για κάθε δείγμα, το οποίο διαλύθηκε σε 500 μL διαλύτη αραιώσης ακετονιτρίλιο/νερό 75:25 (v/v) (2 mM μυρμηκικού οξέος, pH 3.5), ενώ ακολούθησε προσθήκη όγκου 500 μL του προτύπου διαλύματος αναφοράς (CMC, 1 mg/mL). Για καλύτερη διαλυτοποίηση του δείγματος έγινε χρήση υδατόλουτρου υπερήχων για 1 λεπτό. Το τελικό

δείγμα για χρωματογραφική ανάλυση παραλήφθηκε έπειτα από διήθηση με χρήση φίλτρου πορώδους 0.20 μm και διαμέτρου 15 mm (Chromafil Xtra PET-20/15).

3.3.1.4. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR

Η καταγραφή φασμάτων με την τεχνική διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) πραγματοποιήθηκε σε φασματόμετρο FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεικής τριγλυκίνης (DTGS), πηγή Nichrome και διαχωριστή δέσμης KBr. Η βέλτιστη απόδοση του συστήματος διασφαλίστηκε ακολουθώντας συνήθειες διαδικασίες πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων, όπως η ευθυγράμμιση του φασματόμετρου και η ρύθμιση του εξαρτήματος δειγματοληψίας DRIFTS. Λόγω της υγροσκοπικότητας των δειγμάτων απαιτήθηκε η ανάμιξή τους με ξηρό KBr. Για να εκτιμηθεί η επίδραση της αναλογίας δείγματος/KBr στην ποιότητα των φασμάτων ελέγχθηκαν οι εξής περιεκτικότητες: 1%, 2%, 5%, 10%, 25% και 50% (w/w). Από τα φάσματα που καταγράφηκαν φάνηκε ότι με περιεκτικότητα δείγματος 10% (w/w) σε KBr εξασφαλίζεται καλή ποιότητα φάσματος (μεγαλύτερη ένταση και χαμηλότερα επίπεδα θορύβου), όπως επίσης υποδεικνύεται σε σχετική πρόσφατη μελέτη [40]. Τα ομογενοποιημένα δείγματα σε σκόνη (περίπου 6 mg) μετρήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν σε ξηρή, ελεγχόμενη ατμόσφαιρα στους 25 °C, με χρήση του φάσματος από ξηρό KBr ως υπόβαθρο (background). Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας μικροϋποδοχέας δείγματος Spectra-Tech (Thermo Scientific), διαμέτρου 3 mm και ύψους 2 mm, ο οποίος τοποθετούταν στο εξάρτημα DRIFTS (Spectra-Tech) για ανάλυση. Για κάθε φάσμα πραγματοποιήθηκαν 100 διαδοχικές σαρώσεις σε όλο το εύρος του μέσου υπερύθρου (4000 έως 400 cm^{-1}), με τη διαχωριστική ικανότητα του οργάνου να έχει καθοριστεί στα 4 cm^{-1} και την ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου στο συμβολόμετρο να είναι 0.316 cm s^{-1} . Για τη λειτουργία του φασματόμετρου, τη συλλογή των δεδομένων και τη βασική επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό του φασματόμετρου Omnic 7.3 (Thermo Scientific). Αφού προσδιορίστηκαν οι μέσοι όροι των φασμάτων, ακολούθησε η εξομάλυνση Savitzky-Golay (SG), με το μέγεθος παραθύρου να ορίζεται από 15 σημεία, ενώ η διόρθωση της βασικής γραμμής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την ενσωματωμένη λειτουργία του

Omnic για την αυτόματη διόρθωση (με πολυωνυμική προσαρμογή δεύτερης τάξης μέσω μιας διαδικασίας 20 επαναλήψεων).

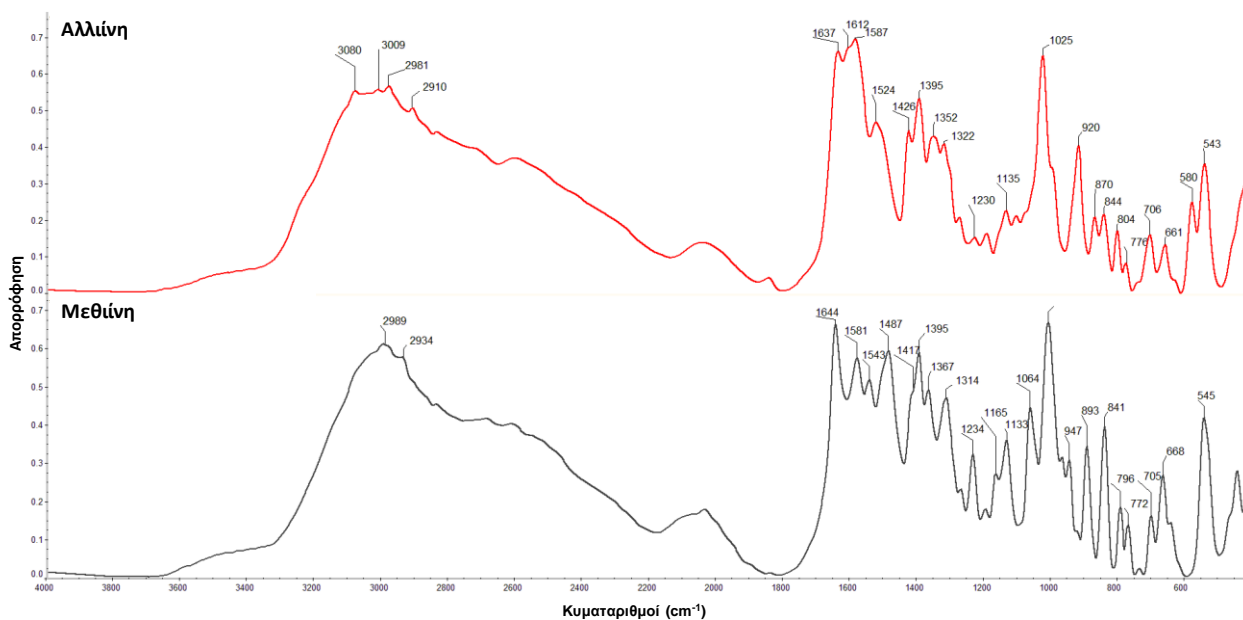
3.3.1.5. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων

Για την ανάπτυξη των μοντέλων βαθμονόμησης με σκοπό την ποσοτικοποίηση της αλλίνης και της μεθίνης από τα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR των εκχυλισμάτων σκόρδου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Ο αλγόριθμος που εφαρμόστηκε περιλαμβάνεται στο λογισμικό TQ Analyst 8.0 (Thermo Scientific). Ύστερα από κεντροποίηση (mean centering) των τιμών των μεταβλητών, έγινε αξιολόγηση των μοντέλων PLS βάσει επιλεγμένων φασματικών περιοχών ή ολόκληρου του φάσματος. Έπειτα από έλεγχο του συνόλου δειγμάτων βαθμονόμησης για δείγματα που αποκλίνουν (outliers), το μοντέλο βαθμονόμησης αναπτύχθηκε τελικά χρησιμοποιώντας δεδομένα από 30 δείγματα, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές αναφοράς που προέκυψαν από την υγροχρωματογραφική ανάλυση. Η ακρίβεια του μοντέλου βαθμονόμησης περιγράφηκε από τις τιμές των συντελεστών συσχέτισης r_c και r_{cv} , ενώ εκτιμήθηκαν επίσης οι τιμές των σφαλμάτων RMSEC, RMSECV και RMSEP για τη βαθμονόμηση, τη διασταυρωμένη επικύρωση και την πρόβλεψη, αντίστοιχα. Για τη διασταυρωμένη επικύρωση του μοντέλου βαθμονόμησης εφαρμόστηκε η επαναληπτική διαδικασία μιας παράλειψης (LOO). Ο βέλτιστος αριθμός λανθανουσών μεταβλητών (LVs) για την ποσοτικοποίηση της αλλίνης και της μεθίνης προσδιορίστηκε σε κάθε περίπτωση σύμφωνα με την ελάχιστη τιμή του RMSECV.

3.3.2. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Τα φάσματα FT-IR της αλλίνης και της μεθίνης παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό χαρακτηριστικών απορροφήσεων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.8, που διαφοροποιούν τις ουσίες και μπορούν να ληφθούν υπόψη για την ποσοτικοποίησή τους. Οι σημαντικότερες διαφορές εντοπίζονται στην περιοχή $1700-500\text{ cm}^{-1}$. Πιο συγκεκριμένα, η αλλίνη εμφανίζει δύο

χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 1612 και 920 cm^{-1} , οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις τάσης του διπλού δεσμού $\text{C}=\text{C}$ και σείσης λόγω $=\text{CH}_2$, αντίστοιχα [41,42]. Διαφοροποιείται, επίσης, βάσει των κορυφών στα 1352 και 1025 cm^{-1} . Όσον αφορά στο φάσμα FT-IR της μεθίνης, εμφανίζεται κορυφή ισχυρής έντασης στα 1487 cm^{-1} που οφείλεται στη συμμετρική δόνηση παραμόρφωσης $^+\text{NH}_3$. Δύο ακόμη χαρακτηριστικές απορροφήσεις για τη μεθίνη παρουσιάζονται στα 1234 και 1064 cm^{-1} , αφενός λόγω της δόνησης στρέβλωσης CH_2 και αφετέρου λόγω της συμμετρικής τάσης $\text{S}=\text{O}$ και της τάσης $\text{C}-\text{N}$ [41]. Επιπλέον, η κορυφή στα 1009 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης $\text{C}-\text{C}$ και $\text{C}-\text{N}$ [41], δείχνει μετατοπισμένη σε σύγκριση με την αντίστοιχη κορυφή στο φάσμα της αλλίνης.



Σχήμα 3.8. Φάσματα FT-IR της αλλίνης και της μεθίνης σε όλη την φασματική περιοχή του μέσου υπεράυθρου ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$).

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.8) περιλαμβάνονται συγκεντρωτικά οι κυριότερες απορροφήσεις για τις δύο ενώσεις.

Πίνακας 3.8. Αποδόσεις των κυριότερων κορυφών απορρόφησης για την αλλιλίνη και τη μεθιλίνη στη φασματική περιοχή του μέσου υπερύθρου (4000-400 cm^{-1}) [41,42].

Κυματαριθμοί (cm^{-1})		Απόδοση
Αλλιλίνη	Μεθιλίνη	
3080		Τάση C-H
3009		Συμμετρική τάση $^+\text{NH}_3$
2981	2989	Ασύμμετρη τάση CH_2
2910	2934	Συμμετρική τάση CH_2
1637	1644	Ασύμ. τάση COO^- , ασύμ. δόνηση παραμόρφωσης $^+\text{NH}_3$
1612		Τάση C=C
1587	1581	Ασύμ. δόνηση παραμόρφωσης $^+\text{NH}_3$
	1487	Συμ. δόνηση παραμόρφωσης $^+\text{NH}_3$
1426	1417	Συμ. τάση COO^-
1395	1395	Συμ. τάση COO^-
	1367	Συμ. δόνηση παραμόρφωσης C-H
1352		Δόνηση σείσης CH_2 , δόνηση κλυδωνισμού C-H
1322	1314	Δόνηση σείσης CH_2 , Δόνηση κλυδωνισμού C-H
1230	1234	Δόνηση στρέβλωσης CH_2
	1169	Δόνηση κλυδωνισμού $^+\text{NH}_3$
1135	1133	Δόνηση κλυδωνισμού $^+\text{NH}_3$
1048	1064	Συμ. τάση S=O, τάση C-N
1025	1009	Τάση C-C, τάση C-N
	947	Τάση C-C
920		Σείση $=\text{CH}_2$
	893	Δόνηση κλυδωνισμού CH_2
706	705	Τάση C-S

Για την ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικοποίησης της αλλιλίνης και μεθιλίνης στα δείγματα σκόρδου με χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με εφαρμογή του αλγορίθμου PLS (PLS2). Τα προκαταρκτικά μοντέλα βαθμονόμησης που αναπτύχθηκαν για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων των δύο συστατικών στα μεθανολικά εκχυλίσματα σκόρδου, προέκυψαν εξετάζοντας ολόκληρη την περιοχή του φάσματος. Μετά την απομάκρυνση δειγμάτων που αποκλίνουν (outliers, $n = 3$), έγινε διαχωρισμός των δειγμάτων σε σύνολα βαθμονόμησης ($n = 34$) και ελέγχου ($n = 8$). Χρησιμοποιήθηκαν 10 λανθάνουσες μεταβλητές για την περίπτωση της αλλιλίνης και 8 για τη μεθιλίνη.

Οι συντελεστές συσχέτισης r_c για τα μοντέλα βαθμονόμησης της αλλιίνης και της μεθίνης υπολογίστηκαν ίσοι με 0.91 και 0.89, αντίστοιχα. Τα σφάλματα βαθμονόμησης (RMSEC) παρουσίασαν τις τιμές 0.94 και 0.15, ενώ ως προς την προβλεπτική ικανότητα των μοντέλων, τα σφάλματα πρόβλεψης (RMSEP) ήταν 2.49 και 0.24 για την αλλιίνη και τη μεθίνη, αντίστοιχα. Για τα σφάλματα διασταυρωμένης επικύρωσης (RMSECV), οι αντίστοιχες τιμές ήταν 2.09 και 0.27.

3.3.3. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR μέσω της τεχνικής διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) σε συνδυασμό με την πολυμεταβλητή ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων αναπτύχθηκε μια εναλλακτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της αλλιλίνης και της μεθίνης στα μεθανολικά εκχυλίσματα από δείγματα σκόρδου. Για την ανάπτυξη των στατιστικών μοντέλων παλινδρόμησης με τη μέθοδο PLS, χρησιμοποιήθηκαν ως τιμές αναφοράς οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν με υγροχρωματογραφική ανάλυση. Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι μέσω της προτεινόμενης μεθοδολογίας καθίσταται δυνατή η γρήγορη εκτίμηση της συγκέντρωσης αλλιλίνης και μεθίνης στο σκόρδο, χωρίς να καταστρέφεται το δείγμα. Επομένως, η μέθοδος ενδείκνυται για τον έλεγχο ποιοτικών χαρακτηριστικών του σκόρδου όπως η συγκέντρωση των δύο κύριων αυτών σουλφοξειδίων της S-αλκ(εν)υλο-L-κυστεΐνης. Για την ανάπτυξη μεθόδων που απαιτούν λιγότερη κατεργασία του δείγματος είναι δυνατό να αξιολογηθούν και άλλες τεχνικές καταγραφής φασμάτων FT-IR, όπως η τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR-IR).

3.4. Βιβλιογραφία

- [1] Block, E. (2010). *Garlic and other Alliums: The Lore and the Science*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- [2] Martins, N., Petropoulos, S., Ferreira, I.C.F.R. (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chem.* 211, 41–50.
- [3] Krest, I., Glodek, J., Keusgen, M. (2000). Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3753–3760.
- [4] Edwards, S.J., Musker, D., Collin, H.A., Britton, G. (1994). The analysis of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavour precursors) from species of *Allium* by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 5, 4–9.
- [5] Kubec, R., Svobodová, M., Velíšek, J. (2000). Distribution of *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides in some *Allium* species. Identification of a new flavor precursor: *S*-ethylcysteine sulfoxide (ethiin). *J. Agric. Food Chem.* 48, 428–433.
- [6] Block, E., Naganathan, S., Putman, D., Zhao, S.-H. (1993). Organosulfur chemistry of garlic and onion: Recent results. *Pure Appl. Chem.* 65, 625–632.
- [7] Hughes, J., Tregova, A., Tomsett, A.B., Jones, M.G., Cosstick, R., Collin, H.A. (2005). Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures. *Phytochemistry* 66, 187–194.
- [8] Thomas, D.J., Parkin, K.L. (1994). Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in Alliums by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1632–1638.
- [9] Kubec, R., Svobodová, M., Velíšek, J. (1999). Gas chromatographic determination of *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *J. Chromatogr. A* 862, 85–94.
- [10] Doran, J.A., O'Donnell, J.S., Lairson, L.L., McDonald, M.R., Schwan, A.L., Grodzinski, B. (2007). *S*-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and relative pungency measurements of photosynthetic and nonphotosynthetic tissues of *Allium porrum*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8243–8250.
- [11] Mochizuki, E., Nakayama, A., Kitada, Y., Saito, K., Nakazawa, H., Suzuki, S., Fujita, M. (1988). Liquid chromatographic determination of alliin in garlic and garlic products. *J. Chromatogr. A* 455, 271–277.
- [12] Ziegler, S.J., Sticher, O. (1989). HPLC of *S*-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in garlic including quantitative determination of (+)-*S*-allyl-L-cysteine sulfoxide (alliin). *Planta Med.* 55, 372–378.

- [13] Iberl, B., Winkler, G., Müller, B., Knobloch, K. (1990). Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.* 56, 320–326.
- [14] Mütsch-Eckner, M., Sticher, O., Meier, B. (1992). Reversed-phase high-performance liquid chromatography of S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in *Allium sativum* including the determination of (+)-S-allyl-L-cysteine sulphoxide, γ -L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine and γ -L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine. *J. Chromatogr. A* 625, 183–190.
- [15] Auger, J., Mellouki, F., Vannereau, A., Boscher, J., Cosson, L., Mandon, N. (1993). Analysis of *Allium* sulfur amino acids by HPLC after derivatization. *Chromatographia* 36, 347–350.
- [16] Yoo, K.S., Pike, L.M. (1998). Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Sci. Hortic.* 75, 1–10.
- [17] Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr. A* 1112, 3–22.
- [18] Kubec, R., Dadáková, E. (2009). Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives—A comparative study. *J. Chromatogr. A* 1216, 6957–6963.
- [19] Kubec, R., Dadáková, E. (2008). Quantitative determination of S-alk(en)ylcysteine-S-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A* 1212, 154–157.
- [20] Dethier, B., Laloux, M., Hanon, E., Nott, K., Heuskin, S., Wathelet, J.P. (2012). Analysis of the diastereoisomers of alliin by HPLC. *Talanta* 101, 447–452.
- [21] Keusgen, M. (1998). A high-throughput method for the quantitative determination of alliin. *Planta Med.* 64, 736–740.
- [22] Krest, I., Keusgen, M. (2002). Biosensoric flow-through method for the determination of cysteine sulfoxides. *Anal. Chim. Acta* 469, 155–164.
- [23] Horie, H., Yamashita, K. (2006). Non-derivatized analysis of methiin and alliin in vegetables by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1132, 337–339.
- [24] Arnault, I., Christidès, J.P., Mandon, N., Haffner, T., Kahane, R., Auger, J. (2003). High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *J. Chromatogr. A* 991, 69–75.
- [25] Ichikawa, M., Ide, N., Yoshida, J., Yamaguchi, H., Ono, K. (2006). Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1535–1540.
- [26] Montaña, A., Beato, V.M., Mansilla, F., Orgaz, F. (2011). Effect of genetic characteristics and environmental factors on organosulfur compounds in garlic (*Allium sativum* L.) grown in Andalusia, Spain. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1301–1307.

- [27] Zhu, Q., Kakino, K., Nogami, C., Ohnuki, K., Shimizu, K. (2016). An LC-MS/MS-SRM method for simultaneous quantification of four representative organosulfur compounds in garlic products. *Food Anal. Methods* 9, 3378–3384.
- [28] Hemström, P., Irgum, K. (2006). Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 29, 1784–1821.
- [29] Bernal, J., Ares, A.M., Pól, J., Wiedmer, S.K. (2011). Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. *J. Chromatogr. A* 1218, 7438–7452.
- [30] Gama, M.R., da Costa Silva, R.G., Collins, C.H., Bottoli, C.B.G. (2012). Hydrophilic interaction chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 37, 48–60.
- [31] Buszewski, B., Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 231–247.
- [32] Dell'mour, M., Jaitz, L., Oburger, E., Puschenreiter, M., Koellensperger, G., Hann, S. (2010). Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research. *J. Sep. Sci.* 33, 911–922.
- [33] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965–977.
- [34] Jiang, X.M., Lu, Y.M., Tan, C.P., Liang, Y., Cui, B. (2014). Combination of aqueous two-phase extraction and cation-exchange chromatography: New strategies for separation and purification of alliin from garlic powder. *J. Chromatogr. B* 957, 60–67.
- [35] Kimbaris, A.C., Siatis, N.G., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Daferera, D.J., Polissiou, M.G. (2006). Quantitative analysis of garlic (*Allium sativum*) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy. *Food Chem.* 94, 287–295.
- [36] Acri, G., Testagrossa, B., Vermiglio, G. (2016). FT-NIR analysis of different garlic cultivars. *Food Measure* 10, 127–136.
- [37] Lu, X., Ross, C.F., Powers, J.R., Aston, D.E., Rasco, B.A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of garlic (*Allium sativum*) and elephant garlic (*Allium ampeloprasum*) by attenuated total reflectance–Fourier transformed infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5215–5221.
- [38] Lohumi, S., Lee, S., Cho, B.-K. (2015). Optimal variable selection for Fourier transform infrared spectroscopic analysis of starch-adulterated garlic powder. *Sens. Actuators, B* 216, 622–628.
- [39] Lawson, L.D., Hughes, B.G. (1992). Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Med.* 58, 345–350.

- [40] Reis, N., Franca, A.S., Oliveira, L.S. (2013). Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics. *Talanta* 115, 563–568.
- [41] Wang, X., Liu, H.P., Zeng, C.C., Liu, S.H. (2013). Infrared and Raman spectral analysis of alliin and methiin. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectrosc. Spect. Anal.* 33, 1570–1574.
- [42] Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts.* (3rd ed.). England: John Wiley & Sons Ltd.

ΜΕΡΟΣ Β

Έλεγχος Αυθεντικότητας Δευτερογενών Μεταβολιτών

4. Έλεγχος νοθείας των σιγμάτων κρόκου με υλικά φυτικής προέλευσης μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών

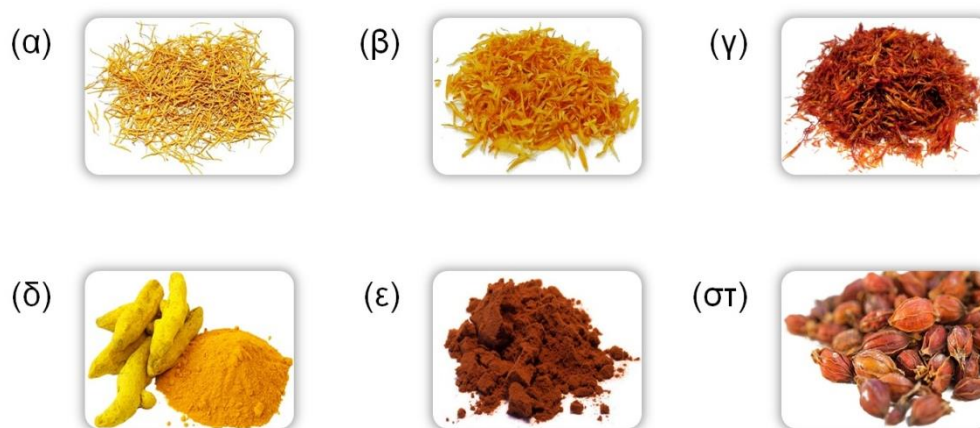
4.1. Εισαγωγή

Η αυθεντικότητα των φυτικών προϊόντων και τροφίμων αποτελεί ολοένα και πιο σημαντικό ζήτημα για τους καταναλωτές, τους ρυθμιστικούς φορείς και τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Στο πλαίσιο των ελέγχων αυθεντικότητας περιλαμβάνεται η ανίχνευση της νοθείας σε προϊόντα διατροφής που έχει κατά βάση οικονομικά κίνητρα. Η οικονομική απάτη συνήθως συντελείται με προσθήκη φθηνότερων και πιο εύκολα διαθέσιμων υποκατάστατων, τα οποία δύσκολα μπορούν να προσδιοριστούν με συνήθεις αναλυτικές μεθοδολογίες [1,2].

Όπως αναφέρθηκε πρόσφατα, ανάμεσα στους πλέον σημαντικούς στόχους για νοθεία βρίσκονται τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα από τα άνθη του καλλιεργούμενου φυτού κρόκος (*Crocus sativus* L.) [3]. Τα στίγματα του κρόκου, τα οποία φέρουν την εμπορική ονομασία “saffron”, συνιστούν ένα πολύτιμο φυσικό προϊόν που είναι ευρέως γνωστό ως άρτυμα, λόγω της χρωστικής δύναμης και του ξεχωριστού αρώματός τους. Εκτός από τη χρήση τους σε τρόφιμα και προϊόντα κοσμετολογίας, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται συνεχώς αυξανόμενη τάση να χρησιμοποιούνται σε βοτανικά προϊόντα και συναφή σκευάσματα λόγω ενός ευρέος φάσματος ευεργετικών ιδιοτήτων για την ανθρώπινη υγεία [4-6]. Δεδομένης της περιορισμένης παραγωγής και της χειρωνακτικής διαδικασίας που απαιτείται, τα στίγματα κρόκου αποτελούν το ακριβότερο άρτυμα στην παγκόσμια αγορά και ως εκ τούτου έχουν υποστεί διάφορους τύπους νοθείας με την πάροδο των αιώνων.

Η προσθήκη μιας ποικιλίας υλικών φυτικής προέλευσης κατώτερης ποιότητας και σαφώς μικρότερης εμπορικής αξίας, αλλά με παρόμοια εμφάνιση, περιλαμβάνεται στις πιο κοινές πρακτικές οικονομικής απάτης με σκοπό την αύξηση του βάρους των σιγμάτων κρόκου. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα όταν τα στίγματα κρόκου απαντούν σε μορφή σκόνης ή όταν χρησιμοποιούνται ως συστατικό σε καρυκεύματα και άλλα προϊόντα διατροφής [7,8]. Πολλές πηγές αναφέρουν ότι οι κομμένοι ή/και βαμμένοι στήμονες του κρόκου (*C. sativus*), τα πέταλα της καλέντουλας (*Calendula officinalis* L.), τα πέταλα του κάρθαμου (*Carthamus tinctorius* L.), και ο κουρκουμάς (*Curcuma longa* L.) αποτελούν χαρακτηριστικά υλικά που συναντώνται συχνά στη

νοθεία των σιγμάτων κρόκου [7-12]. Τα συγκεκριμένα τέσσερα φυτικά υλικά, μάλιστα, είναι πιθανό να διακινούνται εμπορικά με ονομασίες που περιλαμβάνουν τη λέξη “saffron” και την υποτιθέμενη χώρα προέλευσης (π.χ. Turkish saffron, American saffron), αποσκοπώντας στην παραπλάνηση του καταναλωτικού κοινού [7,10]. Το εκχύλισμα των καρπών γαρδένιας (*Gardenia jasminoides* Ellis), καθώς και το εκχύλισμα από τα άνθη βουδλίας (*Buddleja officinalis* Maxim) αποτελούν δύο άλλα νεότερα υλικά που έχουν αναφερθεί για τη νοθεία των σιγμάτων κρόκου [10,12]. Τα δύο αυτά εκχυλίσματα περιέχουν χρωστικές ουσίες με δομή παρόμοια εκείνης των εστέρων της κροκετίνης (κροκίνες) που βρίσκονται στα στίγματα του κρόκου [10,13,14], και για το λόγο αυτό θα μπορούσαν ενδεχομένως να ενσωματωθούν σε μεγαλύτερο βαθμό (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Χαρακτηριστικά υλικά φυτικής προέλευσης που αναφέρονται συχνά σε περιπτώσεις νοθείας των σιγμάτων κρόκου. (α) Στήμονες κρόκου, (β) καλέντουλα, (γ) κάρθαμος, (δ) κουρκουμάς, (ε) εκχύλισμα βουδλίας και (στ) καρποί γαρδένιας από όπου παραλαμβάνεται το αντίστοιχο εκχύλισμα.

Ανεξάρτητα από τη δόλια πρακτική που ακολουθείται, η ανίχνευση της εμπορικής απάτης στα στίγματα κρόκου αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση δεδομένου ότι οι αλλαγές στις φυσικές, χημικές ή οργανοληπτικές ιδιότητες δεν μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα. Ως αποτέλεσμα, τα προϊόντα υψηλής ποιότητας απαντούν συνήθως στο εμπόριο με τη μορφή σιγμάτων [4], όπου η εξωγενής ή η ξένη ύλη μπορούν να είναι πιο εύκολα αναγνωρίσιμες. Για τους σκοπούς της εμπορίας των σιγμάτων κρόκου, οι πρακτικές οικονομικής απάτης μπορούν να

αντιμετωπιστούν με την αξιολόγηση της καθαρότητας και της αυθεντικότητας του εκάστοτε προϊόντος ή με την ταξινόμηση του ως προς τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με το τεχνικό πρότυπο ISO 3632 [15,16], το μέγιστο ποσοστό ξένης ύλης που επιτρέπεται σε τρίτης κατηγορίας προϊόντα είναι 1% (w/w). Για την ίδια κατηγορία, το μέγιστο επιτρεπόμενο ποσοστό εξωγενούς ύλης, δηλαδή υπολειμμάτων από το ίδιο το φυτό όπως π.χ. οι στήμονες και τα τέπαλα του κρόκου, είναι 5% (w/w). Παρ' όλα αυτά, η σχετική μέθοδος που περιγράφεται στο πρότυπο ISO 3632-2 [15] μπορεί να καταστεί εξαιρετικά χρονοβόρα για τη διαλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων, καθώς βασίζεται στη μικροσκοπική εξέταση. Επιπλέον, η καθιερωμένη φασματοφωτομετρική μέθοδος με UV-Vis του ISO 3632-2 που χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση του saffron, όπως καταδείχθηκε πρόσφατα [17], κρίνεται μάλλον ακατάλληλη για την ανίχνευση νοθείας με ποσότητες έως 20% (w/w) καλέντουλας, κάρθαμου ή κουρκουμά. Εξάγεται, έτσι, το συμπέρασμα ότι ένα προϊόν υψηλότερης ποιότητας μπορεί σκόπιμα να αναμιχθεί με υποκατάστατα φυτικής προέλευσης προκειμένου να αποκρυφτεί η απάτη.

Η πλειοψηφία των μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί για τη διερεύνηση της νόθευσης των στιγμάτων κρόκου με υλικά φυτικής προέλευσης βασίζονται σε μοριακές τεχνικές [8,12,18-23]. Η χρήση των δεικτών DNA έχει επιτρέψει την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων (0.5-1% w/w) αρκετών φυτικών υλικών νοθείας, συμπεριλαμβανομένου του κάρθαμου, του κουρκουμά και της καλέντουλας [12,18,19]. Αν και οι μέθοδοι αυτές είναι πολύ ευαίσθητες, συνήθως απαιτούν εκτεταμένη προετοιμασία των δειγμάτων και δεν μπορούν να ανιχνεύσουν εύκολα τη νοθεία με φυτικά εκχυλίσματα (π.χ. εκχύλισμα βουδλίας ή γαρδένιας), πιθανώς λόγω της απουσίας DNA που μπορεί να ανακτηθεί [12]. Για την ανίχνευση φυτικών υλικών νοθείας στα στίγματα κρόκου έχουν, επίσης, αναφερθεί στη βιβλιογραφία αρκετές χρωματογραφικές μέθοδοι με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [17,24-27]. Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδίοδων (PDA) ή φασματομετρίας μαζών - ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS) φάνηκε ότι μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη φυτικών προσμίξεων σε επίπεδα 2-5% (w/w) [17]. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη έδειξε την ικανότητα ενός συστήματος ηλεκτρονικής μύτης (e-nose) σε συνδυασμό με την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και τεχνητών νευρωνικών δικτύων να διαφοροποιούν νοθευμένα και μη νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου [28]. Στις μέρες μας, πάντως, εξακολουθεί να υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη πιο απλών και εύρωστων μεθόδων υψηλής απόδοσης, οι οποίες να επιτρέπουν τη γρήγορη διαλογή χωρίς

να καταστρέφουν το δείγμα, εντοπίζοντας τη νοθεία στα στίγματα κρόκου κυρίως σε επίπεδα πρακτικής οικονομικής σημασίας.

Στο πλαίσιο αυτό, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί μια αναλυτική τεχνική που εφαρμόζεται σε μεγάλο βαθμό για την ταχύτητα και την αναπαραγωγικότητά της, ενώ προσφέρει τη δυνατότητα για υψηλής απόδοσης αναλύσεις με ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος [29,30]. Με το μεταβολικό αποτύπωμα που λαμβάνεται μέσω της φασματοσκοπίας NMR μπορούν να εντοπιστούν οι μικρές διαφοροποιήσεις που συχνά υπάρχουν μεταξύ των αυθεντικών και των νοθευμένων προϊόντων. Η μεταβολομική προσέγγιση με NMR πρωτονίου (^1H NMR) πρόσφατα διερευνήθηκε για το διαχωρισμό του αυθεντικού ιρανικού saffron από εμπορικά δείγματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πικροκροκίνη και οι γλυκοζυλιωμένοι εστέρες της κροκετίνης αποτελούν χαρακτηριστικούς μεταβολίτες για τα αυθεντικά στίγματα κρόκου [31]. Η πολυπλοκότητα των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR στις μεταβολομικές μελέτες τροφίμων είναι σαφώς ο κύριος λόγος για την εφαρμογή στατιστικών μεθόδων πολυμεταβλητής ανάλυσης που μπορούν να διαχωρίσουν δείγματα με παρόμοια χαρακτηριστικά [32,33]. Μεταξύ αυτών υπάρχουν επιβλεπόμενες μέθοδοι, όπως η διαχωριστική ανάλυση με ορθογώνια προβολή σε λανθάνουσες δομές (OPLS-DA) και η αμφίδρομη εκδοχή της (O2PLS-DA) [34], που μπορούν σε πολλές περιπτώσεις να βελτιώσουν την ταξινόμηση ως προς την πιστοποίηση της αυθεντικότητας διαφόρων τροφίμων σύμφωνα με τη γεωγραφική ή βοτανική τους προέλευση [35-40].

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) παρέχει άλλη μία χαμηλότερου κόστους επιλογή που μπορεί να εφαρμοστεί για την υψηλής απόδοσης ανάλυση πολυάριθμων τροφίμων και βοτάνων [41-45]. Η χρησιμότητά της αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο με την ανάπτυξη φορητών συσκευών IR, γεγονός που καθιστά την τεχνική αυτή ένα πολύτιμο εργαλείο για τη λήψη αποτυπωμάτων, είτε για εργαστηριακή είτε για επί τόπου ανάλυση στα πολύπλοκα δίκτυα εφοδιασμού [46]. Ανάμεσα στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για μετρήσεις στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου, όπου υφίστανται δομικές πληροφορίες που σχετίζονται με τις θεμελιώδεις δονήσεις των μορίων [44], η τεχνική διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για τον προσδιορισμό παραμέτρων ποιότητας και αυθεντικότητας των τροφίμων και βοτάνων [47,48]. Με το συνδυασμό της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και μεθόδων πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων είναι

εφικτός ο έλεγχος αυθεντικότητας των σιγμάτων κρόκου από την άποψη της γεωγραφικής προέλευσης [49]. Επίσης, η φασματοσκοπία FT-IR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση υποβάθμισης του προϊόντος λόγω παλαίωσης [50,51] καθώς και για τον έλεγχο νοθείας με διάφορες χρωστικές ουσίες. Η τελευταία εφαρμογή παρουσιάστηκε πολύ πρόσφατα [52], επισημαίνοντας την ικανότητα της φασματοσκοπίας FT-IR σε συνδυασμό με κατάλληλες χημειομετρικές μεθόδους για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό έξι διαφορετικών τεχνητών χρωστικών σε δείγματα Ιρανικού saffron. Η δυνατότητα εφαρμογής της υπέρυθρης φασματοσκοπίας για τον έλεγχο νοθείας των σιγμάτων κρόκου με φυτικές προσμίξεις έχει, επίσης, διερευνηθεί σε μια άλλη πρόσφατη εργασία [53], κάνοντας χρήση της φασματοσκοπικής απεικόνισης υπέρυθρου και της φασματοσκοπίας υπέρυθρου συσχέτισης δύο διαστάσεων σε συνδυασμό με PCA. Ωστόσο, απαιτήθηκαν πληροφορίες τόσο από την εγγύς υπέρυθρου (NIR) μικροφασματοσκοπική απεικόνιση όσο και από το FT-IR, ενώ αξιολογήθηκε ένα μόνο υλικό νοθείας (κάρθαμος).

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται δύο μελέτες διερεύνησης της νοθείας στα σίγματα κρόκου με υλικά φυτικής προέλευσης, εξετάζοντας επίπεδα νοθείας με πρακτικό ενδιαφέρον. Στην πρώτη μελέτη περιγράφεται μια μεταβολομική προσέγγιση δύο σταδίων για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των φυτικών υλικών νοθείας, όπου γίνεται διαδοχικά εφαρμογή των μεθόδων πολυμεταβλητής ταξινόμησης OPLS-DA και O2PLS-DA στα φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR. Η δεύτερη μελέτη, στη συνέχεια, εισάγει και την ποσοτικοποίηση της νοθείας, έπειτα από την ανίχνευση και ταυτοποίηση των φυτικών υλικών. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μια νέα μεθοδολογία χρησιμοποιώντας την τεχνική DRIFTS σε συνδυασμό με μεθόδους πολυμεταβλητής ταξινόμησης, πολυμεταβλητής βαθμονόμησης και επιλογής μεταβλητών κατά τη βαθμονόμηση.

4.2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση φυτικών υλικών νοθείας στα στίγματα κρόκου με χρήση της φασματοσκοπίας ^1H NMR

4.2.1. Πειραματικό μέρος

4.2.1.1. Προμήθεια υλικών

Τα ελληνικά δείγματα ($n = 10$) αποξηραμένων σιγμάτων κρόκου που χρησιμοποιήθηκαν, εσοδείας 2012, παραχωρήθηκαν από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Όλα τα δείγματα ανήκαν στην εμπορική κατηγορία I, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του προτύπου ISO 3632 [16], ενώ προκειμένου να αυξηθεί η μεταβλητότητα ανάμεσά τους συγκαταλέχθηκαν προϊόντα βιολογικής καλλιέργειας ($n = 6$) και συμβατικά ($n = 4$). Η προμήθεια των δειγμάτων από στήμονες κρόκου (εμπορικής ονομασίας “Safran”), κουρκουμά (εμπορικής ονομασίας “Like safran”) και κάρθαμου (εμπορικής ονομασίας “Turkish saffron”) έγινε από την εγχώρια αγορά καθώς και από αγορές του εξωτερικού. Το εκχύλισμα από τους καρπούς γαρδένιας (single herb extract, Zhi Zi) ήταν της εταιρείας Plum Flower Brand (Anguo, China). Για την παραλαβή των εκχυλισμάτων και τη λήψη των φασμάτων ^1H NMR χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO- d_6 , 99.96% D) της εταιρείας Euriso-Top (Saclay, France).

4.2.1.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα σιγμάτων κρόκου και τα φυτικά υλικά νοθείας λειοτριβήθηκαν επιμελώς σε γουδί από αχάτη. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τεχνητά μίγματα σιγμάτων κρόκου που περιείχαν 20% (w/w) φυτικού υλικού ενός τύπου. Για κάθε υλικό νοθείας προετοιμάστηκαν συνολικά 10 μίγματα και έτσι ορίστηκαν πέντε κατηγορίες δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων των αυθεντικών δειγμάτων από στίγματα κρόκου. Τα πενήντα αυτά δείγματα (10 mg), μαζί με τα καθαρά φυτικά υλικά νοθείας που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων ^1H NMR αναφοράς, εκχυλίστηκαν με 600 μL DMSO- d_6 υπό έντονη ανάδευση με χρήση vortex για 3 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 10 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν στα 12,100 g για διάρκεια 10 λεπτών και στη συνέχεια όγκος 500 μL του υπερκείμενου μεταφέρθηκε σε σωλήνα NMR των 5 mm για ανάλυση. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το DMSO λόγω της ικανότητάς του να διαλύει

είτε υδρόφιλες είτε υδρόφοβες ενώσεις, ενώ επίσης τα φάσματα NMR που καταγράφονται στην περίπτωση των στιγμάτων κρόκου περιλαμβάνουν περισσότερο οξείες φασματικές γραμμές σε σύγκριση με άλλους διαλύτες που ελέγχθηκαν (π.χ. CD₃OD).

4.2.1.3. Φασματοσκοπική ανάλυση με ¹H NMR

Η καταγραφή των φασμάτων ¹H NMR διεξήχθη σε φασματόμετρο Avance 600 MHz (14.09 T) της εταιρίας Bruker (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Karlsruhe, Germany), χρησιμοποιώντας αισθητήρα αντίστροφης ανίχνευσης διαμέτρου 5 mm, με βαθμιδωτό πεδίο στον άξονα z (z-gradient). Όλα τα μονοδιάστατα φάσματα λήφθηκαν στους 300 K, με φασματικό πλάτος 10,000 Hz και 32 K (32,768) σημεία δεδομένων. Η καταστολή του σήματος του νερού πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας ακολουθία προκορεσμού (presaturation) με ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων χαμηλής ισχύος για 1.2 s. Για τη λήψη και τη βασική επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TOPSPIN 3.0 (Bruker BioSpin). Η επεξεργασία περιελάμβανε την εφαρμογή ενός εκθετικού συντελεστή στάθμισης με διεύρυνση γραμμής 0.5 Hz στο σήμα ελεύθερης επαγωγικής απόσβεσης (FID), πριν από το μετασχηματισμό Fourier, ενώ ακολούθησε η διόρθωση φάσης και βασικής γραμμής χειροκίνητα. Όλα τα φάσματα ¹H NMR ευθυγραμμίστηκαν σύμφωνα με την υπολειπόμενη κορυφή του διαλύτη στα 2.50 ppm. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του λογισμικού ACD/NMR 11.0 (ACD Labs, Toronto, Canada) τα φάσματα χωρίστηκαν σε μια σειρά περιοχών (buckets), με πλάτος 0.04 ppm η κάθε μία, χρησιμοποιώντας τη φασματική περιοχή 0.40 - 10.50 ppm. Οι περιοχές 2.47-2.52 ppm και 3.31-3.34 ppm που αντιστοιχούν στις κορυφές του διαλύτη και του νερού, αντίστοιχα, αφαιρέθηκαν. Για το σύνολο των περιοχών έγινε κλιμάκωση σύμφωνα με τη συνολική ένταση του φάσματος, έτσι ώστε να ληφθεί υπόψη η διαφορετική σύσταση των δειγμάτων.

4.2.1.4. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων

Για τη χημειομετρική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), η διαχωριστική ανάλυση με ορθογώνια προβολή σε λανθάνουσες δομές (OPLS-DA) και η αμφίδρομη OPLS-DA (O2PLS-DA). Σε όλες τις περιπτώσεις

πραγματοποιήθηκε κλιμάκωση των δεδομένων κατά Pareto. Η μέθοδος PCA εφαρμόστηκε για να αναπαριστάνει την κατανομή των δειγμάτων στον πολυμεταβλητό χώρο. Οι επιβλεπόμενες μέθοδοι ταξινόμησης OPLS-DA και O2PLS-DA χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μειωθεί η πολυπλοκότητα του μοντέλου με αφαίρεση της συστηματικής παραλλακτικότητας στον πίνακα X που δε συσχετιζόταν γραμμικά με την απόκριση Y (δομημένος θόρυβος), μεγιστοποιώντας έτσι το διαχωρισμό μεταξύ των δειγμάτων. Όταν η διάσταση του κοινού συσχετιζόμενου χώρου είναι μία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το διάγραμμα σιγμοειδούς μορφής (S-plot) που αποτελεί χρήσιμο εργαλείο οπτικοποίησης των μεταβλητών και ερμηνείας του εκάστοτε μοντέλου [54]. Η μη τυχαιότητα όλων των μοντέλων ταξινόμησης ελέγχθηκε εκτελώντας έλεγχο μεταθέσεων (permutation test), κατά τον οποίο υπολογίστηκαν συνολικά 200 μοντέλα με τυχαιοποίηση στη σειρά της μεταβλητής απόκρισης Y στο αντίστοιχο μοντέλο διαχωριστικής ανάλυσης με παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Η πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων έγινε με το λογισμικό SIMCA 13 (Umetrics, Umea, Sweden). Οι έλεγχοι Hotelling's T^2 και απόστασης από το μοντέλο βάσει υπολοίπων (DModX) εφαρμόστηκαν για να εξακριβωθεί η παρουσία δειγμάτων που αποκλίνουν και να αξιολογηθεί εάν κατά πόσον τα δείγματα εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής του μοντέλου.

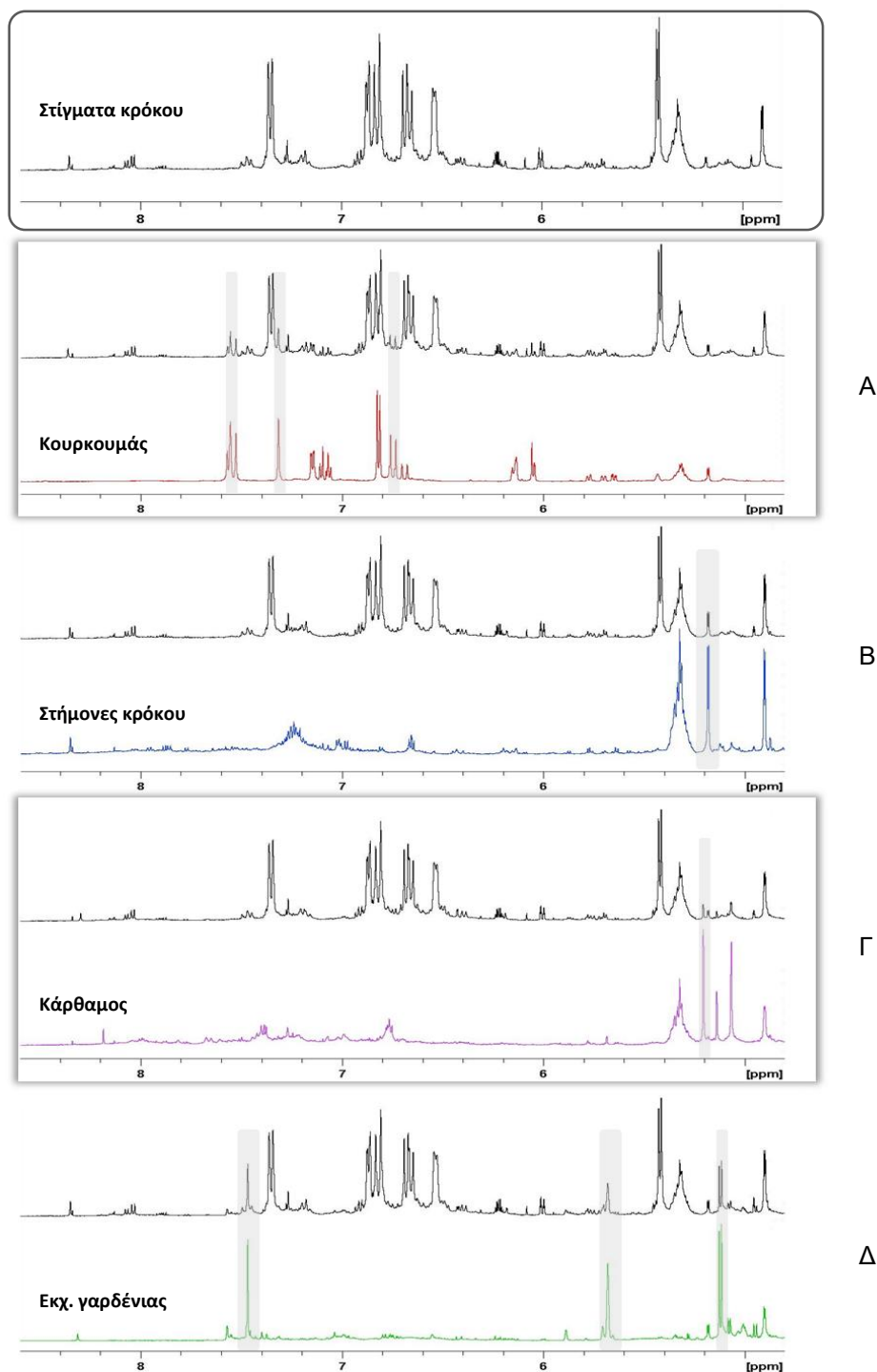
Η διερεύνηση της προβλεπτικής ικανότητας των μοντέλων έγινε με βάση τα σύνολα δειγμάτων εκπαίδευσης και ελέγχου που εξήχθησαν από τα 50 δείγματα. Και στα δύο σύνολα περιλήφθηκαν δείγματα από τις 4 κατηγορίες νοθευμένων δειγμάτων με φυτικά υλικά και την κατηγορία των αυθεντικών δειγμάτων από στίγματα κρόκου. Από κάθε κατηγορία επιλέχθηκαν τυχαία επτά από τα δέκα δείγματα για το σύνολο εκπαίδευσης, ενώ τα υπόλοιπα τρία δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για το σύνολο ελέγχου. Συνοψίζοντας, τα σύνολα εκπαίδευσης και ελέγχου αποτελούνταν από 35 και 15 δείγματα, αντίστοιχα.

4.2.2. Αποτελέσματα - Συζήτηση

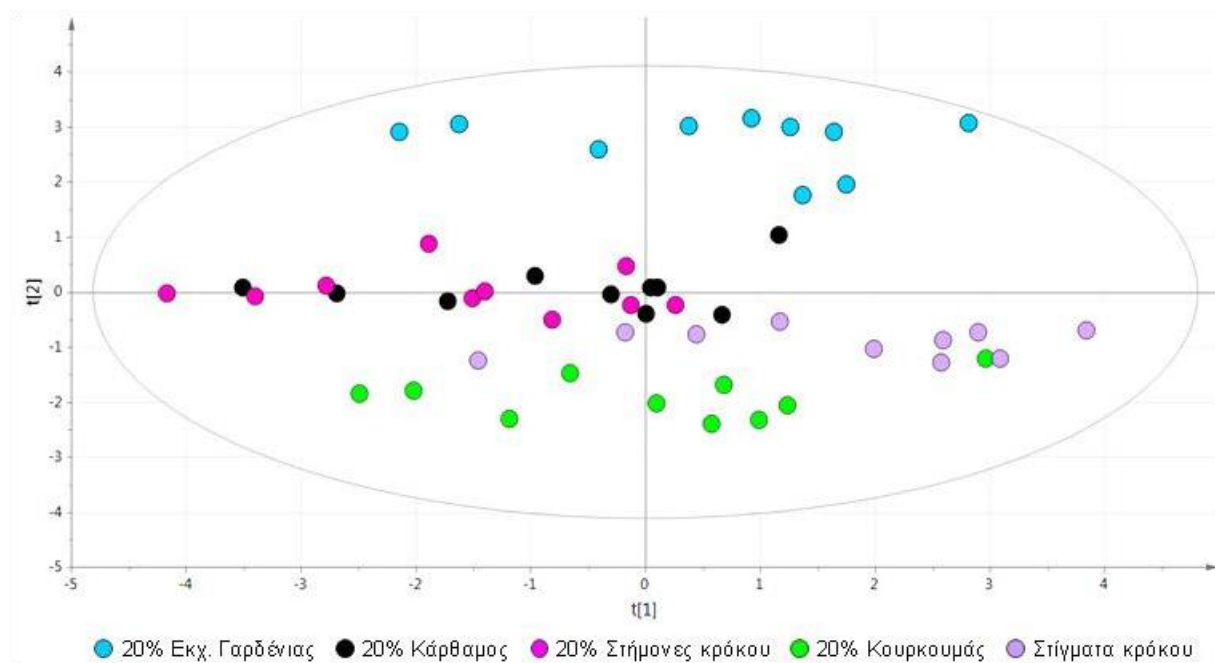
Η ύπαρξη νοθείας στα στίγματα κρόκου θα μπορούσε να αξιολογηθεί εύκολα για κάθε φυτικό υλικό που ελέγχθηκε, συγκρίνοντας τα φάσματα ^1H NMR των αυθεντικών και των

νοθευμένων δειγμάτων. Η παρουσία τυπικών σημάτων για καθένα από τα διαφορετικά υλικά φυτικής προέλευσης επιβεβαιώθηκε κατά μήκος ολόκληρης της φασματικής περιοχής. Στο Σχήμα 4.1 συγκρίνονται οι περιοχές των φασμάτων ^1H NMR που περιλαμβάνουν σήματα πρωτονίων αρωματικών δακτυλίων και ανωμερικών πρωτονίων σακχάρων για τα καθαρά φυτικά υλικά νοθείας και τα αντίστοιχα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου. Στο πλαίσιο Α (κάτω ίχνος), φαίνεται το φάσμα του εκχυλίσματος κουρκουμά σε DMSO-d_6 . Τα τυπικά σήματα για το χαρακτηριστικό τμήμα των κουρκουμινοειδών θα μπορούσαν να εντοπιστούν στα 7.541, 6.751 ppm για τα H1,7 και H2,6, αντίστοιχα, στα 6.059 ppm για το H4, και τα σήματα 7.318, 7.147, και 6.819 ppm για τα αρωματικά πρωτόνια. Οι αποδόσεις αυτές σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα σήματα για το φάσμα ^{13}C NMR (140.26, 120.75, 100.55, 110.93, 122.86 και 115.42 ppm) οδήγησαν σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα που έχουν ήδη αναφερθεί [55]. Τα σήματα κουρκουμινοειδών θα μπορούσαν εύκολα να αναγνωριστούν στο εκχύλισμα από νοθευμένα στίγματα κρόκου με κουρκουμά (άνω ίχνος, πλαίσιο Α) από τη σύγκριση με το φάσμα στιγμάτων κρόκου. Αναλόγως, το πλαίσιο Β αποδεικνύει την αύξηση της διπλέτας στα 5.181 ppm, η οποία πιθανότατα αντιστοιχεί σε περιοχή των σακχάρων που εμφανίζεται σε μεγάλο βαθμό στο εκχύλισμα από στήμονες κρόκου. Το πλαίσιο Γ δείχνει μια αύξηση στα σήματα που εντοπίζονται στα 5.205, 5.138 και 5.066 ppm και τέλος, το πλαίσιο Δ υποδεικνύει την αύξηση των διπλετών στα 7.569 και 7.466 ppm, ενώ εμφανίζονται μια πλατιά κορυφή στα 5.679 ppm και οι διπλέτες στα 5.121 ppm, που πιθανότατα αποδίδεται σε περιοχή των σακχάρων.

Για την πολυμεταβλητή ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων λήφθηκε υπόψη ολόκληρη η περιοχή των φασμάτων ^1H NMR. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) σε όλα τα δείγματα, προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή διαφοροποίησή τους με βάση την καθαρότητα ή το είδος φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε για τη νόθευση. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PCs) ερμήνευσαν το 63.7% της συνολικής διακύμανσης. Το αντίστοιχο διάγραμμα (Σχήμα 4.2) έδειξε έναν ανεπαρκή διαχωρισμό για την πλειοψηφία των δειγμάτων. Μόνο τα δείγματα στιγμάτων κρόκου που νοθεύθηκαν με 20% (w/w) εκχύλισμα γαρδένιας διαφοροποιήθηκαν επαρκώς, ενώ ακολούθησαν τα νοθευμένα δείγματα που περιείχαν κουρκουμά.



Σχήμα 4.1. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων ^1H NMR που λήφθηκαν από τα εκχυλίσματα σε DMSO-d_6 . Το φάσμα στην κορυφή του σχήματος, εντός γκρι πλαισίου, είναι χαρακτηριστικό των αυθεντικών στιγμάτων κρόκου. Τα φάσματα του καθαρών φυτικών υλικών (κουρκουμάς, στήμονες κρόκου, κάρθαμος και εκχύλισμα από τους καρπούς γαρδένιας) απεικονίζονται στο κάτω μέρος των τμημάτων Α, Β, Γ και Δ, αντίστοιχα, ενώ στο άνω μέρος εμφανίζονται τα φάσματα από τα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου σε επίπεδο 20% (w/w) με τα επιμέρους φυτικά υλικά.

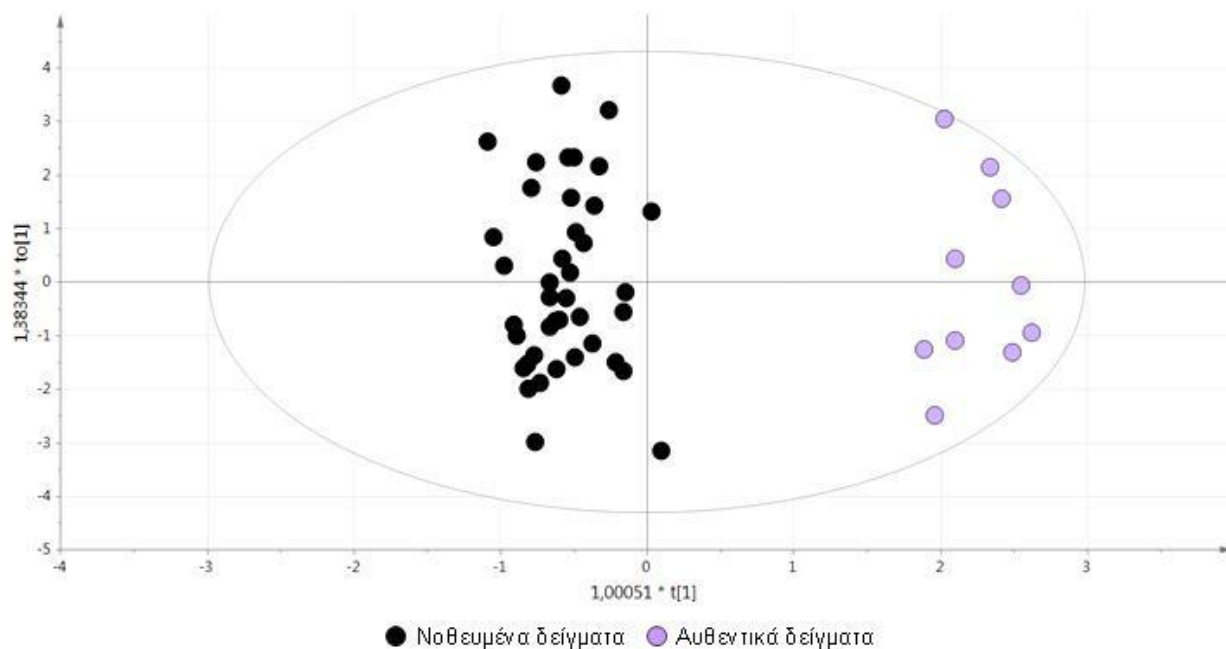


Σχήμα 4.2. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) PCA (PC1 έναντι PC2) από την εξέταση 10 αυθεντικών δειγμάτων από στίγματα κρόκου (μωβ κύκλοι) και των ίδιων δειγμάτων νοθευμένων σε συγκέντρωση 20% (w/w) με εκχύλισμα γαρδένιας (γαλάζιοι κύκλοι), κάρθαμο (μαύροι κύκλοι), στήμονες κρόκου (ροζ κύκλοι) και κουρκουμά (πράσινοι κύκλοι), διαμορφώνοντας ένα σύνολο 40 νοθευμένων δειγμάτων. PC1 = 36.8%, PC2 = 26.9%, $R^2X = 99.5\%$ και $Q^2 = 96.2\%$.

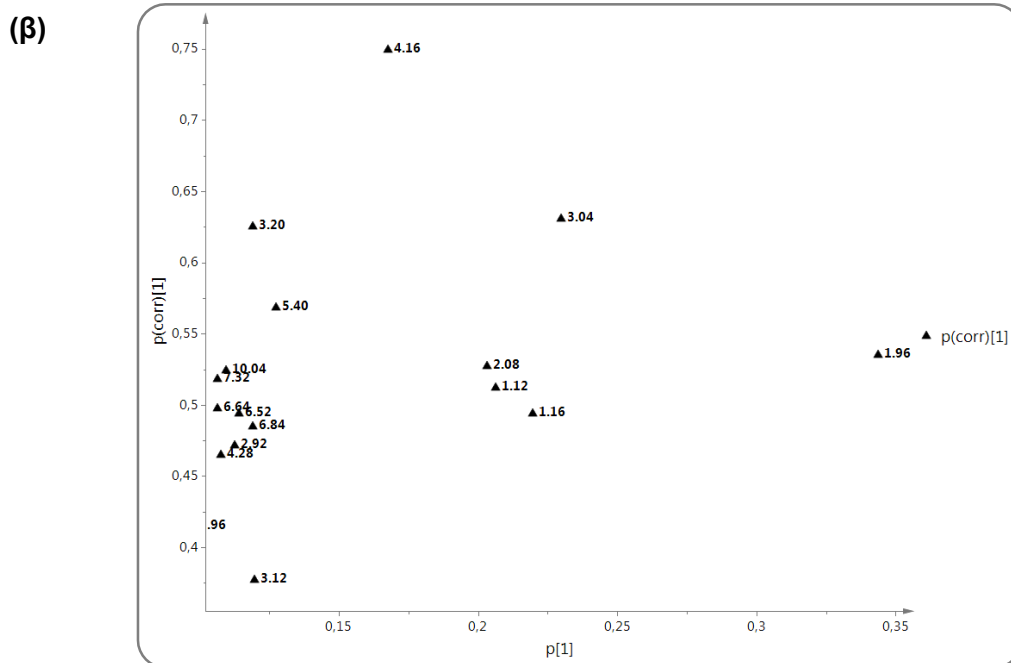
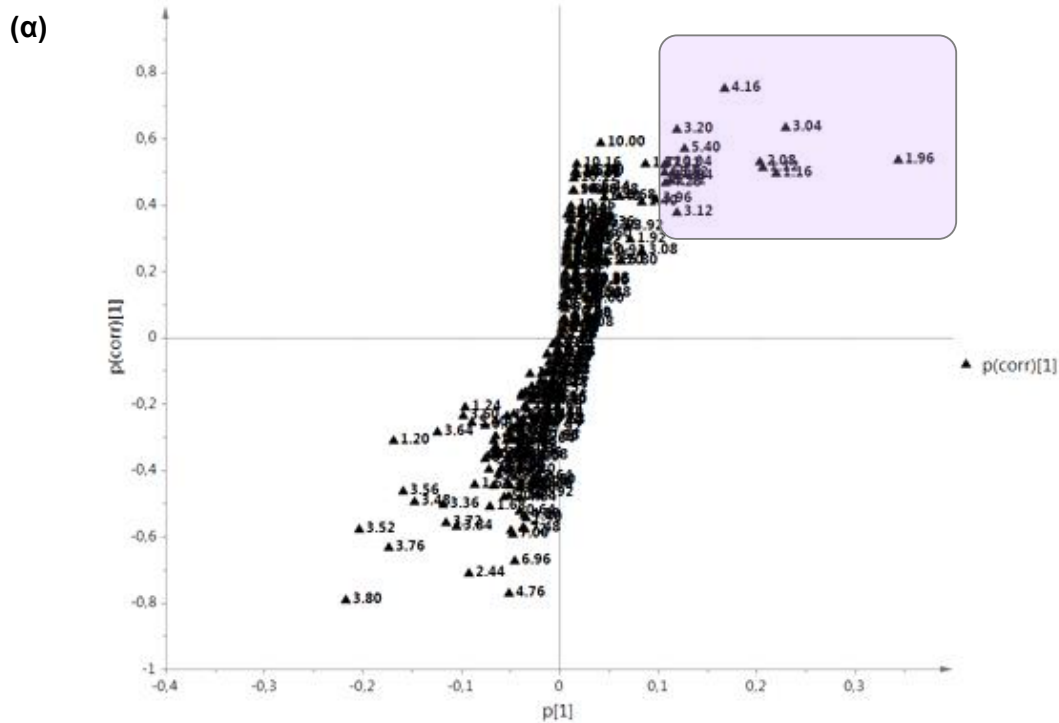
Στη συνέχεια, για να βελτιωθεί ο διαχωρισμός των δειγμάτων στις επιμέρους κατηγορίες, αναπτύχθηκαν μοντέλα επιβλεπόμενης ταξινόμησης με μια προσέγγιση δύο βημάτων. Αρχικά, ελέγχθηκε η διάκριση μεταξύ αυθεντικών και νοθευμένων δειγμάτων από στίγματα κρόκου, ενώ ακολούθησε αξιολόγηση των νοθευμένων δειγμάτων ως προς το φυτικό υλικό νοθείας που περιείχαν.

Το πρώτο μοντέλο βασίστηκε στη μέθοδο διαχωριστικής ανάλυσης με ορθογώνια προβολή σε λανθάνουσες δομές (OPLS-DA), εξετάζοντας δύο κατηγορίες δειγμάτων, δηλαδή τα αυθεντικά δείγματα σιγμάτων κρόκου και τα νοθευμένο δείγματα. Για το μοντέλο OPLS-DA χρησιμοποιήθηκαν μία παράλληλη συνιστώσα πρόβλεψης και τρεις ορθογώνιες συνιστώσες ($R^2X = 82.4\%$, $R^2Y = 94.5\%$ και $Q^2 = 92.3\%$). Στο Σχήμα 4.3 καταδεικνύεται μια σαφής διάκριση μεταξύ των δύο κατηγοριών δειγμάτων. Το αντίστοιχο διάγραμμα σιγμοειδούς μορφής (S-plot)

υποδεικνύει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πικροκροκίνη (buckets 1.12, 1.16, 2.08, 4.28 και 10.04 ppm) και κροκίνες (buckets 1.96, 4.16, 5.40, 6.52, 6.64, 6.84 και 7.32 ppm) για τα αυθεντικά ελληνικά δείγματα σιγμάτων κρόκου σε σχέση με τα νοθευμένα δείγματα με φυτικά υλικά, τα οποία γενικά παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα λιπαρών οξέων (buckets 1.20 και 1.24 ppm), ενώ επίσης συμπεριλαμβάνονται χαρακτηριστικά σήματα για κάθε υλικό νοθείας (Σχήμα 4.4). Τα αποτελέσματα συμπίπτουν με προηγούμενα δημοσιευμένα στοιχεία [31], όπου η πικροκροκίνη και οι γλυκοζυλεστέρες της κροκετίνης αναφέρονται ως οι πιο σημαντικοί δείκτες για τη διάκριση του αυθεντικού ιρανικού saffron από λοιπά εμπορικά δείγματα saffron που προμηθεύθηκαν από άλλες χώρες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτυπώματα μεταβολιτών που καταγράφηκαν μέσω της φασματοσκοπίας ^1H NMR δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των βιολογικών και συμβατικών δειγμάτων από σίγματα κρόκου, υποδηλώνοντας δυνητική ομοιομορφία στα ελληνικά δείγματα.

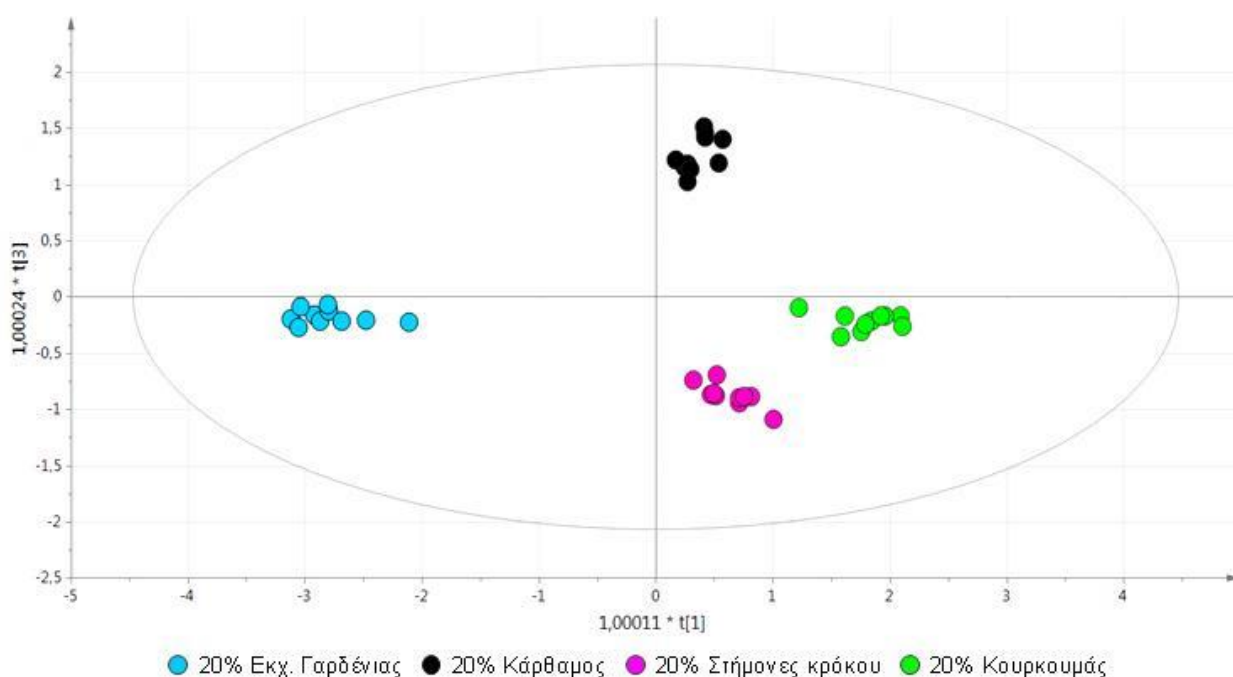


Σχήμα 4.3. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) OPLS-DA μεταξύ παράλληλης και κύριας ορθογώνιας συνιστώσας, όπως προέκυψε από την εξέταση όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν, τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: αυθεντικά (μωβ κύκλοι) και νοθευμένα (μαύροι κύκλοι) δείγματα σιγμάτων κρόκου. $R^2X = 82.4\%$, $R^2Y = 94.5\%$ και $Q^2 = 92.3\%$.



Σχήμα 4.4. (α) Διάγραμμα σιμοειδούς μορφής (S-plot) σύμφωνα με το μοντέλο OPLS-DA που αναπτύχθηκε για την ταξινόμηση των αυθεντικών και νοθευμένων δειγμάτων από στίγματα κρόκου ($R^2X = 82.4\%$, $R^2Y = 94.5\%$ και $Q^2 = 92.3\%$). (β) Μεγέθυνση της περιοχής που περιλαμβάνει τις πιο χαρακτηριστικές μεταβλητές (buckets) για τα αυθεντικά δείγματα σιγμάτων κρόκου.

Διαδοχικά αναπτύχθηκε ένα μοντέλο με τη μέθοδο διαχωριστικής ανάλυσης με αμφίδρομη ορθογώνια προβολή σε λανθάνουσες δομές (O2PLS-DA), εξετάζοντας όλα τα τεχνητά μίγματα στιγμάτων κρόκου που περιείχαν φυτικά υλικά νοθείας σε επίπεδο 20% (w/w). Το μοντέλο αυτό στηρίχθηκε σε τρεις παράλληλες συνιστώσες πρόβλεψης και τρεις ορθογώνιες συνιστώσες ($R^2X = 95.2\%$, $R^2Y = 97.6\%$ και $Q^2 = 96\%$). Στο διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) για την πρώτη και την τρίτη παράλληλη συνιστώσα (Σχήμα 4.5), φαίνεται ότι μπορεί να επιτευχθεί μια σαφής διάκριση των νοθευμένων δειγμάτων σύμφωνα με το φυτικό υλικό νοθείας που χρησιμοποιήθηκε.



Σχήμα 4.5. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) O2PLS-DA μεταξύ πρώτης και τρίτης παράλληλης συνιστώσας όπως προέκυψε από την εξέταση νοθευμένων δειγμάτων, χωρισμένων σε 4 κατηγορίες ανάλογα με το είδος του φυτικού υλικού νοθείας. Τα δείγματα στιγμάτων κρόκου που νοθεύθηκαν σε συγκέντρωση 20% (w/w) με εκχύλισμα γαρδένιας, κάρθαμο, στήμονες κρόκου και κουρκουμά παρουσιάζονται με γαλάζιους, μαύρους, ροζ, και πράσινους κύκλους, αντίστοιχα. $R^2X = 95.2\%$, $R^2Y = 97.6\%$ και $Q^2 = 96\%$.

Η αξιοπιστία στην ταξινόμηση αγνώστων δειγμάτων από στίγματα κρόκου ως προς την αυθεντικότητά τους βασίζεται στη σταθερότητα και αξιοπιστία του μοντέλου που προέκυψε από

την επιβλεπόμενη μέθοδο OPLS-DA. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν δείγματα αυθεντικών και νοθευμένων στιγμάτων κρόκου για τα σύνολα εκπαίδευσης και ελέγχου, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα 35 και 15 δείγματα. Το νέο μοντέλο OPLS-DA για ταξινόμηση σε δύο κατηγορίες στηρίχθηκε στο σύνολο εκπαίδευσης και οδήγησε σε μία παράλληλη συνιστώσα πρόβλεψης και δύο ορθογώνιες συνιστώσες. Η συνολική προσαρμογή του μοντέλου ερμηνεύθηκε από τις τιμές των παραμέτρων R^2X και R^2Y ($R^2X = 72.5\%$, $R^2Y = 93.8\%$), ενώ η τιμή για το συντελεστή διασταυρωμένης επικύρωσης ήταν $Q^2 = 88.2\%$.

Πίνακας 4.1. Λίστα ταξινόμησης για τα 15 δείγματα του συνόλου ελέγχου (3 αυθεντικά δείγματα και 12 νοθευμένα με τα 4 διαφορετικά φυτικά υλικά νοθείας) που προβλήθηκαν στο μοντέλο OPLS-DA δύο κατηγοριών, όπως αναπτύχθηκε με 35 δείγματα (7 αυθεντικά και 28 νοθευμένα δείγματα). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο της εκτιμώμενης τιμής απόκρισης Y, το οποίο υποδεικνύει σε τι βαθμό είναι αντιπροσωπευτικό κάθε δείγμα για την εκάστοτε κατηγορία. Ως κατώτερη οριακή τιμή για κάθε κατηγορία θεωρήθηκε το 0.6.

Τύπος δείγματος ^α	Εκτιμώμενη τιμή απόκρισης Y	
	Νοθευμένο δείγμα	Αυθεντικό δείγμα
Νοθευμένο δείγμα - Sf	1.04	-0.04
Νοθευμένο δείγμα- Sf	0.98	0.02
Νοθευμένο δείγμα - Sf	1.07	-0.07
Νοθευμένο δείγμα - G	0.91	0.09
Νοθευμένο δείγμα - G	1.02	-0.02
Νοθευμένο δείγμα - G	0.99	0.01
Νοθευμένο δείγμα - St	1.01	-0.01
Νοθευμένο δείγμα - St	1.16	-0.16
Νοθευμένο δείγμα - St	0.88	0.12
Νοθευμένο δείγμα - T	0.82	0.18
Νοθευμένο δείγμα - T	1	0
Νοθευμένο δείγμα - T	0.82	0.18
Αυθεντικό δείγμα	-0.06	1.06
Αυθεντικό δείγμα	-0.04	1.04
Αυθεντικό δείγμα	0.15	0.85

^α Τα γράμματα Sf, G, St και T συμβολίζουν τη χρήση του κάρθαμου, του εκχυλίσματος γαρδένιας, των στημόνων κρόκου και του κουρκουμά, αντίστοιχα, ως υλικό νοθείας στα στίγματα κρόκου.

Από τους ελέγχους Hotelling's T^2 και DModX για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, αποδείχθηκε η καταλληλότητα του προτεινόμενου μοντέλου για την πρόβλεψη των αυθεντικών ή νοθευμένων δειγμάτων που ανήκαν στο σύνολο ελέγχου. Με τα αποτελέσματα ταξινόμησης που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1 επισημαίνεται η επίδοση του μοντέλου στην ικανότητα πρόβλεψης. Κανένα νοθευμένο δείγμα από τις τέσσερις κατηγορίες δεν ταξινομήθηκε ως αυθεντικό. Επιπλέον, όλα τα δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά θεωρώντας ως κατώτερο όριο ορθής ταξινόμησης την τιμή 0.6.

Για τις εκτιμήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το νέο μοντέλο O2PLS-DA χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα 12 νοθευμένα δείγματα του συνόλου ελέγχου, ενώ στο σύνολο εκπαίδευσης συμπεριλήφθηκαν 28 νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου. Το μοντέλο O2PLS-DA βασίστηκε σε τρεις παράλληλες συνιστώσες πρόβλεψης και δύο ορθογώνιες συνιστώσες ($R^2X = 93\%$, $R^2Y = 96.7\%$ και $Q^2 = 93.4\%$). Σύμφωνα με τους ελέγχους Hotelling's T^2 και DModX για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, αποδεικνύεται ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε είναι κατάλληλο για την εκτίμηση του τύπου νοθείας στα δείγματα του συνόλου ελέγχου. Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα ταξινόμησης για το μοντέλο O2PLS-DA. Όπως φαίνεται, όλα τα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου κατηγοριοποιούνται σωστά με κατώτερο όριο ορθής ταξινόμησης την τιμή 0.6.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η μη τυχαιότητα και η τυχόν υπερπροσαρμογή των μοντέλων ταξινόμησης, διεξήχθη ο έλεγχος μεταθέσεων στα αντίστοιχα μοντέλα διαχωριστικής ανάλυσης με παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για κάθε ένα από τα μοντέλα OPLS-DA και O2PLS-DA. Οι χαμηλές τιμές και των δύο παραμέτρων R^2 και Q^2 - τα R^2 και Q^2 είχαν τιμές κοντά στο μηδέν ή αρνητικές, αντίστοιχα - επιβεβαίωσαν την εγκυρότητα των μοντέλων.

Πίνακας 4.2. Λίστα ταξινόμησης για τα 12 δείγματα του συνόλου ελέγχου (3 νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου για κάθε φυτικό υλικό νοθείας) που προβλήθηκαν στο μοντέλο O2PLS-DA 4 κατηγοριών, όπως αναπτύχθηκε με 28 νοθευμένα δείγματα (7 νοθευμένα δείγματα για κάθε υλικό). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο της εκτιμώμενης τιμής απόκρισης Y, το οποίο υποδεικνύει σε τι βαθμό είναι αντιπροσωπευτικό κάθε δείγμα για την εκάστοτε κατηγορία. Η κατώτερη οριακή τιμή που λήφθηκε υπόψη για την ορθότητα της ταξινόμησης ήταν το 0.6.

Τύπος νοθείας	Εκτιμώμενη τιμή απόκρισης Y			
	Κάρθαμος (Sf)	Εκχ. γαρδένιας (G)	Στήμονες κρόκου (St)	Κουρκουμάς (T)
Sf	1.05	-0.04	-0.13	0.12
Sf	0.94	0.02	-0.08	0.12
Sf	0.95	-0.04	0.07	0.02
G	0.01	1.04	0.02	-0.06
G	0.03	1.07	0.05	-0.15
G	0.02	0.95	0.13	-0.1
St	0	-0.02	0.99	0.03
St	0.01	0	1.03	-0.04
St	0.02	0.13	0.73	0.12
T	0.03	-0.04	0	1.01
T	-0.01	-0.02	-0.15	1.18
T	0.01	-0.03	0.13	0.89

4.2.3. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα να διαχωρίζονται τα αυθεντικά και τα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου με βάση τα αποτυπώματα μεταβολιτών που προκύπτουν από τη μη στοχευμένη ανάλυση με ^1H NMR και χημειομετρικές μεθόδους. Η προσέγγιση δύο σταδίων που παρουσιάστηκε οδήγησε στην ανίχνευση και ταυτοποίηση της νοθείας ελληνικών δειγμάτων από στίγματα κρόκου με τέσσερα χαρακτηριστικά υλικά φυτικής προέλευσης.

Το πρώτο μοντέλο που αναπτύχθηκε με τη μέθοδο OPLS-DA διαφοροποίησε με επιτυχία τα αυθεντικά από τα νοθευμένα δείγματα, λόγω συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που αποτελούν δείκτες ποιότητας και αυθεντικότητας για τα στίγματα κρόκου. Για τα δείγματα που βρέθηκαν “θετικά” ως προς την παρουσία νοθείας χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο O2PLS-DA, με το οποίο προσδιορίστηκε ο τύπος του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε για τη νόθευση. Η καλή προβλεπτική ικανότητα και των δύο μοντέλων, όπως επιβεβαιώθηκε από τη χρήση του συνόλου δειγμάτων ελέγχου, υποστήριξε την εγκυρότητα του πρωτοκόλλου που προτείνεται. Η προτεινόμενη μεταβολομική προσέγγιση δεν κρίνεται απαιτητική από την άποψη της προετοιμασίας του δείγματος και της απαιτούμενης ποσότητας στιγμάτων κρόκου (10 mg ανά δείγμα), ενώ χαρακτηρίζεται από την υψηλή αναπαραγωγικότητα και τη γρήγορη εκτέλεση. Επομένως, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διαλογή μεγάλων εμπορικών παρτίδων ελληνικού προϊόντος, και επιπρόσθετα θα μπορούσε να είναι προσαρμόσιμη σε έλεγχο αυθεντικότητας δειγμάτων διαφορετικών κατηγοριών κατά ISO ή διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, αφού βέβαια προηγηθεί περαιτέρω μελέτη.

Η λήψη του αποτυπώματος μεταβολιτών με τη χρήση της φασματοσκοπίας ^1H NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας αποδεικνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματική για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση διαδεδομένων παραγόντων αύξησης του βάρους των στιγμάτων κρόκου, λαμβάνοντας μάλιστα υπόψη τις δυσκολίες στην ανίχνευση της οικονομικής απάτης σύμφωνα με τις σχετικές μεθόδους του προτύπου ISO 3632. Οι δυσκολίες αυτές επιτείνονται ιδιαίτερα όταν εμπλέκονται φυτικά υλικά νοθείας και η εμπορία του προϊόντος γίνεται σε μορφή σκόνης. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τη συνδυασμένη χρήση ^1H NMR και πολυμεταβλητής ανάλυσης

ως ένα έγκυρο και ισχυρό εργαλείο για τη διερεύνηση της ποιότητας και της γνησιότητας των τροφίμων.

4.3. Ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός φυτικών υλικών νοθείας στα στίγματα κρόκου με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR

4.3.1. Πειραματικό μέρος

4.3.1.1. Προμήθεια υλικών

Ένα σύνολο 50 ελληνικών δειγμάτων αποξηραμένων σιγμάτων κρόκου, εσοδείας 2012 και 2013, παραχωρήθηκαν από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Όλα τα δείγματα ανήκαν στην εμπορική κατηγορία I, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του προτύπου ISO 3632 [16], και αποτελούνταν από βιολογικής παραγωγής ($n = 28$) και συμβατικά ($n = 22$) δείγματα για αύξηση της μεταβλητότητας ανάμεσά τους. Εμπορικά δείγματα από στήμονες κρόκου (εμπορική ονομασία: “Saffran”), κάρθαμο (εμπορική ονομασία “Turkish saffron”) και κουρκουμά (εμπορική ονομασία “Like saffran”) προμηθεύθηκαν από τοπικές αγορές εντός και εκτός Ελλάδας. Το δείγμα αποξηραμένων πετάλων καλέντουλας, η διαλογή των οποίων έγινε από άνθη εσοδείας 2014, παρασχέθηκε από έναν τοπικό παραγωγό στα Βάγια Βοιωτίας. Το εκχύλισμα από τους καρπούς γαρδένιας (single herb extract, Zhi Zi) ήταν της εταιρείας Plum Flower Brand (Anguo, China), ενώ το εκχύλισμα από τα άνθη βουδλείας προμηθεύθηκε από την εταιρεία Phytoextractum (Portland, OR, USA). Τα φυτικά υλικά και εκχυλίσματα διατηρήθηκαν απουσία φωτός στους 4° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Το βρωμιούχο κάλιο (KBr) για φασματοσκοπία IR (>99%) και το πεντοξείδιο του φωσφόρου (98%) ήταν της εταιρείας Fisher Scientific (Leicestershire, UK).

4.3.1.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα σιγμάτων κρόκου μαζί με τα φυτικά υλικά νοθείας (περίπου 1 g) αρχικά λειοτριβήθηκαν λεπτομερώς μέχρι να γίνουν λεπτή σκόνη, χρησιμοποιώντας γουδί από αχάτη, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων στην ποιότητα των φασμάτων [24]. Στη συνέχεια, μικρή ποσότητα (περίπου 0.05 g) κάθε δείγματος υποβλήθηκε σε ξήρανση υπό ήπιες συνθήκες (25 °C) για διάρκεια 12 h, με τη χρήση ενός γυάλινου ξηραντήρα κενού που περιείχε ως ξηραντικό μέσο πεντοξείδιο του φωσφόρου. Αυτό το στάδιο ξήρανσης

πραγματοποιήθηκε για κάθε παρτίδα δειγμάτων πριν από την ανάλυση με DRIFTS, προκειμένου να μειωθούν τυχόν παρεμποδίσεις λόγω της υγρασίας των δειγμάτων και να ληφθούν φάσματα καλής ποιότητας (μεγαλύτερη ένταση και χαμηλότερα επίπεδα θορύβου), παρακάμπτοντας έτσι την ανάγκη για ανάμιξη των δειγμάτων με KBr. Προκαταρκτικές δοκιμές έδειξαν ότι απαιτούνται τουλάχιστον 12 h προκειμένου η περιεκτικότητα σε υγρασία των σιγμάτων κρόκου σε σκόνη να μειωθεί από 10 max στο 5% (w/w) περίπου, όπως προσδιορίστηκε με την πρότυπη μέθοδο ISO 3632-2 [15]. Τα τεχνητά νοθευμένα δείγματα παρασκευάστηκαν (0,05 g) με ανάμειξη και ομογενοποίηση σε γουδί για 3 λεπτά, χρησιμοποιώντας 10 αντιπροσωπευτικά δείγματα σιγμάτων κρόκου και καθένα από τα έξι υλικά νοθείας σε επίπεδα νοθείας 5, 10 και 20% (w/w). Αυτό το υποσύνολο των δειγμάτων από σίγματα κρόκου επιλέχθηκε με εφαρμογή του αλγορίθμου Kennard-Stone [56,57] για ομοιόμορφη δειγματοληψία στα αρχικά φασματοσκοπικά δεδομένα. Συνολικά, 30 μίγματα χρησιμοποιήθηκαν για κάθε υλικό νοθείας, ορίζοντας έτσι κάθε μία από τις έξι αντίστοιχες κατηγορίες τεχνητά νοθευμένου προϊόντος. Προκειμένου το σύνολο δεδομένων να είναι πιο ισορροπημένο ως προς την ταξινόμηση, συμπεριλήφθηκαν όλα τα αυθεντικά ελληνικά δείγματα σιγμάτων κρόκου που ήταν διαθέσιμα και έτσι χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 230 δείγματα.

4.3.1.3. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR

Οι μετρήσεις με την τεχνική διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεϊκής τριγλυκίνης (DTGS), πηγή Nichrome και διαχωριστή δέσμης KBr. Τα κονιοποιημένα δείγματα (περίπου 4 mg) μετρήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν σε ξηρή, ελεγχόμενη ατμόσφαιρα στους 25 °C, με χρήση του φάσματος από ξηρό KBr ως υπόβαθρο (background). Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας μικροϋποδοχέας δείγματος Spectra-Tech (Thermo Scientific), διαμέτρου 3 mm και ύψους 2 mm, ο οποίος τοποθετούταν στο εξάρτημα DRIFTS (Spectra-Tech) για ανάλυση. Για κάθε φάσμα πραγματοποιήθηκαν 100 διαδοχικές σαρώσεις στο εύρος κυματαριθμών από 4000 έως 600 cm^{-1} , με τη διαχωριστική ικανότητα του οργάνου να έχει καθοριστεί στα 4 cm^{-1} και την ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου στο συμβολόμετρο να είναι 0.316 cm s^{-1} . Για τη λειτουργία του

φασματομέτρου, τη συλλογή των δεδομένων και τη βασική επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό του φασματομέτρου Omnic 7.3 (Thermo Scientific). Προκειμένου να διασφαλιστεί η βέλτιστη απόδοση του συστήματος ακολουθήθηκαν συνήθεις διαδικασίες πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων, όπως η ευθυγράμμιση του φασματομέτρου και η ρύθμιση του εξαρτήματος δειγματοληψίας DRIFTS. Η επαναληψιμότητα (intraday repeatability) και η αναπαραγωγικότητα ή ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision) αξιολογήθηκαν όπως περιγράφεται σε προηγούμενη σχετική μελέτη [58]. Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας καταγράφηκαν εις τριπλούν φάσματα ενός ορισμένου δείγματος στιγμάτων κρόκου ανά χρονικά διαστήματα 3 ωρών, για συνολική περίοδο 12 ωρών, ενώ η ενδιάμεση πιστότητα προσδιορίστηκε με εις τριπλούν μετρήσεις του ίδιου δείγματος για πέντε συνεχόμενες ημέρες. Η αποτίμηση έγινε σύμφωνα με τις μέσες σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) μεταξύ των φασμάτων. Οι τιμές για την επαναληψιμότητα και την ενδιάμεση πιστότητα που προσδιορίστηκαν ήταν $2.1 \pm 1.2\%$ και $3.9 \pm 0.8\%$, αντίστοιχα.

4.3.1.4. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων

(i) Μη επιβλεπόμενη αναγνώριση προτύπων

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) χρησιμοποιήθηκε ως προκαταρκτική ανάλυση διερεύνησης της κατανομής των δειγμάτων, με σκοπό την αναγνώριση ενδεχόμενων προτύπων που πηγάζουν από την καθαρότητα των στιγμάτων ή τον τύπο νοθείας που χρησιμοποιήθηκε. Αυτό επιτυγχάνεται προβάλλοντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα στον πολυμεταβλητό χώρο που ορίζεται από ορθογώνιες κύριες συνιστώσες. Με την ανάλυση PCA αξιολογήθηκε, επιπλέον, η παρουσία πιθανών δειγμάτων που αποκλίνουν με βάση τις τιμές Hotelling's T^2 και των υπολοίπων Q. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν ολόκληρη την περιοχή του φάσματος (1764 μεταβλητές), ενώ για τα μοντέλα PCA αξιολογήθηκαν τρεις διαφορετικοί πίνακες δεδομένων (230×1764), χρησιμοποιώντας (α) ανεπεξέργαστα δεδομένα ή δεδομένα που έγινε επεξεργασία με (β) εξομάλυνση Savitzky-Golay (SG), με το μέγεθος παραθύρου να ορίζεται από 15 σημεία, ακολουθούμενη από τη διόρθωση βασικής γραμμής χρησιμοποιώντας την ενσωματωμένη λειτουργία του Omnic για την αυτόματη διόρθωση (με πολυωνυμική προσαρμογή δεύτερης τάξης μέσω μιας διαδικασίας 20 επαναλήψεων) και με (γ)

κανονικοποίηση της απορρόφησης μετά την προκατεργασία (β). Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε κεντροποίηση των δεδομένων πριν από την ανάλυση PCA.

(ii) Πολυμεταβλητή ταξινόμηση

Για την ανίχνευση της νοθείας και την ταυτοποίηση του φυτικού υλικού νοθείας χρησιμοποιήθηκε η διαχωριστική ανάλυση με παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), η οποία είναι μια επιβλεπόμενη μέθοδος για γραμμική ταξινόμηση. Με τη μέθοδο PLS-DA υπολογίζεται ένα μοντέλο παλινδρόμησης PLS που συσχετίζει τις ανεξάρτητες μεταβλητές (πίνακας X των τιμών των μεταβλητών) με ένα μονοδιάστατο πίνακα κατηγοριών (class vector), ο οποίος μετατρέπεται σε έναν εικονικό πίνακα Y με δυαδικό σύστημα. Τα δείγματα στη συνέχεια αντιστοιχίζονται σε κατηγορίες σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του μοντέλου PLS, με τιμές που κυμαίνονται από 0 έως 1, και τις οριακές τιμές για κάθε κατηγορία να καθορίζονται βάσει του θεωρήματος του Bayes [59]. Η διάκριση σε διαφορετικές κατηγορίες μπορεί να επιτευχθεί λαμβάνοντας υπόψη έναν κατάλληλο αριθμό από λανθάνουσες μεταβλητές (LVs), όπως αλλιώς καλούνται οι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών. Ο αριθμός των LVs που επιλέγονται θεωρείται βέλτιστος για ένα μοντέλο ταξινόμησης όταν το σφάλμα της διασταυρωμένης επικύρωσης ελαχιστοποιείται.

Η αξιολόγηση της προβλεπτικής ικανότητας των μοντέλων PLS-DA έγινε με διασταυρωμένη επικύρωση, εφαρμόζοντας τη διαδικασία venetian blinds με 5 ομάδες ελέγχου [59]. Τα μοντέλα επικυρώθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας ένα εξωτερικό σύνολο ελέγχου. Για το σκοπό αυτό, κάθε σύνολο δεδομένων χωρίστηκε σε σύνολα βαθμονόμησης (εκπαίδευσης) και ελέγχου, τα οποία περιελάμβαναν περίπου το 70% και 30% του συνόλου των δειγμάτων, αντίστοιχα. Η διαίρεση των δεδομένων επιτεύχθηκε με τη χρήση του αλγορίθμου Duplex [60], ο οποίος παρέχει αντιπροσωπευτική επιλογή υποσυνόλων, διατηρώντας παράλληλα την ίδια ποικιλομορφία στα σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου [61]. Δείγματα με σημαντικά υψηλές τιμές μόχλευσης (leverage) καθώς και με τιμές Hotelling's T^2 και υπολοίπων Q πολύ πάνω από τα όρια, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ταυτοποιήθηκαν ως δείγματα που αποκλίνουν. Οι τεχνικές προκατεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων που αξιολογήθηκαν για την ανάλυση με PLS-DA είναι αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω για την ανάλυση με PCA. Όλα τα μοντέλα κατασκευάστηκαν μετά από κεντροποίηση των φασματοσκοπικών δεδομένων. Οι

παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μοντέλων ταξινόμησης ήταν το ποσοστό σφάλματος, το ποσοστό μη-σφάλματος, η ακρίβεια και/ή η πιστότητα, καθώς επίσης η ειδικότητα (ποσοστό αληθώς αρνητικών) και η ευαισθησία (ποσοστό αληθώς θετικών) για κάθε κατηγορία [59].

(iii) Πολυμεταβλητή βαθμονόμηση

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτικών υλικών νοθείας στα νοθευμένα δείγματα διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Έξι διαφορετικοί πίνακες δεδομένων (40×1764) λήφθηκαν υπόψη, με τη χρήση 10 αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από στίγματα κρόκου (τυφλά δείγματα) και 30 νοθευμένων δειγμάτων με κάθε επιμέρους υλικό σε επίπεδα συγκεντρώσεων 5, 10 και 20% (w/w). Οι τεχνικές προκατεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων που αξιολογήθηκαν ήταν: (1) καμία περαιτέρω επεξεργασία (ανεπεξεργαστα δεδομένα), (2) κεντροποίηση (MC), (3) πολλαπλασιαστική διόρθωση σκέδασης (MSC), (4) MSC και διαδοχικά MC, (5) τυπική κανονική τυχαία μεταβλητή (SNV), (6) SNV και διαδοχικά MC, (7) πρώτη παράγωγος και διαδοχικά εξομάλυνση SG και MC, (8) δεύτερη παράγωγος και διαδοχικά εξομάλυνση SG και MC, (9) εξομάλυνση SG και διαδοχικά διόρθωση της βασικής γραμμής (BC) και MC, (10) εξομάλυνση SG και διαδοχικά BC και κανονικοποίηση της απορρόφησης, και (11) εξομάλυνση SG και διαδοχικά BC, κανονικοποίηση της απορρόφησης και MC.

Για τη διασταυρωμένη επικύρωση των μοντέλων βαθμονόμησης εφαρμόστηκε η επαναληπτική διαδικασία μιας παράλειψης (LOO), προκειμένου να εκτιμηθεί η προβλεπτική τους ικανότητα και να εκτιμηθεί ο βέλτιστος αριθμός των LVs για κάθε μοντέλο με βάση την ελάχιστη τιμή του σφάλματος RMSECV. Η επίδοση των μοντέλων αξιολογήθηκε περαιτέρω μέσω παραμέτρων όπως το σφάλμα βαθμονόμησης (RMSEC) και το σφάλμα πρόβλεψης (RMSEP) κατά την εκτίμηση ενός εξωτερικού συνόλου δειγμάτων ελέγχου. Με χρήση του αλγόριθμου Duplex χωρίστηκε κάθε σύνολο δεδομένων σε σύνολα βαθμονόμησης (περίπου 70%) και ελέγχου (περίπου 30%). Η ανίχνευση των δειγμάτων που αποκλίνουν πραγματοποιήθηκε με την αξιολόγηση των τιμών μόχλευσης (leverage) και του διαγράμματος κατανομής Hotelling's T^2 έναντι των υπολοίπων Q.

Μετά την επιλογή της τεχνικής προκατεργασίας που παρουσίασε καλύτερη επίδοση, αξιολογήθηκαν διαφορετικά εύρη κυματαριθμών για τη βελτιστοποίηση των μοντέλων. Επίσης, εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι επιλογής μεταβλητών βάσει διαστημάτων (iPLS), καθώς και σύμφωνα με συνδυασμούς διαστημάτων που εμφανίζουν συνέργεια (siPLS) [62]. Ο στόχος και των δύο μεθόδων είναι να βρεθεί ένα ή μερικά διαστήματα ίδιου μήκους που περιέχουν τις περισσότερες σχετικές πληροφορίες προκειμένου να γίνουν καλύτερες εκτιμήσεις σε σύγκριση με ολόκληρη την περιοχή του φάσματος. Με χρήση του iPLS, τα φασματοσκοπικά δεδομένα διαιρούνται σε έναν καθορισμένο αριθμό διαστημάτων και υπολογίζεται ένα τοπικό μοντέλο PLS για κάθε διάστημα, ενώ η μέθοδος siPLS δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης μοντέλων PLS με βάση όλους τους πιθανούς συνδυασμούς 2, 3, ή 4 διαστημάτων [63]. Η σύγκριση των μοντέλων ως προς την επίδοσή τους βασίστηκε, κυρίως, στις τιμές RMSECV και τον αντίστοιχο αριθμό LVs. Ωστόσο, για την επιλογή των μοντέλων λήφθηκαν υπόψη και οι τιμές RMSEP.

(iv) Λογισμικό

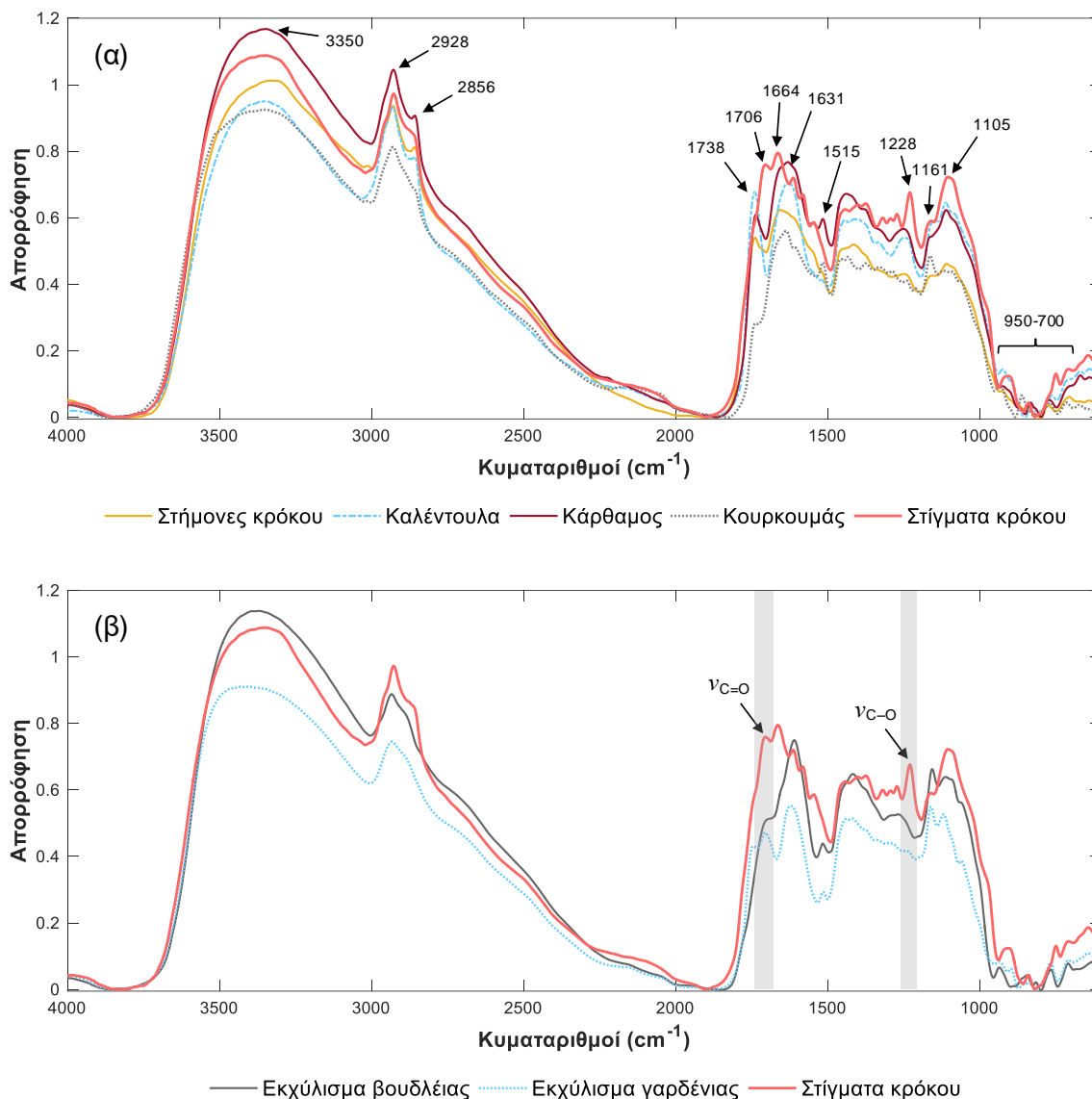
Η επεξεργασία των φασμάτων FT-IR υλοποιήθηκε με τη χρήση των λογισμικών OMNIC 7.3 και TQ Analyst 8.0 (Thermo Scientific), ενώ η εκτέλεση των αλγορίθμων και η πολυμεταβλητή ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων πραγματοποιήθηκαν στο MATLAB 8.1 (The MathWorks, Natick, MA, USA). Οι εργαλείοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση σε περιβάλλον MATLAB ήταν: (α) Classification toolbox [59], (β) iToolbox [62] και (γ) PCA toolbox [64].

4.3.2. Αποτελέσματα - Συζήτηση

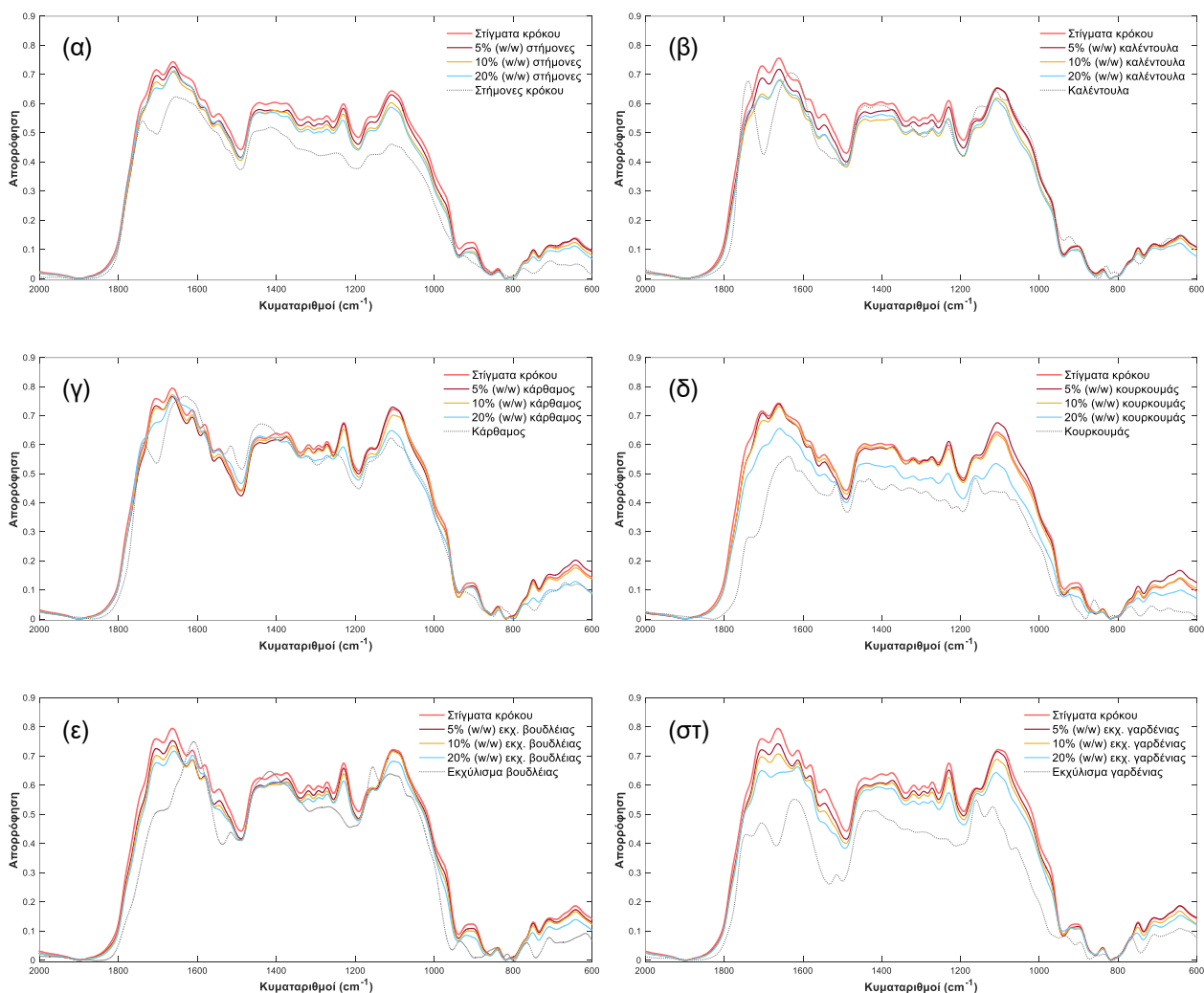
4.3.2.1. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR

Η φασματοσκοπία FT-IR παρέχει πολύτιμες πληροφορίες που σχετίζονται με τους κύριους δευτερογενείς μεταβολίτες των στιγμάτων του κρόκου, δηλαδή τις κροκίνες και την πικροκροκίνη, που μπορούν να αντιπροσωπεύουν έως και το 50% (w/w) των αποξηραμένων στιγμάτων [6]. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 4.6 και 4.7, από τα φάσματα FT-IR μπορούν να

εξαχθούν σημαντικές πληροφορίες για τη διαφοροποίηση μεταξύ των στιγμάτων κρόκου και των άλλων υλικών φυτικής προέλευσης, παρά τα κοινά χαρακτηριστικά που μπορούν να παρατηρηθούν.



Σχήμα 4.6. Φάσματα FT-IR που λήφθηκαν με την τεχνική DRIFTS (α) από στήμονες κρόκου (κίτρινη γραμμή), καλέντουλα (γαλάζια διακεκομμένη γραμμή), κάρθαμο (καφέ γραμμή), κουρκουμά (γκρι διακεκομμένη γραμμή), και (β) από εκχύλισματα βουδλέας (γκρι γραμμή) και γαρδένιας (γαλάζια διακεκομμένη γραμμή). Και στα δύο πλαίσια συμπεριλαμβάνεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα από στίγματα κρόκου (κόκκινη γραμμή), ενώ στο πλαίσιο (β) επισημαίνονται οι χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης (ν) των κροκινών.



Σχήμα 4.7. Φάσματα FT-IR που λήφθηκαν με την τεχνική DRIFTS από δείγμα σιγμάτων κρόκου (κόκκινη γραμμή) και το ίδιο δείγμα έπειτα από νόθευση με καθένα από τα φυτικά υλικά στα επίπεδα 5% (καφέ γραμμή), 10% (κίτρινη γραμμή) και 20% (γαλάζια γραμμή), στη φασματική περιοχή 2000-600 cm^{-1} . Τα φάσματα των καθαρών φυτικών υλικών (στήμονες κρόκου, καλέντουλα, κάρθαμος, κourkoumás και εκχυλίσματα βουδέλιας και γαρδένιας) παρατίθενται στα αντίστοιχα πλαίσια (α) έως (στ) με γκρι διακεκομμένη γραμμή.

Η πλατιά ταινία απορρόφησης ισχυρής έντασης στα $\sim 3350 \text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στη δόνηση τάσης των ομάδων υδροξυλίου ($-\text{OH}$). Η περιοχή $3000\text{-}2830 \text{ cm}^{-1}$ παρουσιάζει δύο άλλες κοινές κορυφές, που οφείλονται στην ασύμμετρη και τη συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C}-\text{H}$. Στην περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων ($1800\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$), οι κορυφές που παρατηρούνται σχετίζονται κατά κύριο λόγο με την καρβονυλική ομάδα ($\text{C}=\text{O}$) και τους δεσμούς $\text{C}=\text{C}$. Πιο αναλυτικά, η κορυφή γύρω στα 1738 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης του $\text{C}=\text{O}$ στους

αλειφατικούς εστέρες [53] που περιέχουν τα υλικά φυτικής προέλευσης, εκτός από το εκχύλισμα βουδλίας. Ιδιαίτερα για τα δείγματα από καλέντουλα, κάρθαμο και στήμονες κρόκου, η συγκεκριμένη κορυφή είναι ισχυρής έντασης, υποδεικνύοντας πιθανώς υψηλές συγκεντρώσεις αλειφατικών εστέρων.

Η ταινία απορρόφησης στα 1706 cm^{-1} οφείλεται κυρίως στη δόνηση τάσης του $\text{C}=\text{O}$ λόγω των ομάδων $-\text{COOR}$ στις κροκίνες [49,65] που βρίσκονται κυρίως στα στίγματα κρόκου. Αυτή η χαρακτηριστική κορυφή παρατηρείται, επίσης, στα φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων γαρδένιας και βουδλίας (Σχήμα 4.6.β). Όπως φαίνεται, το συζυγιακό σύστημα των κροκινών μετατοπίζει την απορρόφηση του εστερικού $\text{C}=\text{O}$ σε μικρότερους κυματαριθμούς σε σύγκριση με τους αλειφατικούς εστέρες [65]. Στη φασματική ταινία αυτή μπορεί, επίσης, να συμβάλει η δόνηση τάσης $\text{C}=\text{O}$ στην ομάδα $-\text{COOH}$ των αμινοξέων [50]. Η κορυφή που εμφανίζεται γύρω στα 1664 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης της ομάδας $\text{C}=\text{C}$ και του $\text{C}=\text{O}$ που βρίσκεται σε συζυγία (π.χ. αλδεϋδικό καρβονύλιο της πικροκροκίνης), καθώς και του $\text{C}=\text{O}$ στους πεπτιδικούς δεσμούς (αμίδιο I) [50,66]. Ειδικότερα για τα φάσματα FT-IR της καλέντουλας και του κάρθαμου, η ταινία που σχετίζεται με τη δόνηση τάσης του $\text{C}=\text{C}$ και/ή του $\text{C}=\text{O}$ σε συζυγία εμφανίζεται μετατοπισμένη κοντά στα 1631 cm^{-1} (Σχήμα 4.6.α), πιθανότατα επειδή τα υλικά αυτά περιέχουν, αντίστοιχα, καροτενοειδή ή κόκκινες και κίτρινες χρωστικές (π.χ. C-γλυκοζίτες της κίνοχαλκόνης) με συζυγιακά συστήματα μεγαλύτερης έκτασης [17,66]. Μετατόπιση της κορυφής που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης $\text{C}=\text{C}$ παρατηρείται, ακόμη, και για τα εκχυλίσματα γαρδένιας και βουδλίας. Η κορυφή εμφανίζεται στην περιοχή $1620\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$, πιθανότατα λόγω συζυγίας $\text{C}=\text{C}$ με αρωματικό δακτύλιο. Στην περίπτωση του κουρκουμά, οι δονήσεις τάσης του $\text{C}=\text{O}$ σε συζυγία (π.χ. κετονικό $\text{C}=\text{O}$ της κουρκουμίνης και άλλων κουρκουμινωειδών) και του $\text{C}=\text{C}$ αντιπροσωπεύονται από τις κορυφές γύρω στα 1635 cm^{-1} και 1605 cm^{-1} , αντίστοιχα [67]. Η ταινία απορρόφησης στα 1515 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική για τον κάρθαμο, τον κουρκουμά, τη γαρδένια και τη βουδλία (Σχήμα 4.6), και αποδίδεται στη δόνηση σκελετού των αρωματικών δακτυλίων, ενώ ενδεχομένως περιλαμβάνεται και η τάση $\text{C}=\text{C}$ εντός του δακτυλίου [53,66].

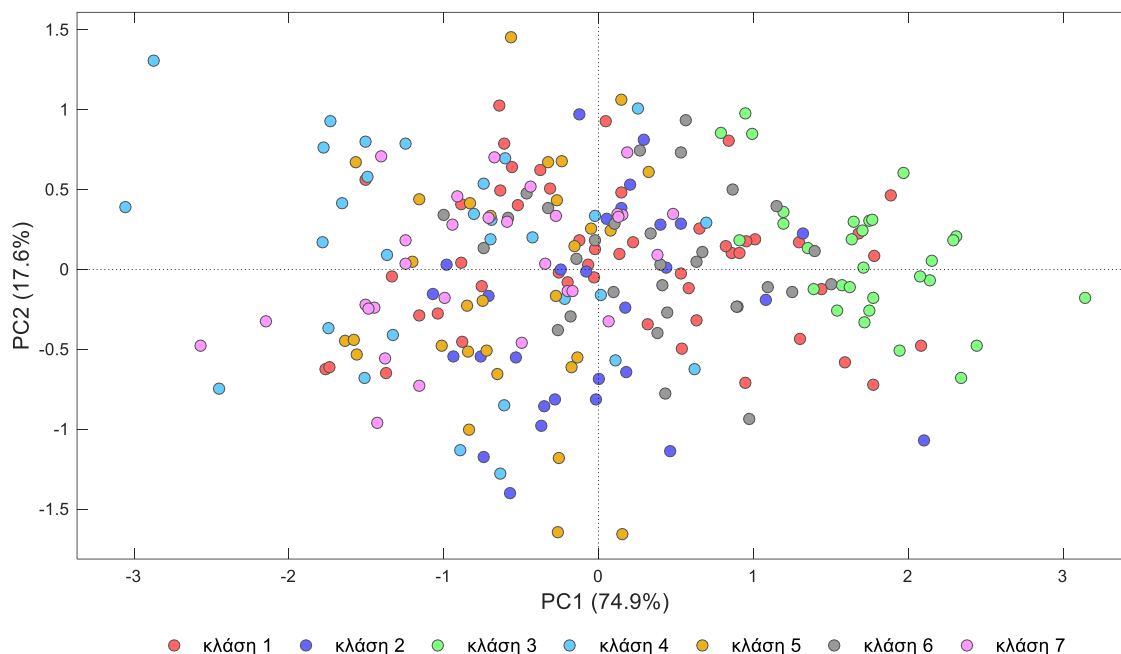
Η περιοχή “δακτυλικών αποτυπωμάτων”, από τα 1500 έως τα 600 cm^{-1} , περιλαμβάνει φασματικές ταινίες που συνδέονται, κυρίως, με τις δονήσεις σκελετού των επιμέρους συστατικών και αποδίδονται στις ομάδες $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ και $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ [49]. Η δόνηση τάσης $\text{C}-\text{O}$ στις εστερικές ομάδες ($\text{C}(\text{=O})-\text{O}$) των κροκινών είναι υπεύθυνη για την κορυφή στα

1228 cm^{-1} , η οποία αποτελεί άλλη μια χαρακτηριστική κορυφή για το φάσμα FT-IR των στιγμάτων κρόκου [65]. Η περιοχή 1200-700 cm^{-1} συσχετίζεται, κυρίως, με την παρουσία σακχάρων [49]. Οι ταινίες που εμφανίζονται γύρω στα 1160 και 1105 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στις δονήσεις τάσης των ομάδων C–O στα σάκχαρα (π.χ. λόγω C–O–C στους δακτυλίους των σακχάρων και τους γλυκοζιτικούς δεσμούς) [49,50,65], ενώ οι δονήσεις σκελετού των γλυκοζιτικών δεσμών μπορούν να παρατηρηθούν στην περιοχή 950-700 cm^{-1} [47]. Οι ταινίες απορρόφησης που εμφανίζονται στις περιοχές 970-920, 890-810 και 780-700 cm^{-1} μπορούν, επίσης, να οφείλονται στις δονήσεις κάμψης εκτός επιπέδου των C–H (*trans*-), των αρωματικών C–H και των C–H (*cis*-), αντίστοιχα [50,66,67].

4.3.2.2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση νοθείας

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) πραγματοποιήθηκε για προκαταρκτική διερεύνηση της πιθανής διαφοροποίησης των δειγμάτων ως προς την καθαρότητα και τον τύπο του υλικού νοθείας που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και για την ανίχνευση δειγμάτων που αποκλίνουν (*outliers*). Η χρήση της εξομάλυνσης (SG) και η διόρθωση της βασικής γραμμής για την επεξεργασία των φασμάτων φάνηκε να παρέχει συγκριτικά καλύτερα αποτελέσματα, με τις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1 και PC2) να ερμηνεύουν συνολικά το 92.5% του αρχικής διακύμανσης. Ωστόσο, όπως προέκυψε από το αντίστοιχο διάγραμμα αποτελεσμάτων (Σχήμα 4.8), η διαφοροποίηση των περισσότερων δειγμάτων δεν ήταν εφικτή παρά μόνο για τα δείγματα που ήταν νοθευμένα με καλέντουλα, τα οποία έδειξαν να διαχωρίζονται σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Για να βελτιωθεί η διαφοροποίηση των δειγμάτων, αναπτύχθηκε μια στρατηγική που περιλαμβάνει δύο στάδια, εφαρμόζοντας επιβλεπόμενη ταξινόμηση με τη μέθοδο PLS-DA. Στο πρώτο στάδιο ελέγχθηκε ο διαχωρισμός καθαρών και νοθευμένων δειγμάτων, ενώ στη συνέχεια εξετάστηκε η αναγνώριση του φυτικού υλικού νοθείας που χρησιμοποιήθηκε στα νοθευμένα δείγματα.



Σχήμα 4.8. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα δείγματα σιγμάτων κρόκου (κλάση 1) και τα νοθευμένα δείγματα σε επίπεδο 5, 10 και 20% (w/w) με στήμονες κρόκου (κλάση 2), καλέντουλα (κλάση 3), κάρθαμο (κλάση 4), κουρκουμά (κλάση 5), εκχύλισμα βουδλέιας (κλάση 6) και εκχύλισμα γαρδένιας (κλάση 7). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1 και PC2), όπου γίνεται η προβολή των δεδομένων, ερμηνεύουν το 92.5% της αρχικής διακύμανσης.

Για την ανίχνευση των νοθευμένων δειγμάτων αξιολογήθηκαν, αρχικά, τρία διαφορετικά μοντέλα PLS-DA που προέκυψαν βάσει διαφορετικών τεχνικών προκατεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από ολόκληρη την φασματική περιοχή ($4000-600\text{ cm}^{-1}$). Μετά την απομάκρυνση των δειγμάτων που απέκλιναν, όπως προσδιορίστηκαν με τη χρήση PCA, τα μοντέλα αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας 158 δείγματα για τη βαθμονόμηση των δύο πρώτων και 157 δείγματα για το μοντέλο που βασίζεται σε κανονικοποιημένα δεδομένα, ενώ σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 70 δείγματα ως εξωτερικό σύνολο δειγμάτων ελέγχου. Ο Πίνακας 4.3 υποδεικνύει ότι τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν (χαμηλότερα σφάλματα και σχετικά χαμηλός αριθμός LVs) όταν χρησιμοποιήθηκαν η εξομάλυνση SG και η διόρθωση βασικής γραμμής για την επεξεργασία των φασμάτων.

Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS-DA δύο κατηγοριών, τα οποία αναπτύχθηκαν με χρήση διαφορετικών τεχνικών επεξεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων από ολόκληρη τη φασματική περιοχή (4000-600 cm^{-1}).

Επεξεργασία ^α	LV		Ποσοστό μη-σφάλματος (%)	Ποσοστό σφάλματος (%)	Ακρίβεια (%)
i)	6	Βαθμονόμηση	97	3	97
		Διασταυρωμένη επικύρωση	96	4	96
		Πρόβλεψη	96	4	96
ii)	5	Βαθμονόμηση	99	1	98
		Διασταυρωμένη επικύρωση	98	2	97
		Πρόβλεψη	99	1	99
iii)	5	Βαθμονόμηση	98	2	97
		Διασταυρωμένη επικύρωση	98	2	97
		Πρόβλεψη	95	5	96

^α i): κεντροποίηση των αρχικών δεδομένων (MC), ii): MC μετά από εξομάλυνση Savitzky-Golay (SG) και διόρθωση της βασικής γραμμής (BC); iii): MC μετά από εξομάλυνση SG, BC και κανονικοποίηση της απορρόφησης. Στον πίνακα επισημαίνεται η επεξεργασία που επιλέχθηκε.

LV: λανθάνουσες μεταβλητές.

Το επιλεγμένο μοντέλο στη συνέχεια βελτιστοποιήθηκε με την αφαίρεση δύο ακόμη δειγμάτων που απέκλιναν, όπως αυτά προσδιορίστηκαν στο σύνολο δειγμάτων βαθμονόμησης. Ακολούθησε εκ νέου βαθμονόμηση με 156 δείγματα, ενώ 70 δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως σύνολο ελέγχου για την πρόβλεψη (Πίνακας 4.4).

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα για το βελτιστοποιημένο μοντέλο συνοψίζονται στον Πίνακα 4.5. Το μοντέλο PLS-DA δύο κατηγοριών ερμήνευσε το 97% της συνολικής διακύμανσης (X), με τις δύο πρώτες από τις πέντε λανθάνουσες μεταβλητές (LVs) που χρησιμοποιήθηκαν να αντιπροσωπεύουν το 83% της συνολικής διακύμανσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας ήταν ιδιαίτερα υψηλά (Πίνακας 4.5), ενώ μόνο δύο νοθευμένα δείγματα με 5% (w/w) εκχύλισμα βουδλίας ταξινομήθηκαν εσφαλμένα κατά τη βαθμονόμηση και τη διασταυρωμένη επικύρωση ως καθαρό προϊόν (Σχήμα 4.9). Σε αμφότερες τις περιπτώσεις το ποσοστό των ορθώς ταξινομημένων δειγμάτων ήταν 99%. Όταν το μοντέλο PLS-DA επικυρώθηκε με το σύνολο δειγμάτων ελέγχου, όλα τα δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά (Πίνακας 4.5), όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.9.

Πίνακας 4.4. Κατάλογος δειγμάτων που επιλέχθηκαν, σύμφωνα με τον αλγόριθμο Duplex, για τα σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου του μοντέλου PLS-DA δύο κατηγοριών.

Τύπος δείγματος	Σύνολο βαθμονόμησης			Σύνολο ελέγχου		
Νοθευμένα δείγματα	121			55		
<i>Επίπεδο νοθείας</i>	5%	10%	20%	5%	10%	20%
Αριθμός δειγμάτων	45	39	37	15	20	20
<i>Υλικό νοθείας</i>						
Στήμονες κρόκου	7	6	8	3	4	2
Καλέντουλα	8	6	8	2	4	2
Κάρθαμος	7	8	8	3	2	2
Κουρκουμάς	8	6	3	2	3	6
Εκχ. βουδλίας	8	6	6	2	4	3
Εκχ. γαρδένιας	7	7	4	3	3	5
Αυθεντικά δείγματα	35			15		
Συνολικός αριθμός	156			70		

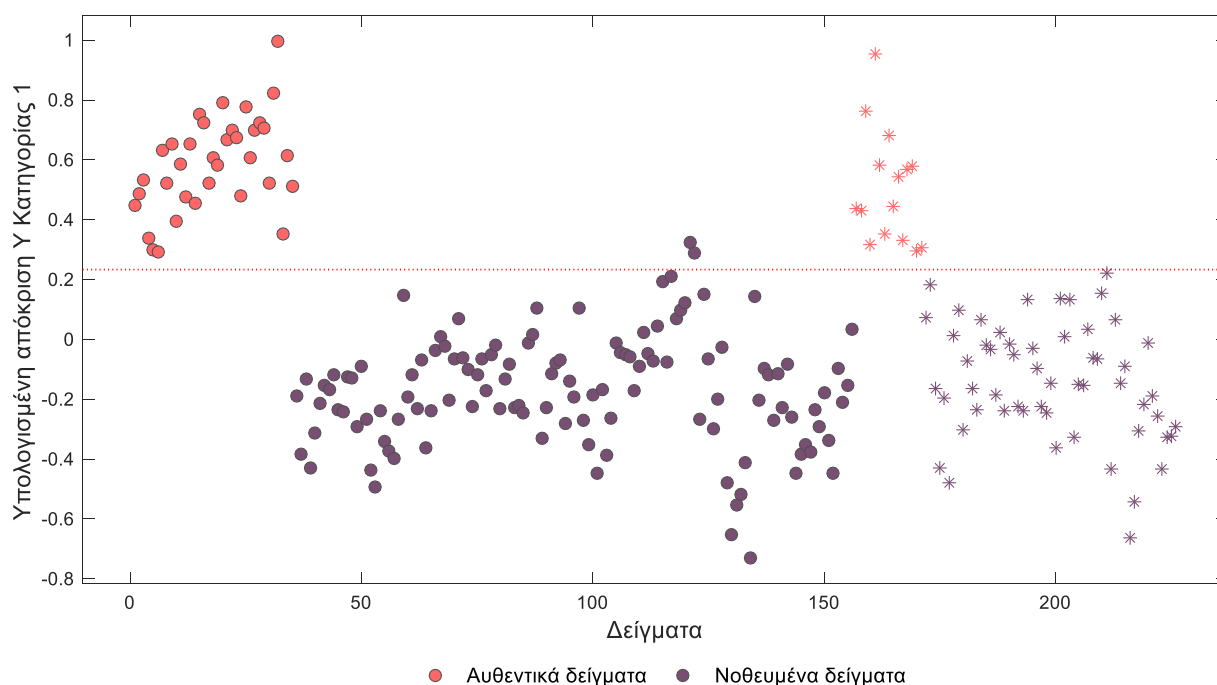
Πίνακας 4.5. Παράμετροι ταξινόμησης που προσδιορίστηκαν από το μοντέλο PLS-DA δύο κατηγοριών για τη διαφοροποίηση των καθαρών και των νοθευμένων δειγμάτων.

	Καθαρὰ στίγματα κρόκου			Νοθευμένα στίγματα κρόκου	
	Σφάλμα (%)	Ειδικότητα (%)	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα(%)	Ευαισθησία(%)
Βαθμονόμηση	1	98	100	100	98
Διασταυρωμένη επικύρωση	1	98	100	100	98
Πρόβλεψη	0	100	100	100	100

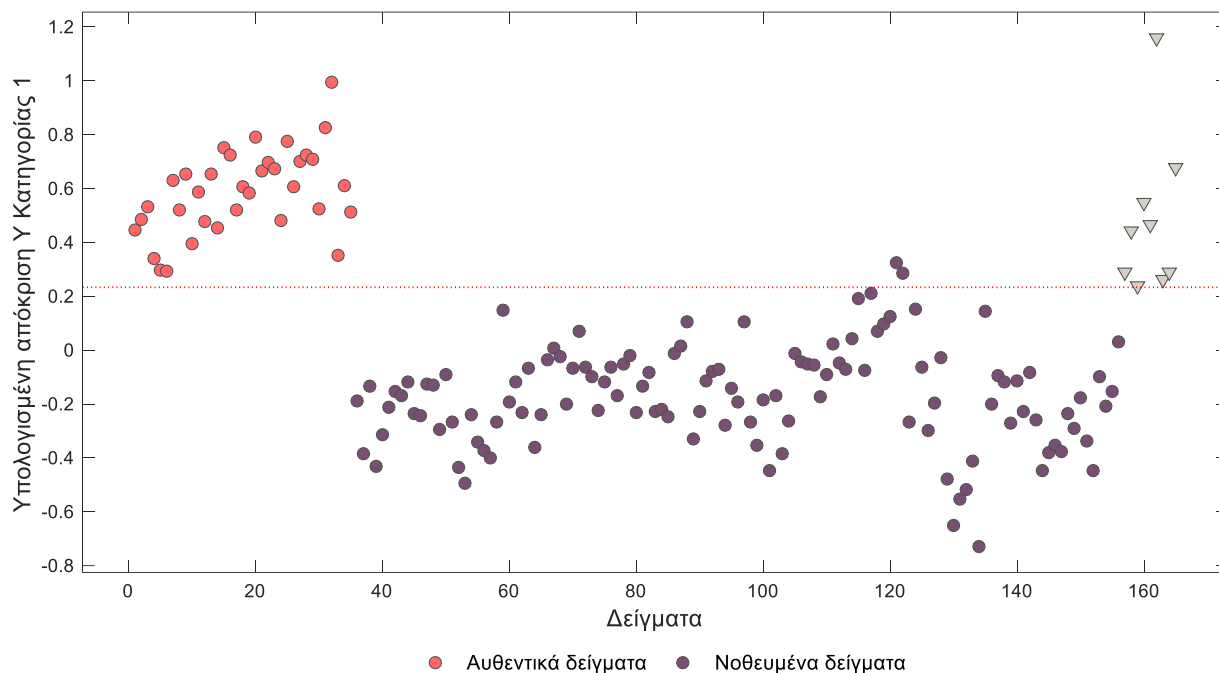
Οι συντελεστές παλινδρόμησης καθώς και τα φορτία (loadings) έδειξαν ότι οι μεταβλητές που συμβάλλουν περισσότερο στην αύξηση της απόκρισης (Y) για την κατηγορία του καθαρών δειγμάτων συνδέονται με τις τυπικές ταινίες απορρόφησης των κροκινών στα 1706 και 1228 cm^{-1} , ενώ ακολουθούν οι ωμοπλάτες στα περίπου 1774 και 970 cm^{-1} , καθώς και η ταινία στα 906 cm^{-1} . Από την άλλη πλευρά, οι μεταβλητές που συνδέονται με τις ταινίες στα 3350, 2928, 2856, 1631, 1515 και 675 cm^{-1} , μαζί με την ωμοπλάτη που εμφανίζεται γύρω στα 1060 cm^{-1} ήταν

υπεύθυνες για την αύξηση της απόκρισης που σχετίζεται με την κατηγορία των νοθευμένων δειγμάτων.

Η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας ένα ακόμη σύνολο δειγμάτων ελέγχου, με δείγματα saffron αναφοράς που παραχωρήθηκαν μέσω της δράσης COST FA1101 (Saffron-OMICS, www.saffronomics.org), περιλαμβάνοντας δείγματα από την Ελλάδα ($n = 3$), την Ισπανία ($n = 5$) και την Ιταλία ($n = 1$). Όλα τα δείγματα αναφοράς χαρακτηρίστηκαν σωστά ως καθαρό προϊόν (Σχήμα 4.10), γεγονός που σηματοδοτεί την πιθανή δυνατότητα εφαρμογής του μοντέλου σε δείγματα διαφορετικής προέλευσης, τα οποία ενδέχεται να έχουν παραχθεί με διάφορους τρόπους ξήρανσης.



Σχήμα 4.9. Διάγραμμα ταξινόμησης PLS-DA (α) για τα καθαρά δείγματα στιγμάτων κρόκου (κόκκινοι κύκλοι) και (β) για τα νοθευμένα δείγματα που προέκυψαν με χρήση των 6 επιμέρους φυτικών υλικών στα επίπεδα συγκεντρώσεων 5, 10 και 20% (w/w). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου που ανήκουν στις δύο κατηγορίες απεικονίζονται με αστερίσκο του αντίστοιχου χρώματος. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει την οριακή τιμή για την κατηγορία 1 (αυθεντικά δείγματα).



Σχήμα 4.10. Διάγραμμα ταξινόμησης PLS-DA (α) για τα καθαρά δείγματα στιγμάτων κρόκου (κόκκινοι κύκλοι) και (β) για τα νοθευμένα δείγματα που προέκυψαν με χρήση των 6 επιμέρους φυτικών υλικών στα επίπεδα συγκεντρώσεων 5, 10 και 20% (w/w). Τα δείγματα στιγμάτων κρόκου που περιλαμβάνονται στο σύνολο ελέγχου αναφοράς απεικονίζονται με γκρι τρίγωνα. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει την οριακή τιμή για την κατηγορία 1 (αυθεντικά δείγματα).

Το επόμενο βήμα ήταν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος PLS-DA για την αναγνώριση του υλικού νοθείας στα νοθευμένα δείγματα. Στο πλαίσιο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν από την επεξεργασία των φασμάτων (εξομάλυνση SG και διόρθωση βασικής γραμμής) των νοθευμένων δειγμάτων. Η εξαίρεση της περιοχής $4000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ οδήγησε στην ανάπτυξη μοντέλου με καλύτερη επίδοση, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι η περιοχή αυτή περιλαμβάνει κυρίως κοινά χαρακτηριστικά για όλα τα φάσματα των νοθευμένων δειγμάτων, τα οποία όπως ήδη αναφέρθηκε συνέβαλαν στην αύξηση της απόκρισης για την κατηγορία των νοθευμένων δειγμάτων. Αντιστρόφως, η φασματική περιοχή από τα 2000 έως τα 600 cm^{-1} παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές με βάση τις χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης όλων σχεδόν των υλικών νοθείας που εξετάστηκαν (Σχήμα 4.7). Αυτή η περιοχή έχει επίσης αποδειχθεί ότι περιέχει επαρκείς φασματικές πληροφορίες για τη διάκριση δειγμάτων από στίγματα κρόκου σε έλεγχο αυθεντικότητας, όπως για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης [49]. Τα

δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, μετά από τον εντοπισμό και την απομάκρυνση των τριών δειγμάτων που απέκλιναν, ήταν 123 για το σύνολο βαθμονόμησης και 54 για το σύνολο ελέγχου. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα σύνολα δειγμάτων βαθμονόμησης και ελέγχου παρέχονται στον Πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6. Κατάλογος δειγμάτων που επιλέχθηκαν, σύμφωνα με τον αλγόριθμο Duplex, για τα σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου του μοντέλου PLS-DA έξι κατηγοριών.

Κατηγορία δείγματος	Σύνολο βαθμονόμησης			Σύνολο ελέγχου		
	5%	10%	20%	5%	10%	20%
<i>Επίπεδο νοθείας</i>						
K1	5	7	8	4	3	2
K2	8	6	7	2	4	3
K3	7	7	6	3	2	4
K4	5	9	7	5	1	3
K5	7	8	6	3	2	4
K6	6	9	5	4	1	4

K1-6: Οι έξι κατηγορίες που αντιστοιχούν σε δείγματα στιγμάτων κρόκου νοθευμένα με στήμονες κρόκου (K1), καλέντουλα (K2), κάρθαμο (K3), κουρκουμά (K4), εκχύλισμα βουδλίας (K5) και εκχύλισμα γαρδένιας (K6).

Σε αυτό το μοντέλο PLS-DA 6 κατηγοριών, οι δύο πρώτες λανθάνουσες μεταβλητές ερμήνευσαν το 89.1% της διακύμανσης, ενώ συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 9 LVs που αντιπροσώπευσαν το 99% της διακύμανσης. Ο πίνακας σύγχυσης (Πίνακας 4.7) συγκεντρώνει τα αποτελέσματα του μοντέλου για τα δείγματα που ανήκουν σε κάθε κατηγορία. Τα κύρια αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά τη βαθμονόμηση, τη διασταυρωμένη επικύρωση, και την επικύρωση του μοντέλου μέσω του συνόλου ελέγχου παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8. Όπως φαίνεται, το 99, 98, και 98% των δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά σε κάθε αντίστοιχη περίπτωση. Ως “απροσδιόριστα” ορίζονται αφενός τα δείγματα που δεν αναγνωρίστηκαν ως μέλη οποιασδήποτε κατηγορίας και αφετέρου τα δείγματα που αντιστοιχήθηκαν σε περισσότερες από μία κατηγορίες [59]. Τα δείγματα αυτά δεν ελήφθησαν υπόψη για τον υπολογισμό των παραμέτρων ταξινόμησης που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.7. Πίνακας σύγκρισης με τα αποτελέσματα ταξινόμησης όπως προέκυψαν από το μοντέλο PLS-DA έξι κατηγοριών.

	Κατηγορία	Εκτιμώμενη κατηγορία						Απροσδιόριστα ^α
		K1	K2	K3	K4	K5	K6	
Βαθμονόμηση	K1	17	0	0	1	0	0	2
	K2	0	19	0	0	0	0	2
	K3	0	0	15	0	0	0	5
	K4	0	0	0	19	0	0	2
	K5	0	0	0	0	21	0	0
	K6	0	0	0	0	0	20	0
Διασταυρωμένη επικύρωση	K1	15	0	0	1	0	0	4
	K2	0	18	0	0	0	0	3
	K3	0	0	15	0	0	0	5
	K4	0	0	1	17	0	0	3
	K5	0	0	0	0	21	0	0
	K6	0	0	0	0	0	20	0
Πρόβλεψη	K1	6	0	0	0	0	1	2
	K2	0	8	0	0	0	0	1
	K3	0	0	9	0	0	0	0
	K4	0	0	0	8	0	0	1
	K5	0	0	0	0	9	0	0
	K6	0	0	0	0	0	9	0

^α Ως απροσδιόριστα θεωρούνται τα δείγματα που δεν αναγνωρίστηκαν ότι ανήκουν σε κάποια από τις κατηγορίες ή τα δείγματα που ταξινομήθηκαν σε πάνω από μία κατηγορία [59]. K1-6: Οι έξι κατηγορίες που αντιστοιχούν σε δείγματα στιγμάτων κρόκου νοθευμένα με στήμονες κρόκου (K1), καλέντουλα (K2), κάρθαμο (K3), κουρκουμά (K4), εκχύλισμα βουδλίας (K5) και εκχύλισμα γαρδένιας (K6).

Όταν συμπεριλήφθηκαν και τα απροσδιόριστα δείγματα, τα ποσοστά σωστής ταξινόμησης για τη βαθμονόμηση, τη διασταυρωμένη επικύρωση και την πρόβλεψη που προκύπτουν είναι 90, 86 και 91%, αντίστοιχα. Στο Σχήμα 4.11 απεικονίζονται τα διαγράμματα ταξινόμησης για τις 6 επιμέρους κατηγορίες νοθευμένων δειγμάτων.

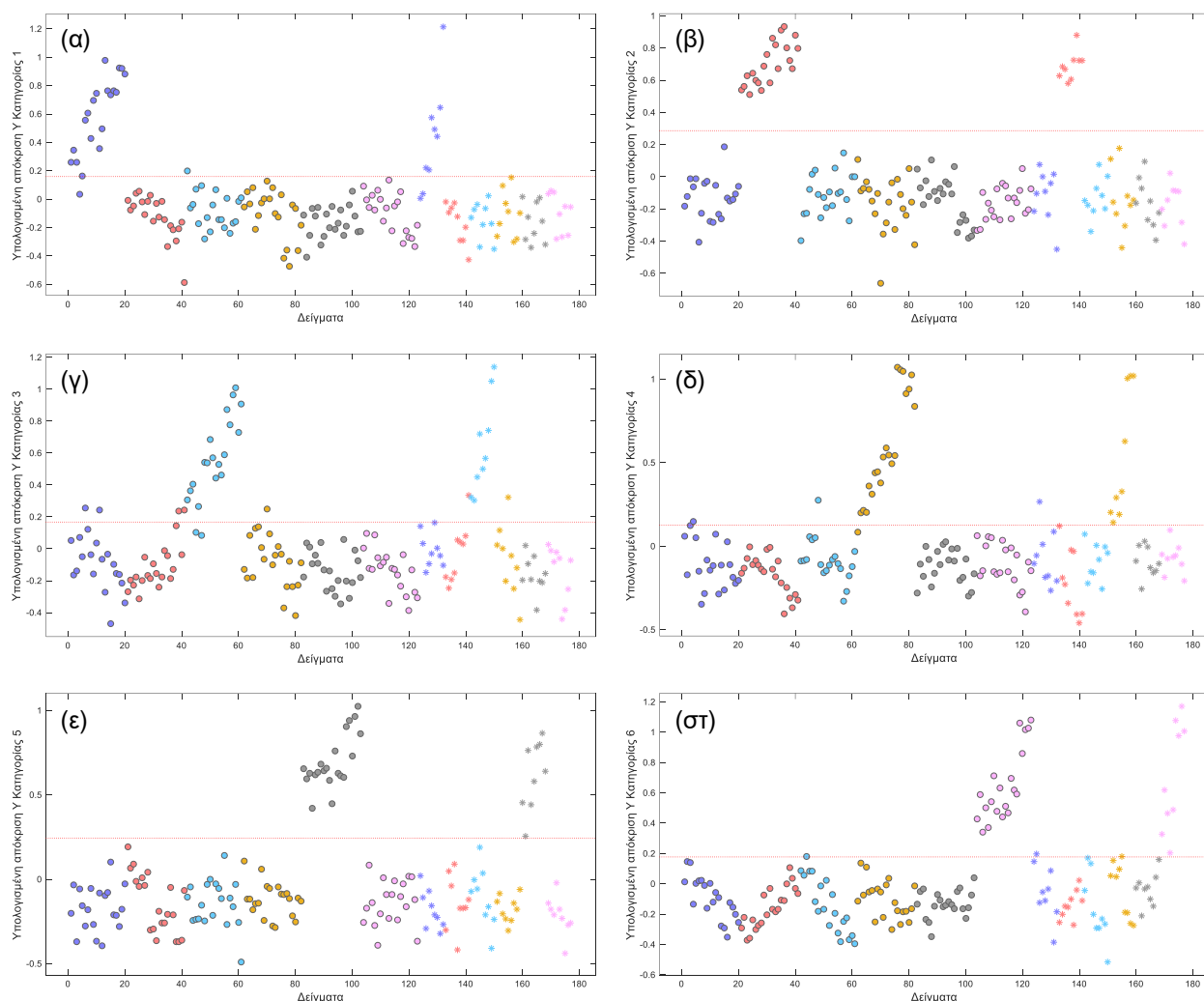
Από τους συντελεστές παλινδρόμησης φάνηκε ότι η απόκριση της κατηγορίας δειγμάτων που ήταν νοθευμένα με στήμονες κρόκου αυξήθηκε, κυρίως, λόγω των μεταβλητών που σχετίζονται με τις ωμοπλάτες που εμφανίζονται γύρω στα 1774 και 1572 cm^{-1} , ενώ σημαντικές μεταβλητές για την κατηγορία των νοθευμένων δειγμάτων με καλέντουλα ήταν εκείνες που

αντιστοιχούν στις ταινίες απορρόφησης στα 1738 και 1664 cm^{-1} . Όσον αφορά στην κατηγορία των δειγμάτων που περιέχουν κάρθαμο ως υλικό νοθείας, οι μεταβλητές που συνδέονται με τις κορυφές στα 1615, 1446, 1250 και 1105 cm^{-1} , μαζί με τις μεταβλητές των περιοχών γύρω στα 1495 και 964 cm^{-1} φάνηκαν να είναι υπεύθυνες για το διαχωρισμό από τις άλλες κατηγορίες. Οι ταινίες στα 1635, 1515, 1163, 934 και 861 cm^{-1} σχετίστηκαν με σημαντικές μεταβλητές για την ταυτοποίηση των νοθευμένων δειγμάτων με κουρκουμά. Επίσης, ο διαχωρισμός μεταξύ της

Πίνακας 4.8. Παράμετροι ταξινόμησης που προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το μοντέλο PLS-DA έξι κατηγοριών για την ταυτοποίηση των φυτικών υλικών νοθείας στα νοθευμένα δείγματα.

	Σφάλμα (%)	Ειδικότητα (%)	Ευαισθησία (%)	Πιστότητα (%)	Απροσδιόριστα ^a (%)
Βαθμονόμηση	1				9
Στήμονες κρόκου		100	94	100	
Καλέντουλα		100	100	100	
Κάρθαμος		100	100	100	
Κουρκουμάς		99	100	95	
Εκχ. βουδλίας		100	100	100	
Εκχ. γαρδένιας		100	100	100	
Διασταυρωμένη επικύρωση	2				12
Στήμονες κρόκου		100	94	100	
Καλέντουλα		100	100	100	
Κάρθαμος		99	100	94	
Κουρκουμάς		99	94	94	
Εκχ. βουδλίας		100	100	100	
Εκχ. γαρδένιας		100	100	100	
Πρόβλεψη	2				7
Στήμονες κρόκου		100	86	100	
Καλέντουλα		100	100	100	
Κάρθαμος		100	100	100	
Κουρκουμάς		100	100	100	
Εκχ. βουδλίας		100	100	100	
Εκχ. γαρδένιας		98	100	90	

^a Ως απροσδιόριστα θεωρούνται τα δείγματα που δεν αναγνωρίστηκαν ότι ανήκουν σε κάποια από τις κατηγορίες ή τα δείγματα που ταξινομήθηκαν σε πάνω από μία κατηγορία [59]. Τα δείγματα αυτά δε λήφθηκαν υπόψη στον υπολογισμό του ποσοστού σφάλματος, της ειδικότητας, της ευαισθησίας και της πιστότητας.



Σχήμα 4.11. Διαγράμματα ταξινόμησης PLS-DA για τις έξι κατηγορίες νοθευμένων δειγμάτων ανάλογα με το υλικό νοθείας: (α) στήμονες κρόκου (κατηγορία 1, μπλε κύκλοι), (β) καλέντουλα (κατηγορία 2, κόκκινοι κύκλοι), (γ) κάρθαμος (κατηγορία 3, γαλάζιοι κύκλοι), (δ) κουρκουμάς (κατηγορία 4, κίτρινοι κύκλοι), (ε) εκχύλισμα βουδλίας (κατηγορία 5, γκρι κύκλοι) και (στ) εκχύλισμα γαρδένιας (κατηγορία 6, ροζ κύκλοι). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου που ανήκουν στις επιμέρους κατηγορίες απεικονίζονται με αστερίσκο του αντίστοιχου χρώματος. Η οριακή τιμή για κάθε κατηγορία επισημαίνεται με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή.

κλάσης των δειγμάτων που νοθεύθηκαν με εκχύλισμα βουδλίας και όλων των υπολοίπων κατηγοριών ενισχύθηκε κυρίως λόγω των μεταβλητών που αντιστοιχούν στην κορυφή στα 1706 cm^{-1} και την περιοχή στα περίπου 1654 cm^{-1} . Τέλος, για την απόκριση των δειγμάτων που ήταν νοθευμένα με εκχύλισμα γαρδένιας συνέβαλαν καθοριστικά οι μεταβλητές των περιοχών στα

1745 και 1628 cm^{-1} , καθώς και οι μεταβλητές που αντιστοιχούν στις φασματικές ταινίες στα 1160 και 767 cm^{-1} .

4.3.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός φυτικών υλικών νοθείας

Για την ποσοτικοποίηση κάθε φυτικού υλικού νοθείας ξεχωριστά, αναπτύχθηκαν μοντέλα με τη μέθοδο παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS), τα οποία προέκυψαν μετά την αφαίρεση των δειγμάτων που αποκλίνουν. Στις περιπτώσεις των στημόνων κρόκου και του κάρθαμου αφαιρέθηκαν ένα και δύο δείγματα, αντίστοιχα, ενώ δεν εντοπίστηκαν δείγματα που αποκλίνουν για τα τέσσερα υπόλοιπα υλικά. Για την επικύρωση κάθε μοντέλου PLS, επιλέχθηκαν από τον αλγόριθμο Duplex 12 από τα 40 δείγματα συνολικά (39 για τους στήμονες κρόκου, 38 για τον κάρθαμο) ως σύνολο ελέγχου. Τα υπόλοιπα δείγματα κάθε συνόλου δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση και τη διασταυρωμένη επικύρωση του ανά περίπτωση μοντέλου. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν διαφορετικές τεχνικές προκατεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων, λαμβάνοντας υπόψη ολόκληρη την περιοχή των φασμάτων (4000-600 cm^{-1}).

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για τα μοντέλα PLS, αποδείχθηκε ότι η καλύτερη επίδοση σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, ειδικά για το σύνολο βαθμονόμησης, βρέθηκε με χρήση του συνδυασμού πρώτης παραγώγου, εξομάλυνσης SG και κεντροποίησης των τιμών των μεταβλητών (Πίνακας 4.9). Έτσι, επιλέχθηκε ως η πλέον κατάλληλη τεχνική για την επεξεργασία των φασμάτων. Παρά το γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η χρήση άλλων τεχνικών οδήγησε σε μοντέλα με ελαφρώς χαμηλότερες τιμές RMSEP, ο αριθμός των LVs ήταν μεγαλύτερος ή η επίδοση κατά τη διασταυρωμένη επικύρωση δεν ήταν το ίδιο ικανοποιητική, από πλευράς των τιμών του συντελεστή συσχέτισης (r_{cv}) και του σφάλματος (RMSECV).

Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS που αναπτύχθηκαν για την ποσοτικοποίηση κάθε φυτικού υλικού νοθείας στα αντίστοιχα νοθευμένα δείγματα, χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές προκατεργασίας των δεδομένων από ολόκληρη τη φασματική περιοχή (4000-600 cm⁻¹).

Υλικό νοθείας	Προκατεργασία	LV	r_c	RMSEC (%)	RMSEP (%)	r_{cv}	RMSECV (%)
Στήμονες κρόκου (n = 39)	Ανεπεξέργαστα δεδομένα	7	0.98	1.29	2.70	0.53	6.27
	MC	9	0.99	0.81	2.67	0.63	5.82
	MSC	6	0.98	1.43	2.80	0.65	5.85
	MSC + MC	5	0.98	1.43	2.81	0.65	5.86
	SNV	6	0.98	1.43	2.81	0.65	5.86
	SNV + MC	5	0.98	1.43	2.81	0.64	5.91
	1η παράγωγος + SG + MC	4	0.99	1.07	2.38	0.83	4.43
	2η παράγωγος + SG + MC	5	0.99	0.95	2.20	0.66	5.45
	SG + BC + MC	7	0.99	0.83	1.51	0.74	5.15
	SG + BC + Κανονικοποίηση	5	0.96	1.96	2.20	0.21	7.35
	SG + BC+ Καν/ποίηση + MC	5	0.97	1.65	1.95	0.22	7.32
Καλέντουλα (n = 40)	Ανεπεξέργαστα δεδομένα	9	0.99	0.58	1.72	0.89	3.35
	MC	4	0.97	1.55	2.42	0.47	6.18
	MSC	9	0.99	0.49	1.80	0.93	2.87
	MSC + MC	8	0.99	0.49	1.78	0.93	2.84
	SNV	9	0.99	0.49	1.79	0.93	2.86
	SNV + MC	7	0.99	0.61	1.69	0.94	2.94
	1η παράγωγος + SG + MC	4	0.99	0.88	1.53	0.93	3.05
	2η παράγωγος + SG + MC	10	0.99	0.23	1.72	0.94	2.77
	SG + BC + MC	8	0.99	0.79	0.74	0.73	6.03
	SG + BC + Κανονικοποίηση	4	0.98	1.47	1.58	0.73	5.27
	SG + BC+ Καν/ποίηση + MC	6	0.99	0.99	1.28	0.83	4.57
Κάρθαμος (n = 38)	Ανεπεξέργαστα δεδομένα	10	0.99	0.71	2.04	0.64	6.21
	MC	6	0.99	1.16	1.91	0.23	7.60
	MSC	9	0.99	0.61	1.91	0.75	5.70
	MSC + MC	8	0.99	0.61	1.98	0.73	5.82
	SNV	9	0.99	0.61	1.90	0.75	5.69
	SNV + MC	8	0.99	0.61	1.90	0.73	5.81
	1η παράγωγος + SG + MC	4	0.99	1.11	1.69	0.80	5.16
	2η παράγωγος + SG + MC	7	0.99	0.46	1.55	0.83	5.28
	SG + BC + MC	9	0.99	0.57	1.70	0.80	5.24
	SG + BC + Κανονικοποίηση	10	0.99	0.40	1.51	0.69	5.84
	SG + BC+ Καν/ποίηση + MC	10	0.99	0.37	1.52	0.71	5.80
Κουρκουμάς (n = 40)	Ανεπεξέργαστα δεδομένα	8	0.99	0.90	1.50	0.93	3.00
	MC	4	0.97	1.76	2.05	0.87	3.83
	MSC	7	0.99	0.94	1.27	0.94	3.03
	MSC + MC	4	0.99	1.20	1.43	0.95	2.92
	SNV	7	0.99	0.93	1.26	0.94	3.03
	SNV + MC	6	0.99	0.93	1.27	0.94	3.06
	1η παράγωγος + SG + MC	4	0.99	0.72	1.39	0.98	2.11

Υλικό νοθείας	Προκατεργασία	LV	r_c	RMSEC (%)	RMSEP (%)	r_{cv}	RMSECV (%)
	2η παράγωγος + SG + MC	5	0.99	0.60	0.98	0.97	1.92
	SG + BC + MC	5	0.99	1.14	1.65	0.95	2.99
	SG + BC + Κανονικοποίηση	8	0.99	0.70	1.51	0.97	1.84
	SG + BC+ Καν/ποίηση + MC	5	0.99	1.04	1.39	0.97	1.86
Εκχ. βουδλείας (n = 40)	Ανεπεξέργαστα δεδομένα	7	0.99	0.60	0.87	0.96	2.67
	MC	5	0.99	1.13	1.15	0.96	2.57
	MSC	5	0.99	0.80	0.73	0.97	2.44
	MSC + MC	4	0.99	0.79	0.72	0.97	2.49
	SNV	5	0.99	0.80	0.73	0.97	2.44
	SNV + MC	4	0.99	0.80	0.73	0.97	2.44
	1η παράγωγος + SG + MC	6	0.99	0.38	1.29	0.99	1.84
	2η παράγωγος + SG + MC	8	0.99	0.19	1.00	0.98	2.08
	SG + BC + MC	4	0.99	1.06	1.51	0.95	2.55
	SG + BC + Κανονικοποίηση	10	0.99	0.22	0.83	0.99	1.21
	SG + BC+ Καν/ποίηση + MC	3	0.99	1.12	1.73	0.94	2.52
Εκχ. γαρδένιας (n = 40)	Ανεπεξέργαστα δεδομένα	9	0.99	0.48	1.01	0.97	1.71
	MC	4	0.99	1.13	1.28	0.98	1.95
	MSC	4	0.98	1.30	1.38	0.96	1.96
	MSC + MC	3	0.98	1.31	1.38	0.96	2.00
	SNV	4	0.98	1.30	1.38	0.96	1.95
	SNV + MC	3	0.98	1.30	1.38	0.96	1.95
	1η παράγωγος + SG + MC	3	0.99	0.57	0.97	0.99	1.19
	2η παράγωγος + SG + MC	3	0.99	0.65	0.74	0.98	1.75
	SG + BC + MC	5	0.99	0.71	1.21	0.98	1.48
	SG + BC + Κανονικοποίηση	5	0.99	0.91	0.60	0.98	1.66
	SG + BC+ Καν/ποίηση + MC	4	0.99	1.08	0.69	0.98	1.74

LV: λανθάνουσες μεταβλητές, r_c : συντελεστής συσχέτισης για τη βαθμονόμηση, r_{cv} : συντελεστής συσχέτισης για τη διασταυρωμένη επικύρωση. RMSEC, RMSEP, RMSECV: τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης, πρόβλεψης και διασταυρωμένης επικύρωσης, αντίστοιχα.

MC: κεντροποίηση, MSC: πολλαπλασιαστική διόρθωση σκέδασης, SNV: τυπική κανονική τυχαία μεταβλητή, SG: εξομάλυνση Savitzky-Golay, BC: διόρθωση βασικής γραμμής.

Τα μοντέλα που επιλέχθηκαν (1η παράγωγος + εξομάλυνση SG + κεντροποίηση) υποδεικνύονται με έντονη γραφή.

Η επίδοση των επιλεγμένων μοντέλων PLS αξιολογήθηκε περαιτέρω με τη χρήση διαφορετικών φασματικών περιοχών καθώς επίσης και με την επιλογή μεταβλητών με τις μεθόδους iPLS και siPLS. Για τις μεθόδους iPLS και siPLS, αξιολογήθηκαν διαφορετικοί αριθμοί διαστημάτων (δηλαδή 10, 15, 20, 30 και 40), ενώ ειδικά για την προσέγγιση με siPLS εξετάστηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί 2, 3 ή 4 διαστημάτων. Ο Πίνακας 4.10 παρουσιάζει τις πιθανές

επιλογές μοντέλων για κάθε φυτικό υλικό, όπως προέκυψαν με την εφαρμογή των μεθόδων

Πίνακας 4.10. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS που βασίστηκαν σε διαφορετικά εύρη κυματαριθμών (διαστήματα μεταβλητών), όπως αυτά επιλέχθηκαν με τις μεθόδους επιλογής μεταβλητών iPLS και siPLS.

Υλικό νοθείας	Μέθοδος	Εύρος (cm ⁻¹)	LV	r_c/r_{cv}	RMSEC (%)	RMSECV (%)	RMSEP (%)
Στήμονες κρόκου	iPLS-20 διαστ.	941-771	6	0.98/0.95	1.31	2.63	2.81
	siPLS-15/3 διαστ.	1963-1510 & 1053-827	3	0.98/0.92	1.37	3.26	2.15
	siPLS-20/2 διαστ.	1794-1626 & 941-771	4	0.99/0.94	1.10	2.94	1.87
	siPLS-20/3 διαστ.	1963-1626 & 941-771	4	0.99/0.94	1.09	2.94	1.75
Καλέντουλα	iPLS-15 διαστ.	1281-1055	5	0.99/0.94	0.92	2.51	1.39
	siPLS-10/2 διαστ.	1622-941	6	0.99/0.96	0.63	2.92	1.15
	siPLS-30/2 διαστ.	1508-1396 & 1167-1055	4	0.99/0.97	0.69	3.00	0.94
	siPLS-40/2 διαστ.	1878-1795 & 858-773	5	0.99/0.97	0.66	1.87	2.06
Κάρθαμος	iPLS-20 διαστ.	1624-1456	8	0.99/0.94	0.79	2.77	1.29
	iPLS-40 διαστ.	1539-1456	5	0.99/0.96	0.90	2.18	2.08
	siPLS-10/2 διαστ.	3321-2983 & 939-600	4	0.99/0.91	1.00	3.88	2.11
	siPLS-40/2 διαστ.	1539-1456 & 858-773	5	0.99/0.96	0.70	2.22	1.11
Κουρκουμάς	iPLS-10 διαστ.	1622-1283	6	0.99/0.98	0.34	1.62	1.40
	iPLS-20 διαστ.	1624-1456	3	0.99/0.96	1.16	2.51	1.57
	siPLS-20/2 διαστ.	1624-1286	6	0.99/0.98	0.34	1.62	1.41
	siPLS-20/3 διαστ.	1624-1286 & 941-771	4	0.99/0.99	0.57	1.44	1.26
Εκχύλισμα βουδλέας	iPLS-20 διαστ.	1794-1626	4	0.99/0.97	1.02	2.20	1.31
	siPLS-10/2 διαστ.	1963-1283	8	0.99/0.99	0.44	1.26	1.46
	siPLS-20/2 διαστ.	1624-1456 & 941-771	3	0.99/0.99	0.69	1.45	1.23
	siPLS-20/3 διαστ.	1794-1456 & 941-771	7	0.99/0.99	0.45	1.19	1.38
Εκχύλισμα γαρδένιας	iPLS-10 διαστ.	1963-1624	4	0.99/0.99	0.69	1.15	1.28
	iPLS-20 διαστ.	1113-943	4	0.99/0.99	0.71	1.05	1.03
	iPLS-20 διαστ.	1794-1626	4	0.99/0.99	0.70	1.05	1.34
	siPLS-20/2 διαστ.	1794-1626 & 1113-943	3	0.99/0.99	0.62	1.12	1.01

LV: λανθάνουσες μεταβλητές, r_c : συντελεστής συσχέτισης για τη βαθμονόμηση, r_{cv} : συντελεστής συσχέτισης για τη διασταυρωμένη επικύρωση. RMSEC, RMSEP, RMSECV: τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης, πρόβλεψης και διασταυρωμένης επικύρωσης, αντίστοιχα. Για κάθε μοντέλο siPLS παρατίθεται ο αριθμός των διαστημάτων δεδομένων καθώς και ο αριθμός των συνδυασμένων διαστημάτων. Τα μοντέλα που

επιλέχθηκαν με βάση την επιλογή του βέλτιστου υποσυνόλου μεταβλητών, όπως προέκυψε με τη μέθοδο siPLS, υποδεικνύονται με έντονη γραφή.

επιλογής μεταβλητών. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα μοντέλα που παρουσίασαν την καλύτερη επίδοση τόσο κατά τη βαθμονόμηση όσο και κατά την επικύρωση βασίστηκαν στη μέθοδο siPLS.

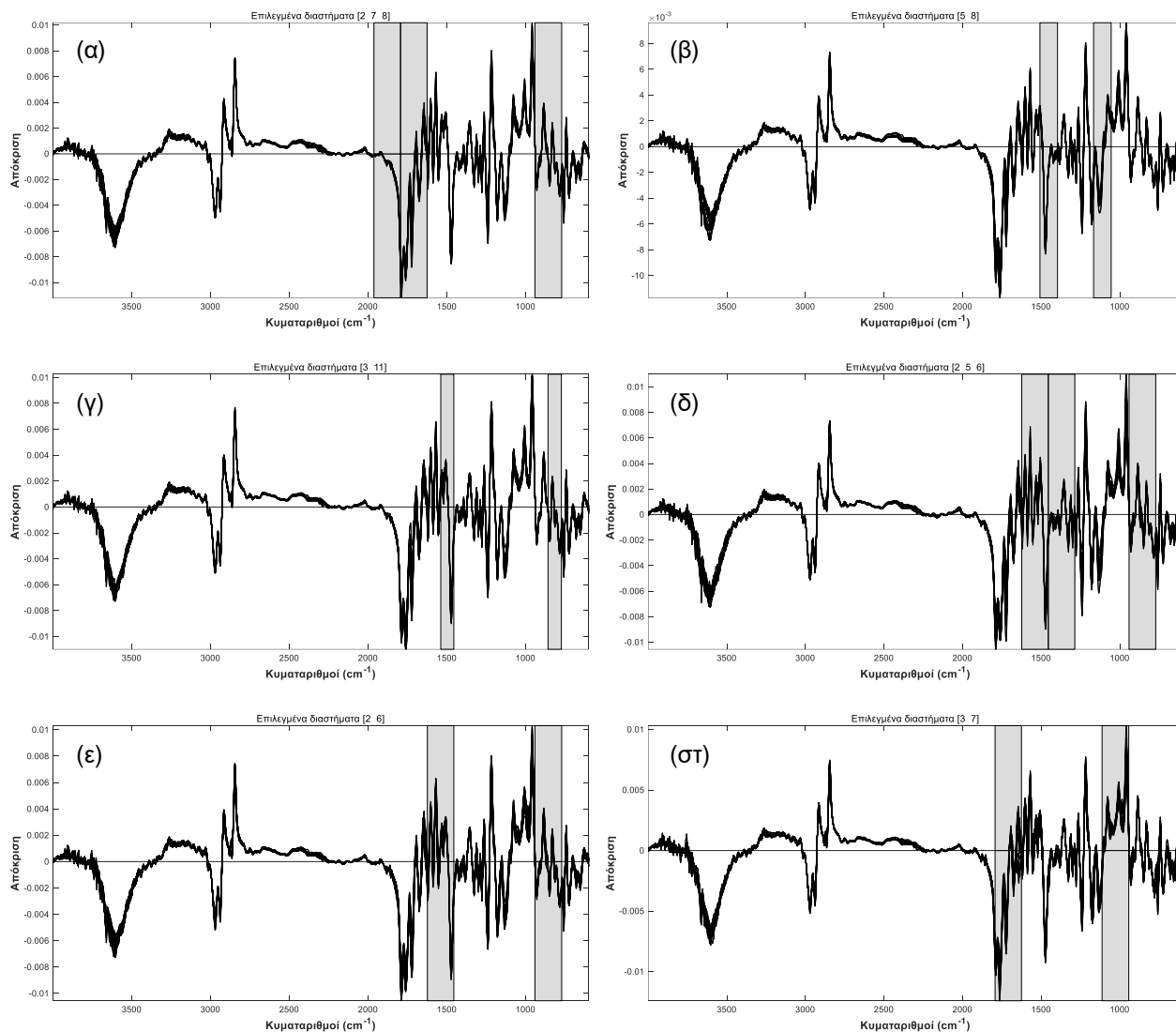
Στον Πίνακα 4.11 παρατίθενται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από τη χρήση διαφορετικών φασματικών περιοχών, καθώς και αυτά που προέκυψαν από τα καλύτερα υποσύνολα μεταβλητών που προτείνονται για κάθε υλικό νοθείας σύμφωνα με τη μέθοδο siPLS (Σχήμα 4.12).

Πίνακας 4.11. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS που αναπτύχθηκαν για την ποσοτικοποίηση κάθε φυτικού υλικού νοθείας στα νοθευμένα δείγματα, χρησιμοποιώντας διαφορετικά εύρη κυματαριθμών.

Υλικό νοθείας	Εύρος (cm ⁻¹)	LV	<i>r_c</i>	RMSEC (%)	RMSEP (%)	<i>r_{cv}</i>	RMSECV (%)
Στήμονες κρόκου	4000-600	4	0.99	1.07	2.38	0.83	4.43
	3200-2700 & 2000-600	4	0.99	1.10	2.31	0.83	4.20
	2000-600	3	0.99	1.29	2.16	0.89	3.77
	1963-1626 & 941-771	4	0.99	1.09	1.75	0.94	2.94
Καλέντουλα	4000-600	4	0.99	0.88	1.53	0.93	3.05
	3200-2700 & 2000-600	7	0.99	0.49	1.58	0.93	3.01
	2000-600	3	0.99	1.05	1.52	0.90	3.31
	1508-1396 & 1167-1055	4	0.99	0.69	0.94	0.97	3.00
Κάρθαμος	4000-600	4	0.99	1.11	1.69	0.80	5.16
	3200-2700 & 2000-600	4	0.99	1.12	1.28	0.86	4.19
	2000-600	5	0.99	0.88	1.34	0.90	3.51
	1539-1456 & 858-773	5	0.99	0.70	1.11	0.96	2.22
Κουρκουμάς	4000-600	4	0.99	0.72	1.39	0.98	2.11
	3200-2700 & 2000-600	3	0.99	0.79	1.47	0.98	1.68
	2000-600	3	0.99	0.82	1.53	0.98	1.64
	1624-1286 & 941-771	4	0.99	0.57	1.26	0.99	1.44
Εκχ. βουδλίας	4000-600	6	0.99	0.38	1.29	0.99	1.84
	3200-2700 & 2000-600	6	0.99	0.41	1.21	0.99	1.80
	2000-600	6	0.99	0.43	1.20	0.99	1.86
	1624-1456 & 941-771	3	0.99	0.69	1.23	0.99	1.45
Εκχ. γαρδένιας	4000-600	3	0.99	0.57	0.97	0.99	1.19
	3200-2700 & 2000-600	3	0.99	0.63	1.05	0.99	1.19

2000-600	3	0.99	0.62	1.01	0.99	1.13
1794-1626 & 1113-943	3	0.99	0.62	1.01	0.99	1.12

LV: λανθάνουσες μεταβλητές, r_c : συντελεστής συσχέτισης για τη βαθμονόμηση, r_{cv} : συντελεστής συσχέτισης για τη διασταυρωμένη επικύρωση. RMSEC, RMSEP, RMSECV: τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης, πρόβλεψης και διασταυρωμένης επικύρωσης, αντίστοιχα. Τα μοντέλα που επιλέχθηκαν με βάση την επιλογή του βέλτιστου υποσυνόλου μεταβλητών, όπως προέκυψε με τη μέθοδο siPLS, υποδεικνύονται με έντονη γραφή.



Σχήμα 4.12. Συνδυασμοί διαστημάτων φασματοσκοπικών δεδομένων DRIFTS που επιλέχθηκαν με τη μέθοδο siPLS και εξασφάλισαν τη βέλτιστη επίδοση στα μοντέλα PLS για την ποσοτικοποίηση (α) των στημόνων κρόκου, (β) της καλέντουλας, (γ) του κάρθαμου, (δ) του κουρκουμά, (ε) του εκχυλίσματος βουδλίας και (στ) του εκχυλίσματος γαρδένιας στα αντίστοιχα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου.

Σε γενικές γραμμές, τα μοντέλα siPLS/PLS εμφάνισαν βελτιωμένη προβλεπτική ικανότητα σε σχέση με τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας δεδομένα από διαφορετικές φασματικές περιοχές. Επίσης, ο συντελεστής συσχέτισης για την πρόβλεψη (r_v) βρέθηκε να είναι 0.98 για το μοντέλο ποσοτικοποίησης των στημόνων κρόκου και 0.99 για τα μοντέλα όλων των άλλων φυτικών υλικών. Παρά το γεγονός ότι, για την περίπτωση του εκχυλίσματος γαρδένιας, το μοντέλο PLS που βασίστηκε σε ολόκληρη την φασματική περιοχή παρείχε συγκρίσιμα αποτελέσματα με το μοντέλο siPLS/PLS. Το τελευταίο, όμως, φαίνεται να περιέχει τις πιο σχετικές πληροφορίες, βοηθώντας έτσι στη φασματοσκοπική ερμηνεία.

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκαν με τη χρήση ενός νέου εκτιμητή, συμβατού με τον υπολογισμό κατά IUPAC, που υιοθετεί τη μορφή ενός διαστήματος ανίχνευσης [68]. Οι κατώτερες και ανώτερες τιμές του διαστήματος LOD για κάθε υλικό νόθευσης, όπως εκτιμήθηκαν από τα αντίστοιχα μοντέλα siPLS/PLS, παρατίθενται στον Πίνακα 4.12. Επιπλέον, έγινε ο υπολογισμός της αναλυτικής ευαισθησίας (γ) για καθένα από τα επιλεγμένα μοντέλα. Το αντίστροφο του γ (γ^{-1}) παρέχει μία εκτίμηση της ελάχιστης διαφοράς στη συγκέντρωση που μπορεί να διακρίνει κάθε μοντέλο siPLS/PLS, λαμβάνοντας υπόψη τον τυχαίο θόρυβο του οργάνου ως τη μόνη πηγή σφάλματος [69]. Οι τιμές που υπολογίστηκαν κυμαίνονται από 0.2 έως 0.6% (w/w), όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.12.

Πίνακας 4.12. Σύγκριση των ορίων ανίχνευσης και των τιμών αναλυτικής ευαισθησίας που προέκυψαν για κάθε υλικό νοθείας μέσω siPLS/PLS, σε εύρος συγκεντρώσεων 0-20% (w/w).

Υλικό νοθείας	<i>l</i>	LOD [min-max] (%)	γ (1/%)	γ^{-1} (%)
Στήμονες κρόκου	27	2.2-3.1	1.8	0.5
Καλέντουλα	28	1.9-2.6	1.9	0.5
Κάρθαμος	26	2.1-2.8	1.8	0.6
Κουρκουμάς	28	1.0-1.6	4.0	0.2
Εκχ. βουδλίας	28	1.1-1.6	3.7	0.3
Εκχ. γαρδένιας	28	1.1-1.5	4.2	0.2

l: αριθμός δειγμάτων βαθμονόμησης, LOD: όριο ανίχνευσης που υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στην αναφορά [68], γ : αναλυτική ευαισθησία και γ^{-1} : αντίστροφο του γ .

Συγκρίνοντας τις τιμές LOD που προσδιορίστηκαν από τα αντίστοιχα μοντέλα siPLS/PLS για την καλέντουλα (1.9-2.6% w/w), τον κάρθαμο (2.1-2.8% w/w) και τον κουρκουμά (1.0-1.6% w/w) με εκείνες που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη [17] χρησιμοποιώντας HPLC με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων ή ESI/MS, οι οποίες ήταν 5% (w/w) για την καλέντουλα ή τον κάρθαμο και 2% (w/w) για τον κουρκουμά, συμπεραίνεται ότι η παρούσα προσέγγιση μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση φυτικών υλικών νοθείας σε συγκρίσιμα ή ακόμη χαμηλότερα επίπεδα. Επισημαίνεται, επομένως, η θετική συμβολή της προκατεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων και της επιλογής μεταβλητών στην ευαισθησία και τη συνολική βελτίωση των μοντέλων PLS.

4.3.3. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον των παραγωγών, των εμπόρων και των καταναλωτών για την αυθεντικότητα πολύτιμων προϊόντων, όπως είναι τα στίγματα του κρόκου, καθιστά επιτακτική την ανάγκη για αναλυτικές μεθόδους υψηλής απόδοσης που επιτρέπουν με πρακτικό τρόπο τον άμεσο έλεγχο πιθανών νοθεύσεων. Μόλις ανιχνεύεται η νοθεία και προσδιορίζεται το υλικό νοθείας, απαιτείται επίσης σαφής εκτίμηση του επιπέδου νοθείας.

Επιδίωξη της παρούσας μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μια απλή και ευέλικτη προσέγγιση για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό έξι χαρακτηριστικών υλικών που ενδέχεται να χρησιμοποιούνται για τη νόθευση των στιγμάτων κρόκου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική DRIFTS, η οποία είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα, ενώ απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία και ποσότητα δείγματος (περίπου 4 mg). Με τα φασματοσκοπικά δεδομένα που παραλήφθηκαν έγινε η ανάπτυξη γραμμικών μοντέλων πολυμεταβλητής ταξινόμησης και βαθμονόμησης, τα οποία βελτιστοποιήθηκαν με τεχνικές για την προκατεργασία των δεδομένων, το διαχωρισμό δειγμάτων σε σύνολα βαθμονόμησης (εκπαίδευσης) και ελέγχου, καθώς και για την επιλογή μεταβλητών. Τα βελτιστοποιημένα μοντέλα siPLS/PLS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτικών υλικών νοθείας παρουσίασαν συγκρίσιμα ή ακόμη χαμηλότερα όρια ανίχνευσης σε σχέση με αυτά που έχουν αναφερθεί για υγροχρωματογραφικές μεθόδους.

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε, μέσω μιας διαδικασίας τριών βημάτων, επιβεβαιώνει την πρακτική καταλληλότητα της τεχνικής DRIFTS σε συνδυασμό με χημειομετρική ανάλυση ως μια πράσινη, εναλλακτική λύση που θα μπορούσε να έχει ιδιαίτερη απήχηση από οικονομική άποψη για την ταχεία αξιολόγηση της νοθείας των στιγμάτων του κρόκου με υλικά φυτικής προέλευσης. Με την παρούσα προσέγγιση θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η διαλογή μεγάλων εμπορικών παρτίδων ελληνικού προϊόντος, ενώ με περαιτέρω μελέτη θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί η χρήση της για τον έλεγχο αυθεντικότητας δειγμάτων από στίγματα κρόκου διαφορετικών κατηγοριών κατά ISO ή διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

4.4. Βιβλιογραφία

- [1] Cubero-Leon, E., Peñalver, R., Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Res. Int.* 60, 95–107.
- [2] Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Martín-Belloso, O. (2013). Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food. *Food Res. Int.* 54, 1172–1183.
- [3] Moore, J.C., Spink, J., Lipp, M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 77, 118–126.
- [4] Melnyk, J.P., Wang, S., Marcone, M.F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: saffron. *Food Res. Int.* 43, 1981–1989.
- [5] Winterhalter, P., Straubinger, M. (2000). Saffron - Renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.* 16, 39–59.
- [6] Kyriakoudi, A., Ordoudi, S.A., Roldán-Medina, M., Tsimidou, M.Z. (2015). Saffron, a functional spice. *Austin J. Nutri. Food Sci.* 3, 1059.
- [7] Hagh-Nazari, S., Keifi, N. (2007). Saffron and various fraud manners in its production and trades. *Acta Hort.* 739, 411–416.
- [8] 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, 126–131.
- [9] Saffron in Europe, White Book (2007). http://www.europeansaffron.eu/archivos/White_book_english.pdf (τελευταία πρόσβαση: 01.10.16).
- [10] Sánchez, A.M., Maggi, L., Carmona, M., Alonso, G.L. (2011). Authentication of saffron spice (*Crocus sativus* L.). In S.E. Ebeler et al. (Eds.), *Progress in authentication of food and wine. ACS symposium series* (Vol. 1081, pp. 309–331). Washington, DC: American Chemical Society.
- [11] Ordoudi, S.A., Tsimidou, M.Z. (2004). Saffron quality: Effect of agricultural practices, processing and storage. In R. Dris & S.M. Jain (Eds.), *Production practices and quality assessment of food crops* (Vol. 1, pp. 209–260). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- [12] Soffritti, G., Busconi, M., Sánchez, R.A., Thiercelin, J.-M., Polissiou, M., Roldán, M., Fernández, J.A. (2016). Genetic and epigenetic approaches for the possible detection of adulteration and auto-adulteration in saffron (*Crocus sativus* L.) spice. *Molecules* 21, 343.
- [13] Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A.M., Novella, J.L., Alonso, G.L. (2006). 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. *J. Agric. Food Chem.* 54, 973–979.
- [14] Liao, Y.-H., Houghton, P.J., Hoult, J.R.S. (1999). Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J. Nat. Prod.* 62, 1241–1245.
- [15] ISO (2010). *International standard ISO 3632-2: Saffron (Crocus sativus L.) test methods*. Geneva: The International Organization for Standardization.
- [16] ISO (2011). *International standard ISO 3632-1: Saffron (Crocus sativus L.) specification*. Geneva: The International Organization for Standardization.
- [17] Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M., Belligno, A., Traulo, P., Gagliano, G. (2011). HPLC/PDA/ESI-MS evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1873–1876.
- [18] Javanmardi, N., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Sharifi, A., Hemati Kakhki, A. (2011). Identification of safflower as a fraud in commercial saffron using RAPD/SCAR marker. *J. Cell Mol. Res.* 3, 31–37.
- [19] 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. *J. Agric. Food Chem.* 60, 10998–11004.
- [20] Zhao, M., Shi, Y., Wu, L., Guo, L., Liu, W., Xiong, C., Yan, S., Sun, W., Chen, S. (2016). Rapid authentication of the precious herb saffron by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence. *Sci. Rep.* 6, 25370.
- [21] Jiang, C., Cao, L., Yuan, Y., Chen, M., Jin, Y., Huang, L. (2014). Barcoding melting curve analysis for rapid, sensitive, and discriminating authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) from its adulterants. *BioMed Res. Int.* 2014, Article ID 809037.
- [22] 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, 323–328.
- [23] Ma, X.Q., Zhu, D.Y., Li, S.P., Dong, T.T.X., Tsim, K.W.K. (2001). Authentic identification of stigma croci (stigma of *Crocus sativus*) from its adulterants by molecular genetic analysis. *Planta Med.* 67, 183–186.
- [24] Sampathu, S.R., Shivashankar, S., Lewis, Y.S., Wood, A.B. (1984). Saffron (*Crocus sativus* Linn.) - Cultivation, processing, chemistry and standardization. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 20, 123–157.

- [25] Alonso, G.L., Salinas, M.R., Garijo, J. (1998). Method to determine the authenticity of aroma of saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Food Prot.* 61, 1525–1528.
- [26] Haghighi, B., Feizy, J., Hemati Kakhki, A. (2007). LC Determination of adulterated saffron prepared by adding styles colored with some natural colorants. *Chromatographia* 66, 325–332.
- [27] Lozano, P., Castellar, M.R., Simancas, M.J., Iborra, J.L. (1999). Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *J. Chromatogr. A* 830, 477–483.
- [28] Heidarbeigi, K., Mohtasebi, S.S., Foroughirad, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Rafiee, S., Rezaei, K. (2015). Detection of adulteration in saffron samples using electronic nose. *Int. J. Food Prop.* 18, 1391–1401.
- [29] Longobardi, F., Ventrella, A., Bianco, A., Catucci, L., Cafagna, I., Gallo, V., Mastroilli, P., Agostiano, A. (2013). Non-targeted ^1H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries. *Food Chem.* 141, 3028–3033.
- [30] Mannina, L., Sobolev, A., Viel, S. (2012). Liquid state ^1H high field NMR in food analysis. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 66, 1–39.
- [31] Yilmaz, A., Nyberg, N.T., Mølgaard, P., Asili, J., Jaroszewski, J.W. (2010). ^1H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts. *Metabolomics* 6, 511–517.
- [32] Consonni, R., Cagliani, L.R. (2010). Nuclear magnetic resonance and chemometrics to assess geographical origin and quality of traditional food products. In S.L. Taylor (Ed.), *Advances in food and nutrition research* (Vol. 59, pp. 87–165). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Inc.
- [33] Tomassini, A., Capuani, G., Delfini, M., Miccheli, A. (2013). NMR-based metabolomics in food quality control. In F. Marini (Ed.), *Chemometrics in food chemistry. Data handling in science and technology* (Vol. 28, pp. 411–447). Oxford, UK: Elsevier B.V.
- [34] Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J.K., Holmes, E., Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemom.* 20, 341–351.
- [35] Consonni, R., Cagliani, L.R., Cogliati, C. (2012a). NMR based geographical characterization of roasted coffee. *Talanta* 88, 420–426.
- [36] Consonni, R., Cagliani, L.R., Cogliati, C. (2012b). NMR Characterization of saccharides in Italian honeys of different floral sources. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4526–4534.
- [37] Consonni, R., Cagliani, L.R., Cogliati, C. (2013). Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. *Food Control* 32, 543–548.

- [38] Consonni, R., Cagliani, L.R., Stocchero, M., Porretta, S. (2009). Triple concentrated tomato paste: Discrimination between Italian and Chinese products. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4506–4513.
- [39] Consonni, R., Cagliani, L.R., Stocchero, M., Porretta, S. (2010). Evaluation of the production year in Italian and Chinese tomato paste for geographical determination using O2PLS models. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7520–7525.
- [40] Fotakis, C., Christodouleas, D., Kokkotou, K., Zervou, M., Zoumpoulakis, P., Moulos, P., Liouni, M., Calokerinos, A. (2013). NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits. *Food Chem.* 138, 1837–1846.
- [41] Karoui, R., Downey, G., Blecker, C. (2010). Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships - A review. *Chem. Rev.* 110, 6144–6168.
- [42] Talpur, M.Y., Kara, H., Sherazi, S.T.H., Ayyildiz, H.F., Topkafa, M., Arslan, F.N., Naz, S., Durmaz, F., Sirajuddin. (2014). Application of multivariate chemometric techniques for simultaneous determination of five parameters of cottonseed oil by single bounce attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta* 129, 473–480.
- [43] Cozzolino, D. (2015). The role of vibrational spectroscopy as a tool to assess economically motivated fraud and counterfeit issues in agricultural products and foods. *Anal. Methods* 7, 9390–9400.
- [44] Lohumi, S., Lee, S., Lee, H., Cho, B.-K. (2015). A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 85–98.
- [45] Rooney, J.S., McDowell, A., Strachan, C.J., Gordon, K.C. (2015). Evaluation of vibrational spectroscopic methods to identify and quantify multiple adulterants in herbal medicines. *Talanta* 138, 77–85.
- [46] Ellis, D.I., Muhamadali, H., Haughey, S.A., Elliott, C.T., Goodacre, R. (2015). Point-and-shoot: rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis – moving out of the laboratory and into the food supply chain. *Anal. Methods* 7, 9401–9414.
- [47] Reis, N., Franca, A.S., Oliveira, L.S. (2013). Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics. *Talanta* 115, 563–568.
- [48] Saltas, D., Pappas, C.S., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. (2013). Direct determination of rosmarinic acid in Lamiaceae herbs using diffuse reflectance infrared

- Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3235–3241.
- [49] Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C.P., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G. (2010). Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 571–577.
- [50] 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 Chem.* 150, 414–421.
- [51] Consonni, R., Ordoudi, S.A., Cagliani, L.R., Tsiangali, M., Tsimidou, M.Z. (2016). On the traceability of commercial saffron samples using $^1\text{H-NMR}$ and FT-IR metabolomics. *Molecules* 21, 286.
- [52] Karimi, S., Feizy, J., Mehrjo, F., Farrokhnia, M. (2016). Detection and quantification of food colorant adulteration in saffron sample using chemometric analysis of FT-IR spectra. *RSC Adv.* 6, 23085–23093.
- [53] Chen, J.-B., Zhou, Q., Sun, S.-Q. (2016). Adulteration screening of botanical materials by a sensitive and model-free approach using infrared spectroscopic imaging and two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 1124, 262–267.
- [54] Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E.J., Edlund, U., Shockcor, J.P., Gottfries, J., Moritz, T., Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem.* 80, 115–122.
- [55] Saladini, M., Lazzari, S., Pignedoli, F., Rosa, R., Spagnolo, F., Ferrari, E. (2009). New synthetic glucosyl-curcuminoids, and their ^1H and ^{13}C NMR characterization, from *Curcuma longa* L. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 224–229.
- [56] Kennard, R.W., Stone, L.A. (1969). Computer aided design of experiments. *Technometrics* 11, 137–148.
- [57] Daszykowski, M., Walczak, B., Massart, D.L. (2002). Representative subset selection. *Anal. Chim. Acta* 468, 91–103.
- [58] Craig, A.P., Franca, A.S., Oliveira, L.S., Irudayaraj, J., Ileleji, K. (2014). Application of elastic net and infrared spectroscopy in the discrimination between defective and non-defective roasted coffees. *Talanta* 128, 393–400.
- [59] Ballabio, D., Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. PLS-DA. *Anal. Methods* 5, 3790–3798.

- [60] Snee, R.D. (1977). Validation of regression models: methods and examples. *Technometrics* 19, 415–428.
- [61] Westad, F., Marini, F. (2015). Validation of chemometric models – a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 893, 14–24.
- [62] Nørgaard, L. (2004). The iToolbox for MATLAB, KVL, Denmark. <http://www.models.life.ku.dk> (τελευταία πρόσβαση: 01.10.16).
- [63] Andersen, C.M., Bro, R. (2010). Variable selection in regression—a tutorial. *J. Chemom.* 24, 728–737.
- [64] Ballabio, D. (2015). A MATLAB toolbox for principal component analysis and unsupervised exploration of data structure. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 149, 1–9.
- [65] 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. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 54, 651–657.
- [66] Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts.* (3rd ed.). England: John Wiley & Sons Ltd.
- [67] Dhakal, S., Chao, K., Schmidt, W., Qin, J., Kim, M., Chan, D. (2016). Evaluation of turmeric powder adulterated with metanil yellow using FT-Raman and FT-IR spectroscopy. *Foods* 5, 36.
- [68] Allegrini, F., Olivieri, A.C. (2014). IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Anal. Chem.* 86, 7858–7866.
- [69] Silva, M.A.M., Ferreira, M.H., Braga, J.W.B., Sena, M.M. (2012). Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. *Talanta* 89, 342–351.

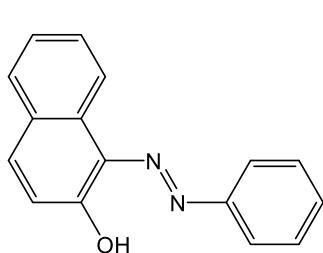
5. Έλεγχος νοθείας των σιγμάτων κρόκου με χρωστικές Sudan μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR

5.1. Εισαγωγή

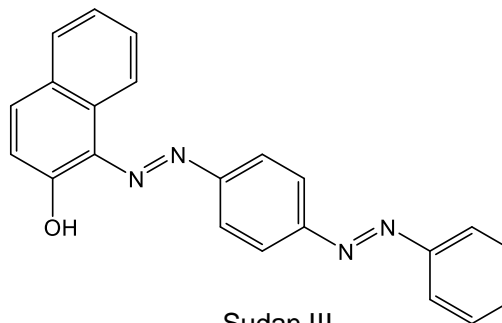
Οι χρωστικές ουσίες Sudan αποτελούν μια οικογένεια λιπόφιλων συνθετικών αζωχρωμάτων με ευρεία βιομηχανική χρήση για το χρωματισμό προϊόντων όπως υφάσματα, πλαστικά, κηροί και γυαλιστικά. Ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο έχει χαρακτηρίσει τις ερυθρές χρωστικές Sudan I-IV ως καρκινογόνες ουσίες της Ομάδας 3 [1], ενώ έχει επίσης φανεί πως ο μεταβολισμός τους στον άνθρωπο οδηγεί στο σχηματισμό καρκινογόνων αρωματικών αμινών, ως αποτέλεσμα της δράσης βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας ή των αντιδράσεων οξειδωσης που καταλύουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 στο ήπαρ [2]. Η χρήση των χρωστικών αυτών στα τρόφιμα δεν είναι εγκεκριμένη στις περισσότερες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ευρωπαϊκής Ένωσης [3]. Ωστόσο, από την πρώτη εκτενή αναφορά για την παρουσία χρωστικών Sudan σε τσίλι και προϊόντα τσίλι που έγινε το 2003, έχουν ακολουθήσει πολυάριθμες κοινοποιήσεις στο σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης της ΕΕ για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (RASFF) [4]. Με βάση τις αναφορές αποδεικνύεται ακόμη και σήμερα η παράνομη παρουσία των χρωστικών αυτών ουσιών σε μια σειρά τροφίμων, όπου συμπεριλαμβάνεται το άρτυμα των σιγμάτων κρόκου (saffron).

Τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα του φυτού κρόκος (*Crocus sativus* L.) υπόκεινται εδώ και αιώνες σε διάφορους τύπους νοθείας και συνεχίζουν να παραμένουν βασικός υποψήφιος στόχος, λόγω της υψηλής εμπορικής τους αξίας και των περιορισμών που υφίστανται για την παραγωγή τους [5,6]. Ένας από τους συνηθέστερους τρόπους που συντελείται η οικονομική απάτη για τα στίγματα κρόκου είναι η προσθήκη συνθετικών χρωστικών ουσιών. Για το λόγο αυτό, ο ποιοτικός έλεγχος των σιγμάτων κρόκου περιλαμβάνει την ανίχνευση και τον προσδιορισμό χρωστικών που είναι ύποπτες ως πιθανά υλικά νοθείας. Κάποιες από αυτές θα μπορούσαν, παράλληλα, να αποτελέσουν απειλή για την ασφάλεια ενός ευεργετικού για την ανθρώπινη υγεία προϊόντος [7]. Κατά γενικό κανόνα οι τεχνητές χρωστικές ουσίες πρέπει να απουσιάζουν από τα στίγματα κρόκου, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του προτύπου ISO 3632 [8,9]. Ωστόσο, οι χρωματογραφικές μέθοδοι (π.χ. TLC, HPLC) που περιγράφονται [8] αφορούν

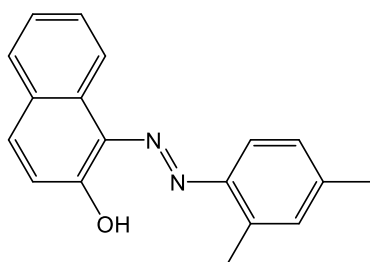
τον έλεγχο μόνο τεχνητών υδατοδιαλυτών όξιων χρωστικών και δεν εξετάζονται λιποδιαλυτές ενώσεις, όπως οι απαγορευμένες χρωστικές Sudan I-IV, που ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της εμφάνισης υποβαθμισμένων ή κατώτερης ποιότητας προϊόντων.



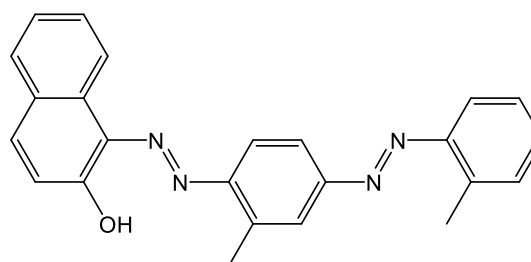
Sudan I
1-φαινυλαζω-2-ναφθόλη



Sudan III
1-[4-(φαινυλαζω)φαινυλαζω]-2-ναφθόλη



Sudan II
1-[(2,4-διμεθυλοφαινυλο)αζω]-2-ναφθόλη



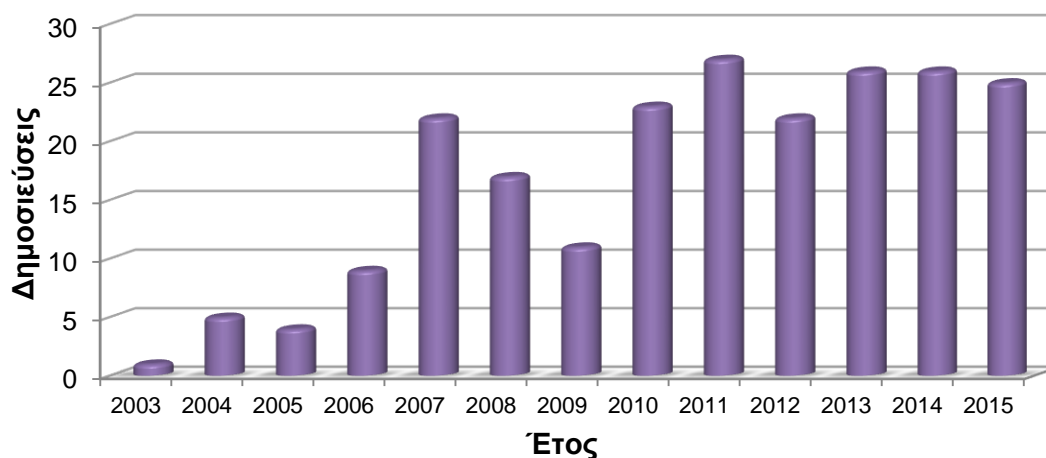
Sudan IV
1-[[2-μεθυλο-4-[(2-μεθυλοφαινυλο)αζω]φαινυλο]αζω]-2-ναφθόλη

Εικόνα 5.1. Δομές των χρωστικών Sudan I-IV.

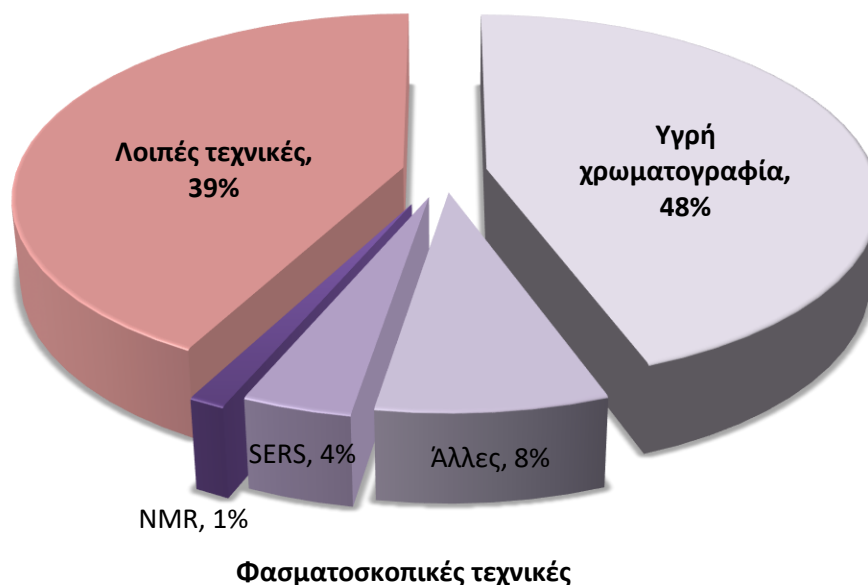
Η νοθεία των σιγμάτων κρόκου με συνθετικές χρωστικές ουσίες έχει αποτελέσει το αντικείμενο έρευνας σε σχετικά περιορισμένο αριθμό μελετών, οι οποίες δίνουν ιδιαίτερη έμφαση σε υδατοδιαλυτές χρωστικές όπως η ερυθροσίνη, το ερυθρό της κοχενίλης A (πονσώ 4R) και η ταρτραζίνη [10-14]. Η μόνη μέθοδος που είχε αναφερθεί μέχρι πρότινος για τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan στα σίγματα κρόκου βασίζεται στη μέθοδο εκχύλισης στο σημείο εκνέφωσης και τη χρήση υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μαζών (LC/MS) [15], ενώ μόλις πρόσφατα αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης

υποστρώματος και διαδοχικά υγροχρωματογραφική ανάλυση με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (HPLC/UV-Vis) [16].

Τα τελευταία χρόνια συνεχίζει να παρατηρείται μια σταθερή τάση ως προς τις έρευνες που διεξάγονται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan, κυρίως σε τσίλι, κάρυ και συναφή προϊόντα τροφίμων (Σχήμα 5.1). Η πλειοψηφία των αναλυτικών μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή UV-Vis, συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) ή MS (Σχήμα 5.2) [17,18]. Παρά τη μεγάλη ευαισθησία και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, οι μέθοδοι αυτές είναι συνήθως χρονοβόρες και προϋποθέτουν απαιτητική προκατεργασία του δείγματος. Προκειμένου να ξεπεραστούν τέτοια μειονεκτήματα, θα μπορούσαν να εφαρμοστούν φασματοσκοπικές τεχνικές που παρέχουν ταχύτητα, αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.



Σχήμα 5.1. Αριθμός δημοσιευμένων ερευνητικών εργασιών ανά έτος για τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan σε τρόφιμα. Το σύνολο των δημοσιεύσεων για την περίοδο 2003-2015 ξεπερνά τις 215. (Πηγές: βάσεις δεδομένων Scopus και PubMed)



Σχήμα 5.2. Δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες για τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan σε τρόφιμα με χρήση διάφορων αναλυτικών τεχνικών. Το σύνολο των δημοσιεύσεων για την περίοδο 2003-2015 ξεπερνά τις 215. (Πηγές: βάσεις δεδομένων Scopus και PubMed)

Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει την αποτελεσματικότητα φασματοσκοπικών τεχνικών, όπως η φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) [19,20], εγγύς υπερύθρου [21], Raman [22] και UV-Vis [23], για την εκτίμηση παραμέτρων ποιότητας και αυθεντικότητας των σιγμάτων κρόκου. Η φασματοσκοπία UV-Vis αποτελεί βασική αναλυτική τεχνική για τον ποιοτικό έλεγχο του προϊόντος και όπως φάνηκε, με βάση αποτελέσματα έρευνας [24], μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση χρωστικών ουσιών Sudan στα σίγματα κρόκου. Ωστόσο, η ευαισθησία που παρέχει είναι σχετικά χαμηλή, καθώς η ανιχνεύσιμη νοθεία είναι 5 g/kg για τα Sudan I και II και 2 g/kg για τα Sudan III και IV, αντίστοιχα. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη έδειξε πως νοθευμένα δείγματα σιγμάτων κρόκου με ελάχιστη περιεκτικότητα σε Sudan II 5 g/kg μπορούν, μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR και χημειομετρικών τεχνικών, να διαφοροποιηθούν από τα αυθεντικά δείγματα ή από δείγματα που περιέχουν άλλες χρωστικές ουσίες σε αντίστοιχο επίπεδο νοθείας [25].

Όσον αφορά στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), οι πρώτες εφαρμογές είχαν απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση της δομής απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών από εκχυλίσματα στιγμάτων κρόκου [26-31]. Έκτοτε, αρκετές μεταβολομικές προσεγγίσεις με χρήση NMR έχουν αναφερθεί [32-37], αναδεικνύοντας τη σπουδαιότητα της τεχνικής για τον έλεγχο ποιότητας και αυθεντικότητας των στιγμάτων κρόκου. Επιπλέον, πρόσφατα αποδείχθηκε η χρησιμότητα της φασματοσκοπίας ^1H NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας σε συνδυασμό με μεθόδους πολυμεταβλητής ταξινόμησης για την ανίχνευση νοθείας με τις χρωστικές Sudan I-IV σε διάφορα καρυκεύματα, συμπεριλαμβανομένου του κουρκουμά, του κάρυ και της πάπρικας [38,39].

Η φασματοσκοπία NMR πρωτονίου (^1H NMR), τελευταία, έχει προσελκύσει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον ως ένα αποτελεσματικό εργαλείο ποσοτικής ανάλυσης [40-42]. Η πρόσφατη ανάπτυξη φασματομέτρων NMR με μαγνήτες υψηλού πεδίου, καθώς και οι εξελίξεις στην κρυογενική τεχνολογία (π.χ. CryoProbes) έχουν επιτρέψει τον ποσοτικό προσδιορισμό πολυάριθμων ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με υψηλή ακρίβεια και πιστότητα [40-42]. Καθώς το ολοκλήρωμα ενός σήματος NMR είναι ευθέως ανάλογο του αριθμού των αντίστοιχων πρωτονίων, η ποσοτικοποίηση του υπό εξέταση μορίου μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα με τη χρήση μιας ουσίας αναφοράς και στη συνέχεια υπολογίζοντας το λόγο των ολοκληρωμάτων. Η μη αναγκαιότητα για απομόνωση και καθαρισμό του εκάστοτε μορίου και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης χρησιμοποιώντας μόνο ένα καλά διαχωρισμένο σήμα αποτελούν βασικά πλεονεκτήματα του ποσοτικού προσδιορισμού με ^1H NMR (qHNMR). Με βάση τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, η δυνατότητα του qHNMR για τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan σε καρυκεύματα και άλλα τρόφιμα δεν έχει διερευνηθεί.

Η μελέτη αυτή είχε ως στόχο την ανάπτυξη μια απλής, γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan I-IV στα στίγματα κρόκου με τη χρήση φασματοσκοπίας ^1H NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Στο πλαίσιο αυτό προηγήθηκε η πλήρης αντιστοίχιση των ^1H και ^{13}C στα φάσματα NMR των χρωστικών Sudan I-IV, η οποία επιτεύχθηκε με εκτεταμένη χρήση ομοπυρηνικών (COSY, TOCSY) και ετεροπυρηνικών (HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY) πειραμάτων NMR δύο διαστάσεων. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ελέγχθηκε, ως αντιπροσωπευτικό παράδειγμα, η χρωστική Sudan III [2]. Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθοδολογίας qHNMR για την ποσοτικοποίηση του Sudan III σε νοθευμένα

δείγματα σιγμάτων κρόκου, λαμβάνοντας υπόψη επίπεδα νοθείας που μπορούν να επηρεάσουν ουσιαστικά την οπτική εικόνα του προϊόντος, χωρίς να απαιτείται πολύπλοκη προετοιμασία των δειγμάτων.

5.2. Πειραματικό μέρος

5.2.1. Προμήθεια υλικών και χημικών αντιδραστηρίων

Ένα αυθεντικό ελληνικό δείγμα σιγμάτων κρόκου (εσοδείας 2012) της εμπορικής κατηγορίας I, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του προτύπου ISO 3632 [9], παραχωρήθηκε από το Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Η προμήθεια της πρότυπης ουσίας Sudan I (καθαρότητα $\geq 95\%$) πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), ενώ οι χρωστικές Sudan II (90%) και Sudan IV ($\geq 80\%$) προμηθεύθηκαν από την εταιρεία Aldrich (Steinheim, Germany). Η προμήθεια της χρωστικής Sudan III (καθαρότητα αναλυτικού προτύπου $\geq 96\%$, βάσει ανάλυσης με HPLC) έγινε από την εταιρεία Fluka (Steinheim, Germany). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (99.96 atom % D) της εταιρείας Euriso-Top (Saclay, France).

5.2.2. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Για την παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης έγινε ακριβής ζύγιση ποσότητας 4.0 mg του προτύπου Sudan III και ακολούθησε διάλυση σε 1 mL CDCl_3 . Το διάλυμα παρακαταθήκης, αφού σφραγίστηκε με πώμα και φιλμ παραφίνης (parafilm), αποθηκεύτηκε στους 4 °C απουσία φωτός. Στη συνέχεια προετοιμάστηκε διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 0.36 mg/mL με λήψη και αραίωση τμήματος του διαλύματος παρακαταθήκης σε CDCl_3 .

5.2.3. Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των εμβολιασμένων δειγμάτων έγινε με προσθήκη του διαλύματος εργασίας του Sudan III στο επιλεγμένο δείγμα σιγμάτων κρόκου, πρώτα σε επίπεδα περιεκτικότητας 1.4, 3.6 και 7.1 g/kg [38,39] και έπειτα στις συγκεντρώσεις 0.14, 0.36 και 0.71 g/kg. Τα τρία τελευταία επίπεδα νοθείας χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η ευαισθησία της μεθόδου ποσοτικοποίησης με ^1H NMR. Όλα τα επίπεδα νοθείας βρίσκονται εντός του εύρους συγκεντρώσεων για τα νοθευμένα αρτύματα, όπως επισημαίνεται από την ASTA [44]. Για τη λήψη των φασμάτων NMR, ζυγίστηκε με ακρίβεια ποσότητα 10 mg σιγμάτων κρόκου, καθαρών χρωστικών Sudan I-IV και εμβολιασμένων δειγμάτων με Sudan III, ενώ ακολούθησε προσθήκη όγκου 600 μL CDCl_3 σε κάθε δείγμα και στη συνέχεια έντονη ανάδευση με χρήση vortex για 3 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 10 λεπτά, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12,100 g για διάρκεια 10 λεπτών και στη συνέχεια όγκος 500 μL από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωλήνα NMR των 5 mm. Η ανάλυση με NMR ακολούθησε αμέσως μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, έτσι ώστε να αποφευχθεί πιθανή εξάτμιση του διαλύτη.

5.2.4. Φασματοσκοπική ανάλυση με NMR

Όλα τα πειράματα NMR διεξήχθησαν σε φασματόμετρο Avance 600 MHz (14.09 T) της εταιρείας Bruker (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Karlsruhe, Germany), με χρήση αισθητήρα αντίστροφης ανίχνευσης διαμέτρου 5 mm, βαθμιδωτό πεδίο στον άξονα z (z-gradient) και σε θερμοκρασία 300 K.

5.2.4.1. Ποσοτικός προσδιορισμός με ^1H NMR (qHNMR)

Τα φάσματα ^1H NMR καταγράφηκαν με κριτήριο τη λήψη ποσοτικών αποτελεσμάτων, χρησιμοποιώντας μια σειρά παλμών 90° και συλλέγοντας 32 K (32,768) σημεία δεδομένων με 128 σαρώσεις ανά φάσμα, ενώ η καθυστέρηση επαναφοράς (relaxation delay) ήταν 40 s. Η ποσοτικοποίηση της χρωστικής Sudan III στα εκχυλίσματα των νοθευμένων δειγμάτων σε CDCl_3 , θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με μια προσέγγιση ποσοτικοποίησης βάσει γραμμομοριακότητας κατ' όγκο (Molarity). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται μια καμπύλη

βαθμονόμησης με ένα διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης κάποιας από τις χρωστικές Sudan, με την καταγραφή του φάσματος υπό τις ίδιες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για όλα τα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου. Στην παρούσα εργασία αυτό επιτεύχθηκε με χρήση του Sudan II. Επιπλέον, η υπολειπόμενη κορυφή πρωτονίου του διαλύτη λόγω του CHCl_3 (0.04%) στα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό σήμα αναφοράς, και η περιεκτικότητα σε Sudan III (καθαρότητα $\geq 96\%$) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση [42]:

$$W_{SIII} = \frac{I_{SIII}}{I_{std}} \times \frac{N_{std}}{N_{SIII}} \times \frac{M_{SIII}}{M_{std}} \times \frac{P_{std}}{P_{SIII}} \times W_{std} \quad (1)$$

όπου τα I , N , M , P και W συμβολίζουν την τιμή του ολοκληρώματος κορυφής, τον αριθμό των πρωτονίων που συμβάλλουν στο σήμα προς ολοκλήρωση, το μοριακό βάρος, την καθαρότητα και το βάρος του Sudan III ($SIII$) και του προτύπου αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε (std), αντίστοιχα. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας (g/kg) των νοθευμένων δειγμάτων σε Sudan III έγινε με χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Περιεκτικότητα (g/kg)} = \frac{W_{SIII} \times 1000}{W_{\text{δείγματος}}} \quad (2)$$

όπου $W_{\text{δείγματος}}$ είναι το βάρος του νοθευμένου δείγματος στιγμάτων κρόκου (0.010 g).

5.2.4.2. Φασματοσκοπία ^{13}C NMR

Τα φάσματα ^{13}C NMR των χρωστικών Sudan I-IV λήφθηκαν με 1024 σαρώσεις και 64 K (65,536) σημεία. Το φασματικό πλάτος ήταν 34,000 Hz και το πλάτος παλμού 11 μs (παλμός 90°), ενώ χρησιμοποιήθηκε η ακολουθία παλμών για αποσύζευξη αντίστροφης εισόδου (inverse-

gated decoupling) που περιλαμβάνεται στη βιβλιοθήκη της Bruker, ώστε να αποφευχθεί το ετεροπυρηνικό φαινόμενο Overhauser λόγω της αποσύζευξης πρωτονίων.

5.2.4.3. Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων

Για την αντιστοίχιση των σημάτων ^1H και ^{13}C στις χρωστικές Sudan I-IV λήφθηκαν δισδιάστατα ομοπυρηνικά και ετεροπυρηνικά φάσματα NMR συσχέτισης (DQF-COSY, TOCSY, HSQC, HMBC και HSQC-TOCSY). Τα φάσματα, γενικά, καταγράφηκαν σε φασματικό πλάτος 11 και 231 ppm, με συλλογή 2048 και 256 σημείων δεδομένων για το πρωτόνιο και τον άνθρακα, αντίστοιχα. Το κλείδωμα του σπιν για τα φάσματα TOCSY ορίστηκε στα 80 ms, με την σταθερά ετεροπυρηνικής σύζευξης στα 145 Hz.

5.2.4.4. Επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR

Για την επεξεργασία των φασμάτων NMR εφαρμόστηκε, αρχικά, εκθετικός συντελεστής στάθμισης με διεύρυνση γραμμής 0.3 (^1H) και 1.2 Hz (^{13}C), προκειμένου να βελτιωθεί ο λόγος σήματος προς θόρυβο (SNR). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε zero-filling στα 32 K (^1H) και 64 K (^{13}C), πριν από το μετασχηματισμό Fourier. Ακολούθησε η διόρθωση φάσης και βασικής γραμμής που εκτελέστηκε χειροκίνητα. Για τα φάσματα ^1H και ^{13}C χρησιμοποιήθηκε ως σήμα αναφοράς το υπολειπόμενο σήμα του διαλύτη στα 7.260 ppm και 77.16 ppm, αντίστοιχα. Η επεξεργασία όλων των φασματοσκοπικών δεδομένων υλοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού TOPSPIN 3.0 (Bruker BioSpin).

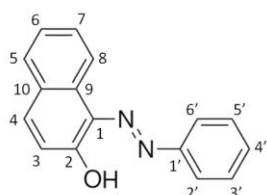
5.3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Τα φάσματα ^1H NMR των χρωστικών Sudan I-IV σε CDCl_3 έδειξαν ότι η πλειοψηφία των σημάτων εντοπίζεται στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, με μόνη εξαίρεση τα σήματα των μεθυλομάδων για τα Sudan II και IV, τα οποία εμφανίζονται στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων. Παρά το γεγονός ότι η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων περιλαμβάνει πλήθος σημάτων, ανάλογο της πολυπλοκότητας των επιμέρους μορίων, κατέστη δυνατή η πλήρης αντιστοίχιση των συντονισμών τόσο για τα πρωτόνια όσο και για τα άτομα άνθρακα. Τα αποτελέσματα για κάθε μία από τις χρωστικές Sudan I-IV παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, τα ομοπυρηνικά και ετεροπυρηνικά φάσματα NMR δύο διαστάσεων, τα οποία λήφθηκαν για όλες τις χρωστικές Sudan σε CDCl_3 . Η συνδυασμένη χρήση των φασμάτων που καταγράφηκαν από τα αντίστοιχα πειράματα HSQC, HMBC και HSQC-TOCSY διευκόλυνε την αποσαφήνιση της θέσης των πρωτονίων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκαν επικαλύψεις των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR (Σχήματα Π1-Π4, Παράρτημα II). Όλα τα αρωματικά πρωτόνια των χρωστικών Sudan I-IV συντονίζονται στη φασματική περιοχή μεταξύ 6.750 και 8.650 ppm. Όπως δείχνει το Σχήμα 5.3, το φάσμα ^1H NMR των στιγμάτων κρόκου δεν εμφανίζει κάποιο σημαντικό σήμα στη συγκεκριμένη περιοχή, επομένως εκεί θα μπορούσε να διεξαχθεί ο έλεγχος νοθείας με αρωματικές ενώσεις όπως οι χρωστικές Sudan.

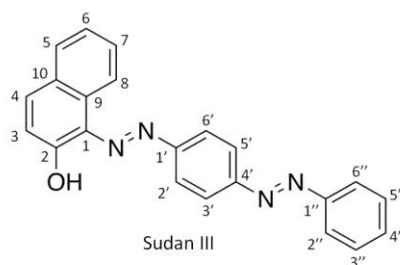
Επιπλέον, η μελέτη έδειξε ότι κάθε μία από τις χρωστικές Sudan I-IV είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί ξεχωριστά στα νοθευμένα δείγματα. Στο Σχήμα 5.3 επισημαίνονται συγκεκριμένοι συντονισμοί πρωτονίων για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κάθε μίας από τις χρωστικές. Για το Sudan I επιλέχθηκε το σήμα του πρωτονίου που βρίσκεται στη θέση 3 του μορίου και παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 6.870 ppm. Σημειώνεται ότι το σήμα που παρατηρείται για τα στίγματα κρόκου στην ίδια περιοχή του φάσματος ^1H NMR, όπως φαίνεται σε μεγέθυνση στο Σχήμα 5.3, αποδίδεται σε σήμα θορύβου. Όσον αφορά στο Sudan II, ξεχωρίζει το σήμα του πρωτονίου 8 στα 8.618 ppm, ενώ για το Sudan III επιλέχθηκε η διπλή κορυφή στα 8.064 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια 2' και 6' που αλληλεπικαλύπτονται. Στην περίπτωση του Sudan IV θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η διπλή κορυφή του πρωτονίου 6' στα 8.181 ppm.

Πίνακας 5.1. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C των συνθετικών χρωστικών Sudan I-IV σε διαλύτη CDCl_3 .

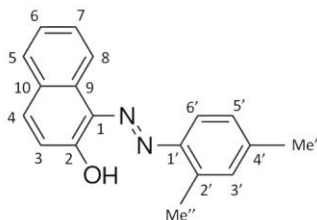
Άτομο	Sudan I		Sudan II		Sudan III		Sudan IV	
	^1H ppm	^{13}C ppm	^1H ppm	^{13}C ppm	^1H ppm	^{13}C ppm	^1H ppm	^{13}C ppm
1	-	130.22	-	130.57	-	131.14	-	131.66
2	-	171.99	-	170.57	-	175.66	-	176.47
3	6.870	124.95	6.925	124.64	6.818	125.73	6.810	125.90
4	7.713	140.20	7.724	139.41	7.719	141.61	7.690	141.62
5	7.598	128.76	7.619	128.69	7.583	129.01	7.554	129.36
6	7.393	125.86	7.391	125.55	7.421	126.58	7.401	126.57
7	7.552	129.00	7.557	128.81	7.549	129.41	7.561	128.97
8	8.564	121.87	8.618	121.72	8.547	122.22	8.537	122.12
9	-	133.75	-	133.72	-	133.61	-	133.56
10	-	128.21	-	128.09	-	128.45	-	128.32
1'	-	144.94	-	141.19	-	151.02	-	143.72
2'	7.738	118.74	-	137.97	8.064	124.80	-	150.92
3'	7.481	129.73	7.098	131.91	7.828	118.52	7.825	125.71
4'	7.304	127.57	-	129.74	-	146.00	-	128.38
5'	7.481	129.73	7.159	128.27	7.828	118.52	7.930	122.98
6'	7.738	118.74	7.966	116.00	8.064	124.80	8.181	116.13
1''	-	-	-	-	-	152.95	-	138.34
2''	-	-	-	-	7.945	123.06	-	151.00
3''	-	-	-	-	7.538	129.29	7.648	115.53
4''	-	-	-	-	7.486	131.20	7.275	126.52
5''	-	-	-	-	7.538	129.29	7.362	131.02
6''	-	-	-	-	7.945	123.06	7.349	131.42
Me'	-	-	2.377	21.34	-	-	2.602	17.71
Me''	-	-	2.527	17.71	-	-	2.747	17.76



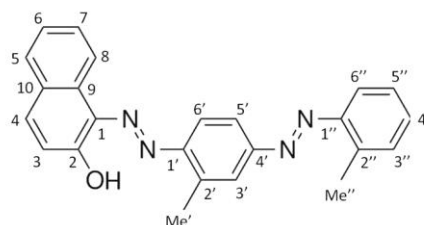
Sudan I



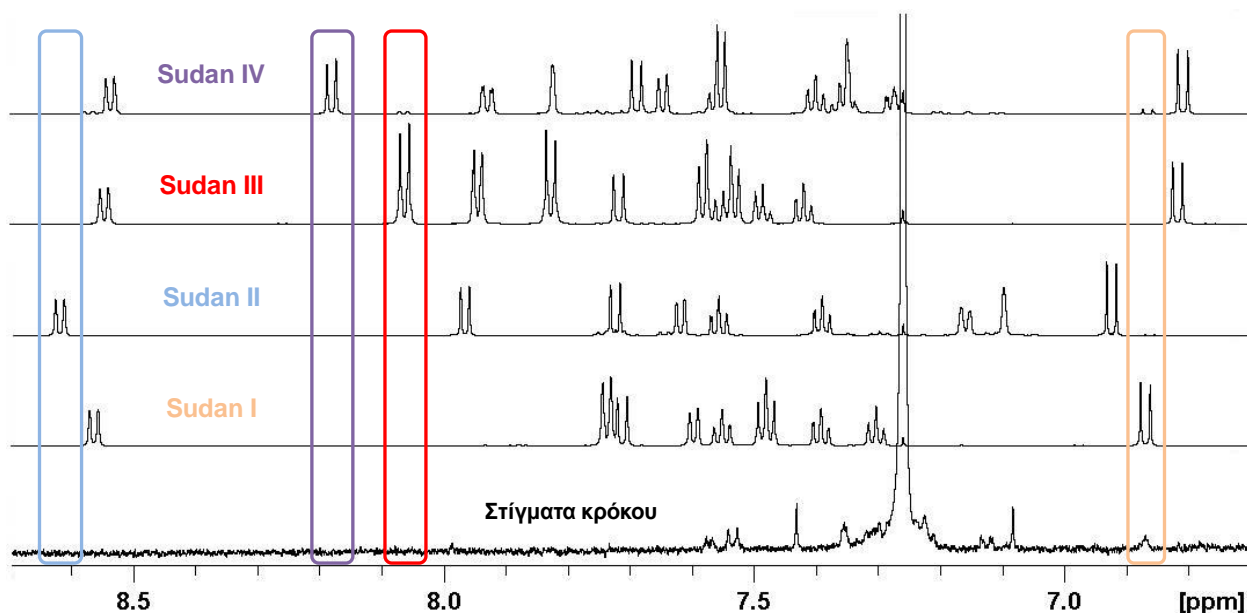
Sudan III



Sudan II



Sudan IV



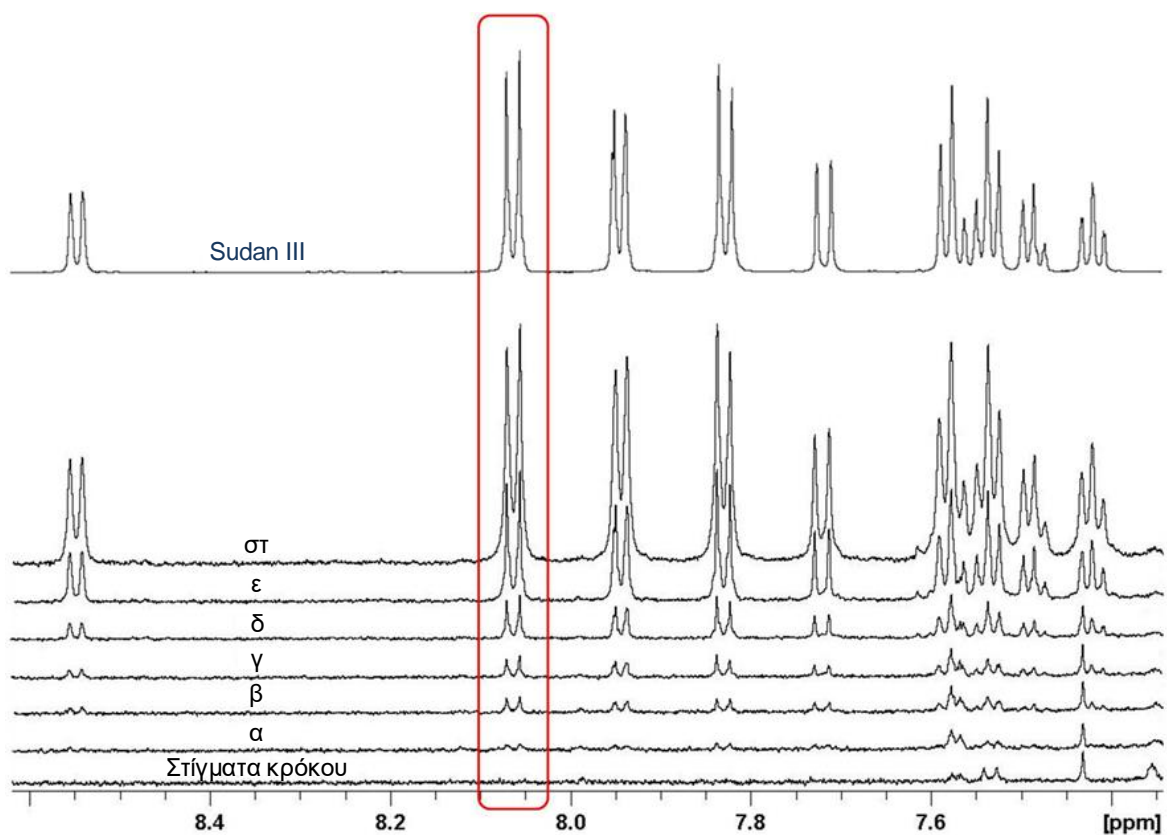
Σχήμα 5.3. Περιοχή των αρωματικών πρωτονίων στα φάσματα ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) των χρωστικών Sudan I-IV και των σιγμάτων κρόκου. Τα επιλεγμένα σήματα για την ταυτοποίηση των επιμέρους χρωστικών Sudan στα νοθευμένα δείγματα σιγμάτων κρόκου επισημαίνονται με πλαίσιο του αντίστοιχου χρώματος.

Για την ποσοτικοποίηση με τη μεθοδολογία qHNMR λήφθηκαν υπόψη οι βασικές απαιτήσεις ως προς την διαδικασία καταγραφής και επεξεργασίας των φασμάτων [42]. Το σημαντικότερο κριτήριο, δηλαδή η παρουσία ενός μη-επικαλυπτόμενου σήματος του μορίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί μέσω ολοκλήρωσης [45], καλύφθηκε για τουλάχιστον ένα σήμα στο αντίστοιχο φάσμα ^1H NMR κάθε χρωστικής Sudan, υποδεικνύοντας υψηλή ειδικότητα και εκλεκτικότητα.

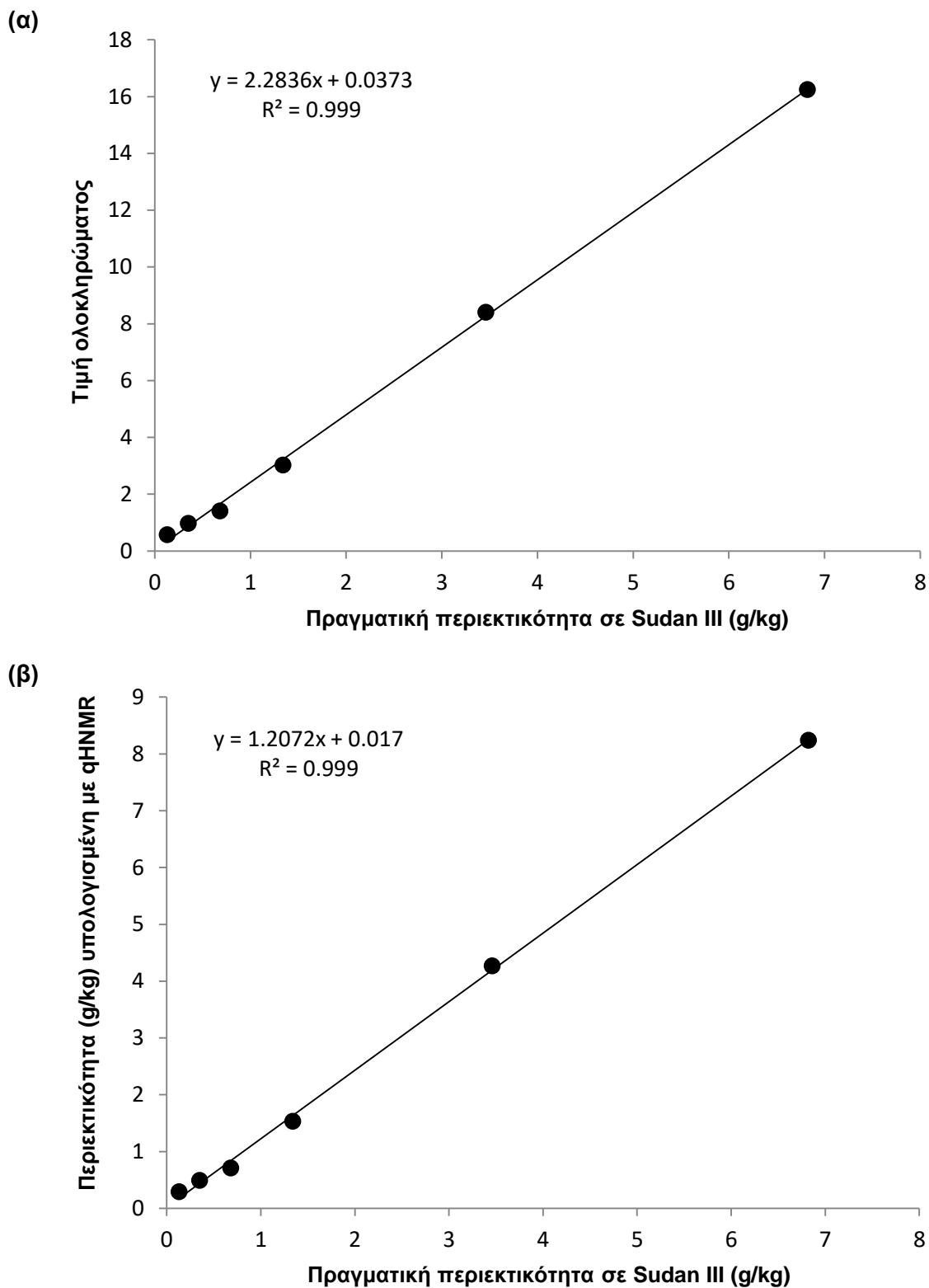
Για τον έλεγχο γραμμικότητας της μεθόδου ποσοτικοποίησης των χρωστικών Sudan στα νοθευμένα στίγματα κρόκου, χρησιμοποιήθηκε το Sudan III ως αντιπροσωπευτικό παράδειγμα. Πιο αναλυτικά, η παρουσία της χρωστικής ελέγχθηκε για εύρος νοθείας από 0.14 έως 7.1 g/kg, εξετάζοντας διαλύματα που περιείχαν το δείγμα σιγμάτων κρόκου εμβολιασμένο με το διάλυμα εργασίας του Sudan III σε έξι επίπεδα: 0.14, 0.36, 0.71, 1.4, 3.6 και 7.1 g/kg (Σχήμα 5.4). Η ποσοτικοποίηση του Sudan III διεξήχθη με βάση τη διπλή κορυφή στα 8.064 ppm που αντιπροσωπεύει δύο διφαινυλαζω-πρωτόνια [46], σε θέσεις 2' και 6'.

Η ολοκλήρωση του συγκεκριμένου σήματος πραγματοποιήθηκε για όλα τα εμβολιασμένα δείγματα σιγμάτων κρόκου με Sudan III, χρησιμοποιώντας ως αναφορά το υπολειπόμενο σήμα

του διαλύτη. Στο Σχήμα 5.5α απεικονίζεται η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε από τη συσχέτιση των τιμών ολοκλήρωσης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της χρωστικής. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 ήταν 0.999, επιβεβαιώνοντας έτσι την υψηλή αξιοπιστία και γραμμικότητα των μετρήσεων. Οι τιμές ολοκλήρωσης χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του Sudan III σε σχέση με το σήμα αναφοράς, δηλαδή το υπολειπόμενο σήμα του διαλύτη CDCl_3 που αντιστοιχεί στο CHCl_3 (0.04%), εφαρμόζοντας τις εξισώσεις (1) και (2) που αναφέρθηκαν. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 υπολογίστηκε, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.5β, ίσος με 0.999.



Σχήμα 5.4. Επιλεγμένη περιοχή των αρωματικών πρωτονίων στα φάσματα ^1H NMR που λήφθηκαν από τα εκχυλίσματα σε CDCl_3 του δείγματος στίγματος κρόκου, του εμβολιασμένου δείγματος με χρωστική Sudan III στις συγκεντρώσεις (α) 0.14 g/kg, (β) 0.36 g/kg, (γ) 0.71 g/kg, (δ) 1.4 g/kg, (ε) 3.6 g/kg και (στ) 7.1 g/kg, και του καθαρού Sudan III (από κάτω προς τα πάνω). Το σήμα που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του Sudan III εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση 8.064 ppm ($2'$, $6'$ H) και επισημαίνεται με κόκκινο πλαίσιο.



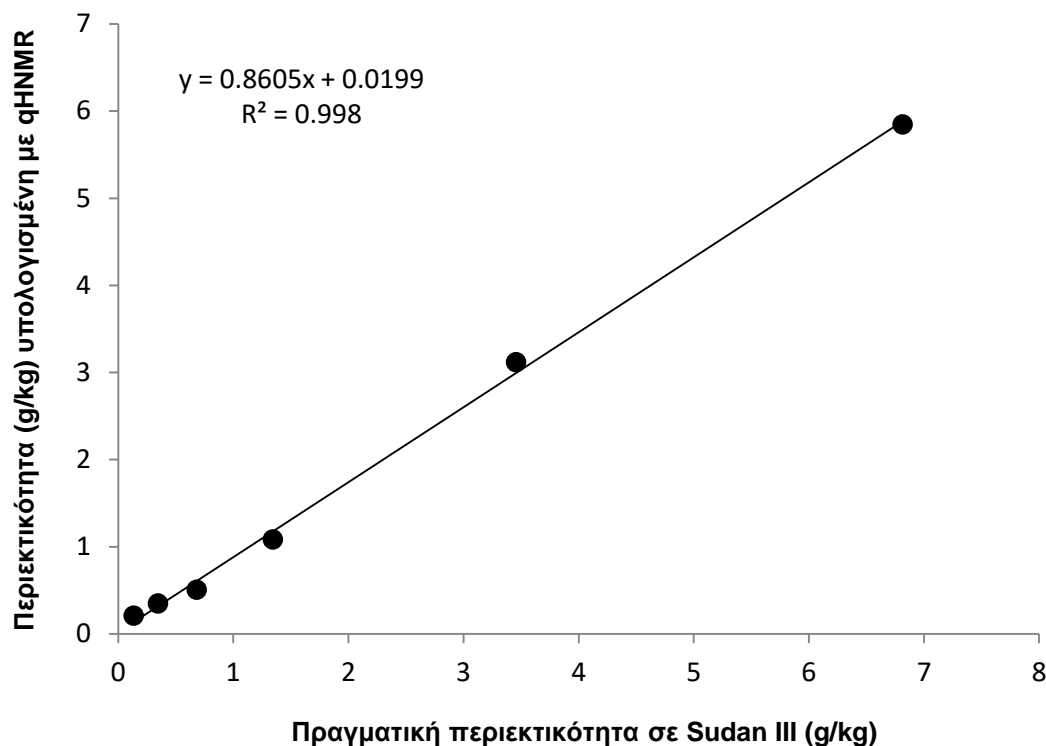
Σχήμα 5.5. Γραμμική συσχέτιση της πραγματικής περιεκτικότητας (g/kg) των εμβολιασμένων δειγμάτων από στίγματα κρόκου σε Sudan III και (α) των τιμών ολοκληρώματος του σήματος σε χημική μετατόπιση 8.064 ppm, (β) της περιεκτικότητας (g/kg) που υπολογίστηκε για τη χρωστική λαμβάνοντας υπόψη το

υπολειπόμενο σήμα του CHCl_3 στα 7.260 ppm. Τα επίπεδα νοθείας που ελέγχθηκαν ήταν από 0.14 έως 7.1 g/kg.

Εναλλακτικά, η ποσοτικοποίηση του Sudan III θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση διαλύματος ουσίας αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης ως εξωτερικό πρότυπο. Στην περίπτωση αυτή εξετάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα της χρωστικής Sudan II (βαθμός καθαρότητας 90%), επιλέγοντας για την ποσοτικοποίηση βάσει γραμμομοριακότητας το απομονωμένο σήμα της χρωστικής στα 8.618 ppm. Η διπλή αυτή κορυφή αντιστοιχεί στο ναφθολο-πρωτόνιο που εντοπίζεται στη θέση 8 του μορίου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για εύρος περιεκτικότητας από 0.14 έως 7.1 g/kg παρουσίασαν υψηλή γραμμικότητα, όπως φαίνεται από την καμπύλη βαθμονόμησης στο Σχήμα 5.6. Η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 βρέθηκε ίση με 0.998.

Και στις δύο διαδικασίες, η ποσοτικοποίηση του Sudan III στα στίγματα κρόκου πραγματοποιήθηκε αξιολογώντας έναν απομονωμένο συντονισμό της περιοχής των αρωματικών πρωτονίων, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός για τη συγκεκριμένη χρωστική. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπολοίπων χρωστικών Sudan καθίσταται εφικτός ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία, καθώς εύκολα μπορούν να ταυτοποιηθούν στα στίγματα κρόκου παρακολουθώντας συγκεκριμένα απομονωμένα σήματα πρωτονίων, όπως διαπιστώνεται από το Σχήμα 5.3. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ο αντίστοιχος αριθμός πρωτονίων, σύμφωνα με την πλήρη αντιστοίχιση των συντονισμών που πραγματοποιήθηκε. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση ενός οργανικού διαλύτη όπως το χλωροφόρμιο αποτρέπει την ανίχνευση επικαλυπτόμενων σημάτων από τα συστατικά των σιγμάτων κρόκου που περιλαμβάνουν αρωματικούς δακτυλίους.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με προσεγγίσεις σύντηξης δεδομένων (data fusion) που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενη εργασία [39], όπου απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία και πολυμεταβλητή ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων. Στην παρούσα προσέγγιση με $^1\text{H-NMR}$ αρκεί ένα φάσμα του



Σχήμα 5.6. Γραμμική συσχέτιση της πραγματικής περιεκτικότητας (g/kg) των εμβολιασμένων δειγμάτων από στίγματα κρόκου σε Sudan III και της περιεκτικότητας (g/kg) που υπολογίστηκε για τη χρωστική Sudan III με χρήση του Sudan II ως εξωτερικού πρότυπου. Τα επίπεδα νοθείας που ελέγχθηκαν ήταν από 0.14 έως 7.1 g/kg.

δείγματος που περιέχει τον αναλύτη, το οποίο λαμβάνεται με υψηλή αναπαραγωγικότητα και γραμμικότητα από την άποψη της απόκρισης. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτή η απευθείας εκτίμηση της περιεκτικότητας, χωρίς να απαιτείται ένα σύνολο αντιπροσωπευτικών δειγμάτων που είναι απαραίτητο για περαιτέρω πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Επιπλέον, η χρήση των μετρήσεων $^1\text{H NMR}$ υψηλής ευαισθησίας επέτρεψε την ανίχνευση του Sudan III στα στίγματα κρόκου σε χαμηλότερη περιεκτικότητα (0.14 g/kg) συγκριτικά με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία UV-Vis, όπου το κατώτερο επίπεδο ανίχνευσης της χρωστικής ήταν 2 g/kg [24]. Επομένως, η παρούσα μέθοδος θα μπορούσε να λειτουργήσει συμπληρωματικά ή και ως εναλλακτική στις υγροχρωματογραφικές μεθόδους που έχουν αναφερθεί [15,16].

Τέλος, ο ποσοτικός προσδιορισμός των χρωστικών Sudan I-IV θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί λαμβάνοντας υπόψη είτε ένα εσωτερικό (CHCl_3) είτε ένα εξωτερικό σήμα αναφοράς, προερχόμενο πιθανότατα από ένα πρότυπο διάλυμα οποιασδήποτε χρωστικής Sudan. Η άμεση χρήση του διαλύτη ως ουσία αναφοράς για ποσοτικοποίηση υπερέχει της προετοιμασίας ενός προτύπου διαλύματος χρωστικής, καθώς ο πειραματικός χρόνος μειώνεται και τόσο ο διαλύτης όσο και ο αναλύτης (χρωστική Sudan) υποβάλλονται στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, ελαχιστοποιώντας τις πιθανές αποκλίσεις. Μια άλλη επιλογή θα μπορούσε να αποτελέσει η χρήση εσωτερικού προτύπου, το οποίο να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις. Πιο συγκεκριμένα, οι κορυφές της ουσίας αναφοράς και του αναλύτη δε θα πρέπει να αλληλεπικαλύπτονται στην περιοχή ενδιαφέροντος, ενώ επίσης δε θα πρέπει να προκαλείται καμία παρεμπόδιση στο μόριο που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί [47]. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε Sudan III που προσδιορίστηκε με $^1\text{H-NMR}$ ήταν 0.14 g/kg. Έχοντας υπόψη ότι τα επίπεδα νοθείας με πρακτική οικονομική σημασία υπερβαίνουν τα 0.12 g/kg και μπορούν να φθάσουν το 1 g/kg [44], η προτεινόμενη μέθοδος δείχνει να συνιστά ένα έγκυρο αναλυτικό εργαλείο για την ανίχνευση ενδεχόμενης νοθείας των σιγμάτων κρόκου με τις χρωστικές Sudan I-IV.

5.4. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η φασματοσκοπία ^1H NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας προσφέρεται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των χρωστικών Sudan I-IV σε ενδεχομένη νοθεία τέτοιου τύπου στα στίγματα κρόκου. Αφού πραγματοποιήθηκε ο πλήρης προσδιορισμός των συντονισμών των ^1H και ^{13}C για τα Sudan I-IV, φάνηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξατομικευμένα σήματα πρωτονίων για τον προσδιορισμό κάθε χρωστικής Sudan σε δείγματα νοθευμένων σιγμάτων κρόκου. Η εφαρμογή της καθιερωμένης μεθοδολογίας ποσοτικού προσδιορισμού με ^1H NMR (qHNMR) επέτρεψε, ως παράδειγμα, την ποσοτικοποίηση του Sudan III, εξετάζοντας για διάφορα επίπεδα νοθείας (0.14 – 7.1 g/kg) το σήμα NMR που εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση 8.064 ppm. Η υψηλή γραμμικότητα, η ακρίβεια και η ταχύτητα της προσέγγισης αυτής την καθιστούν κατάλληλη για την αξιολόγηση της νοθείας των σιγμάτων κρόκου με χρωστικές ουσίες Sudan. Η μεθοδολογία αυτή θα μπορούσε να αξιολογηθεί, επιπλέον, για τον έλεγχο νοθείας με χρωστικές Sudan και σε άλλα αρτύματα ή συναφή προϊόντα. Στο πλαίσιο του ποιοτικού ελέγχου και του ελέγχου ασφάλειας των φυτικών προϊόντων και των τροφίμων, το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης της φασματοσκοπίας NMR είναι η ελάχιστη προκατεργασία του δείγματος, ενώ δεν απαιτείται περαιτέρω χημική επεξεργασία.

Με τον ίδιο τρόπο θα μπορούσε, επίσης, να διερευνηθεί η νοθεία των σιγμάτων κρόκου με υδατοδιαλυτές συνθετικές χρωστικές, οι οποίες συνήθως ελέγχονται με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές (π.χ. UV-Vis) ή με υγροχρωματογραφικές μεθόδους. Έτσι, είναι δυνατό να αποφευχθεί η χρονοβόρα προετοιμασία του δείγματος, καθώς επίσης και πιθανά προβλήματα που ενδέχεται να ανακύψουν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση λόγω της επίδρασης του υποστρώματος (matrix effect).

Ως προς την επιλογή του διαλύτη, το χλωροφόρμιο φαίνεται να ενδείκνυται για την ανίχνευση νοθείας με λιπόφιλες χρωστικές στα στίγματα κρόκου, ενώ πιο κατάλληλος διαλύτης για τον έλεγχο νοθείας με υδρόφιλα μόρια ή υλικά φυτικής προέλευσης [37] κρίνεται το DMSO.

5.5. Βιβλιογραφία

- [1] IARC (1975). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: some aromatic azo compounds* (Vol. 8, pp. 224–231). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [2] Zanoni, T.B., Lizier, T.M., das Dores Assis, M., Zanoni, M.V.B., de Oliveira, D.P. (2013). CYP-450 isoenzymes catalyze the generation of hazardous aromatic amines after reaction with the azo dye Sudan III. *Food Chem. Toxicol.* 57, 217–226.
- [3] Commission Decision (2005). Commission decision 2005/402/EC of 23 May 2005 on emergency measures regarding chilli, chilli products, curcuma and palm oil. *Off. J. Eur. Union* L 135, 34–36.
- [4] RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). <http://ec.europa.eu/food/safety/rasff> (τελευταία πρόσβαση: 01.10.16).
- [5] Hagh-Nazari, S., Keifi, N. (2007). Saffron and various fraud manners in its production and trades. *Acta Hort.* 739, 411–416.
- [6] Moore, J.C., Spink, J., Lipp, M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 77, 118–126.
- [7] Winterhalter, P., Straubinger, M. (2000). Saffron - Renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.* 16, 39–59.
- [8] ISO (2010). *International standard ISO 3632-2: Saffron (Crocus sativus L.) test methods*. Geneva: The International Organization for Standardization.
- [9] ISO (2011). *International standard ISO 3632-1: Saffron (Crocus sativus L.) specification*. Geneva: The International Organization for Standardization.
- [10] Hajimahmoodi, M., Afsharimanesh, M., Moghaddam, G., Sadeghi, N., Oveisi, M.R., Jannat, B., Pirhadi, E., Zamani Mazdeh, F., Kanan, H. (2013). Determination of eight synthetic dyes in foodstuffs by green liquid chromatography. *Food Addit. Contam. Part A* 30, 780–785.
- [11] Lozano, P., Castellar, M.R., Simancas, M.J., Iborra, J.L. (1999). Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *J. Chromatogr. A* 830, 477–483.
- [12] 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 Addit. Contam. Part A* 28, 417–422.

- [13] 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 Addit. Contam.* 22, 607–615.
- [14] 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. *Anal. Chim. Acta* 535, 133–138.
- [15] Ates, E., Mittendorf, K., Senyuva, H. (2011). LC/MS Method using cloud point extraction for the determination of permitted and illegal food colors in liquid, semiliquid, and solid food matrixes: Single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* 94, 1853–1862.
- [16] Rajabi, M., Sabzalian, S., Barfi, B., Arghavani-Beydokhti, S., Asghari, A. (2015). In-line micro-matrix solid-phase dispersion extraction for simultaneous separation and extraction of Sudan dyes in different spices. *J. Chromatogr. A* 1425, 42–50.
- [17] Rebane, R., Leito, I., Yurchenko, S., Herodes, K. (2010). A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrixes. *J. Chromatogr. A* 1217, 2747–2757.
- [18] Zhu, Y., Zhao, B., Xiao, R., Yun, W., Xiao, Z., Tu, D., Chen, S. (2014). Simultaneous determination of 14 oil-soluble synthetic dyes in chilli products by high performance liquid chromatography with a gel permeation chromatography clean-up procedure. *Food Chem.* 145, 956–962.
- [19] Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C.P., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G. (2010). Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 571–577.
- [20] 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 Chem.* 150, 414–421.
- [21] 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. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9337–9341.
- [22] Anastasaki, E.G., Kanakis, C.D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G. (2010). Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6011–6017.
- [23] Maggi, L., Sánchez, A.M., Carmona, M., Kanakis, C.D., Anastasaki, E., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Alonso, G.L. (2011). Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chem.* 127, 369–373.

- [24] Sánchez, A.M., Maggi, L., Carmona, M., Alonso, G.L. (2011). Authentication of saffron spice (*Crocus sativus* L.). In S.E. Ebeler et al. (Eds.), *Progress in authentication of food and wine. ACS symposium series* (Vol. 1081, pp. 309–331). Washington, DC: American Chemical Society.
- [25] Karimi, S., Feizy, J., Mehrjo, F., Farrokhnia, M. (2016). Detection and quantification of food colorant adulteration in saffron sample using chemometric analysis of FT-IR spectra. *RSC Adv.* 6, 23085–23093.
- [26] Zarghami, N.S., Heinz, D.E. (1971). Monoterpene aldehydes and isophorone-related compounds of saffron. *Phytochemistry* 10, 2755–2761.
- [27] Pfister, S., Meyer, P., Steck, A., Pfander, H. (1996). Isolation and structure elucidation of carotenoid–glycosyl esters in gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* Linne). *J. Agric. Food Chem.* 44, 2612–2615.
- [28] Straubinger, M., Jezussek, M., Waibel, R., Winterhalter, P. (1997). Novel glycosidic constituents from saffron. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1678–1681.
- [29] Van Calsteren, M.-R., Bissonnette, M.C., Cormier, F., Dufresne, C., Ichi, T., LeBlanc, J.C.Y., Perreault, D., Roewer, I. (1997). Spectroscopic characterization of crocetin derivatives from *Crocus sativus* and *Gardenia jasminoides*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1055–1061.
- [30] Assimiadis, M.K., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. (1998). UV-Vis, FT-Raman, and ^1H NMR spectroscopies of *cis-trans* carotenoids from saffron (*Crocus sativus* L.). *Appl. Spectrosc.* 52, 519–522.
- [31] Straubinger, M., Bau, B., Eckstein, S., Fink, M., Winterhalter, P. (1998). Identification of novel glycosidic aroma precursors in saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 46, 3238–3243.
- [32] Yilmaz, A., Nyberg, N.T., Mølgaard, P., Asili, J., Jaroszewski, J.W. (2010). ^1H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts. *Metabolomics* 6, 511–517.
- [33] Yilmaz, A., Nyberg, N.T., Jaroszewski, J.W. (2011). Metabolic profiling based on two-dimensional *J*-resolved ^1H NMR data and parallel factor analysis. *Anal. Chem.* 83, 8278–8285.
- [34] Sobolev, A.P., Carradori, S., Capitani, D., Vista, S., Trella, A., Marini, F., Mannina, L. (2014). Saffron samples of different origin: An NMR study of microwave-assisted extracts. *Foods* 3, 403–419.
- [35] Cagliani, L.R., Culeddu, N., Chessa, M., Consonni, R. (2015). NMR investigations for a quality assessment of Italian PDO saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Control* 50, 342–348.

- [36] Ordoudi, S.A., Cagliani, L.R., Lalou, S., Naziri, E., Tsimidou, M.Z., Consonni, R. (2015). ^1H NMR-based metabolomics of saffron reveals markers for its quality deterioration. *Food Res. Int.* 70, 1–6.
- [37] Petrakis, E.A., Cagliani, L.R., Polissiou, M.G., Consonni, R. (2015). Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ^1H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chem.* 173, 890–896.
- [38] Di Anibal, C.V., Ruisánchez, I., Callao, M.P. (2011). High-resolution ^1H Nuclear Magnetic Resonance spectrometry combined with chemometric treatment to identify adulteration of culinary spices with Sudan dyes. *Food Chem.* 124, 1139–1145.
- [39] Di Anibal, C.V., Callao, M.P., Ruisánchez, I. (2011). ^1H NMR and UV-visible data fusion for determining Sudan dyes in culinary spices. *Talanta* 84, 829–833.
- [40] Holzgrabe, U. (2010). Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 57, 229–240.
- [41] Pauli, G.F., Gödecke, T., Jaki, B.U., Lankin, D.C. (2012). Quantitative ^1H NMR: Development and potential of an analytical method - an update. *J. Nat. Prod.* 75, 834–851.
- [42] Bharti, S.K., Roy, R. (2012). Quantitative ^1H NMR spectroscopy. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 35, 5–26.
- [43] Ohtsuki, T., Sato, K., Furusho, N., Kubota, H., Sugimoto, N., Akiyama, H. (2013). Absolute quantification of dehydroacetic acid in processed foods using quantitative ^1H NMR. *Food Chem.* 141, 1322–1327.
- [44] ASTA (2005). *Sudan Red and related dyes - White Paper*. <http://www.astaspice.org/files/public/SudanWhitePaper.pdf> (τελευταία πρόσβαση 01.10.16). Washington, DC: American Spice Trade Association.
- [45] Beyer, T., Schollmayer, C., Holzgrabe, U. (2010). The role of solvents in the signal separation for quantitative ^1H NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, 51–58.
- [46] De Nino, A., Di Donna, L., Maiuolo, L., Mazzotti, F., Sindona, G. (2008). Synthesis of deuterium-labeled azo dyes of the Sudan family. *Synthesis* 3, 459–463.
- [47] Mavromoustakos, T., Zervou, M., Bonas, G., Kolocouris, A., Petrakis, P. (2000). A novel analytical method to detect adulteration of virgin olive oil by other oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 405–411.

ΜΕΡΟΣ Γ

Εκτίμηση Βιοδραστικότητας Δευτερογενών Μεταβολιτών

6. Εκτίμηση της βιοδραστικότητας τερπενοειδών επί του *Culex ripiens* L. με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR

6.1. Εισαγωγή

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να διερευνήσει τη βιοδραστικότητα τερπενοειδών ενώσεων μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR και της χημειομετρίας. Στο πλαίσιο αυτό, ελέγχθηκε η προνυμφοκτόνος δράση για το είδος κουνουπιών *Culex ripiens* L. Τα κουνούπια του είδους αυτού, από υγειονομική άποψη, αποτελούν φορείς της ελονοσίας των πτηνών και του ιού του κίτρινου πυρετού και του Δάγκειου αιμορραγικού πυρετού. Συνιστούν, επίσης, φορείς σημαντικών παθογόνων και παρασίτων (ιών, βακτηρίων, κ.ά.) του ανθρώπου, όπως τα παθογόνα που σχετίζονται με τις φιλαριάσεις και τις εγκεφαλίτιδες.

Στο βιολογικό κύκλο του κουνουπιού συμπεριλαμβάνονται το στάδιο του ωού (αβγό), τα προνυμφικά στάδια (προνύμφη), το στάδιο της νύμφης και, τέλος, το στάδιο του ακμαίου ή ενήλικου. Η διάρκεια ζωής των ενηλίκων κουνουπιών (ακμαίων) εξαρτάται συνήθως από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το φύλο του κουνουπιού και η εποχή του χρόνου. Τα αρσενικά ακμαία ζουν για περίπου μία εβδομάδα, ενώ ο κύκλος ζωής των θηλυκών είναι μεγαλύτερος και ανάλογα με τους παραπάνω παράγοντες μπορεί να φθάσει έως και ένα μήνα.

Εξαιρουμένου του τελευταίου αυτού σταδίου, τα κουνούπια που βρίσκονται στα υπόλοιπα στάδια διαβιούν στο νερό [1]. Κατάλληλα ενδιαιτήματα των κουνουπιών αποτελούν οι υγρότοποι (μικρές ή μεγάλες λίμνες), τα έλη και οι βάλτοι, τα επιφανειακά στάσιμα ύδατα, οι ορυζώνες, οι παρόχθιες ζώνες ποταμών καθώς και οι κοιλότητες βράχων ή δένδρων. Κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου, η αύξηση του μεγέθους των κουνουπιών εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία.

Εκ των σημαντικότερων σταδίων για την ανάπτυξή τους είναι αυτό της προνύμφης, το οποίο αποτελεί ουσιαστικά το μόνο στάδιο κατά το οποίο γίνεται η λήψη της τροφής. Οι υδρόβιες προνύμφες τρέφονται με μικροοργανισμούς και άλλα οργανικά σωματίδια στο νερό, και αυξάνουν το μέγεθός τους με έκδυση του εξωτερικού περιβλήματος. Το στάδιο αυτό, σε συνδυασμό με τη σωστή διατροφή, καθορίζει τη δυναμικότητα του ακμαίου θηλυκού σε αριθμό ωών [1]. Διακρίνονται 4 περίοδοι (ή στάδια) ανάπτυξης που συνιστούν, αντίστοιχα, την 1η, 2η,

3η και 4η ηλικία. Η συνολική χρονική διάρκεια του σταδίου αυτού εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού και τη θερμοκρασία του νερού, με συνήθη χρόνο εξέλιξης τις 7-10 ημέρες. Όταν η θερμοκρασία είναι κατάλληλη και υπάρχει αρκετή τροφή, ο χρόνος αυτός τείνει να περιορίζεται στις 5-7 ημέρες. Στο τέλος της ανάπτυξης της 4ης ηλικίας οι προνύμφες εκδύονται και περνούν στο νυμφικό στάδιο.

Ο έλεγχος απωθητικής και εντομοκτόνου δράσης ουσιών στα διάφορα είδη κουνουπιών πραγματοποιείται πολύ συχνά έναντι σε προνύμφες. Όπως έχουν δείξει μελέτες της τελευταίας δεκαετίας [2-7], είναι δυνατή η πρόβλεψη της δράσης αυτής σε κουνούπια από τα είδη *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles stephensi* και *Culex quinquefasciatus* για ομάδες ουσιών με κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Η ανάπτυξη μεθόδων εκτίμησης της ποσοτικής σχέσης δομής-δραστικότητας (QSAR) που λαμβάνουν υπόψη φυσικοχημικές παραμέτρους των μορίων οδηγεί συχνά σε μοντέλα με υψηλή προβλεπτική ικανότητα. Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε, μάλιστα, την πιθανή χρήση χημειομετρικών μοντέλων για τη δράση τερπενοειδών ενώσεων έναντι σε προνύμφες του είδους *A. aegypti* [8]. Τα τερπένια αποτελούν, ίσως, την κυριότερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που έχει μελετηθεί, λόγω της υψηλής δραστηριότητας που παρουσιάζουν σε έντομα υγειονομικής ή γεωργικής σημασίας [9-12]. Τελευταία, μάλιστα, διερευνήθηκε και η συσχέτιση της βιολογικής δράσης των φυσικών τους μιγμάτων, των αιθερίων ελαίων, με τη σύστασή τους σε τερπένια, χρησιμοποιώντας χημειομετρικές τεχνικές [13].

Παρόλο που η διερεύνηση της βιολογικής δράσης πολυάριθμων ανάλογων μορίων έγκειται κατά κύριο λόγο στην ανάπτυξη και εφαρμογή μοντέλων QSAR, βελτιστοποιώντας με την πάροδο των χρόνων τις εκάστοτε μεθοδολογίες [14], πολύ πρόσφατα φάνηκε ότι η χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο [15,16]. Οι σχετικές μελέτες υποστηρίζουν τη συσχέτιση που μπορούν να έχουν τα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR με την πρόβλεψη της αντιοξειδωτικής δράσης φαινολικών συστατικών. Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί με την προσέγγιση αυτή στην εκτίμηση της προνυμφοκτόνου δράσης τερπενοειδών σε κουνούπια του είδους *C. pipiens*.

6.2. Πειραματικό μέρος

6.2.1. Πρότυπες ουσίες αναφοράς

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες με βαθμό καθαρότητας άνω του 96%, των οποίων η προμήθεια έγινε κατά κύριο λόγο από τις εταιρείες Aldrich (Steinheim, Germany), Extrasynthese (Genay, France), Fluka (Steinheim, Germany) και Sigma (St. Louis, MO, USA). Οι ουσίες περιλαμβάνονται συνολικά στον Πίνακα 6.1.

6.2.2. Εκτροφή του *Culex ripiens* L.

Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, χρησιμοποιώντας την εργαστηριακή εκτροφή του κουνουπιού *Culex ripiens* βιότυπος *molestus*. Η συγκεκριμένη εκτροφή διατηρείται πάνω από δύο δεκαετίες στους χώρους του Εργαστηρίου και αναφέρεται στη διατήρηση του πληθυσμού του κουνουπιού σε συνθήκες και περιβάλλον που ευνοούν την ανάπτυξη, δηλαδή θερμοκρασία 20 ± 2 °C, φωτοπερίοδος 14:10 ωρών (Φ:Σ) και σχετική υγρασία $80 \pm 2\%$. Οι συνθήκες αυτές παρέμειναν σταθερές σε όλη τη διάρκεια του πειράματος [17]. Η διαδικασία της εκτροφής περιλαμβάνει ειδικές μεταχειρίσεις για κάθε στάδιο ανάπτυξης.

6.2.2.1. Ωα - προνύμφες

Τα ωά των κουνουπιών τοποθετούνται σε εμαγιέ λεκάνες (διάμετρος 35 cm × βάθος 10 cm) με λίγη τροφή, προκειμένου να εκκολαφθούν και να εμφανιστούν οι νέες προνύμφες. Μετά την επώαση των ωών που διαρκεί περίπου 2-3 ημέρες, εμφανίζονται οι πρώτης ηλικίας προνύμφες. Τότε οι πληθυσμοί τους αραιώνονται και τοποθετούνται σε νέες καθαρές λεκάνες ανοικτού χρώματος για να καθίσταται εύκολη η διάκρισή τους. Κατά το στάδιο της προνύμφης (1ης έως 4ης ηλικίας), η τροφή που παρέχεται για την ορθή ανάπτυξη περιλαμβάνει αποξηραμένο ψωμί και ζύμη (BioNatural, Superzyme powder), ενώ ενδέχεται να γίνεται και χρήση τροφής που παρέχεται σε νεαρά ψάρια (Tetramin, Baby Fish Food), σε συγκέντρωση 0.25 g/L νερού και για

όλο το χρονικό διάστημα έως το στάδιο της νύμφης. Έτσι εξασφαλίζονται οι απαραίτητες για την ανάπτυξη των προνυμφών ποσότητες υδατανθράκων, πρωτεϊνών και μετάλλων. Η τροφή χορηγείται καθημερινά έως την ολοκλήρωση του προνυμφικού σταδίου, το οποίο κυμαίνεται από 7 έως 10 ημέρες, ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας, τη διαθεσιμότητα τροφής και τον πληθυσμό των προνυμφών ανά λεκάνη (φαινόμενο ανταγωνισμού).

6.2.2.2. Νύμφες - ακμαία

Όταν ολοκληρώνεται το προνυμφικό στάδιο, οι νύμφες συλλέγονται από τις λεκάνες εκτροφής και μεταφέροντα σε πλαστικά κύπελλα, τα οποία τοποθετούνται στους κλωβούς για το τελικό στάδιο της εξέλιξης των νυμφών σε τέλεια έντομα (ακμαία). Το στάδιο αυτό είναι το πλέον σημαντικό και δύσκολο για όλα τα κουνούπια. Η συλλογή των νυμφών πραγματοποιείται ανά δύο ημέρες. Οι κλωβοί που χρησιμοποιούνται έχουν διαστάσεις 33 cm × 33 cm × 33 cm, με ξύλινες ακμές και πλευρές καλυμμένες με σίτα.

Για τα ακμαία έντομα χρησιμοποιείται ως τροφή υδατικό διάλυμα σακχαρόζης, που τοποθετείται σε ειδικό κλωβό μέσα σε ένα μικρό γυάλινο δοχείο, μαζί με μια κατασκευή από διηθητικό χαρτί και βαμβάκι με τη μορφή φυτιλιού, για διευκόλυνση της λήψης του από τα έντομα. Σε κάθε κλωβό τοποθετούνται δύο διαλύματα σακχαρόζης, τα οποία αντικαθίστανται κάθε 4 ημέρες.

6.2.3. Βιοδοκιμές προνυμφοκτόνου δράσης

Τα πειράματα με σκοπό την αξιολόγηση της δραστηριότητας των τερπενοειδών ως προνυμφοκτόνα κουνουπιών πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλο εργαστηριακό χώρο του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Ο χώρος αυτός ήταν απαλλαγμένος από βιοκτόνα σκευάσματα, με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, αερισμού και φωτισμού. Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα αποστειρώθηκαν σε κλίβανο πριν από κάθε χρήση.

Δεδομένου ότι οι βιοδοκιμές αποσκοπούν στη μελέτη της μεταβολής της θνησιμότητας σε σχέση με τη μεταβολή της δόσης, εφαρμόστηκε μια σειρά δόσεων οι οποίες προκαλούν θνησιμότητα πάνω από 0% και κάτω από 100%. Σε όλες τις βιοδοκιμές των προνυμφοκτόνων

χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας αποχλωριωμένο νερό βρύσης με 2% DMSO. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών εκφράστηκαν σε ανά εικοσιτετράωρο καταγραφή της θνησιμότητας των εντόμων. Για κάθε πείραμα υπολογίστηκε το ποσοστό θνησιμότητας και στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι δείκτες LC₅₀ και LC₉₀ επί 24ώρου. Οι δείκτες LC₅₀ και LC₉₀ αντιστοιχούν στη θανατηφόρα (ή αποτελεσματική) συγκέντρωση που επιδρά στο 50% και 90% αντίστοιχα του πληθυσμού. Όσο μικρότερος είναι ο δείκτης LC₅₀ τόσο μεγαλύτερη είναι η τοξικότητα που εμφανίζει το δείγμα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές παρασκευάστηκαν με διάλυση των προτύπων ενώσεων σε DMSO ($\leq 10\%$ w/v).

Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και περιγράφεται στο WHO/VBC/81.807 [18], με κάποιες τροποποιήσεις ή παραδοχές. Πιο συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν 198 mL αποχλωριωμένου νερού και 2 mL DMSO σε γυάλινα ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 250 mL. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 20 προνύμφες κουνουπιών σε κάθε ποτήρι, οι οποίες ήταν ανεπτυγμένες τρίτου σταδίου ή νεαρές τέταρτου σταδίου. Ακολούθησε προσθήκη της αντίστοιχης δόσης βιοκτόνου (μL) και για κάθε δόση πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις. Η θνησιμότητα των κουνουπιών μετρήθηκε μετά από ένα 24ωρο και υπολογίστηκαν οι δείκτες LC₅₀ και LC₉₀ για τις πρότυπες ουσίες.

6.2.4. Φασματοσκοπική ανάλυση με FT-IR

Όλες οι μετρήσεις FT-IR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός φασματόμετρου FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειικής τριγλυκίνης (DTGS), πηγή Nichrome και διαχωριστή δέσμης KBr. Τα φάσματα καταγράφηκαν στη φασματική περιοχή 4000-500 cm⁻¹ με την τεχνική της διέλευσης (transmission), σε ελεγχόμενες συνθήκες (25 °C). Κάθε πρότυπη ουσία προς ανάλυση τοποθετήθηκε μεταξύ δύο στρογγυλών κρυστάλλινων παραθύρων ZnSe (25 mm × 2 mm). Το μήκος της διαδρομής μεταξύ των παραθύρων καθορίστηκε στα 15 μm με χρήση περιμετρικά δακτυλίου από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE). Τα παράθυρα τοποθετούνταν σε κατάλληλο αποσπώμενο υποδοχέα (Thermo Scientific), ο οποίος στη συνέχεια προσαρμοζόταν σε ειδικό πλαίσιο εντός του φασματόμετρου. Για τη λήψη κάθε φάσματος πραγματοποιήθηκαν 100

διαδοχικές σαρώσεις, με τη διαχωριστική ικανότητα του οργάνου να έχει καθοριστεί στα 4 cm^{-1} και την ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου στο συμβολόμετρο να είναι 0.316 cm s^{-1} . Το φάσμα των καθαρών παραθύρων ZnSe χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μέτρηση ως υπόβαθρο (background). Για τη λειτουργία του φασματομέτρου, τη συλλογή των δεδομένων και τη βασική επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Omnic 7.3 (Thermo Scientific) που συνοδεύει το όργανο. Η καταγραφή των φασμάτων FT-IR έγινε εις τριπλούν και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι μέσοι όροι των φασμάτων. Η εξομάλυνση του σήματος (smoothing) σε όλα τα φάσματα FT-IR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Savitzky-Golay, με το μέγεθος παραθύρου να ορίζεται από 15 σημεία. Ακολούθησε η διόρθωση της βασικής γραμμής με την αυτόματη λειτουργία του λογισμικού, η οποία γίνεται πολυωνυμικά.

6.2.5. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων

Για την ανάπτυξη των μοντέλων βαθμονόμησης, με σκοπό την εκτίμηση της προνυμφοκτόνου δράσης των τερπενοειδών από τα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Ο αλγόριθμος που εφαρμόστηκε περιλαμβάνεται στο λογισμικό TQ Analyst 8.0 (Thermo Scientific). Ύστερα από κεντροποίηση (mean centering) των τιμών των μεταβλητών, έγινε αξιολόγηση των μοντέλων PLS βάσει επιλεγμένων φασματικών περιοχών ή ολόκληρου του φάσματος. Έπειτα από τον έλεγχο του συνόλου βαθμονόμησης για πρότυπες ουσίες που αποκλίνουν (outliers), το μοντέλο βαθμονόμησης αναπτύχθηκε τελικά χρησιμοποιώντας δεδομένα από 31 τερπενοειδείς ενώσεις. Η ακρίβεια του μοντέλου βαθμονόμησης περιγράφηκε από την τιμή του συντελεστή συσχέτισης r_c , ενώ εκτιμήθηκαν επίσης οι τιμές των σφαλμάτων RMSEC, RMSECV και RMSEP για τη βαθμονόμηση, τη διασταυρωμένη επικύρωση και την πρόβλεψη, αντίστοιχα. Για τη διασταυρωμένη επικύρωση του μοντέλου βαθμονόμησης εφαρμόστηκε η επαναληπτική διαδικασία μιας παράλειψης (LOO). Ο βέλτιστος αριθμός λανθανουσών μεταβλητών (LVs) για την εκτίμηση της προνυμφοκτόνου δράσης προσδιορίστηκε σύμφωνα με την ελάχιστη τιμή του RMSECV.

6.3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Από τις βιοδοκιμές προνυμφοκτόνου δράσης προέκυψαν οι τιμές των δεικτών LC_{50} και LC_{90} για κάθε επιμέρους τερπενοειδές. Λόγω του μεγάλου εύρους τιμών και για τους δύο δείκτες, που οφείλεται σε διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων, ακολούθησε μετατροπή των τιμών. Οι τιμές LC_{50} και LC_{90} εκφράστηκαν από mg/mL σε mol/L και στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι τιμές pLC_{50} και pLC_{90} , οι οποίες αντιστοιχούν στον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο των LC_{50} και LC_{90} σε mol/L . Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται οι τιμές που προέκυψαν για κάθε επιμέρους τερπενοειδές. Στη συνέχεια, για την ανάπτυξη των μοντέλων εκτίμησης της τοξικής δράσης με PLS, έγινε διαχωρισμός των ενώσεων σε σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου (Πίνακας 6.1).

Με εφαρμογή του αλγορίθμου PLS (PLS2) στα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR, αναπτύχθηκαν μοντέλα βαθμονόμησης για την εκτίμηση των τιμών pLC_{50} και pLC_{90} . Για τα μοντέλα αυτά λήφθηκαν υπόψη διάφορες επιλεγμένες περιοχές, εξετάζοντας ωστόσο την ίδια φασματική περιοχή κάθε φορά και για τις δύο τιμές. Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε επιμέρους μοντέλο βαθμονόμησης. Τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από τα μοντέλα που βασίστηκαν σε φασματοσκοπικά δεδομένα από τις περιοχές $3700-2800\text{ cm}^{-1}$ και $1900-500\text{ cm}^{-1}$. Και στις δύο περιπτώσεις τιμών pLC_{50} και pLC_{90} , τα αντίστοιχα μοντέλα παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές συντελεστών συσχέτισης r_c που ήταν 0.96, ενώ τα σφάλματα βαθμονόμησης (RMSEC) βρέθηκαν να είναι 0.12 και 0.11, αντίστοιχα.

Πίνακας 6.1. Τιμές pLC_{50} και pLC_{90} των τερπενοειδών που χρησιμοποιήθηκαν στα σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου των μοντέλων PLS.

	pLC_{50}	pLC_{90}		pLC_{50}	pLC_{90}
Σύνολο βαθμονόμησης					
(-)-Ισοπουλεγόλη	3.03	2.83	Ευγενόλη	3.95	3.58
(-)-Τερπινεν-4-όλη	2.95	2.89	Λιναλοόλη	3.27	3.13
(-)-β-Καρυοφυλλένιο	3.21	2.86	π-Κιμένιο	3.86	3.67
(+)-2-Καρένιο	3.30	3.10	Πιπεριτενόνη	3.39	3.20
(+)-Αρωμαδενδρένιο	2.70	2.60	Εποξείδιο της πιπεριτενόνης	3.91	3.61
(+)-β-Κιτρονελλένιο	2.86	2.71	Πιπεριτόνη	2.86	2.74
(+)-Καμφορά	2.62	2.50	Εποξείδιο της πιπεριτόνης	3.54	3.34
(1S,2R,5S)-(+)-Μινθόλη	3.35	3.18	π-Μενθ-1-ένιο	3.14	2.94
3-Μεθυλοκυκλοεξανόνη	2.44	2.22	(R)-(+)-Πουλεγόνη	3.66	3.33
Μεθυλοκαβικόλη	3.48	3.22	(R)-(-)-α-Φελλανδρένιο	3.42	3.17
α-Πινένιο	3.23	2.95	(R)-(-)-Καρβόνη	3.19	3.11
α-Τερπινένιο	3.56	3.32	(R)-(+)-Λιμονένιο	3.62	3.36
β-Μυρκένιο	3.61	3.41	(S)-(-)-Περιλλυλική αλκοόλη	3.03	2.87
Καρβακρόλη	4.33	3.96	(E)-Ανηθόλη	3.95	3.77
Κιτράλη	3.57	3.33	Θυμοκινόνη	4.11	3.77
Ευκαλυπτόλη	3.16	2.76			
Σύνολο ελέγχου					
(E)-π-Μενθ-2-ένιο	3.04	2.85			
(+)-3-Καρένιο	3.12	3.02			
1S-(-)-β-Πινένιο	3.29	3.07			
Τερπινολένιο	3.53	3.22			
π-Μενθάνιο	2.65	2.54			
Μεθυλο-π-βενζοκινόνη	3.6	3.29			
γ-Τερπινένιο	3.64	3.35			
α-Τερπινεόλη	2.87	2.75			

Η τιμή pLC_{50} (mol/L) ισοδυναμεί με το $\log(1/LC_{50})$, όταν το LC_{50} εκφράζεται σε mol/L αντί για mg/L. Το ίδιο ισχύει κατ'αντιστοιχία για το pLC_{90} .

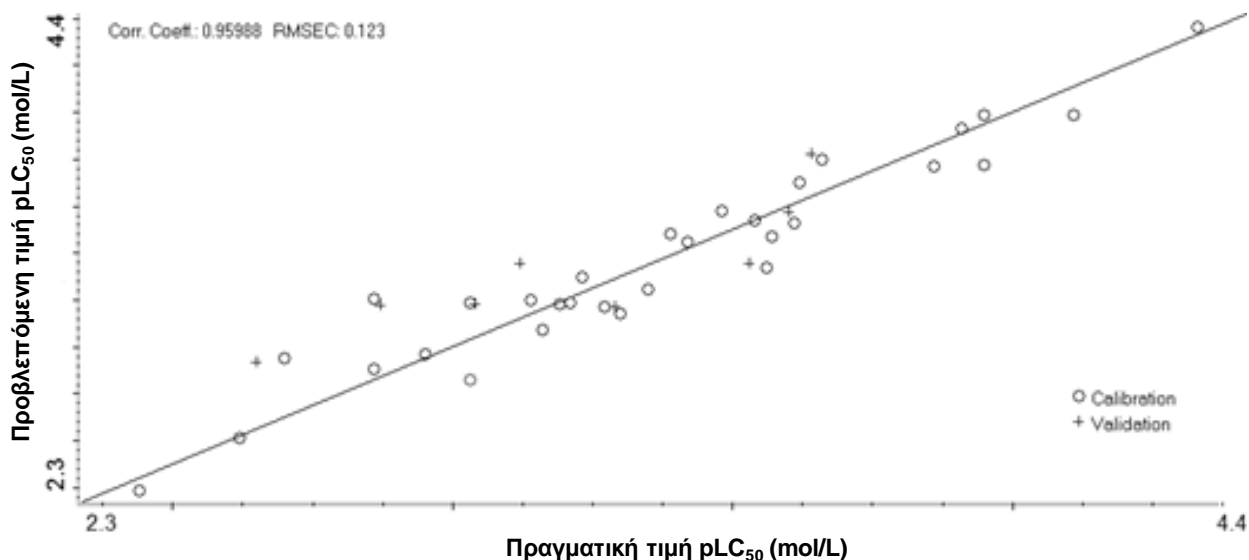
Με τη χρήση των 6 λανθανουσών μεταβλητών (LVs) ερμηνεύτηκε το 73.5-73.7% της διακύμανσης στον πίνακα X (φασματοσκοπικά δεδομένα) και το 92.1% της διακύμανσης στον πίνακα Y (συγκέντρωση). Επιπλέον, τα μοντέλα αυτά παρουσίασαν την καλύτερη προβλεπτική ικανότητα ως προς το σύνολο ελέγχου, με το σφάλμα πρόβλεψης (RMSEP) για το πρώτο μοντέλο

(pLC_{50}) να είναι 0.20, ενώ για το δεύτερο (pLC_{90}) 0.19. Οι τιμές για τα σφάλματα διασταυρωμένης επικύρωσης για τα δύο μοντέλα βρέθηκαν να είναι 0.43 και 0.40. Στα Σχήματα 6.1 και 6.2 απεικονίζονται τα μοντέλα βαθμονόμησης για την εκτίμηση των τιμών pLC_{50} και pLC_{90} .

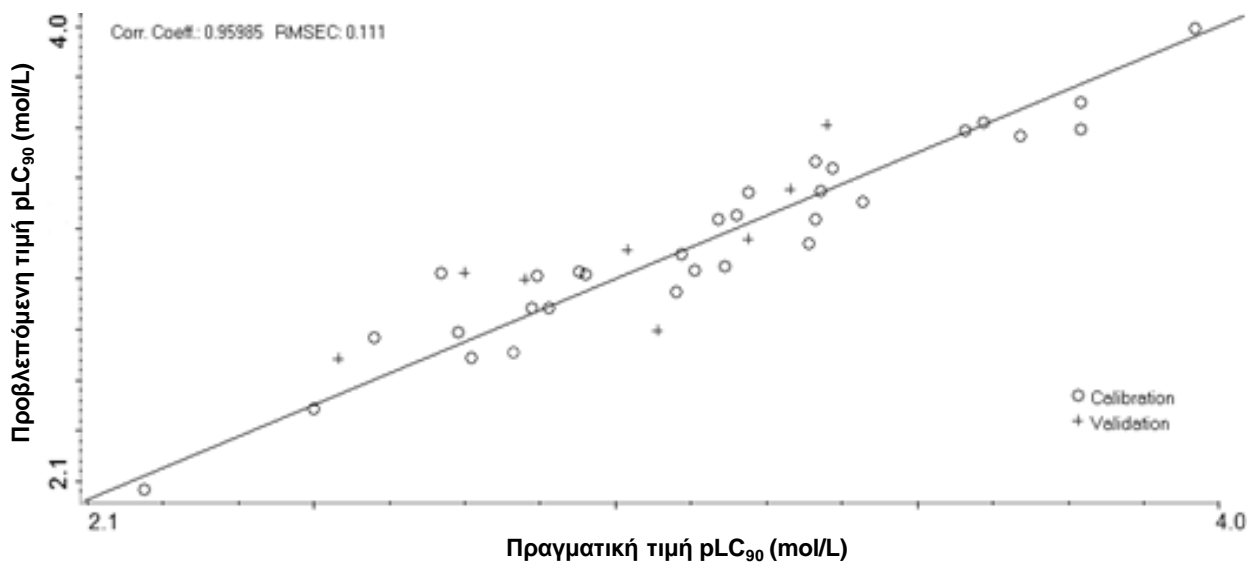
Πίνακας 6.2. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS για την εκτίμηση των τιμών pLC_{50} και pLC_{90} , τα οποία βασίστηκαν σε διαφορετικά εύρη κυματαριθμών.

	Εύρος (cm^{-1})	LV	r_c	RMSEC (mol/L)	RMSECV (mol/L)	RMSEP (mol/L)
pLC_{50}	4000-400	6	0.96	0.13	0.43	0.21
	3100-2800 & 1900-500	5	0.94	0.15	0.43	0.25
	1900-500	4	0.87	0.22	0.44	0.33
	3700-2800	6	0.86	0.22	0.37	0.14
	3100-2800	4	0.78	0.27	0.38	0.27
	3700-2800 & 1900-500	6	0.96	0.12	0.43	0.20
pLC_{90}	4000-400	6	0.96	0.11	0.43	0.19
	3100-2800 & 1900-500	5	0.94	0.14	0.39	0.23
	1900-500	4	0.87	0.20	0.43	0.27
	3700-2800	6	0.86	0.20	0.31	0.16
	3100-2800	4	0.81	0.23	0.32	0.30
	3700-2800 & 1900-500	6	0.96	0.11	0.40	0.19

LV: λανθάνουσες μεταβλητές, r_c : συντελεστής συσχέτισης για τη βαθμονόμηση. RMSEC, RMSEP, RMSECV: τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης, πρόβλεψης και διασταυρωμένης επικύρωσης, αντίστοιχα.



Σχήμα 6.1. Μοντέλο βαθμονόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για την πρόβλεψη της τιμής pLC_{50} , με χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR από τις περιοχές $3700-2800\text{ cm}^{-1}$ και $1900-500\text{ cm}^{-1}$. Τα δείγματα των συνόλων βαθμονόμησης και επικύρωσης του μοντέλου απεικονίζονται με τα σύμβολα (○) και (+), αντίστοιχα.



Σχήμα 6.2. Μοντέλο βαθμονόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για την πρόβλεψη της τιμής pLC_{90} , με χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR από τις περιοχές $3700-2800\text{ cm}^{-1}$ και $1900-500\text{ cm}^{-1}$. Τα δείγματα των συνόλων βαθμονόμησης και επικύρωσης του μοντέλου απεικονίζονται με τα σύμβολα (○) και (+), αντίστοιχα.

6.4. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η φασματοσκοπία FT-IR μπορεί να παρέχει γρήγορες και αξιόπιστες εκτιμήσεις για την προνυμφοκτόνο δράση τερπενοειδών σε κουνούπια του είδους *Culex ripiens*. Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν 39 τερπενοειδείς ενώσεις, εκ των οποίων οι 8 χρησιμοποιήθηκαν για τα σύνολα ελέγχου των μοντέλων. Η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα πρώτο βήμα για την ποσοτική συσχέτιση της δομής-δραστικότητας μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR, σε συνδυασμό με τη μέθοδο πολυμεταβλητής βαθμονόμησης PLS. Οι παράμετροι που κρίνεται σκόπιμο να εξεταστούν στη συνέχεια αφορούν τον έλεγχο και άλλων μεθόδων πολυμεταβλητής βαθμονόμησης για την ανάπτυξη βέλτιστων μοντέλων εκτίμησης της βιοδραστικότητας. Επίσης, αντίστοιχα μοντέλα είναι δυνατό να προκύψουν και για άλλου τύπου δραστικότητες (π.χ. απωθητική δράση), σε άλλα είδη εντόμων υγειονομικής ή γεωργικής σημασίας. Θα μπορούσε, τέλος, να διερευνηθεί ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR με δεδομένα που λαμβάνονται υπόψη για την ανάπτυξη μοντέλων εκτίμησης της ποσοτικής σχέσης δομής-δραστικότητας (QSAR).

6.5. Βιβλιογραφία

- [1] <http://www.conops.gr/bilogikos-kyklos/> (τελευταία πρόσβαση 01.10.16).
- [2] Wang, Z., Song, J., Chen, J., Song, Z., Shang, S., Jiang, Z., Han, Z. (2008). QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2854–2859.
- [3] Hansch, C., Verma, R.P. (2009). Larvicidal activities of some organotin compounds on mosquito larvae: a QSAR study. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 260–273.
- [4] Paluch, G., Grodnitzky, J., Bartholomay, L., Coats, J. (2009). Quantitative structure-activity relationship of botanical sesquiterpenes: spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7618–7625.
- [5] Begum, N.A., Roy, N., Laskar, R.A., Roy, K. (2010). Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure–activity relationship analysis. *Med. Chem. Res.* 20, 184–191.
- [6] Garcia-Domenech, R., Aguilera, J., Moncef, A.E., Pocovi, S., Galvez, J. (2010). Application of molecular topology to the prediction of mosquito repellents of a group of terpenoid compounds. *Mol. Divers.* 14, 321–329.
- [7] Pasquale, G., Romanelli, G.P., Autino, J.C., Garcia, J., Ortiz, E.V., Duchowicz, P.R. (2012). Quantitative structure-activity relationships of mosquito larvicidal chalcone derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 60, 692–697.
- [8] Scotti, L., Scotti, M., Silva, V., Santos, S., Cavalcanti, S., Junior, F. (2014). Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. *Med. Chem.* 10, 201–210.
- [9] Grodnitzky, J.A., Coats, J.R. (2002). QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4576–4580.
- [10] Wang, Z., Song, J., Han, Z., Jiang, Z., Zheng, W., Chen, J., Song, Z., Shang, S. (2008). Quantitative structure–activity relationship of terpenoid aphid antifeedants. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11361–11366.
- [11] Badawy, M.E., El-Arami, S.A., Abdelgaleil, S.A. (2010). Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 52, 261–274.
- [12] Herrera, J.M., Zunino, M.P., Dambolena, J.S., Pizzolitto, R.P., Gañan, N.A., Lucini, E.I., Zygodlo, J.A. (2015). Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Ind. Crops Prod.* 70, 435–442.

-
- [13] Miladinovic, D.L., Ilic, B.S., Mihajilov-Krstev, T.M., Nikolic, N.D., Miladinovic, L.C., Cvetkovic, O.G. (2012). Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1007–1018.
- [14] Martincic, R., Kuzmanovski, I., Wagner, A., Novic, M. (2015). Development of models for prediction of the antioxidant activity of derivatives of natural compounds. *Anal. Chim. Acta* 868, 23–35.
- [15] Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H.M., Ross, C.F., Powers, J.R., Tang, J., Rasco, B.A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chem.* 129, 637–644.
- [16] Lu, X., Rasco, B.A. (2012). Determination of antioxidant content and antioxidant activity in foods using infrared spectroscopy and chemometrics: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 853–875.
- [17] Gerberg, E.J. (1970). *Manual for mosquito rearing and experimental techniques*. American Mosquito Control Association Bulletin No 5, 109 pp.
- [18] World Health Organization (1981). *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. WHO/VBC/81.807.

7. Γενικά Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε σε τρεις επιμέρους σύγχρονες πτυχές της φυτοχημικής ανάλυσης, αποσκοπώντας στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό, τον έλεγχο αυθεντικότητας και την εκτίμηση βιοδραστικότητας επιλεγμένων δευτερογενών μεταβολιτών και συναφών προϊόντων φυτικής προέλευσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρώτης μελέτης που πραγματοποιήθηκε, ο συνδυασμός της φασματοσκοπίας FT-IR με τη μέθοδο παλινδρόμησης PLS βρέθηκε να είναι ένα πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο για τον ακριβή και γρήγορο ποσοτικό προσδιορισμό της πουλεγόνης στο αιθέριο έλαιο από φλισκούνι. Συγκριτικά με τις καθιερωμένες αεριοχρωματογραφικές μεθόδους, οι οποίες είναι πολύ υψηλότερου κόστους και χρονοβόρες, η μέθοδος που αναπτύχθηκε φάνηκε πως είναι υποσχόμενη ως εναλλακτική και προσφέρεται για υψηλής απόδοσης αναλύσεις. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγεται ο απλός τρόπος καταγραφής των φασμάτων και η άμεση εκτίμηση της συγκέντρωσης πουλεγόνης, εφόσον έχει προηγηθεί η ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου βαθμονόμησης.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλιίνης και της μεθιίνης στο σκόρδο αναπτύχθηκαν νέες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι, οι οποίες βασίστηκαν στη χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιδόδων (PDA) και ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών - ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS). Η χρήση της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης (RSM) επέτρεψε την εύρεση των βέλτιστων τιμών για τις παραμέτρους της κινητής φάσης για τις δύο μεθόδους. Στα πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών συμπεριλαμβάνεται ο μικρός χρόνος ανάλυσης (20 λεπτά), ενώ επίσης δε χρειάζεται να προηγηθεί παραγωγοποίηση των ουσιών πριν από την ανάλυση του δείγματος. Στη συνέχεια, με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR μέσω της τεχνικής διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) σε συνδυασμό με την πολυμεταβλητή ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων αναπτύχθηκε μια εναλλακτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της αλλιίνης και της μεθιίνης στα μεθανολικά εκχυλίσματα από δείγματα σκόρδου. Για την ανάπτυξη των μοντέλων παλινδρόμησης με τη μέθοδο PLS, χρησιμοποιήθηκαν ως τιμές αναφοράς οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν με υγροχρωματογραφική ανάλυση. Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι μέσω της

προτεινόμενης μεθοδολογίας καθίσταται δυνατή η γρήγορη εκτίμηση της συγκέντρωσης αλλεΐνης και μεθίνης στο σκόρδο, χωρίς να καταστρέφεται το δείγμα.

Δεδομένου του συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος των παραγωγών, των εμπόρων και των καταναλωτών για την αυθεντικότητα πολύτιμων προϊόντων, όπως είναι τα στίγματα του κρόκου, στο πλαίσιο της διατριβής αναπτύχθηκαν δύο νέες μεθοδολογίες για τον έλεγχο νοθείας των στιγμάτων κρόκου με φυτικά υλικά νοθείας, χρησιμοποιώντας τις φασματοσκοπικές τεχνικές ^1H NMR και FT-IR καθώς και χημειομετρικές τεχνικές. Για πρώτη φορά αξιολογήθηκε η ικανότητα να διαχωρίζονται τα αυθεντικά και τα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου με βάση τα αποτυπώματα μεταβολιτών που προκύπτουν από τη μη στοχευμένη ανάλυση με ^1H NMR και FT-IR. Σε ό,τι αφορά τη μεθοδολογία που βασίστηκε στα φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR, η προτεινόμενη προσέγγιση δύο σταδίων οδήγησε στην ανίχνευση και ταυτοποίηση της νοθείας ελληνικών δειγμάτων από στίγματα κρόκου με τέσσερα χαρακτηριστικά υλικά φυτικής προέλευσης. Με το πρώτο μοντέλο επιβλεπόμενης ταξινόμησης OPLS-DA διαχωρίστηκαν πλήρως τα αυθεντικά από τα νοθευμένα δείγματα, γεγονός που συνδέθηκε με συγκεκριμένους δευτερογενείς μεταβολίτες - δείκτες ποιότητας και αυθεντικότητας για τα στίγματα κρόκου. Στη συνέχεια, η χρήση του μοντέλου O2PLS-DA οδήγησε στον προσδιορισμό του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε για τη νόθευση. Για την εγκυρότητα του προτεινόμενου πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκε και στις δύο περιπτώσεις ένα σύνολο δειγμάτων ελέγχου, επιβεβαιώνοντας έτσι την καλή προβλεπτική ικανότητα των μοντέλων. Η μεταβολομική προσέγγιση αυτή απαιτεί ελάχιστη κατεργασία του δείγματος και μόλις 10 mg ανά δείγμα στιγμάτων κρόκου, ενώ χαρακτηριστικά της αποτελούν η υψηλή αναπαραγωγικότητα και η γρήγορη εκτέλεση. Η λήψη του αποτυπώματος μεταβολιτών με τη χρήση της φασματοσκοπίας ^1H NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας αποδεικνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματική για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση διαδεδομένων παραγόντων αύξησης του βάρους των στιγμάτων κρόκου.

Στη μελέτη που βασίστηκε στη φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS), παρουσιάστηκε μια απλή και ευέλικτη προσέγγιση για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό έξι χαρακτηριστικών φυτικών υλικών νοθείας στα στίγματα κρόκου. Με τα φασματοσκοπικά δεδομένα που παραλήφθηκαν έγινε η ανάπτυξη γραμμικών μοντέλων πολυμεταβλητής ταξινόμησης και βαθμονόμησης, τα οποία βελτιστοποιήθηκαν με τεχνικές επεξεργασίας των δεδομένων, επιλογής δειγμάτων για τα σύνολα βαθμονόμησης

(εκπαίδευσης) και ελέγχου, καθώς και επιλογής μεταβλητών. Τα βελτιστοποιημένα μοντέλα siPLS/PLS που αναπτύχθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτικών υλικών νοθείας παρουσίασαν συγκρίσιμα ή ακόμη χαμηλότερα όρια ανίχνευσης σε σχέση με αυτά που έχουν αναφερθεί για υγροχρωματογραφικές μεθόδους. Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε, μέσω μιας διαδικασίας τριών βημάτων, επιβεβαιώνει την πρακτική καταλληλότητα της τεχνικής DRIFTS σε συνδυασμό με χημειομετρική ανάλυση ως μια γρήγορη εναλλακτική και οικονομική λύση για υψηλής απόδοσης αναλύσεις. Και σε αυτήν την περίπτωση απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία και ποσότητα δείγματος (περίπου 4 mg), ενώ επίσης το δείγμα δεν καταστρέφεται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αναλύσεις.

Οι προσεγγίσεις αυτές παρέχουν τη δυνατότητα εφαρμογής για τη διαλογή μεγάλων εμπορικών παρτίδων ελληνικού προϊόντος, λαμβάνοντας μάλιστα υπόψη τις δυσκολίες στην ανίχνευση της οικονομικής απάτης σύμφωνα με τις σχετικές μεθόδους του προτύπου ISO 3632, ιδίως όταν τα υλικά νοθείας είναι φυτικής προέλευσης και η εμπορία του προϊόντος γίνεται σε μορφή σκόνης. Τα αποτελέσματα των δύο μελετών επιβεβαιώνουν την ιδιαίτερη χρησιμότητα των φασματοσκοπικών τεχνικών ^1H NMR και FT-IR, σε συνδυασμό με κατάλληλες χημειομετρικές τεχνικές, για την άμεση διερεύνηση της ποιότητας και της γνησιότητας φυσικών προϊόντων και τροφίμων.

Η φασματοσκοπία ^1H NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φάνηκε, επίσης, να προσφέρεται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των χρωστικών Sudan I-IV σε ενδεχομένη νοθεία τέτοιου τύπου στα στίγματα κρόκου. Χρησιμοποιώντας ξεχωριστά σήματα αρωματικών πρωτονίων για κάθε αντίστοιχη χρωστική Sudan και εφαρμόζοντας την καθιερωμένη μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού με ^1H NMR (qHNMR), είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των χρωστικών σε δείγματα νοθευμένων σιγμάτων κρόκου. Ως χαρακτηριστικό παράδειγμα λήφθηκε υπόψη η χρωστική Sudan III, εξετάζοντας για διάφορα επίπεδα νοθείας (0.14 – 7.1 g/kg) το σήμα NMR που εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση 8.064 ppm. Η υψηλή γραμμικότητα, η ακρίβεια και η ταχύτητα της προσέγγισης αυτής έδειξαν ότι καθίσταται κατάλληλη για την αξιολόγηση της νοθείας των σιγμάτων κρόκου με χρωστικές ουσίες αυτού του τύπου. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή απαιτεί ελάχιστη κατεργασία των δειγμάτων σε σύγκριση με υγροχρωματογραφικές μεθόδους, ενώ, επίσης, αποφεύγονται πιθανά προβλήματα που μπορούν να ανακύψουν λόγω της επίδρασης του υποστρώματος. Ως προς την

επιλογή του διαλύτη, το χλωροφόρμιο φάνηκε να ενδείκνυται για την ανίχνευση νοθείας με λιπόφιλες χρωστικές στα στίγματα κρόκου, ενώ για τον έλεγχο νοθείας με υδρόφιλα μόρια ή υλικά φυτικής προέλευσης πιο κατάλληλος διαλύτης κρίνεται το DMSO.

Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης που διεξήχθη για την εκτίμηση της βιοδραστικότητας τερπενοειδών ενώσεων σε προνύμφες κουνουπιών του είδους *Culex pipiens* L. έδειξαν ότι η φασματοσκοπία FT-IR μπορεί να συντελέσει στη διερεύνηση της σχέσης δομής - δραστικότητας των ενώσεων αυτών. Από τα φάσματα FT-IR που καταγράφηκαν, συγκεκριμένες ταινίες απορρόφησης χαρακτηριστικής έντασης οφείλονται στην ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων που μπορούν να καθορίζουν τη δραστικότητα μορίων με ανάλογη δομή. Οι τιμές θανάσιμων συγκεντρώσεων LC_{50} και LC_{90} που προσδιορίστηκαν, κατά τον έλεγχο της τοξικής δράσης τερπενοειδών, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης της εν λόγω δραστικότητας, τα οποία στηρίχθηκαν στα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR και τη μέθοδο πολυμεταβλητής βαθμονόμησης PLS.

8. Προοπτικές - Προτάσεις

Οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή εντάσσονται στο πλαίσιο της ανάλυσης φυσικών προϊόντων και έχουν τη δυνατότητα να εφαρμοστούν σε ένα ευρύ πεδίο. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πουλεγόνης στο αιθέριο έλαιο από φλισκούνι με τη φασματοσκοπική μέθοδο FT-IR παρουσιάζει ενδιαφέρον, κυρίως, για τη βιομηχανία τροφίμων, προκειμένου να γίνεται ταχεία αξιολόγηση της πρώτης ύλης και έτσι να διασφαλίζεται ότι η συγκέντρωση πουλεγόνης στα τελικά προϊόντα βρίσκεται εντός των επιτρεπόμενων ορίων.

Το πεδίο εφαρμογής των μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλιίνης και της μεθιίνης στο σκόρδο εντοπίζεται στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, όπου γίνεται αξιολόγηση της πρώτης ύλης από την οποία προκύπτουν συναφή τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής ή σκευάσματα. Ειδικότερα για τα σκευάσματα σκόρδου, με επέκταση των μεθόδων θα είναι εφικτός ο απευθείας προσδιορισμός αλλιίνης και μεθιίνης. Περιλαμβάνοντας κι άλλες πρότυπες ουσίες (π.χ. ισοαλλίνη, προπιίνη κλπ.) καθώς και διαφορετικά υποστρώματα, δύναται να προκύψει μελλοντικά μια μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των πρόδρομων ουσιών από μια ευρύτερη ομάδα φυτικών προϊόντων του γένους *Allium*, με βάση την τεχνική υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC). Η αξιολόγηση και άλλων στατικών φάσεων HILIC είναι δυνατό να οδηγήσει σε περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου. Η γρήγορη εκτίμηση της συγκέντρωσης αλλιίνης και μεθιίνης στο σκόρδο, χωρίς να καταστρέφεται το δείγμα, καθίσταται δυνατή με την εφαρμογή της μεθόδου που βασίστηκε στην τεχνική DRIFTS σε συνδυασμό με τη μέθοδο παλινδρόμησης PLS, ενώ για την ανάπτυξη μεθόδων που απαιτούν ελάχιστη κατεργασία του δείγματος υπάρχει η δυνατότητα να ελεγχθούν και άλλες τεχνικές καταγραφής φασμάτων FT-IR (π.χ. ATR-IR).

Οι μέθοδοι που προτείνονται για τον έλεγχο νοθείας των στιγμάτων κρόκου με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR ή ^1H NMR μπορούν να αξιοποιηθούν από φορείς ελέγχου τροφίμων, εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου ή ακόμη και από τη βιομηχανία τροφίμων. Με επέκταση των μεθόδων θα είναι δυνατό να ελεγχθούν προϊόντα διαφορετικής προέλευσης, τα οποία ενδεχομένως προκύπτουν μέσω διαφορετικών μεθόδων ξήρανσης, όπως επίσης και δείγματα άλλων κατηγοριών κατά ISO. Για την ανάπτυξη των μοντέλων ταξινόμησης μπορούν να

ελεγχθούν και διαφορετικές μεθοδολογίες επιβλεπόμενης ταξινόμησης. Σχετικά με τα μοντέλα ποσοτικοποίησης που αναπτύχθηκαν με τη χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR, είναι δυνατό να ελεγχθούν μεθοδολογίες ικανές να προσαρμόζουν τη βαθμονόμηση ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση ή την κατηγορία των δειγμάτων. Η προσέγγιση της σύντηξης των δεδομένων (data fusion) που λαμβάνονται με τη χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών FT-IR και $^1\text{H NMR}$ ενδέχεται να αποτελέσει ένα ακόμη σημαντικό αναλυτικό εργαλείο για τον αξιόπιστο έλεγχο νοθείας στα δείγματα στιγμάτων κρόκου. Η φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$ μπορεί, επίσης, να παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης της νοθείας και με άλλες συνθετικές χρωστικές εκτός των χρωστικών Sudan I-IV, ενώ η χρήση της μεθοδολογίας qHNMR μπορεί επιπλέον να αξιολογηθεί για το γρήγορο ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Αναφορικά με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε για την εκτίμηση της βιοδραστικότητας τερπενοειδών ενώσεων σε προνύμφες κουνουπιών του είδους *Culex ripiens*, αποτελεί ένα πρώτο βήμα για την ποσοτική συσχέτιση της δομής-δραστικότητας μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR. Οι παράμετροι που θα ήταν χρήσιμο να εξεταστούν σε συνέχεια της μελέτης αφορούν τον έλεγχο και άλλων μεθόδων πολυμεταβλητής βαθμονόμησης, για την ανάπτυξη βέλτιστων μοντέλων εκτίμησης της βιοδραστικότητας, καθώς και τον έλεγχο βιοδραστικότητας σε άλλα είδη εντόμων υγειονομικής ή γεωργικής σημασίας. Θα μπορούσε, τέλος, να διερευνηθεί ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR με δεδομένα που λαμβάνονται υπόψη για την ανάπτυξη μοντέλων εκτίμησης της ποσοτικής σχέσης δομής-δραστικότητας (QSAR).

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2.1. Δομή της (R)-(+)-πουλεγόνης.....	10
Εικόνα 2.2. Πορεία βιοσύνθεσης της πουλεγόνης στο φλισκούνι και σε άλλα είδη του γένους <i>Mentha</i> , σύμφωνα με τους Turner & Croteau [14]. Οι επιμέρους ενζυματικές αντιδράσεις καταλύονται από: (1) τη συνθετάση του διφωσφορικού γερανυλίου (GPPS), (2) τη συνθετάση του (-)-λιμονένιου, (3) την υδροξυλάση του (-)-λιμονένιου (L3OH), (4) την αφυδρογονάση της ισοπιπεριτενόλης ((-)- <i>trans</i> -IPD), (5) την αναγωγή της (-)-ισοπιπεριτενόνης, και (6) την ισομεράση της (+)- <i>cis</i> -ισοπουλεγόνης.	10
Εικόνα 2.3. Μετατροπή της πουλεγόνης σε μενθοφουράνιο.....	11
Εικόνα 2.4. Συσκευή τύπου Clevenger για την παραλαβή αιθερίου ελαίου από φλισκούνι με υδροαπόσταξη (HD).....	14
Εικόνα 3.1. Δομές της αλλιίνης και της μεθίνης.	33
Εικόνα 3.2. Η ομάδα της διοντικής σουλφοβεταΐνης στη στατική φάση της στήλης ZIC-HILIC.	35
Εικόνα 4.1. Χαρακτηριστικά υλικά φυτικής προέλευσης που αναφέρονται συχνά σε περιπτώσεις νοθείας των στιγμάτων κρόκου. (α) Στήμονες κρόκου, (β) καλέντουλα, (γ) κάρθαμος, (δ) κουρκουμάς, (ε) εκχύλισμα βουδλίας και (στ) καρποί γαρδένιας από όπου παραλαμβάνεται το αντίστοιχο εκχύλισμα.	69
Εικόνα 5.1. Δομές των χρωστικών Sudan I-IV.....	122

Κατάλογος Πινάκων

- Πίνακας 2.1.** Χημική σύσταση (%) των αιθερίων ελαίων PO1-PO6 που παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη από τα αντίστοιχα δείγματα ξηρής δρόγης φλισκουιού (*Mentha pulegium* L.).....19
- Πίνακας 2.2.** Συγκέντρωση πουλεγόνης (\pm SD) στα αιθέρια έλαια από φλισκούνι, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αναφοράς GC-FID και τη νέα μέθοδο που βασίστηκε στη φασματοσκοπία FT-IR. Παρατίθενται, επίσης, οι τιμές που προέκυψαν από τους στατιστικούς ελέγχους *F* και *t*.26
- Πίνακας 3.1.** Πειραματικός πίνακας για τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD) δύο μεταβλητών.41
- Πίνακας 3.2.** Πειραματικός πίνακας κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD) με τα επίπεδα των μεταβλητών και τις αποκρίσεις που μελετήθηκαν.....43
- Πίνακας 3.3.** Εξισώσεις παλινδρόμησης και στατιστικές παράμετροι των αποκρίσεων που εξετάστηκαν μέσω του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD).....43
- Πίνακας 3.4.** Στοιχεία γραμμικότητας, όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης για την αλλίνη και τη μεθίνη με τις δύο μεθόδους.51
- Πίνακας 3.5.** Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης της αλλίνης και της μεθίνης για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε δείγμα σκόρδου ($n = 6$).51
- Πίνακας 3.6.** Επαναληψιμότητα, ενδιάμεση πιστότητα και αναπαραγωγιμότητα της έγχυσης για τις δύο μεθόδους.52
- Πίνακας 3.7.** Συγκέντρωση αλλίνης και μεθίνης στα δείγματα σκόρδου που εξετάστηκαν.53
- Πίνακας 3.8.** Αποδόσεις των κυριότερων κορυφών απορρόφησης για την αλλίνη και τη μεθίνη στη φασματική περιοχή του μέσου υπερύθρου ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) [41,42].60
- Πίνακας 4.1.** Λίστα ταξινόμησης για τα 15 δείγματα του συνόλου ελέγχου (3 αυθεντικά δείγματα και 12 νοθευμένα με τα 4 διαφορετικά φυτικά υλικά νοθείας) που προβλήθηκαν στο μοντέλο OPLS-DA δύο κατηγοριών, όπως αναπτύχθηκε με 35 δείγματα (7 αυθεντικά και 28 νοθευμένα δείγματα). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο της εκτιμώμενης τιμής απόκρισης *Y*, το οποίο υποδεικνύει σε τι βαθμό είναι αντιπροσωπευτικό κάθε δείγμα για την εκάστοτε κατηγορία. Ως κατώτερη οριακή τιμή για κάθε κατηγορία θεωρήθηκε το 0.6.....82
- Πίνακας 4.2.** Λίστα ταξινόμησης για τα 12 δείγματα του συνόλου ελέγχου (3 νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου για κάθε φυτικό υλικό νοθείας) που προβλήθηκαν στο μοντέλο O2PLS-DA 4 κατηγοριών, όπως αναπτύχθηκε με 28 νοθευμένα δείγματα (7 νοθευμένα δείγματα για κάθε υλικό). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο της εκτιμώμενης τιμής

απόκρισης Y, το οποίο υποδεικνύει σε τι βαθμό είναι αντιπροσωπευτικό κάθε δείγμα για την εκάστοτε κατηγορία. Η κατώτερη οριακή τιμή που λήφθηκε υπόψη για την ορθότητα της ταξινόμησης ήταν το 0.6.	84
Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS-DA δύο κατηγοριών, τα οποία αναπτύχθηκαν με χρήση διαφορετικών τεχνικών επεξεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων από ολόκληρη τη φασματική περιοχή (4000-600 cm ⁻¹).	98
Πίνακας 4.4. Κατάλογος δειγμάτων που επιλέχθηκαν, σύμφωνα με τον αλγόριθμο Duplex, για τα σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου του μοντέλου PLS-DA δύο κατηγοριών.	99
Πίνακας 4.5. Παράμετροι ταξινόμησης που προσδιορίστηκαν από το μοντέλο PLS-DA δύο κατηγοριών για τη διαφοροποίηση των καθαρών και των νοθευμένων δειγμάτων.	99
Πίνακας 4.6. Κατάλογος δειγμάτων που επιλέχθηκαν, σύμφωνα με τον αλγόριθμο Duplex, για τα σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου του μοντέλου PLS-DA έξι κατηγοριών.	102
Πίνακας 4.7. Πίνακας σύγκρισης με τα αποτελέσματα ταξινόμησης όπως προέκυψαν από το μοντέλο PLS-DA έξι κατηγοριών.	103
Πίνακας 4.8. Παράμετροι ταξινόμησης που προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το μοντέλο PLS-DA έξι κατηγοριών για την ταυτοποίηση των φυτικών υλικών νοθείας στα νοθευμένα δείγματα.	104
Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS που αναπτύχθηκαν για την ποσοτικοποίηση κάθε φυτικού υλικού νοθείας στα αντίστοιχα νοθευμένα δείγματα, χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές προκατεργασίας των δεδομένων από ολόκληρη τη φασματική περιοχή (4000-600 cm ⁻¹).	107
Πίνακας 4.10. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS που βασίστηκαν σε διαφορετικά εύρη κυματαριθμών (διαστήματα μεταβλητών), όπως αυτά επιλέχθηκαν με τις μεθόδους επιλογής μεταβλητών iPLS και siPLS.	109
Πίνακας 4.11. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS που αναπτύχθηκαν για την ποσοτικοποίηση κάθε φυτικού υλικού νοθείας στα νοθευμένα δείγματα, χρησιμοποιώντας διαφορετικά εύρη κυματαριθμών.	110
Πίνακας 4.12. Σύγκριση των ορίων ανίχνευσης και των τιμών αναλυτικής ευαισθησίας που προέκυψαν για κάθε υλικό νοθείας μέσω siPLS/PLS, σε εύρος συγκεντρώσεων 0-20% (w/w).	112
Πίνακας 5.1. Χημικές μετατοπίσεις των ¹ H και ¹³ C των συνθετικών χρωστικών Sudan I-IV σε διαλύτη CDCl ₃	131
Πίνακας 6.1. Τιμές rLC ₅₀ και rLC ₉₀ των τερπενοειδών που χρησιμοποιήθηκαν στα σύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου των μοντέλων PLS.	151

Πίνακας 6.2. Αποτελέσματα επίδοσης των μοντέλων PLS για την εκτίμηση των τιμών pLC_{50} και pLC_{90} , τα οποία βασίστηκαν σε διαφορετικά εύρη κυματαριθμών.152

Κατάλογος Σχημάτων

- Σχήμα 2.1.** Καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια από φλισκούνι, όπως προέκυψε για τη μέθοδο αναφοράς με GC-FID.....20
- Σχήμα 2.2.** Φάσματα FT-IR της πουλεγόνης και χαρακτηριστικών αιθερίων ελαίων από δείγματα φλισκουνιού με χημειότυπο πουλεγόνης στη φασματική περιοχή $3050-500\text{ cm}^{-1}$22
- Σχήμα 2.3.** Μοντέλο βαθμονόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό πουλεγόνης με χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR. Τα δείγματα βαθμονόμησης και επικύρωσης του μοντέλου απεικονίζονται με τα σύμβολα (ο) και (+), αντίστοιχα. ...23
- Σχήμα 2.4.** Επίδοση του μοντέλου βαθμονόμησης κατά τη διασταυρωμένη επικύρωση με την επαναληπτική διαδικασία μιας παράλειψης (LOO).24
- Σχήμα 2.5.** Διάγραμμα μεταβολής των τιμών RMSECV σύμφωνα με τον αριθμό των λανθανουσών μεταβλητών/παραγόντων PLS (LVs) στη διασταυρωμένη επικύρωση και στη βαθμονόμηση του μοντέλου PLS για τον προσδιορισμό της πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια φλισκουνιού. Ο βέλτιστος αριθμός παραγόντων που συνετέλεσαν στο να ελαχιστοποιηθεί η τιμή RMSECV και ακολούθως η τιμή PRESS ήταν 5.....24
- Σχήμα 2.6.** Φάσματα FT-IR της πουλεγόνης και των υπολοίπων βασικών πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου από φλισκούνι, όπου επισημαίνεται η επιλεγμένη φασματική περιοχή $1650-1260\text{ cm}^{-1}$25
- Σχήμα 2.7.** Ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες σύμφωνα με τον αλγόριθμο του Ward για τα φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR της περιοχής $1650-1260\text{ cm}^{-1}$ που προέκυψαν από τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων από φλισκούνι.26
- Σχήμα 2.8.** Σύγκριση τιμών αναφοράς (GC-FID) και τιμών που προέκυψαν με χρήση του μοντέλου PLS, βάσει των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR, για τη συγκέντρωση πουλεγόνης στα αιθέρια έλαια από φλισκούνι.27
- Σχήμα 3.1.** Διαγράμματα επιφάνειας απόκρισης που απεικονίζουν το λόγο μονομερούς/διμερούς (βάσει εμβადού κορυφής) και το εύρος κορυφής ως συνάρτηση της τιμής του pH και του % ποσοστού νερού στην κινητή φάση για την αλλίνη (α, β) και τη μεθίνη (γ, δ), αντίστοιχα. Στο διάγραμμα (ε) απεικονίζεται η διαχωριστικότητα για τις κορυφές αλλίνης και μεθίνης σε συνάρτηση της τιμής του pH και του % ποσοστού νερού στην κινητή φάση.....45
- Σχήμα 3.2.** Φάσματα UV (α) της αλλίνης, (β) της πρότυπης ουσίας αναφοράς (CMC) και (γ) της μεθίνης.45

Σχήμα 3.3. Τυπικό χρωματογράφημα δείγματος σκόρδου σε σύστημα LC με στήλη ZIC-HILIC και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδίοδων (PDA) σε μήκος κύματος 210 nm. Η αλλιλίνη (ACSO), η πρότυπη ουσία αναφοράς (CMC) και η μεθιλίνη (MCSO) παρουσιάζουν χρόνους κατακράτησης 8.93, 11.59 και 14.20 min, αντίστοιχα.	46
Σχήμα 3.4. (α) Χρωματογράφημα LC-MS όπου εμφανίζονται οι κορυφές των επιλεγμένων ιόντων (SIM) της αλλιλίνης [αλλιλίνη + H] ⁺ και του διμερούς της [2(αλλιλίνη) + H] ⁺ . (β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό, όπου απεικονίζεται το ιόν της αλλιλίνης μαζί με άλλα ιόντα προσθήκης.	47
Σχήμα 3.5. (α) Χρωματογράφημα LC-MS όπου εμφανίζονται οι κορυφές των επιλεγμένων ιόντων (SIM) της μεθιλίνης [μεθιλίνη + H] ⁺ και του διμερούς της [2(μεθιλίνη) + H] ⁺ . (β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό, όπου απεικονίζεται το ιόν της μεθιλίνης μαζί με άλλα ιόντα προσθήκης.	48
Σχήμα 3.6. (α) Χρωματογράφημα LC-MS όπου έχουν επιλεγθεί τα ιόντα της S-καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνης [CMC + H] ⁺ και του διμερούς της [2(CMC) + H] ⁺ . (β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης σε θετικό ιονισμό, όπου απεικονίζεται το ιόν του CMC μαζί με άλλα ιόντα προσθήκης.	49
Σχήμα 3.7. Χρωματογράφημα LC-MS όπου εμφανίζονται οι κορυφές των επιλεγμένων ιόντων (SIM) της αλλιλίνης [αλλιλίνη + H] ⁺ , του CMC [CMC + H] ⁺ και της μεθιλίνης [μεθιλίνη + H] ⁺	50
Σχήμα 3.8. Φάσματα FT-IR της αλλιλίνης και της μεθιλίνης σε όλη την φασματική περιοχή του μέσου υπερύθρου (4000-400 cm ⁻¹).	59
Σχήμα 4.1. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων ¹ H NMR που λήφθηκαν από τα εκχυλίσματα σε DMSO-d ₆ . Το φάσμα στην κορυφή του σχήματος, εντός γκρι πλαισίου, είναι χαρακτηριστικό των αυθεντικών στιγμάτων κρόκου. Τα φάσματα του καθαρών φυτικών υλικών (κουρκουμάς, στήμονες κρόκου, κάρθαμος και εκχύλισμα από τους καρπούς γαρδένιας) απεικονίζονται στο κάτω μέρος των τμημάτων Α, Β, Γ και Δ, αντίστοιχα, ενώ στο άνω μέρος εμφανίζονται τα φάσματα από τα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου σε επίπεδο 20% (w/w) με τα επιμέρους φυτικά υλικά.	77
Σχήμα 4.2. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) PCA (PC1 έναντι PC2) από την εξέταση 10 αυθεντικών δειγμάτων από στίγματα κρόκου (μωβ κύκλοι) και των ίδιων δειγμάτων νοθευμένων σε συγκέντρωση 20% (w/w) με εκχύλισμα γαρδένιας (γαλάζιοι κύκλοι), κάρθαμο (μαύροι κύκλοι), στήμονες κρόκου (ροζ κύκλοι) και κουρκουμά (πράσινοι κύκλοι), διαμορφώνοντας ένα σύνολο 40 νοθευμένων δειγμάτων. PC1 = 36.8%, PC2 = 26.9%, R ² X = 99.5% και Q ² = 96.2%.	78
Σχήμα 4.3. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) OPLS-DA μεταξύ παράλληλης και κύριας ορθογώνιας συνιστώσας, όπως προέκυψε από την εξέταση όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν, τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: αυθεντικά (μωβ κύκλοι) και νοθευμένα (μαύροι κύκλοι) δείγματα στιγμάτων κρόκου. R ² X = 82.4%, R ² Y = 94.5% και Q ² = 92.3%.	79
Σχήμα 4.4. (α) Διάγραμμα σιμοειδούς μορφής (S-plot) σύμφωνα με το μοντέλο OPLS-DA που αναπτύχθηκε για την ταξινόμηση των αυθεντικών και νοθευμένων δειγμάτων από στίγματα κρόκου (R ² X = 82.4%, R ² Y = 94.5% και Q ² = 92.3%). (β) Μεγέθυνση της περιοχής που περιλαμβάνει τις πιο χαρακτηριστικές μεταβλητές (buckets) για τα αυθεντικά δείγματα στιγμάτων κρόκου.	80

Σχήμα 4.5. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) O2PLS-DA μεταξύ πρώτης και τρίτης παράλληλης συνιστώσας όπως προέκυψε από την εξέταση νοθευμένων δειγμάτων, χωρισμένων σε 4 κατηγορίες ανάλογα με το είδος του φυτικού υλικού νοθείας. Τα δείγματα στιγμάτων κρόκου που νοθεύθηκαν σε συγκέντρωση 20% (w/w) με εκχύλισμα γαρδένιας, κάρθαμο, στήμονες κρόκου και κουρκουμά παρουσιάζονται με γαλάζιους, μαύρους, ροζ, και πράσινους κύκλους, αντίστοιχα. $R^2X = 95.2\%$, $R^2Y = 97.6\%$ και $Q^2 = 96\%$81

Σχήμα 4.6. Φάσματα FT-IR που λήφθηκαν με την τεχνική DRIFTS (α) από στήμονες κρόκου (κίτρινη γραμμή), καλέντουλα (γαλάζια διακεκομμένη γραμμή), κάρθαμο (καφέ γραμμή), κουρκουμά (γκρι διακεκομμένη γραμμή), και (β) από εκχυλίσματα βουδλίας (γκρι γραμμή) και γαρδένιας (γαλάζια διακεκομμένη γραμμή). Και στα δύο πλαίσια συμπεριλαμβάνεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα από στίγματα κρόκου (κόκκινη γραμμή), ενώ στο πλαίσιο (β) επισημαίνονται οι χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης (ν) των κροκινών.93

Σχήμα 4.7. Φάσματα FT-IR που λήφθηκαν με την τεχνική DRIFTS από δείγμα στιγμάτων κρόκου (κόκκινη γραμμή) και το ίδιο δείγμα έπειτα από νόθευση με καθένα από τα φυτικά υλικά στα επίπεδα 5% (καφέ γραμμή), 10% (κίτρινη γραμμή) και 20% (γαλάζια γραμμή), στη φασματική περιοχή $2000-600\text{ cm}^{-1}$. Τα φάσματα των καθαρών φυτικών υλικών (στήμονες κρόκου, καλέντουλα, κάρθαμος, κουρκουμάς και εκχυλίσματα βουδλίας και γαρδένιας) παρατίθενται στα αντίστοιχα πλαίσια (α) έως (στ) με γκρι διακεκομμένη γραμμή.94

Σχήμα 4.8. Διάγραμμα αποτελεσμάτων (score plot) από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα δείγματα στιγμάτων κρόκου (κλάση 1) και τα νοθευμένα δείγματα σε επίπεδο 5, 10 και 20% (w/w) με στήμονες κρόκου (κλάση 2), καλέντουλα (κλάση 3), κάρθαμο (κλάση 4), κουρκουμά (κλάση 5), εκχύλισμα βουδλίας (κλάση 6) και εκχύλισμα γαρδένιας (κλάση 7). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1 και PC2), όπου γίνεται η προβολή των δεδομένων, ερμηνεύουν το 92.5% της αρχικής διακύμανσης.97

Σχήμα 4.9. Διάγραμμα ταξινόμησης PLS-DA (α) για τα καθαρά δείγματα στιγμάτων κρόκου (κόκκινοι κύκλοι) και (β) για τα νοθευμένα δείγματα που προέκυψαν με χρήση των 6 επιμέρους φυτικών υλικών στα επίπεδα συγκεντρώσεων 5, 10 και 20% (w/w). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου που ανήκουν στις δύο κατηγορίες απεικονίζονται με αστερίσκο του αντίστοιχου χρώματος. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει την οριακή τιμή για την κατηγορία 1 (αυθεντικά δείγματα).100

Σχήμα 4.10. Διάγραμμα ταξινόμησης PLS-DA (α) για τα καθαρά δείγματα στιγμάτων κρόκου (κόκκινοι κύκλοι) και (β) για τα νοθευμένα δείγματα που προέκυψαν με χρήση των 6 επιμέρους φυτικών υλικών στα επίπεδα συγκεντρώσεων 5, 10 και 20% (w/w). Τα δείγματα στιγμάτων κρόκου που περιλαμβάνονται στο σύνολο ελέγχου αναφοράς απεικονίζονται με γκρι τρίγωνα. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει την οριακή τιμή για την κατηγορία 1 (αυθεντικά δείγματα).101

Σχήμα 4.11. Διαγράμματα ταξινόμησης PLS-DA για τις έξι κατηγορίες νοθευμένων δειγμάτων ανάλογα με το υλικό νοθείας: (α) στήμονες κρόκου (κατηγορία 1, μπλε κύκλοι), (β) καλέντουλα (κατηγορία 2, κόκκινοι κύκλοι), (γ) κάρθαμος (κατηγορία 3, γαλάζιοι κύκλοι), (δ) κουρκουμάς (κατηγορία 4, κίτρινοι κύκλοι), (ε) εκχύλισμα βουδλίας (κατηγορία 5, γκρι κύκλοι) και (στ) εκχύλισμα γαρδένιας (κατηγορία 6, ροζ κύκλοι). Τα δείγματα του συνόλου ελέγχου που ανήκουν στις επιμέρους κατηγορίες απεικονίζονται με αστερίσκο

του αντίστοιχου χρώματος. Η οριακή τιμή για κάθε κατηγορία επισημαίνεται με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή.105

Σχήμα 4.12. Συνδυασμοί διαστημάτων φασματοσκοπικών δεδομένων DRIFTS που επιλέχθηκαν με τη μέθοδο siPLS και εξασφάλισαν τη βέλτιστη επίδοση στα μοντέλα PLS για την ποσοτικοποίηση (α) των στημόνων κρόκου, (β) της καλέντουλας, (γ) του κάρθαμου, (δ) του κουρκουμά, (ε) του εκχυλίσματος βουδλίας και (στ) του εκχυλίσματος γαρδένιας στα αντίστοιχα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου.111

Σχήμα 5.1. Αριθμός δημοσιευμένων ερευνητικών εργασιών ανά έτος για τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan σε τρόφιμα. Το σύνολο των δημοσιεύσεων για την περίοδο 2003-2015 ξεπερνά τις 215. (Πηγές: βάσεις δεδομένων Scopus και PubMed)123

Σχήμα 5.2. Δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες για τον προσδιορισμό των χρωστικών Sudan σε τρόφιμα με χρήση διάφορων αναλυτικών τεχνικών. Το σύνολο των δημοσιεύσεων για την περίοδο 2003-2015 ξεπερνά τις 215. (Πηγές: βάσεις δεδομένων Scopus και PubMed).....124

Σχήμα 5.3. Περιοχή των αρωματικών πρωτονίων στα φάσματα ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) των χρωστικών Sudan I-IV και των στιγμάτων κρόκου. Τα επιλεγμένα σήματα για την ταυτοποίηση των επιμέρους χρωστικών Sudan στα νοθευμένα δείγματα στιγμάτων κρόκου επισημαίνονται με πλαίσιο του αντίστοιχου χρώματος.132

Σχήμα 5.4. Επιλεγμένη περιοχή των αρωματικών πρωτονίων στα φάσματα ^1H NMR που λήφθηκαν από τα εκχυλίσματα σε CDCl_3 του δείγματος στιγμάτων κρόκου, του εμβολιασμένου δείγματος με χρωστική Sudan III στις συγκεντρώσεις (α) 0.14 g/kg, (β) 0.36 g/kg, (γ) 0.71 g/kg, (δ) 1.4 g/kg, (ε) 3.6 g/kg και (στ) 7.1 g/kg, και του καθαρού Sudan III (από κάτω προς τα πάνω). Το σήμα που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του Sudan III εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση 8.064 ppm ($2'$, $6'$ H) και επισημαίνεται με κόκκινο πλαίσιο.....133

Σχήμα 5.5. Γραμμική συσχέτιση της πραγματικής περιεκτικότητας (g/kg) των εμβολιασμένων δειγμάτων από στίγματα κρόκου σε Sudan III και (α) των τιμών ολοκληρώματος του σήματος σε χημική μετατόπιση 8.064 ppm, (β) της περιεκτικότητας (g/kg) που υπολογίστηκε για τη χρωστική λαμβάνοντας υπόψη το υπολειπόμενο σήμα του CHCl_3 στα 7.260 ppm. Τα επίπεδα νοθείας που ελέγχθηκαν ήταν από 0.14 έως 7.1 g/kg.....134

Σχήμα 5.6. Γραμμική συσχέτιση της πραγματικής περιεκτικότητας (g/kg) των εμβολιασμένων δειγμάτων από στίγματα κρόκου σε Sudan III και της περιεκτικότητας (g/kg) που υπολογίστηκε για τη χρωστική Sudan III με χρήση του Sudan II ως εξωτερικού πρότυπου. Τα επίπεδα νοθείας που ελέγχθηκαν ήταν από 0.14 έως 7.1 g/kg.....136

Σχήμα 6.1. Μοντέλο βαθμονόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για την πρόβλεψη της τιμής pLC_{50} , με χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR από τις περιοχές $3700\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ και $1900\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Τα δείγματα των συνόλων βαθμονόμησης και επικύρωσης του μοντέλου απεικονίζονται με τα σύμβολα (ο) και (+), αντίστοιχα.....153

Σχήμα 6.2. Μοντέλο βαθμονόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για την πρόβλεψη της τιμής pLC_{90} , με χρήση των φασματοσκοπικών δεδομένων FT-IR από τις περιοχές $3700-2800\text{ cm}^{-1}$ και $1900-500\text{ cm}^{-1}$. Τα δείγματα των συνόλων βαθμονόμησης και επικύρωσης του μοντέλου απεικονίζονται με τα σύμβολα (ο) και (+), αντίστοιχα.....153

Συντμήσεις - Αρκτικόλεξα

ACN	Ακετονιτρίλιο Acetonitrile
ACSO	Σουλφοξείδιο της S-αλλυλο-L-κυστεΐνης (αλλιίνη) S-Allyl-L-cysteine sulfoxide (alliin)
CCD	Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός Central composite design
CMC	S-Καρβοξυμεθυλο-L-κυστεΐνη S-Carboxymethyl-L-cysteine
CV	Διασταυρωμένη επικύρωση Cross validation
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο Dimethyl sulfoxide
DRIFTS	Φασματοσκοπία υπερύθρου διάχυτης ανάκλασης με μετασχηματισμό Fourier Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy
DTGS	Δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη Deuterated triglycine sulfate
EI	Ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων Electron impact
ESI	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό Electrospray ionization
EtOH	Αιθανόλη Ethanol
FID	Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας Flame ionization detector
FT	Μετασχηματισμός Fourier Fourier transform
GC	Αέρια χρωματογραφία Gas chromatography
GC-MS	Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών Gas chromatography-mass spectrometry
HCA	Ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες Hierarchical cluster analysis
HD	Υδροαπόσταξη Hydrodistillation

HILIC	Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων Hydrophilic interaction liquid chromatography
HMBC	Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης απλού κβάντου Heteronuclear single quantum coherence
HSQC-TOCSY	Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης απλού κβάντου-ολικής συσχέτισης Heteronuclear single quantum coherence-total correlation spectroscopy
iPLS	PLS βασισμένη σε διαστήματα interval PLS
IR	Υπέρυθρο Infrared
ISO	Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης International Organization for Standardization
LC	Υγρή χρωματογραφία Liquid chromatography
LC₅₀	Θανατηφόρος συγκέντρωση, 50% Lethal concentration, 50%
LC₉₀	Θανατηφόρος συγκέντρωση, 90% Lethal concentration, 90%
LC-MS	Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών Liquid chromatography-mass spectrometry
LOD	Όριο ανίχνευσης Limit of detection
LOO	Επαναληπτική διαδικασία μιας παράλειψης Leave-one-out
LOQ	Όριο ποσοτικοποίησης Limit of quantification
LV	Λανθάνουσα μεταβλητή Latent variable
m/z	Λόγος μάζας προς φορτίο Mass to charge ratio
MCSO	Σουλφοξειδίο της S-μεθυλο-L-κυστεΐνης (μεθιίνη) S-Methyl-L-cysteine sulfoxide (methiin)
MeOH	Μεθανόλη Methanol
MIR	Μέσο υπέρυθρο

	Mid infrared
MS	Φασματομετρία μαζών Mass spectrometry
MSC	Πολλαπλασιαστική διόρθωση σκέδασης Multiplicative scatter correction
NIR	Εγγύς υπέρυθρο Near infrared
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός Nuclear magnetic resonance
O2PLS-DA	Αμφίδρομη OPLS-DA Bidirectional OPLS-DA
OPLS-DA	Διαχωριστική ανάλυση με ορθογώνια προβολή σε λανθάνουσες δομές Orthogonal projection to latent structures-discriminant analysis
PCA	Ανάλυση κύριων συνιστωσών Principal component analysis
PCR	Παλινδρόμηση κύριων συνιστωσών Principal component regression
PDA	Συστοιχία φωτοδιόδων Photodiode array
PLS-DA	Διαχωριστική (διακριτική) ανάλυση με παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων Partial least squares-discriminant analysis
PLS	Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων Partial least squares regression
PRESS	Προβλεπόμενο σφάλμα υπολοίπου του αθροίσματος τετραγώνων Predicted residual error sum of squares
PTFE	Πολυτετραφθοροαιθυλένιο (τεφλόν) Polytetrafluoroethylene (teflon)
qHNMR	Ποσοτικός προσδιορισμός με ^1H NMR Quantitative ^1H NMR
RASFF	Σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές Rapid alert system for food and feed
RI	Δείκτης κατακράτησης Retention index
RMSEC	Τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης Root mean square error of calibration
RMSECV	Τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος διασταυρωμένης επικύρωσης Root mean square error of cross validation

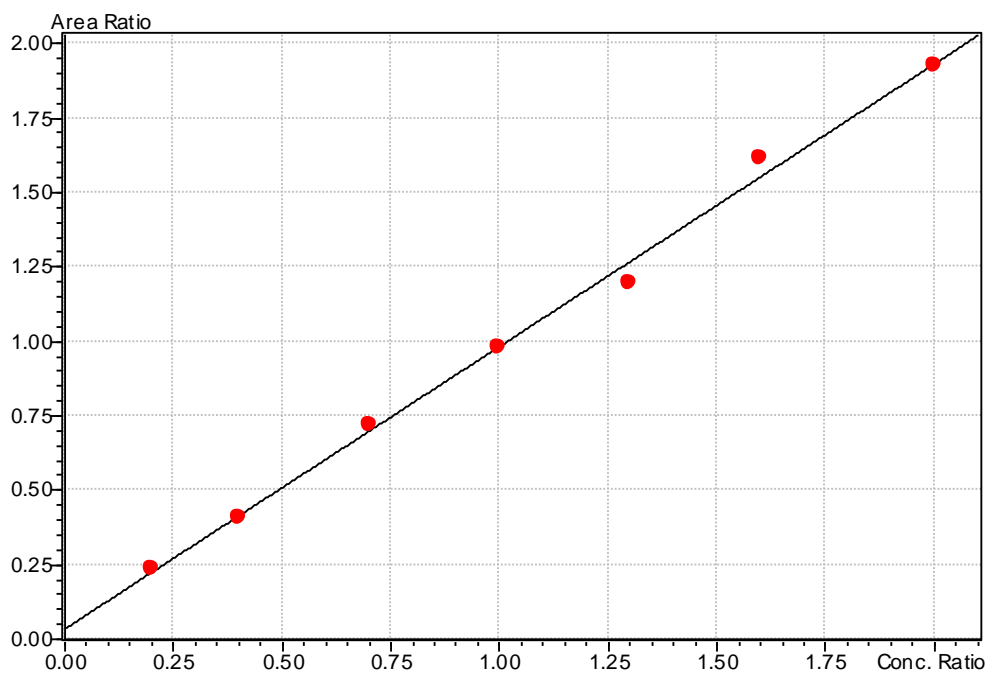
RMSEP	Τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος πρόβλεψης Root mean square error of prediction
RSD	Σχετική τυπική απόκλιση Relative standard deviation
RSM	Μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης Response surface methodology
RT	Χρόνος κατακράτησης Retention Time
SD	Τυπική απόκλιση Standard deviation
siPLS	PLS βασισμένη σε διαστήματα με συνέργεια synergy interval PLS
SNR	Λόγος σήματος προς θόρυβο Signal to noise ratio
SNV	Τυπική κανονική τυχαία μεταβλητή Standard normal variate
TOCSY	Φασματοσκοπία ολικής συσχέτισης Total correlation spectroscopy
UV-Vis	Υπεριώδες-Ορατό Ultraviolet-Visible

Παράρτημα Ι

1) Καμπύλες βαθμονόμησης αλλιλίνης και μεθιλίνης με HILIC-ESI(+)-MS και τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου

Όνομα	Τύπος	m/z	Χρόνος κατακράτησης (min)	Συγκέντρωση (μg/mL)						
				C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Αλλιλίνη	Αναλύτης	178.00	9.025	100	200	350	500	650	800	1000
CMC	ISTD	180.00	11.285	500	500	500	500	500	500	500
Μεθιλίνη	Αναλύτης	152.00	14.600	8	16	28	40	52	64	80

α) Αλλιλίνη



$$Y = 0.9486591X + 0.0351650$$

$$R^2 = 0.9958065$$

$$R = 0.9979010$$

Internal Standard

Curve: Linear

Origin: Not Forced

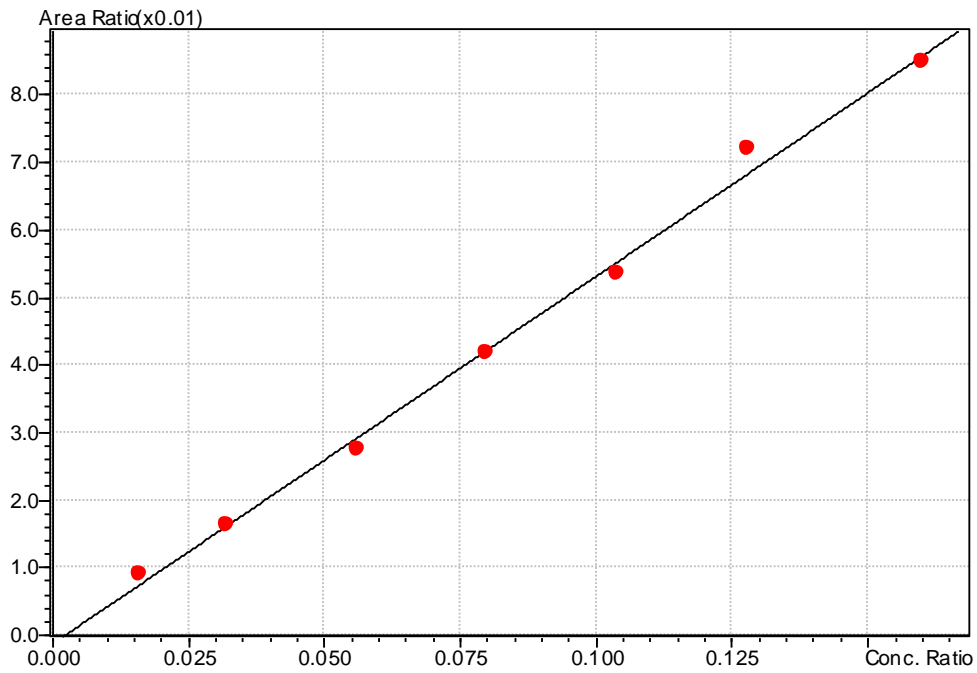
Weighting Method: None

Mean RF: 1.012090

RF SD: 0.0937945

RF %RSD: 9.267412

β) Μεθίνη



$$Y = 0.5440764X - 0.0012135$$

$$R^2 = 0.9956159$$

$$R = 0.9978055$$

Internal Standard

Curve: Linear

Origin: Not Forced

Weighting Method: None

Mean RF: 0.5263649

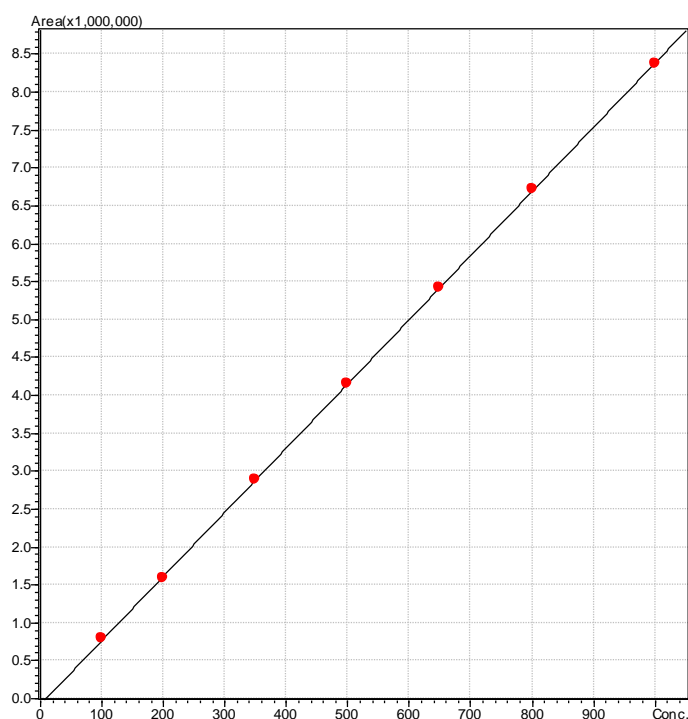
RF SD: 0.0447091

RF %RSD: 8.493942

2) Καμπύλες βαθμονόμησης αλλιίνης και μεθίνης με HILIC-PDA και τη μέθοδο εξωτερικού προτύπου

Όνομα	Τύπος	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος κατακράτησης (min)	Συγκέντρωση (μg/mL)						
				C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Αλλιίνη	Αναλύτης	210	9.025	100	200	350	500	650	800	1000
CMC	Αναλύτης	210	11.285	500	500	500	500	500	500	500
Μεθίνη	Αναλύτης	210	14.600	8	16	28	40	52	64	80

α) Αλλιίνη



$$Y = aX + b \quad a = 8464.697, b = -78486.7$$

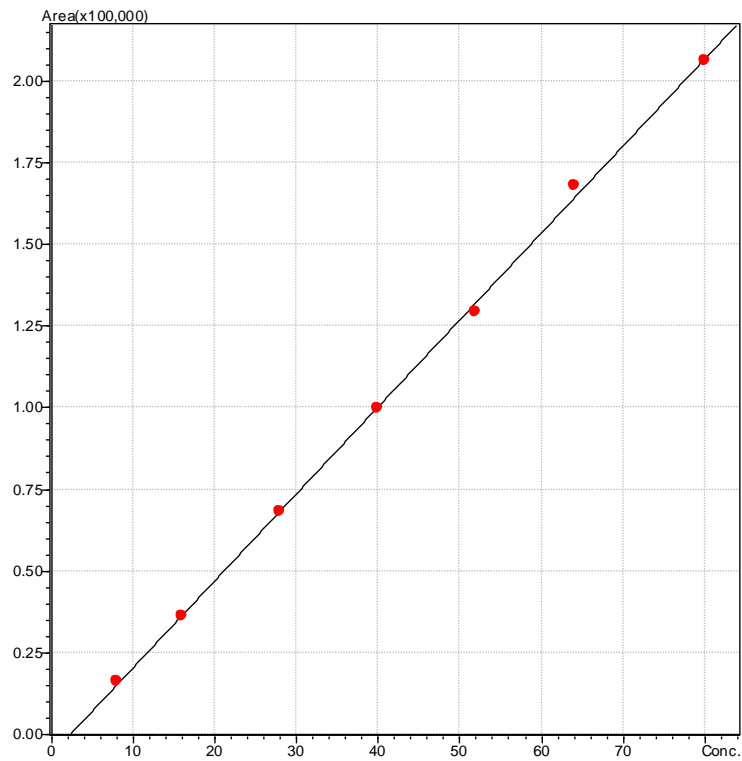
$$R^2 = 0.9999439$$

$$R = 0.9999720$$

External Standard
 Curve Fit Type: Linear
 Origin: Not Forced
 Weight: None

Mean RF: 8213.995
 RF SD: 194.7381
 RF %RSD: 2.370809

β) Μεθίνη



$$Y = aX + b \quad a = 2659.246, b = -6014.537$$

$$R^2 = 0.9991978$$

$$R = 0.9995988$$

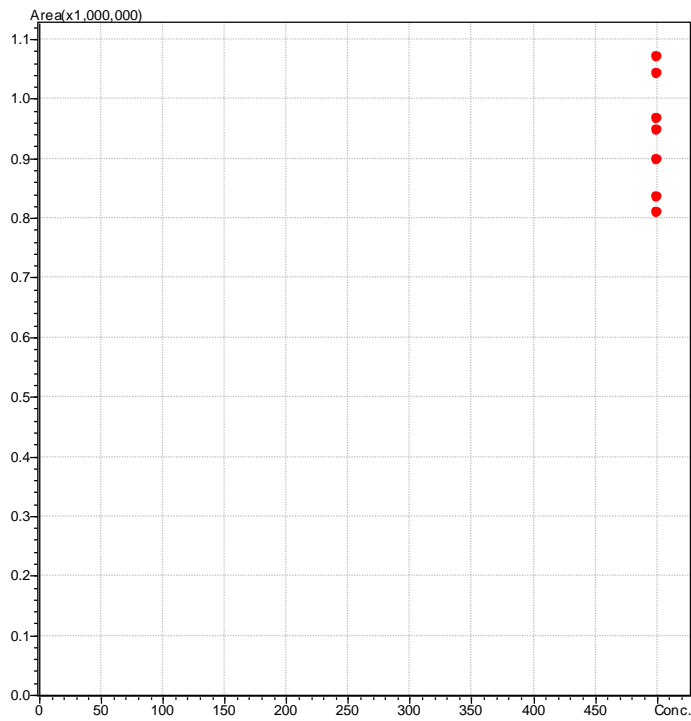
External Standard
Curve Fit Type: Linear
Origin: Not Forced
Weight: None

Mean RF: 2417.748

RF SD: 193.6314

RF %RSD: 8.008751

γ) Απόκριση του CMC ως εξωτερικού προτύπου



$$Y = aX + b$$

$$a = 0.0$$

$$b = 0.0$$

$$R^2 = 0.0000000$$

$$R = 0.0000000$$

External Standard

Curve Fit Type: Linear

Origin: Not Forced

Weight: None

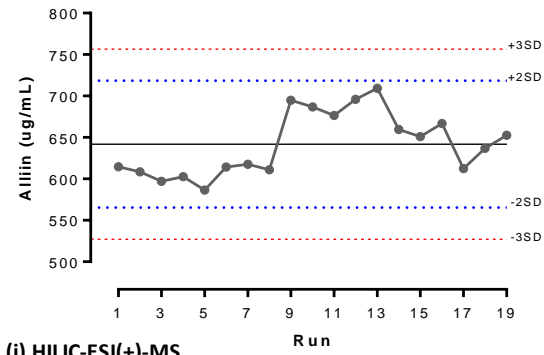
Mean RF: 1875.536

RF SD: 189.0199

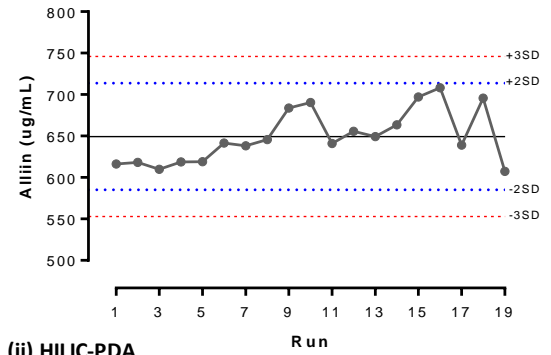
RF %RSD: 10.07818

3) Διαγράμματα ελέγχου (QC) για τον προσδιορισμό αλλιίνης και μεθίνης με HILIC-ESI(+)-MS και HILIC-PDA

α) Αλλιίνη

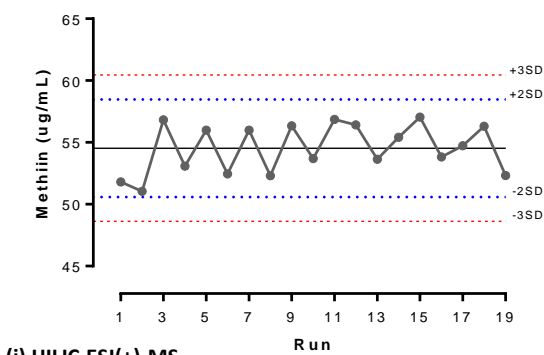


(i) HILIC-ESI(+)-MS

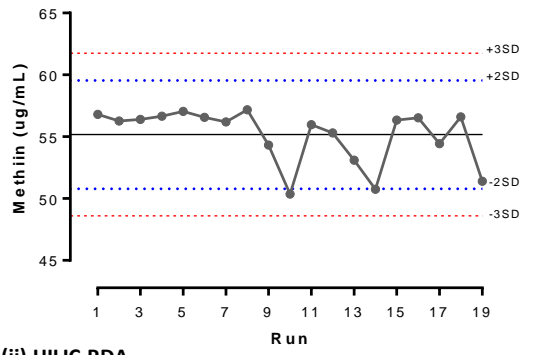


(ii) HILIC-PDA

β) Μεθίνη



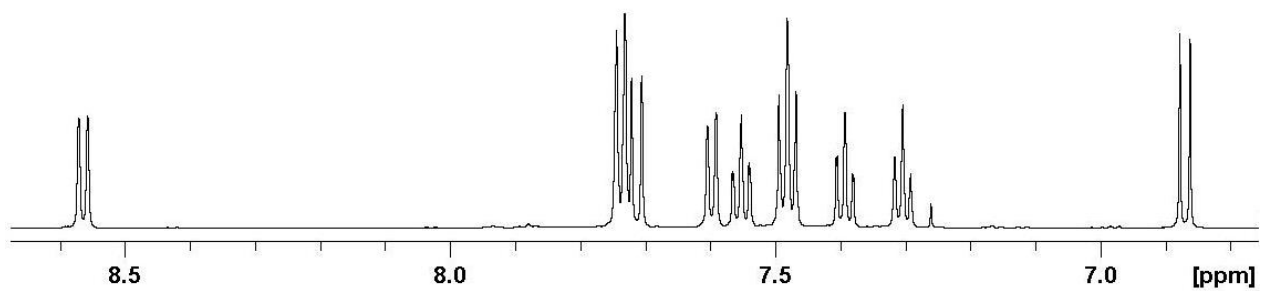
(i) HILIC-ESI(+)-MS



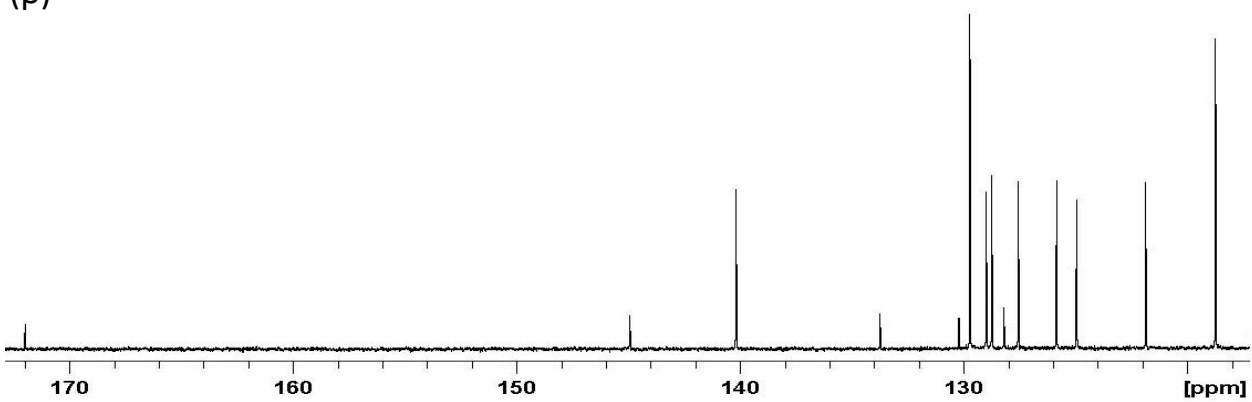
(ii) HILIC-PDA

Παράρτημα II

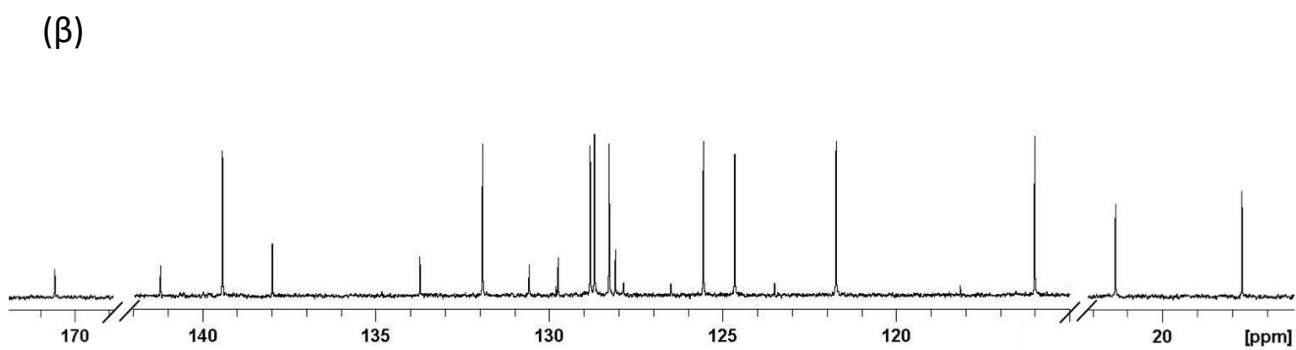
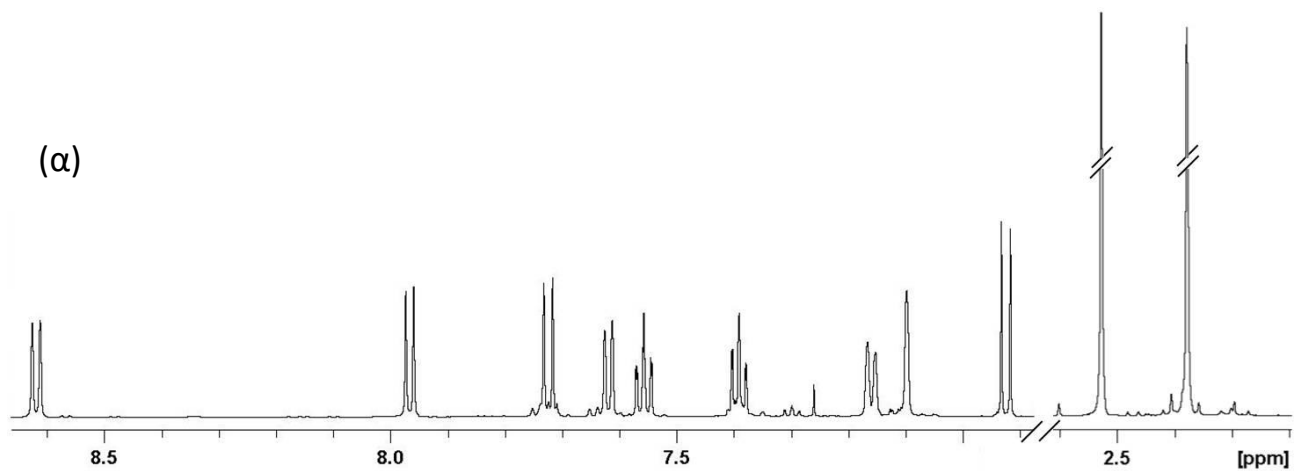
(α)



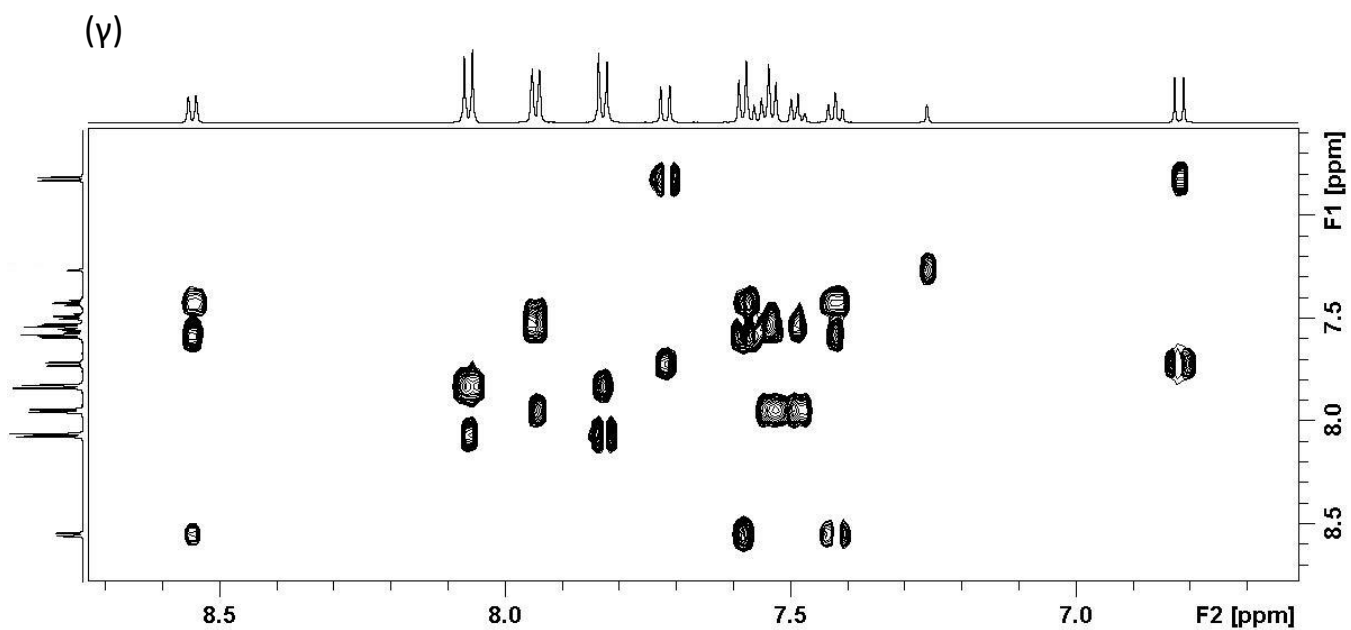
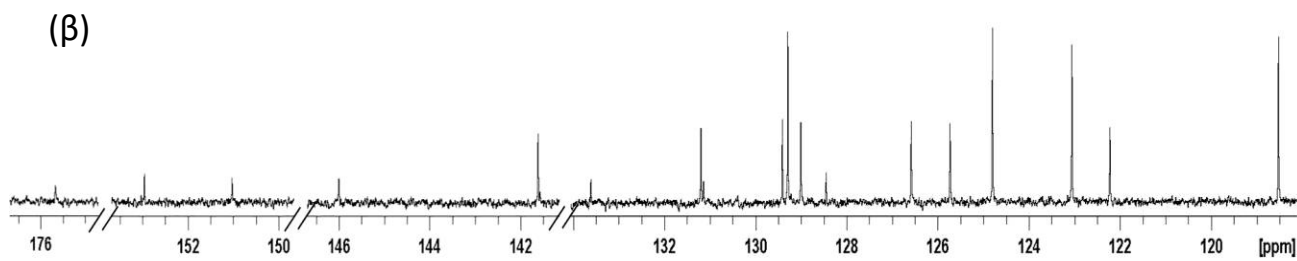
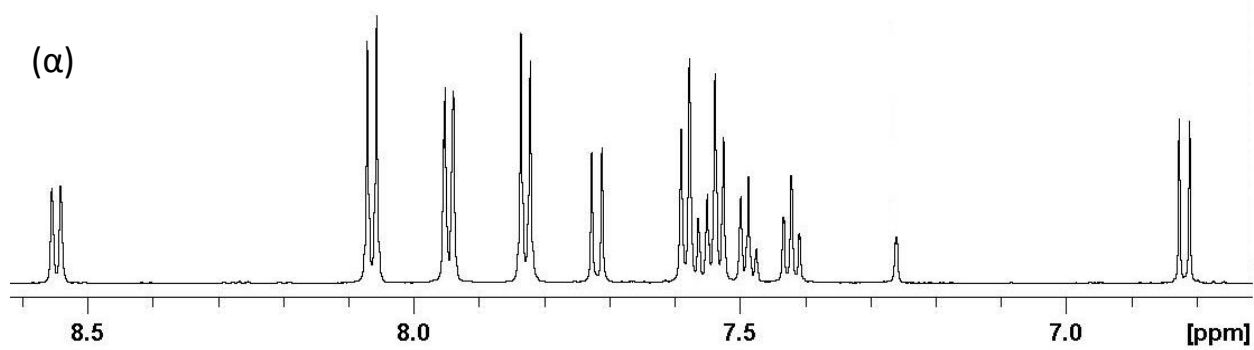
(β)



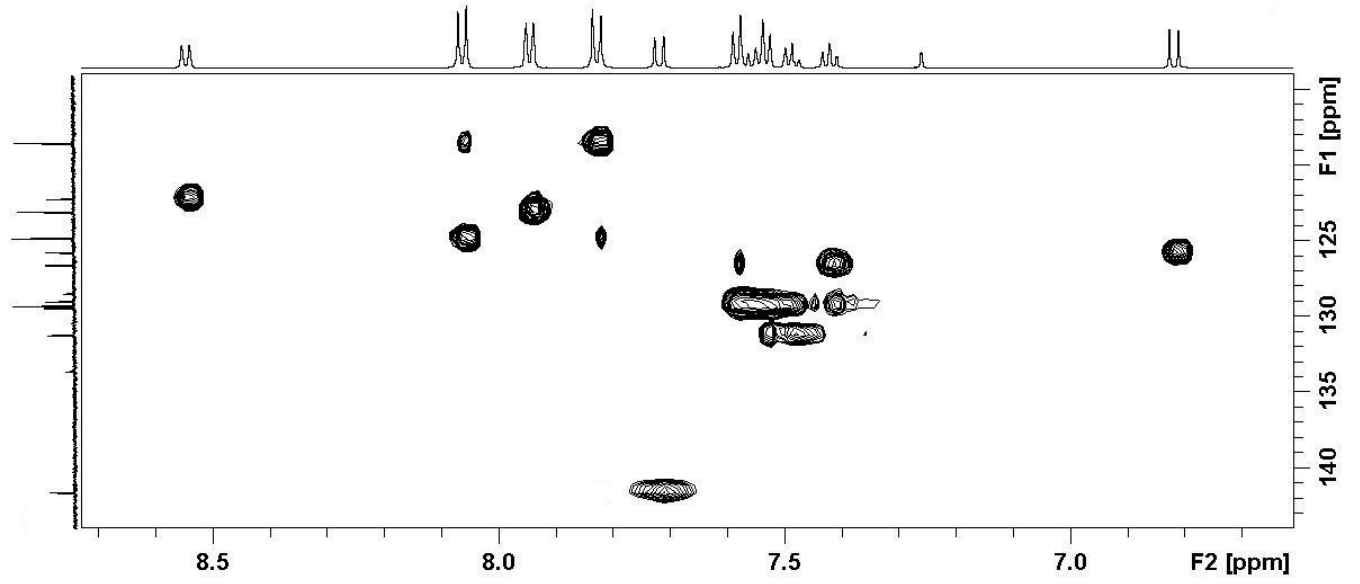
Σχήμα Π1. Φάσματα (α) ^1H και (β) ^{13}C NMR της χρωστικής Sudan I σε διαλύτη CDCl_3 .



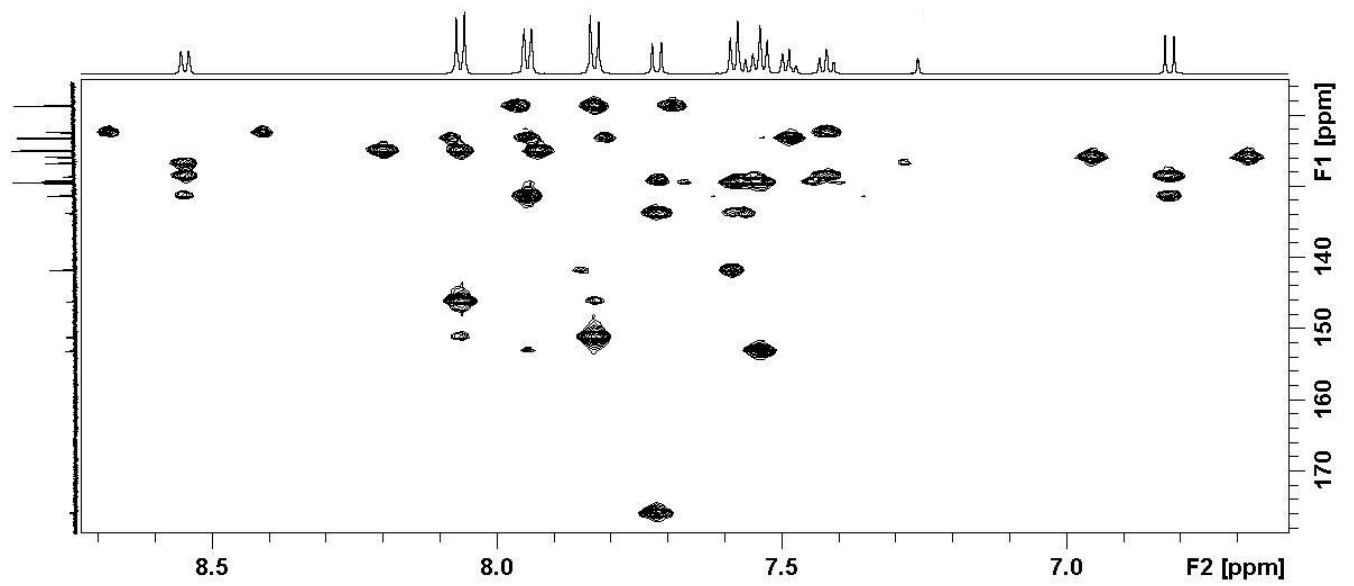
Σχήμα Π2. Φάσματα (α) ^1H και (β) ^{13}C NMR της χρωστικής Sudan II σε διαλύτη CDCl_3 .

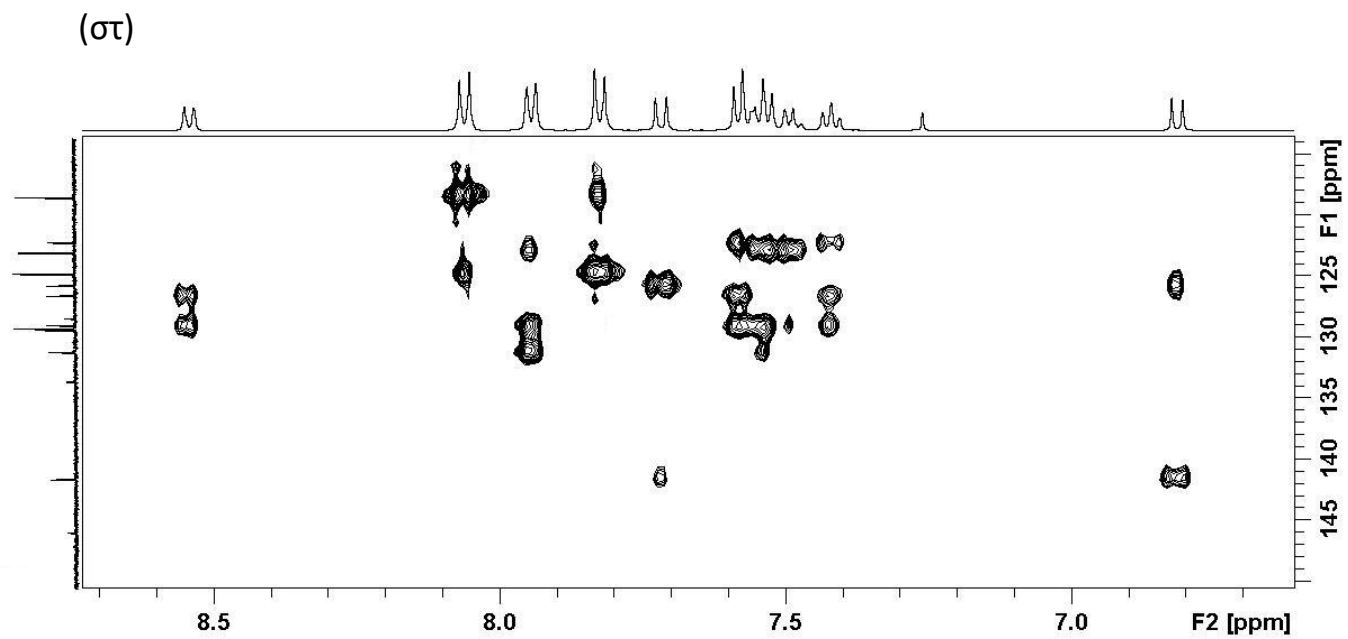


(δ)

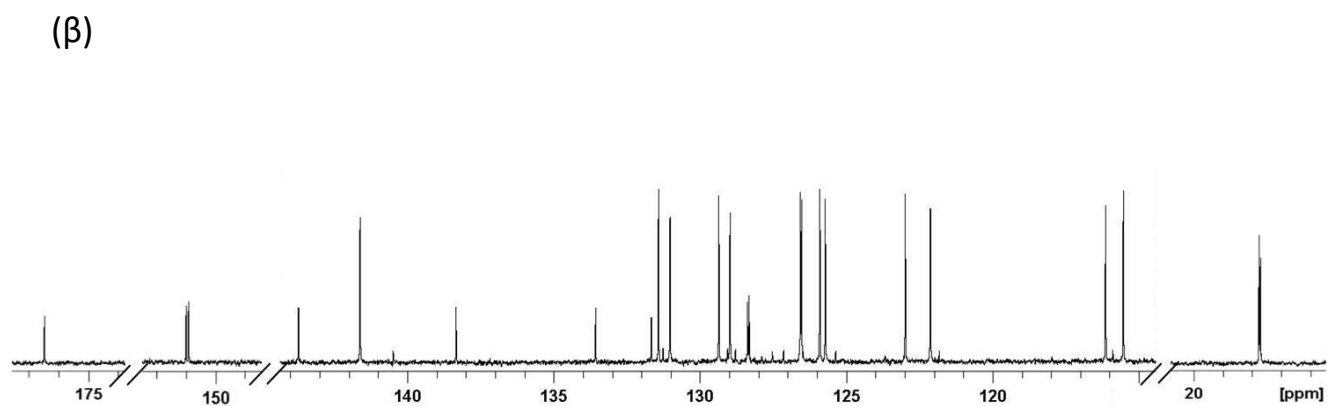
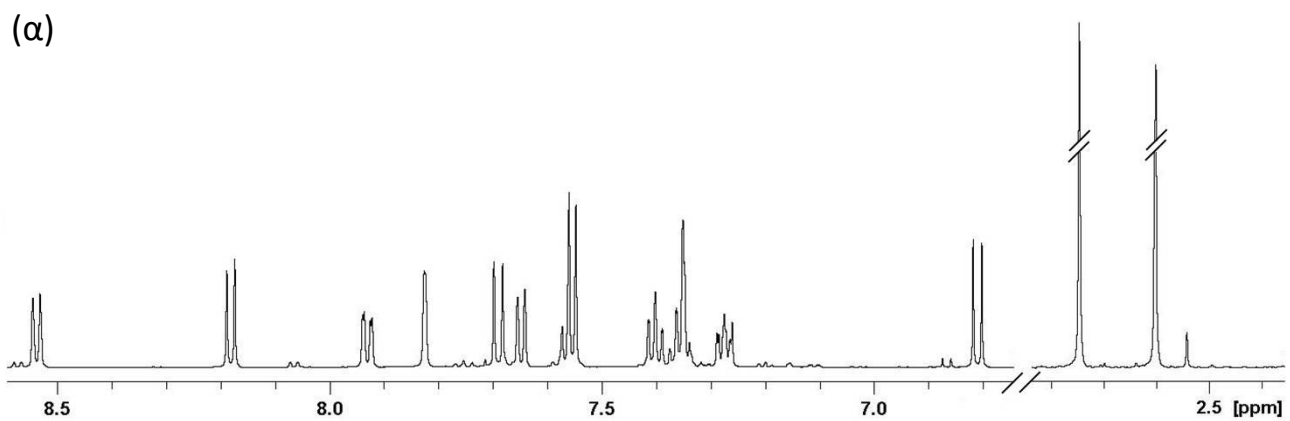


(ε)

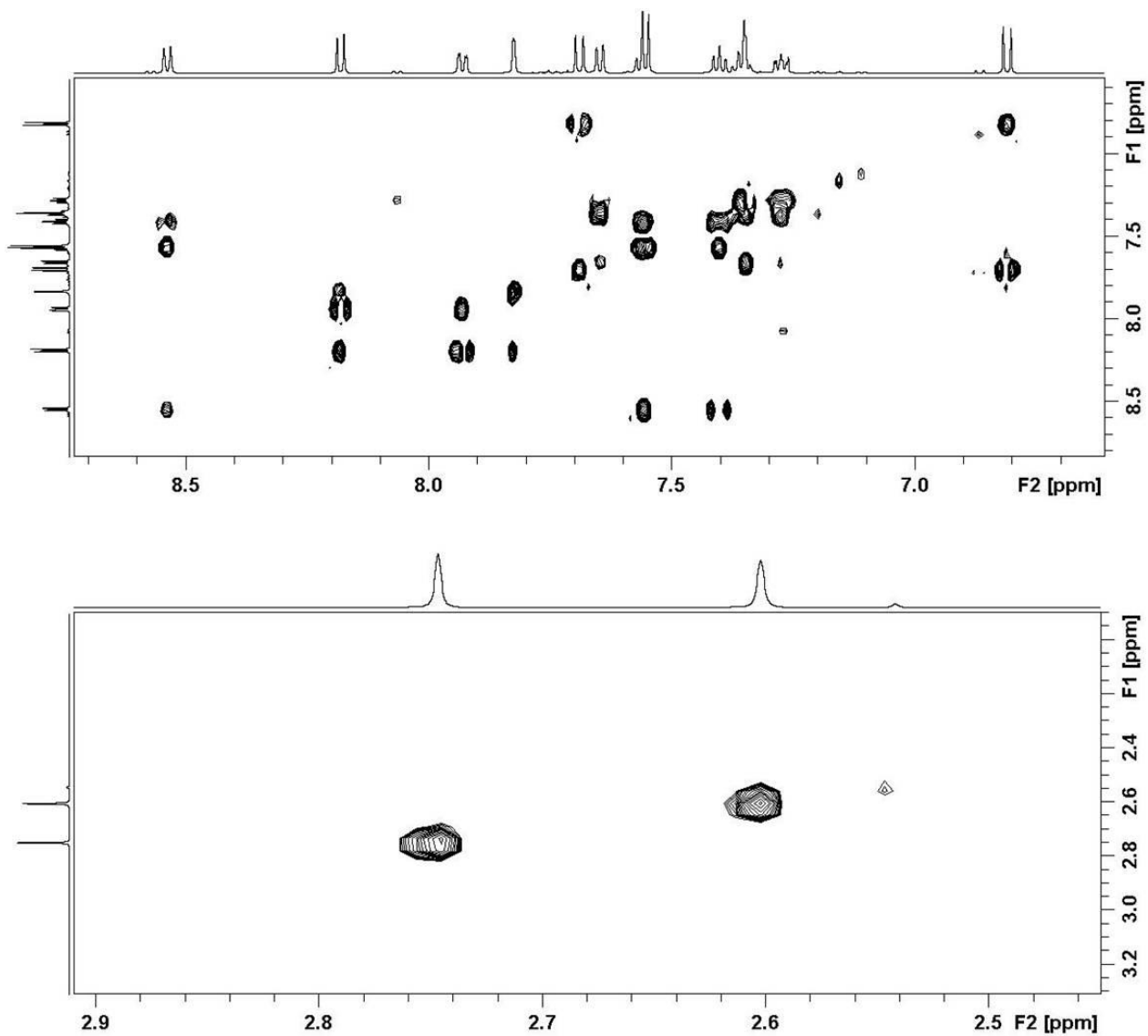




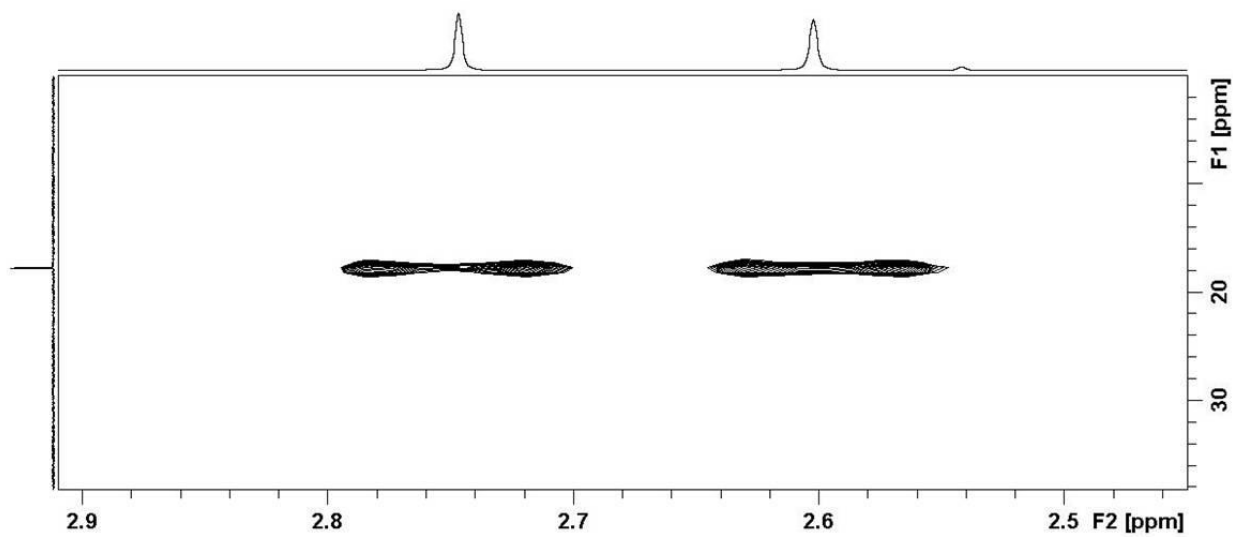
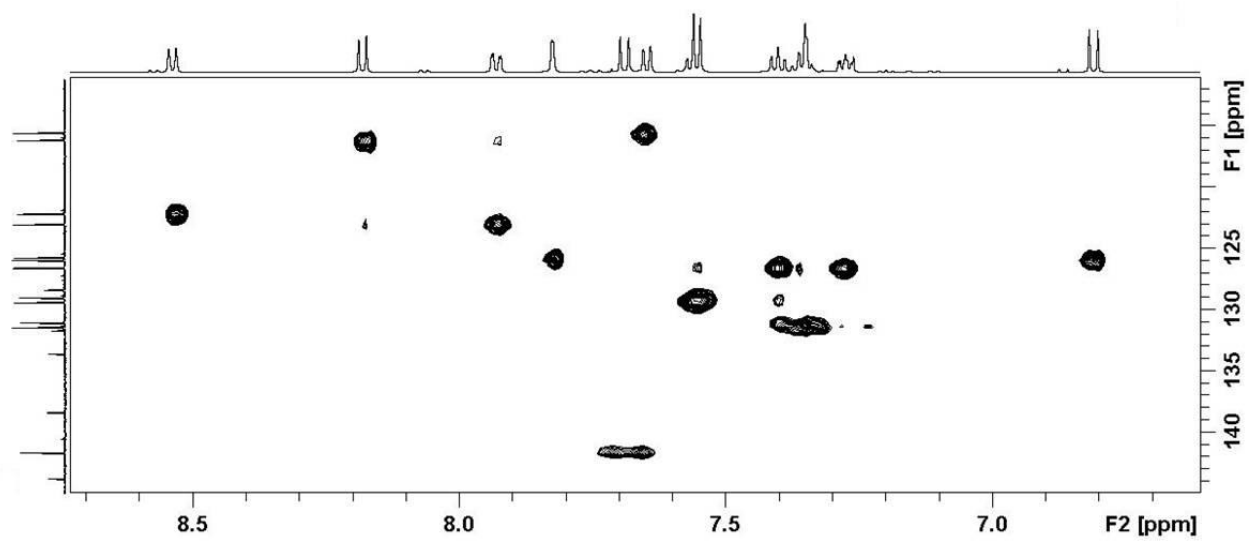
Σχήμα Π3. Φάσματα (α) ^1H και (β) ^{13}C NMR, καθώς και φάσματα 2D NMR (γ) TOCSY, (δ) HSQC, (ε) HMBC και (στ) HSQC-TOCSY της χρωστικής Sudan III σε διαλύτη CDCl_3 .



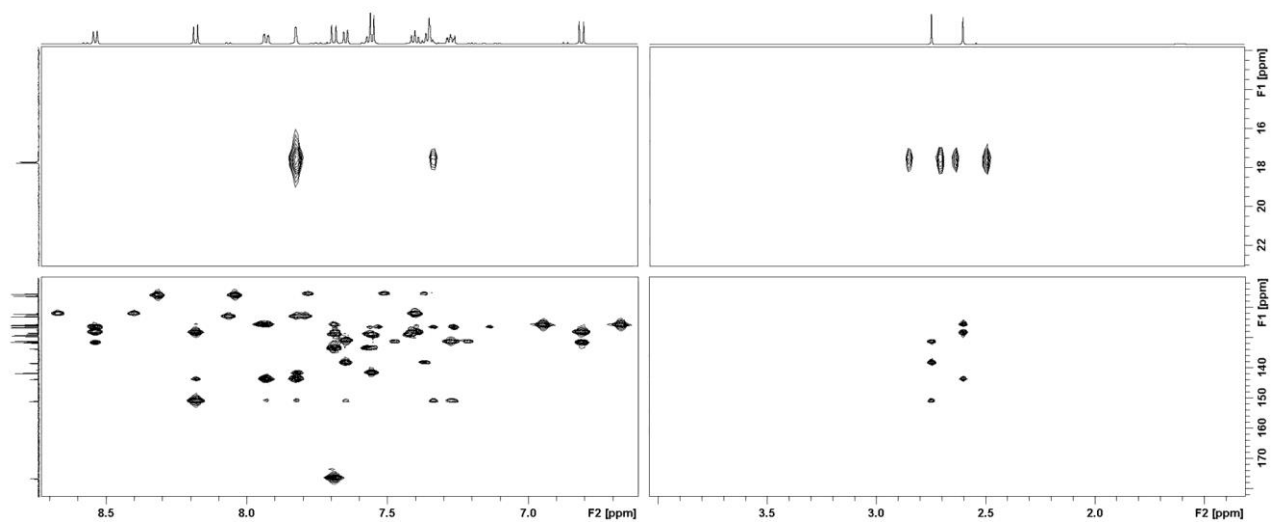
(γ)



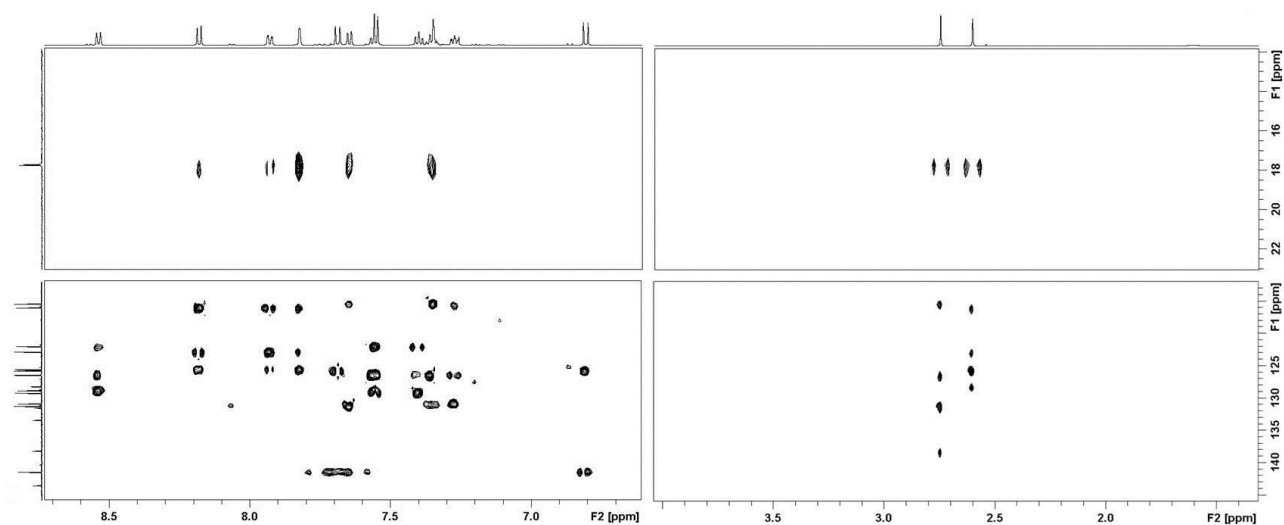
(δ)



(ε)



(στ)



Σχήμα Π4. Φάσματα (α) ^1H και (β) ^{13}C NMR, καθώς και φάσματα 2D NMR (γ) TOCSY, (δ) HSQC, (ε) HMBC και (στ) HSQC-TOCSY της χρωστικής Sudan IV σε διαλύτη CDCl_3 .

Παράρτημα III

Κατάλογος Δημοσιεύσεων

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής και των σχετικών συνεργασιών προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

A) Σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και συλλογικούς τόμους

- I. Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. (2009). Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10044–10048.
(Συντελεστής απήχησης: 2.857, αριθμός ετεροαναφορών: 18)
- II. Petrakis, E.A., Cagliani, L.R., Polissiou, M.G., Consonni, R. (2015). Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chemistry*, 173, 890–896.
(Συντελεστής απήχησης: 4.052, αριθμός ετεροαναφορών: 27)
- III. Consonni, R., Cagliani, L.R., Polissiou, M.G., Petrakis, E.A., Tsimidou, M.Z., Ordoudi, S. (2015). NMR spectroscopic studies in saffron authenticity and quality (within the frame Saffronomics COST Action FA1101). In: Capozzi F, Laghi L & Belton PS (Eds.), *Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance* (special publ. no. 349, pp. 65–76). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- IV. Consonni, R., Astraka, K., Cagliani, L.R., Nenadis, N., Petrakis, E., Polissiou, M. (2016). Authenticity of Food. In: Caballero B, Finglas P & Toldrá F (Eds.), *The Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., vol. 1, pp. 285–293). Oxford, UK: Academic Press, Elsevier.
- V. Petrakis, E.A., Polissiou, M.G. (2017). Assessing saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant-derived adulterants by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy coupled with chemometrics. *Talanta*, 162, 558–566.
(Συντελεστής απήχησης: 4.035)
- VI. Petrakis, E.A., Cagliani, L.R., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Consonni, R. (2017). Sudan dyes in adulterated saffron (*Crocus sativus* L.): Identification and quantification by ¹H NMR. *Food Chemistry*, 217, 418–424.
(Συντελεστής απήχησης: 4.052)

B) Σε διεθνή και εθνικά επιστημονικά συνέδρια

- I. Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. (2009). Quantitative determination of pulegone by FT-IR spectroscopy. 6th International Conference “Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications”, 4-8 October, Athens, Greece. *Book of Abstracts*, p. 96.
- II. Consonni, R., Cagliani, L.R., Polissiou, M., Petrakis, E.A., Tsimidou, M., Ordoudi, S., Naziri, E., Lalou, S. (2014). NMR spectroscopic studies in saffron authenticity and quality control within the frame of Saffronomics (COST Action FA1101). XII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science, FOODMR 2014, 20-23 May, Cesena, Italy.
- III. Cagliani, L.R., Chessa, M., Culeddu, N., Lalou, S., Naziri, E., Ordoudi, S.A., Petrakis, E.A., Polissiou, M.G., Tsimidou, M.Z., Consonni, R. (2015). Saffron quality characterization by NMR and chemometrics. 12o Congresso Italiano di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, CISETA 2015, 3-4 May, Milan, Italy. *Book of Abstracts*, pp. 6–7.

Quantitative Determination of Pulegone in Pennyroyal Oil by FT-IR Spectroscopy

ELEFTHERIOS A. PETRAKIS,[†] ATHANASIOS C. KIMBARIS,[‡] CHRISTOS S. PAPPAS,[†]
PETROS A. TARANTILIS,[†] AND MOSCHOS G. POLISSIOU*[†]

[†]Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Street, 11855 Athens, Greece, and [‡]Laboratory of Chemistry & Biochemistry, Faculty of Agricultural Development, Democritus University of Thrace, 193 Pantazidou Street, 68200 New Orestiada, Greece

Pulegone constitutes a monoterpene occurring in *Mentha* species and primarily in *Mentha pulegium* L. (pennyroyal). A major source of human exposure to pulegone is the use of pennyroyal essential oil in flavorings, confectionery and cosmetics. The rapid quantification of pulegone in hydrodistilled pennyroyal oils (which were also “spiked” to increase the validation range) by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) combined with partial least-squares (PLS) regression was evaluated, using the spectral region 1650–1260 cm⁻¹. Gas chromatography was applied as the reference method for pennyroyal oil samples, which ranged in pulegone content from 157 to 860 mg/mL. The two methods were subjected to statistical tests and proved equivalent in terms of accuracy and reproducibility (99% confidence level). The use of FT-IR spectroscopy could offer a viable alternative to the standard analysis procedures presently applied for quantification of valuable plant substances and could also provide the processing industry with a simple and high-throughput technique for the fast quality check of incoming raw materials such as pennyroyal oils.

KEYWORDS: Fourier transform infrared spectroscopy; PLS; quantitative analysis; *Mentha pulegium*; essential oil; hydrodistillation

INTRODUCTION

Pennyroyal oil is a volatile oil derived by steam distillation or hydrodistillation from European (*Mentha pulegium* L.) and American (*Hedeoma pulegioides* (L.) Pers.) species of pennyroyal, principally from the leaves and flowering tops (1). Historically, pennyroyal oil has been used as a folk remedy for dizziness or as an anticonvulsive and sedative (2), while it is still sometimes used in traditional medicine for abortions and the induction of menses (3, 4). Nevertheless, there are no approved medicinal uses for pennyroyal oil (1). Leaves containing pennyroyal oil have been used as flavoring, as spice and for brewing teas (3). Because of the strong aromatic, mint-like pungent smell, pennyroyal oil is a constituent of alcoholic beverages and a frequently used raw material in flavorings, confectionery and cosmetics (1, 3). It has been reported that the pungent smell of *Mentha pulegium* is associated with the presence of pulegone (2).

(*R*)-(+)-Pulegone, also referred to as pulegone, is a hepatotoxic monoterpene occurring in plant tissues from a number of species, including pennyroyal (3). The (*R*)-(+)-enantiomer comprises the major constituent of pennyroyal essential oils (3, 5), and the toxicological database largely relates to this isomer (6, 7), whereas the other enantiomer, (*S*)-(–)-pulegone, is rarely found in essential oils (8). Pulegone generally ranges from traces (< 0.1%) up to 90.7% in pennyroyal oil (3, 9). However, it has been reported that the usual pulegone content in pennyroyal oil is 60–90%, especially when pulegone-type oils are mentioned (10). Hepatotoxicity

of pulegone is due, at least in part, to its major metabolite, menthofuran (8) and results from the ingestion of pennyroyal oil as an abortifacient and as an infusion for the treatment of colic in children (1). Toxicological observations also indicate that pulegone is an insect neurotoxin (11). The European Commission set maximum levels for pulegone in the following foods and beverages: foodstuffs, 25 mg/kg; beverages, 100 mg/kg; peppermint or mint-flavored beverages, 250 mg/kg; and mint confectionery, 350 mg/kg (7). Pulegone may not be added as such to foodstuffs (6). Recommended limits of pulegone in cosmetic formulations are ≤1% (1). Conversely, pulegone is listed among the authorized synthetic flavoring substances in the USA (12).

To date the pulegone content occurring in essential oils, such as pennyroyal oil, along with related products is predominantly determined by chromatographic techniques (5, 12, 13). Gas chromatography (GC) has been established as the standard method for the analysis of essential oil volatile compounds, and since it is time-consuming, numerous attempts have been recently made to find alternative analytical options. In this context, molecular spectroscopy techniques such as mid-infrared (MIR) or near-infrared (NIR) in combination with suitable chemometric algorithms have been shown to be advantageous for rapid evaluation of essential oils and other plant-derived products (14–17). However, the peaks in the NIR region are broad and weak, as they are combinations and overtones of the sample functional groups (18).

The objective of this study was to develop a direct and rapid method to quantify pulegone, the compound which characterizes a pennyroyal essential oil, using Fourier transform mid-infrared

*Corresponding author. Tel: +30 210 5294241. Fax: +30 210 5294265. E-mail: mopol@aua.gr.

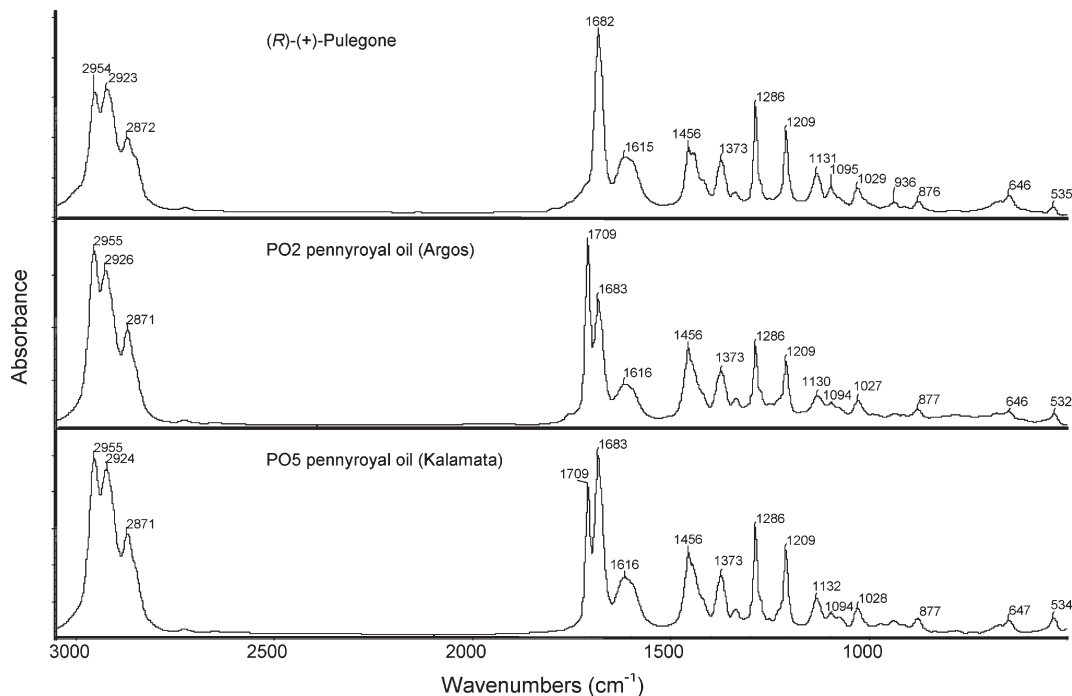


Figure 1. FT-IR spectra of pulegone and pulegone-rich pennyroyal oils over the spectral region 3050–500 cm^{-1} .

spectroscopy (FT-IR) associated with chemometric manipulation. Results were compared with those obtained using gas chromatography as a reference method.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Reagents. Aerial plant parts of six different fully flowered pennyroyal populations were provided from various collect areas around Greece: (1) Island of Samos (P1); (2) Argos (P2); (3) Evia (P3); (4) Island of Samothraki (P4); (5) Kalamata (P5) and (6) Island of Crete (Heraklion) (P6). All pennyroyal plants were collected in the years 2007–2008 during midsummer and were acquired from local retailers (i.e., health food stores and spice stores).

(*R*)-(+)-Pulegone, α -pinene, β -pinene, and (–)-menthol were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). (+)-Menthone was purchased from Fluka (Steinheim, Germany), while eucalyptol and limonene were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Piperitone and *iso*-menthone were acquired from Extrasynthese (Genay, France). The purity grade of all the pure standard substances used was more than 98%.

Isolation of Essential Oils. A sample (200 g) of each pennyroyal population was ground in an electric blender and subsequently subjected to hydrodistillation for 4 h, using a Clevenger-type apparatus (19). The received pennyroyal essential oils from plant materials P1–P6 were named as PO1–PO6, respectively. Moreover, they were dried over anhydrous magnesium sulfate and, after filtration, stored in labeled sterile screw capped bottles at $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

Analysis of Essential Oils. All isolated pennyroyal oils (PO1–PO6) were analyzed using a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph (GC) fitted with an HP-5 ms capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) and coupled with Hewlett-Packard 5972 mass selective detector, operating in EI mode at 70 eV. The injector and detector temperatures were set at 220 and 290 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The column temperature was gradually raised from 60 to 240 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then held isothermally for 10 min. The carrier gas was helium, with a constant flow rate of 1 mL/min. Diluted samples of 1.0 μL (1/100 in diethyl ether, v/v) were injected manually in splitless mode. The identification of the major volatile compounds of essential oils was based on their relative retention time and their mass spectra in comparison with those observed by the aforementioned pure standard substances. For the other components, tentative identification was performed by matching their mass spectra and elution order with those obtained from NIST 98 and Wiley 275 libraries as well as literature data (20).

Sample Preparation. In order to develop the FT-IR method for determining pulegone, two different sets of samples were prepared: 31 samples with various concentrations of pulegone in ethanol (46.8–889.2 mg/mL) for calibration and 10 oil samples for validation. Concerning the latter set of samples, to expand the range of concentration of initial pulegone content in the five pennyroyal oils obtained, pennyroyal oil samples PO1–PO5 were “spiked” with authentic pulegone or PO6 oil and thus five more samples (SPO1–SPO5) were finally prepared so as to test the predictive ability of the FT-IR method.

Reference GC–FID Analysis. The specific amounts (reported as peak area) of pulegone contained in the pennyroyal oil samples (i.e., PO1–PO5 and SPO1–SPO5) were determined by gas chromatography–flame ionization detection (GC–FID) with the use of a Hewlett-Packard 5890 series II GC, equipped with an FID detector and an HP-5 ms capillary column. Detector and injector temperatures were set at 290 and 220 $^{\circ}\text{C}$, respectively. A total of 8 pulegone standards ranging from 55 to 890 mg/mL (in ethanol) were used to build a calibration curve for quantification based on peak area. Triplicate analyses were performed, and the mean value was determined. The oven temperature was programmed individually for each set of samples. Standard samples: from 60 to 140 at 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, then 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 240 $^{\circ}\text{C}$, followed by a 2 min hold at this temperature. Oil samples: from 60 to 160 at 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 240 $^{\circ}\text{C}$, followed by a 2 min hold at this temperature. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1 mL/min. One microliter of each diluted sample (1/100 in ethanol, v/v) was injected manually in splitless mode.

FT-IR Spectroscopy. All FT-IR measurements were performed using a Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific) spectrometer operating in the 4000–400 cm^{-1} wavenumber range (mid-infrared), equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector, a Nichrome source and a KBr beamsplitter. The prepared samples were placed between ZnSe round crystal windows (25 mm \times 2 mm) and the transmission path length was fixed at 15 μm with a polytetrafluoroethylene (PTFE) spacer. The cell was then placed in the presslock demountable cell holder (Thermo Scientific), and the sample was scanned against a background air spectrum at constant temperature (25 $^{\circ}\text{C}$). For each spectrum, 100 scans were accumulated at a resolution of 4 cm^{-1} . Spectra were collected in triplicate for each sample and averaged using the software supplied from the manufacturer of the spectrometer, OMNIC 7.3 (Thermo Electron Corp.). All spectra were smoothed using the “automatic smooth” function of the OMNIC 7.3 software, which uses the Savitsky-Golay algorithm (95-point moving second-degree polynomial). Subsequently the baseline was corrected using the “automatic baseline correct” function (polynomial).

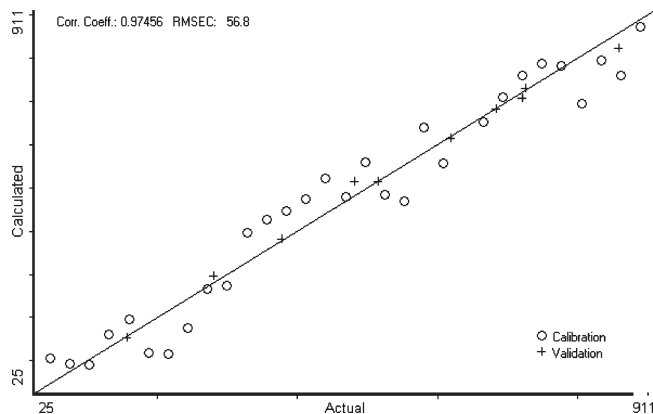


Figure 2. Partial least-squares (PLS) calibration model for the quantitative analysis of pulegone by FT-IR.

Chemometrics. Calibration model for the prediction of pulegone content in the different oil samples from FT-IR spectral data was obtained by partial least-squares (PLS) algorithm, using the TQ Analyst software (7.2.0.161 Release, Thermo Electron Corp.). The spectral data were mean centered and selected wavenumber ranges, as well as the full recorded spectral range, were evaluated for development of the PLS calibration model. The spectral region used for the PLS calibration was from 1650 to 1260 cm^{-1} . All data in the calibration set were examined carefully to detect and eliminate outlier samples and the resulting calibration model was established with 30 FT-IR spectra. Statistical accuracy of the calibration model was described by the correlation coefficient r and the overall errors between modeled and reference values, i.e. the root-mean-square error of calibration (RMSEC), the root-mean-square error of cross validation (RMSECV) using the leave-one-out approach and the root-mean-square error of prediction (RMSEP). The optimum number of PLS factors for pulegone quantification was determined by using the PRESS (predicted residual error sum of squares) calculation. PRESS values are indications of how closely a model fits the calibration data (21). The FT-IR method was further evaluated by computing the differences for reproducibility and accuracy between the predicted FT-IR data and the actual pulegone content values in the oil samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Composition of Pennyroyal Oils. Analysis of the extracted pennyroyal essential oils (PO1–PO6) by GC–MS provided their relative percentage composition, which was taken into account in order to determine the spiking levels for the pulegone-type pennyroyal oils. Concerning PO1–PO5 oils, pulegone was found to be the main constituent (61.3–77.9%), followed by *iso*-menthone (10.6–18.5%), menthone (0.6–8.3%), piperitenone (0.3–3.2%) and *cis*-isopulegone (0–1.7%). In the case of PO6 oil, piperitone was the major ingredient (69.3%), followed by *iso*-menthone (24.8%). Limonene (1.8%) and menthone (1.6%) were detected in minor percentages. The results obtained for these pennyroyal populations by GC–MS analysis of their corresponding oils are in agreement with those reported for populations occurring in the same climatic zones of Greece (9).

Reference Quantitative Analysis. Gas chromatography in combination with flame ionization detection was used as a reference method due to its sensitivity and selectivity, properties that provide reliable analysis of volatiles such as pulegone (5, 12). A calibration curve was created for the set of pulegone standard samples as the function of pulegone's peak area ($A_{\text{pulegone}} = \text{pulegone's peak area}/10^6$ in GC–FID chromatograms) and pulegone's content. The empirical equation of calibration curve for pulegone was described as follows: $A_{\text{pulegone}} = (0.0539 \pm 0.0004) \times (\text{mg of Pulegone})$, while the correlation coefficient was $r = 0.9998$. For the PO1–PO5 pennyroyal oil samples, the range

Table 1. Pulegone Content (\pm SD) in Pennyroyal Oils as Determined by Reference GC–FID Analysis and Predicted by FT-IR Spectroscopy^a

sample ^c	pulegone (mg/mL)		<i>F</i> -test ^b	<i>t</i> -test ^b
	GC–FID	FT-IR		
SPO1	157 \pm 4	153 \pm 32	64.0	0.2
SPO2	281 \pm 8	297 \pm 16	4.0	1.3
SPO3	379 \pm 31	381 \pm 42	1.8	0.1
PO1	482 \pm 33	515 \pm 53	2.6	0.7
PO2	516 \pm 28	514 \pm 81	8.4	0.0
PO3	621 \pm 18	613 \pm 9	4.0	0.6
SPO4	686 \pm 22	682 \pm 25	1.3	0.2
PO4	723 \pm 51	708 \pm 37	1.9	0.3
PO5	728 \pm 57	729 \pm 14	16.6	0.0
SPO5	860 \pm 24	823 \pm 22	1.2	1.6

^aThe respective statistical *F*-test and *t*-test values are provided. ^bConfidence level: 99%. ^cPO1–PO5: isolated pennyroyal oil samples. SPO1–SPO5: spiked pennyroyal oil samples.

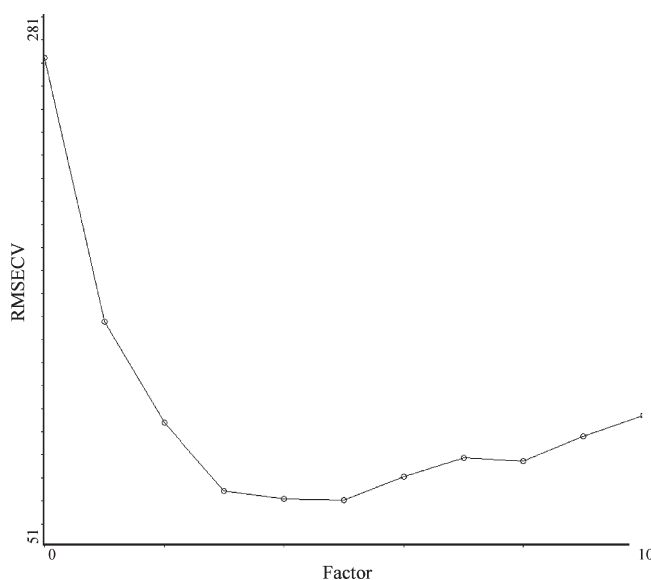


Figure 3. Plot of root-mean-square error of cross validation (RMSECV) values vs the different number of factors used in the cross validation and calibration of the PLS model for pulegone determination in pennyroyal oils. The optimum number of factors that resulted in the minimum RMSECV value and accordingly, minimum predicted residual error sum of squares (PRESS) value was 5.

of pulegone contents was 482–728 mg/mL. The addition of the spiked pennyroyal oil samples (SPO1–SPO5) increased the upper limit to 860 mg/mL and decreased the lower limit to 157 mg/mL (Table 1).

Spectral Analysis. The typical FT-IR spectrum of pulegone (Figure 1) showed characteristic bands associated with methyl and methylene groups at $\sim 2954 \text{ cm}^{-1}$ (C–H asymmetric stretching, $-\text{CH}_3$), 2923 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$ asym stretching, $-\text{CH}_3$ sym stretching due to $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) and 2872 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$ sym stretching, $-\text{CH}_3$ sym stretching due to $>\text{CH}-\text{CH}_3$) (22). The strong peak demonstrated at $\sim 1682 \text{ cm}^{-1}$ is attributed to C=O (ketones) stretching vibration, while the broad band of medium intensity at $\sim 1615 \text{ cm}^{-1}$ is assigned to C=C stretching vibration, which is conjugated with C=O (22). The “fingerprint region” between 1500 and 500 cm^{-1} provides complex but unique and reproducible spectral information with a significant contribution for substance identification (22). The band at 1456 cm^{-1} is due to $-\text{CH}_2-$ scissoring and $-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ asym deformation vibrations. The characteristic bands at 1373 and 1286 cm^{-1} are

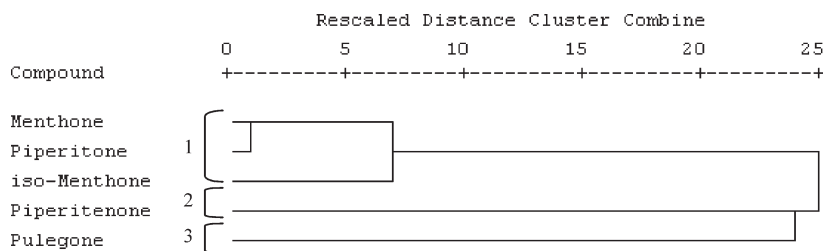


Figure 4. Hierarchical cluster analysis (Ward's algorithm) based on the FT-IR spectra (spectral range: 1650–1260 cm^{-1}) of the major substances contained in pennyroyal oils.

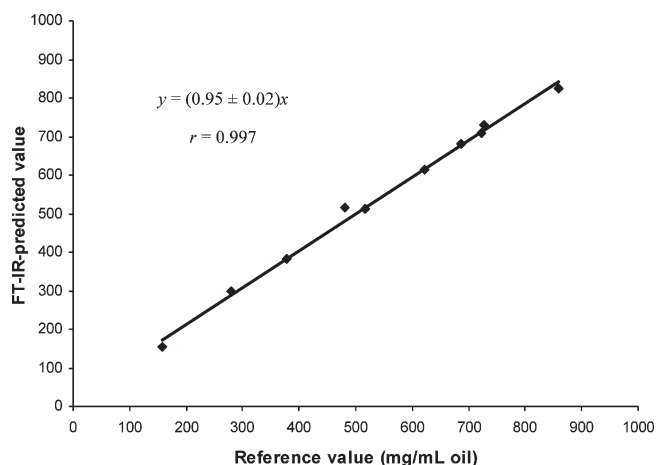


Figure 5. Reference values (GC–FID) vs partial least-squares (PLS) predicted values (FT-IR) of the pulegone content in pennyroyal oils.

assigned to C–H sym deformation of $>\text{CH}-\text{CH}_3$ and $=\text{C}-(\text{CH}_3)_2$, respectively (22). The band at 1209 cm^{-1} is due to C–H deformation vibration, whereas the weak peaks in the region 1131–936 cm^{-1} are attributed mainly to CH_3 rocking vibrations of the pulegone molecule (22). C–H wagging vibration and ring vibration are suggested for the band at 876 cm^{-1} , while the C–CO–C group in-plane deformation is related to the band at 646 cm^{-1} (14, 22). The pulegone band occurring at 535 cm^{-1} is assigned to $-\text{CH}_2-$ rocking, C=C=O deformation and C=C skeletal vibration (22). Due to the significantly high pulegone content in the pennyroyal oils PO1–PO5, the corresponding FT-IR spectra present mostly the characteristic IR signals of pure pulegone (Figure 1). Additionally, pennyroyal oils display another typical peak at 1709 cm^{-1} , which is representative of *iso*-menthone and menthone C=O stretching (Figure 1) (22).

Quantitative Analysis of Pulegone by FT-IR. Only the data from the regions with features of interest were abstracted by the PLS calibration model, so that calibration standards especially representative of the samples to be analyzed are included (23). The best prediction results were produced by using spectral data in the 1650–1260 cm^{-1} wavenumber range. The data from this region produced the highest correlation coefficient r (0.97) and the lowest RMSEC (56.8) and RMSEP (17.1) (Figure 2). The results obtained for all oil samples used in prediction set are presented in Table 1. Regarding cross-validation, the values for r and RMSECV were 0.96 and 70.4, respectively. In addition, the maximum number of factors used to calculate the optimum PRESS value was 10, while the optimum number of factors that resulted in the minimum PRESS value was 5 (Figure 3).

Besides, this region differentiates pulegone from other pennyroyal oil substances due to the heterogeneity of the measured FT-IR spectra (Figure 4). Hierarchical cluster analysis was performed using SPSS 14.0 (SPSS Inc.) software for the 1650–1260 cm^{-1}

spectral range, and the application of Ward's algorithm led to the clear discrimination between pulegone and the other oil major components.

A regression was derived by plotting the pulegone contents in the pennyroyal oil samples (PO1–PO5 and SPO1–SPO5) as determined by the GC–FID reference method against the FT-IR predicted values. The plot (Figure 5) shows the validation of the predictive model with the actual pulegone contents compared with the data obtained using FT-IR spectroscopy. The slope was 0.95, while r was 0.997. The F -test and t -test that were applied indicated that accuracy and reproducibility were high (99% confidence level), demonstrating that the PLS predicted pulegone contents were very close to the reference values (Table 1).

In conclusion, the FT-IR technique used was found to be a suitable analytical tool for the fast and accurate quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil. Instead of the current standard chromatographic methods, which are resource- and time-consuming, the analysis by FT-IR is promising, with minimal personnel training, simple data acquisition and immediate predictions.

ABBREVIATIONS USED

Pennyroyal, *Mentha pulegium* L.; FT-IR, Fourier transform infrared; GC, gas chromatography; MS, mass spectrometry; FID, flame ionization detection; PLS, partial least-squares; RMSEC, root-mean-square error of calibration; RMSECV, root-mean-square error of cross validation; RMSEP, root-mean-square error of prediction; PRESS, predictive residual error sum of squares.

LITERATURE CITED

- (1) Barceloux, D. G. Pennyroyal and Pulegone (*Mentha pulegium* L.). In *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2008; pp 563–567.
- (2) Karousou, R.; Balta, M.; Hanlidou, E.; Kokkini, S. "Mints", smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 248–257.
- (3) Hayes, J. R.; Stavanja, M. S.; Lawrence, B. M. Biological and toxicological properties of mint oils and their major isolates: Safety assessment. In *Mint: The Genus Mentha*; Lawrence, B. M., Ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group: 2007; pp 462–477.
- (4) Khojasteh-Bakht, S. C.; Chen, W.; Koenigs, L. L.; Peter, R. M.; Nelson, S. D. Metabolism of (*R*)-(+)-pulegone and (*R*)-(+)-menthofuran by human liver cytochrome P-450s: Evidence for formation of a furan epoxide. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 574–580.
- (5) Ravid, U.; Putievsky, E.; Katzir, I. Chiral GC analysis of (*1R*)-(+)-pulegone with high enantiomeric purity in essential oils of some Lamiaceae aromatic plants. *Flavour Fragrance J.* **1994**, *9*, 205–207.
- (6) Council Directive 88/388/EEC of 22 June 1988 on the approximation of the laws of the Member States relating to flavorings for use in foodstuffs and to source materials for their production. Official Journal L 184 (July 15, 1988).

- (7) European Commission - SCF (Scientific Committee on Food). Opinion of the Scientific Committee on Food on pulegone and menthofuran. Add 2 final, July 25, 2002.
- (8) Engel, W. In vivo studies on the metabolism of the monoterpene pulegone in humans using the metabolism of ingestion-correlated amounts (MICA) approach: Explanation for the toxicity differences between (S)-(-) and (R)-(+)-pulegone. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6589–6597.
- (9) Kokkini, S.; Hanlidou, E.; Karousou, R. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 588–593.
- (10) European Medicines Agency - HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products). Public statement on the use of herbal medicinal products containing pulegone and menthofuran. Final, November 23, 2005.
- (11) Grundy, D. L.; Still, C. C. Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1985**, *23*, 383–388.
- (12) Siano, F.; Catalfamo, M.; Cautela, D.; Servillo, L.; Castaldo, D. Analysis of pulegone and its enantiomeric distribution in mint-flavoured food products. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 197–203.
- (13) Bicchi, C.; Frattini, C. Quantitative determination of minor components in essential oils: determination of pulegone in peppermint oils. *J. Chromatogr. A* **1980**, *190*, 471–474.
- (14) Schulz, H.; Baranska, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2007**, *43*, 13–25.
- (15) Mirghani, M. E. S.; Che Man, Y. B. A new method for determining gossypol in cottonseed oil by FTIR spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80*, 625–628.
- (16) Wilson, N. D.; Ivanova, M. S.; Watt, R. A.; Moffat, A. C. The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Pharmacol.* **2002**, *54*, 1257–1263.
- (17) De Nardo, T.; Shiroma-Kian, C.; Halim, Y.; Francis, D.; Rodríguez-Saona, L. E. Rapid and simultaneous determination of lycopene and β -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1105–1112.
- (18) Bombarda, I.; Dupuy, N.; Le Van Da, J.-P.; Gaydou, E. M. Comparative chemometric analyses of geographic origins and compositions of lavandin var. Grosso essential oils by mid infrared spectroscopy and gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *613*, 31–39.
- (19) Golmakani, M.-T.; Rezaei, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.* **2008**, *109*, 925–930.
- (20) Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, 2007.
- (21) Haaland, D. M.; Thomas, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1193–1202.
- (22) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd ed.; John Wiley & Sons Ltd, Oxford, England, 2004.
- (23) Fuller, M. P.; Ritter, G. L.; Draper, C. S. Partial least-squares quantitative analysis of infrared spectroscopic data. Part II: Application to detergent analysis. *Appl. Spectrosc.* **1988**, *42*, 228–236.

Received July 27, 2009. Revised manuscript received September 15, 2009. Accepted September 16, 2009.



Analytical Methods

Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ^1H NMR metabolite fingerprintingEleftherios A. Petrakis^a, Laura R. Cagliani^b, Moschos G. Polissiou^a, Roberto Consonni^{b,*}^aLaboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Str., 11855 Athens, Greece^bInstitute for the Study of Macromolecules, NMR Laboratory, National Council of Research, v. Bassini 15, 20133 Milan, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2014

Received in revised form 10 September 2014

Accepted 19 October 2014

Available online 27 October 2014

Keywords:

Saffron

Quality control

Food authenticity

Adulteration

Nuclear magnetic resonance (NMR)

Chemometrics

ABSTRACT

In the present work, a preliminary study for the detection of adulterated saffron and the identification of the adulterant used by means of ^1H NMR and chemometrics is reported. Authentic Greek saffron and four typical plant-derived materials utilised as bulking agents in saffron, i.e., *Crocus sativus* stamens, safflower, turmeric, and gardenia were investigated. A two-step approach, relied on the application of both OPLS-DA and O2PLS-DA models to the ^1H NMR data, was adopted to perform authentication and prediction of authentic and adulterated saffron. Taking into account the deficiency of established methodologies to detect saffron adulteration with plant adulterants, the method developed resulted reliable in assessing the type of adulteration and could be viable for dealing with extensive saffron frauds at a minimum level of 20% (w/w).

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Food authenticity is an increasingly important issue for consumers, regulatory agencies, and food industry. Aspects of authentication involve the detection of economically motivated adulteration in food products, usually carried out with less expensive and more readily available substitutes which are difficult to identify by routine analytical methodologies (Cubero-Leon, Peñalver, & Maquet, 2014; Oms-Oliu, Odriozola-Serrano, & Martín-Belloso, 2013).

Among the major candidates for adulteration conducted for economic gain, saffron is one of the most targeted spices (Moore, Spink, & Lipp, 2012); it consists of the dried stigmas of the cultivated species *Crocus sativus* L. Saffron, that has long been used as a colouring and flavouring agent in food, is also known for a wide range of health promoting benefits (Melnyk, Wang, & Marcone, 2010; Winterhalter & Straubinger, 2000). Due to its high price and limited production, saffron has been subjected to various types of adulteration over the centuries. Common fraudulent practices include the addition of inferior plant material with similar appearance to extend the more expensive saffron. This particularly happens when the spice is in powder form or when added to

seasonings and other food products as an ingredient (Hagh-Nazari & Keifi, 2007; Torelli, Marieschi, & Bruni, 2014). Within the most frequently reported plant materials to adulterate saffron are cut or dyed *C. sativus* stamens, *Carthamus tinctorius* L. petals (safflower) as well as *Curcuma longa* L. powdered rhizomes (turmeric) (Hagh-Nazari & Keifi, 2007; Ordoudi & Tsimidou, 2004; Saffron in Europe, 2007). Additionally, commercial safflower and turmeric are often mislabeled, using the name “saffron” and the supposed country of origin for misleading consumers (Hagh-Nazari & Keifi, 2007; Sánchez, Maggi, Carmona, & Alonso, 2011). The use of gardenia, the extract obtained from the fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis, is another possible and more sophisticated method of adulteration, considering that gardenia and saffron differ merely in the pigments contained (Carmona, Zalacain, Sánchez, Novella, & Alonso, 2006; Ordoudi & Tsimidou, 2004; Sánchez et al., 2011).

Regardless of the practice followed, the detection of commercial frauds in saffron is a challenging task since changes in physical, chemical or organoleptic properties are not always easily identifiable. As a result, the best quality saffron is usually sold in filaments (Melnyk et al., 2010), where the extraneous or foreign matter may be more easily detectable. In the quality assessment of saffron according to the ISO 3632 standards (ISO, 2010, 2011), up to 1% (w/w) of foreign matter is permitted in third-class products. However, microscopic examination is required, which is time-consuming for the screening of large batches of samples. Also, the UV–Vis

* Corresponding author. Tel.: +39 2 23699578; fax: +39 2 23699620.

E-mail address: roberto.consonni@ismac.cnr.it (R. Consonni).

spectrophotometric method proposed by ISO 3632-2 (ISO, 2010) may not detect saffron contamination with amounts of up to 20% (w/w) of safflower or turmeric, as it was recently reported (Sabatino et al., 2011). For the detection of plant adulterants in saffron, several chromatographic (Alonso, Salinas, & Garijo, 1998; Haghighi, Fezy, & Hemati Kakhki, 2007; Lozano, Castellar, Simancas, & Iborra, 1999; Sabatino et al., 2011; Sampathu, Shivashankar, Lewis, & Wood, 1984) and molecular (Babaei, Talebi, & Bahar, 2014; Javanmardi, Bagheri, Moshtaghi, Sharifi, & Hemati Kakhki, 2011; Ma, Zhu, Li, Dong, & Tsim, 2001; Marieschi, Torelli, & Bruni, 2012; Torelli et al., 2014) methods have been employed so far with encouraging results. The use of DNA markers has allowed the detection of low amounts (up to 1%) of several bulking materials including safflower and turmeric (Javanmardi et al., 2011; Marieschi et al., 2012). Nevertheless, there is still an ongoing demand for the development of faster, simple and robust screening methods suited for identifying saffron adulteration, especially at levels that make practical economic sense.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is an analytical technique largely applied for its rapidity and reproducibility, having the potential for high-throughput analyses with minimal sample pretreatment (Longobardi et al., 2013; Mannina, Sobolev, & Viel, 2012). NMR based metabolite fingerprinting may identify the subtle differences that often exist between authentic and fraudulent products. As a matter of fact, this metabolomic approach has been recently explored to discriminate authentic Iranian saffron from commercial samples; the results indicated relative amounts of picrocrocin and the sum of different crocetin glycosides as the characteristic metabolites for authentic saffron (Yilmaz, Nyberg, Mølgaard, Asili, & Jaroszewski, 2010). The complexity of NMR data in food metabolomics studies is clearly the primary impetus for the coupling of NMR spectroscopy with multivariate statistical methods, capable of gathering samples with similar features (Consonni & Cagliani, 2010; Tomassini, Capuani, Delfini, & Miccheli, 2013). Among them, supervised methods that may enhance classification performance, such as orthogonal projection to latent structures – discriminant analysis (OPLS-DA) and its bidirectional modifications (O2PLS-DA) (Bylesjö et al., 2006), have shown great potential to determine the authenticity of various foodstuffs, mainly on the basis of their geographical or botanical origin (Consonni, Cagliani, & Cogliati, 2012a,b, 2013; Consonni, Cagliani, Stocchero, & Porretta, 2009; Consonni, Cagliani, Stocchero, & Porretta, 2010; Fotakis et al., 2013).

The present work describes a preliminary study for the detection of adulterated saffron and the identification of the adulterant used by means of ^1H NMR and chemometrics. The two-step approach proposed herein relied on the application of both OPLS-DA and O2PLS-DA models to the ^1H NMR data. Taking into account the deficiency of established methodologies to detect saffron adulteration with plant adulterants, the method developed could be viable for dealing with extensive saffron frauds at a minimum level of 20% (w/w). The efforts focused on four typical plant-derived materials utilised as bulking agents in saffron, i.e., *C. sativus* stamens, safflower, turmeric and gardenia.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Ten samples of Greek *C. sativus* dried stigmas of commercial grade, harvested in 2012, were supplied by Kozani Saffron Producers Cooperative (Cooperative De Saffran). The Greek saffron samples selected were either organic ($n=6$) or conventionally produced ($n=4$), to extend variability among them. Prior to ^1H NMR analysis, their quality and authenticity had been checked

according to the ISO 3632 parameters and HPLC analysis at the Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens. All saffron samples belonged to the commercial category I. Samples of turmeric (branded as “Like safran”), safflower (branded as “Turkish saffron”) and *C. sativus* stamens (branded as “Safran”) were purchased from local markets. *G. jasminoides* fruit extract (single herb extract, Zhi Zi) was acquired from Plum Flower Brand (Anguo, China).

2.2. Preparation of commercial and spiked samples

All of the plant-derived materials, namely “saffron samples” and “plant adulterants”, were finely ground in a mortar. To simulate conditions of commercial samples, artificial counterfeit mixtures containing saffron and 20% (w/w) of plant adulterant were prepared. Overall, 10 mixtures were used for each adulterant and thus five classes were defined, including the authentic saffron samples. Those fifty samples (10 mg) along with the pure plant adulterants used for reference were extracted with 600 μL DMSO- d_6 by stirring (vortex) for 3 min at room temperature. After 10 min, they were submitted to centrifugation at 12,100 rcf for 10 min and then 500 μL aliquots of the supernatant were transferred into 5 mm NMR tube for analysis. DMSO solvent was used because of its capability to dissolve both hydrophobic and hydrophilic compounds, leading to NMR signals with sharp line width.

2.3. NMR analysis

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 600 spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Karlsruhe, Germany), operating at 14.09 T and equipped with a 5-mm inverse probe with a z-gradient. All monodimensional spectra were acquired at 300 K with a spectral width of 10,000 Hz over 32 K data points. Residual water suppression was achieved by applying a presaturation scheme with low power radiofrequency irradiation for 1.2 s. Spectra were processed using TOPSPIN software (Bruker BioSpin GmbH, version 3.0, Rheinstetten, Karlsruhe, Germany) by applying an exponential function for resolution enhancement with a line broadening of 0.5 Hz before Fourier transformation; phase and baseline were manually corrected. Spectra were aligned on the residual solvent signal at 2.50 ppm. The NMR spectra were reduced to integrated regions (buckets) of equal width of 0.04 ppm each in the range of 0.40–10.50 ppm, excluding solvent and water regions from 2.47 to 2.52 ppm and from 3.31 to 3.34 ppm, respectively. Buckets were scaled with respect to the total spectrum intensity, thus taking into account the different composition of samples (ACD/NMR v. 11.0, ACD Labs, Toronto, Canada).

2.4. Multivariate data analysis

Principal component analysis (PCA), orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA) and bidirectional OPLS-DA (O2PLS-DA) were performed with Pareto scaling. PCA was applied to represent the sample distribution in the multivariate space. Supervised OPLS-DA and O2PLS-DA were used in order to reduce the model complexity by removing the systematic variations in the X matrix that were not related to Y response (structured noise) maximising the separation among samples. When the dimension of the joint correlated space is one, a useful visualisation tool, such as the S-plot, could be adopted (Wiklund et al., 2008). The non randomness of all classification models was checked by performing the permutation test, in which a total of 200 models were calculated by randomising the order of Y variable in the corresponding PLS-DA (partial least squares-discriminant analysis) models. Multivariate data analysis was performed with

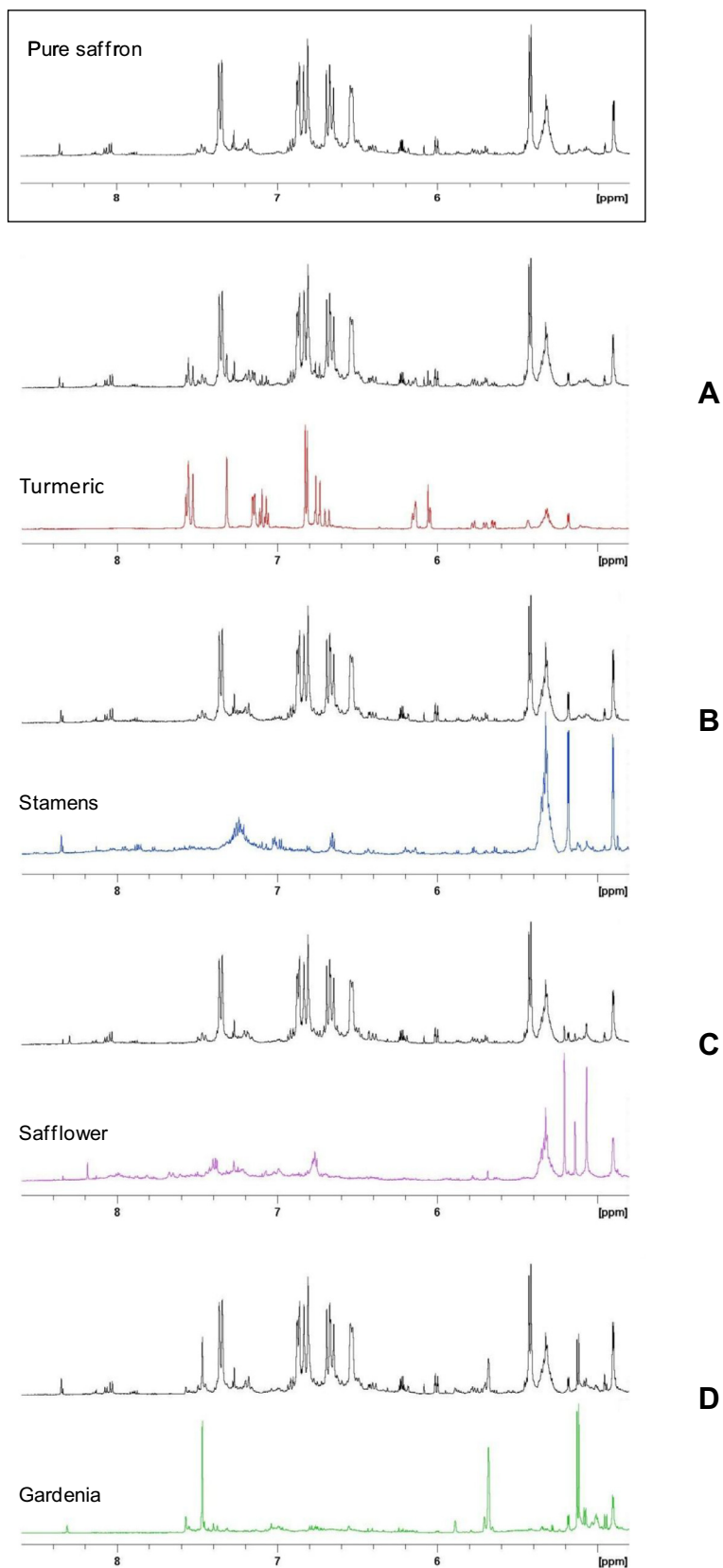


Fig. 1. Selected regions of ^1H NMR spectra acquired from DMSO-d_6 extracts. Squared top spectrum is characteristic of pure saffron. Spectra of pure plant material (turmeric, *C. sativus* stamens, safflower, and gardenia *jasmoides* fruit extract) are reported in panels A, B, C, and D, respectively in bottom traces, while spiked saffron with 20% (w/w) concentration of plants adulterants are reported in panels A, B, C and D in top traces.

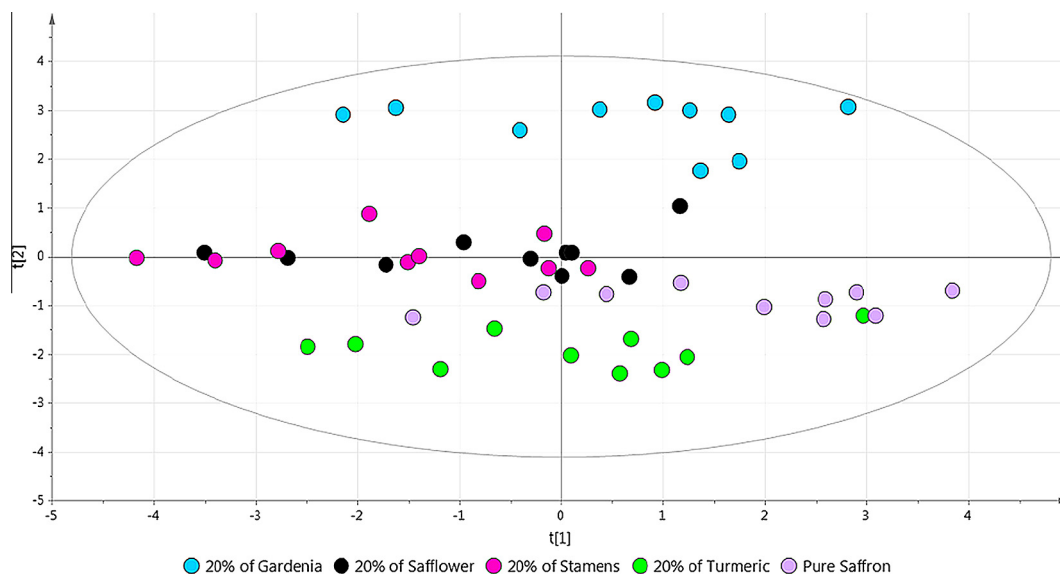


Fig. 2. PCA score plot performed considering 10 pure Greek saffron samples (purple circles) and the same samples spiked at 20% (w/w) concentration with *Gardenia jasminoides* fruit extract (light blue circles), safflower (black circles), *C. sativus* stamens (pink circles), and turmeric (green circles) for a total of 40 samples. PC1 = 36.8%, and PC2 = 26.9%. $R^2X = 99.5\%$, and $Q^2 = 96.2\%$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

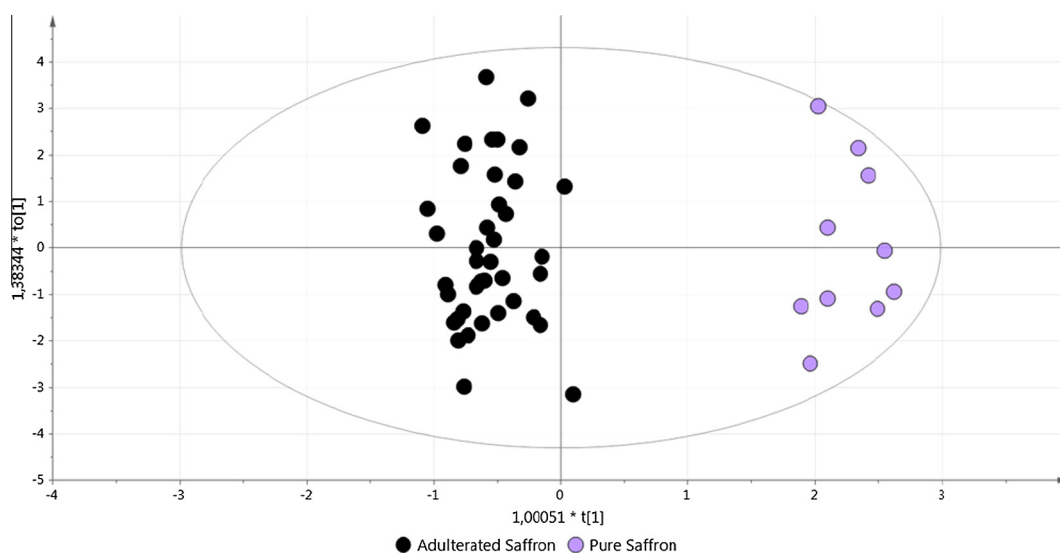


Fig. 3. OPLS-DA score plot performed by considering all saffron samples analysed divided in two classes: pure (purple circles) and adulterated (black circles) saffron. $R^2X = 82.4\%$, $R^2Y = 94.5\%$ and $Q^2 = 92.3\%$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the SIMCA-P+ 13 software (Umetrics, Umea, Sweden). T2 and distance to the model (DModX) tests were applied to verify the presence of outliers and to evaluate whether samples fall within the model applicability domain.

2.5. Training and test set selection

To investigate the predictive capability of the models, training and test sets were extracted from the 50 samples containing the 4 classes of adulterated saffron with plant adulterants and the class of pure saffron samples. Seven out of ten samples for each class were randomly selected to build the training set, while the three remaining samples were used for the test set. In total, training and test set consisted of 35 and 15 samples, respectively.

3. Results and discussion

Adulteration of saffron could be easily evaluated for each plant adulterant by comparing ^1H NMR spectra of authentic and spiked saffron. Typical signals concerning the different plant-derived materials used as bulking agents were present along the entire spectral region. Fig. 1 reports the aromatic and anomeric regions of ^1H NMR spectra for pure plant adulterants and the corresponding spiked saffron for the sake of clarity. In panel A (bottom trace), the spectrum of turmeric extract is reported; the typical signals of curcuminoid moiety could be identified at 7.541, 6.751 ppm for H1,7 and H2,6, respectively, at 6.059 ppm for H4, and signals at 7.318, 7.147, and 6.819 ppm for the aromatic protons. These assignments and the corresponding carbon signals (140.26,

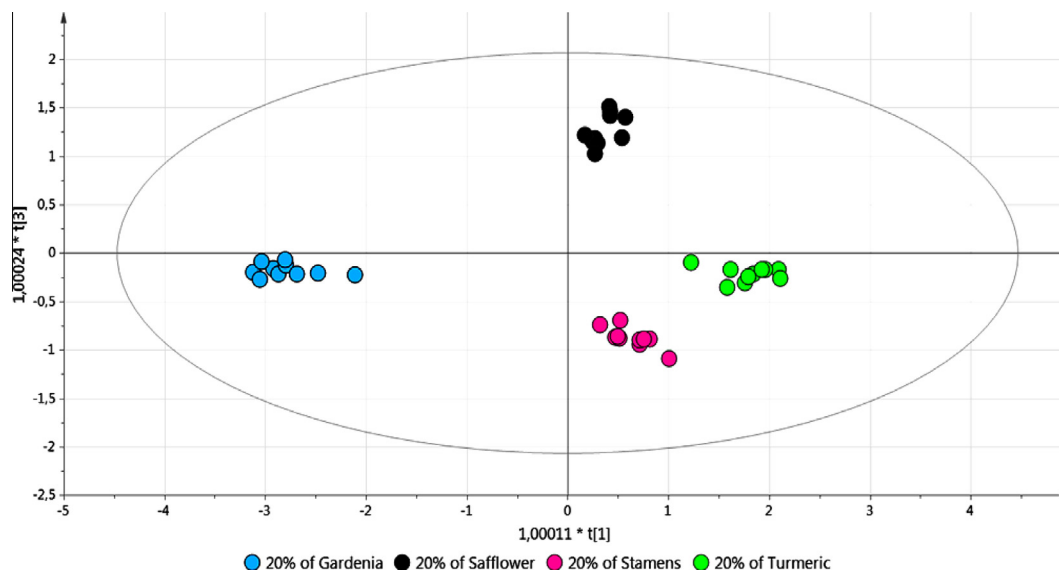


Fig. 4. O2PLS-DA score plot (PC1 versus PC3) performed by considering only adulterated saffron divided into 4 classes according to the type of plant adulterant: saffron adulterated with 20% (w/w) concentration with *Gardenia jasminoides* fruit extract, safflower, *C. sativus* stamens and turmeric are presented with light blue, black, pink, and green circles, respectively. $R^2X = 95.2\%$, $R^2Y = 97.6\%$ and $Q^2 = 96\%$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

120.75, 100.55, 110.93, 122.86, and 115.42 ppm) resulted in full agreement with previously reported data (Saladini et al., 2009). Curcuminoid signals could be easily recognised in the saffron adulterated with turmeric extract (top trace, panel A) by comparison with the pure saffron spectrum. Analogously, panel B evidenced the increase of a doublet at 5.181 ppm most likely referred to a saccharidic moiety, largely present in stamens extracts; Panel C showed the increase of signal at 5.205, 5.138, and 5.066 ppm and finally, panel D evidenced the increase of doublets at 7.569 and 7.466, a broad signal at 5.679 ppm, and doublets at 5.121 ppm most likely due to a saccharide moiety.

Full ^1H NMR spectra were considered for statistical analysis. PCA was initially performed on all samples to evaluate possible differentiation according to the purity and type of plant adulterant used. The first two PCs explained 63.7% of the total variance; the corresponding score plot (Fig. 2) revealed a poor separation for the majority of samples. Only saffron samples adulterated with 20% (w/w) gardenia extract resulted sufficiently differentiated, followed by saffron samples containing turmeric as bulking agent. A two-step approach with supervised classification models was performed to improve the differentiation of samples; pure and adulterated saffron were discriminated at first, while all artificial mixtures containing 20% (w/w) plant adulterants were successively evaluated.

The OPLS-DA model performed by considering two classes (authentic Greek and adulterated saffron), resulting in one predictive and three orthogonal components ($R^2X = 82.4\%$, $R^2Y = 94.5\%$, $Q^2 = 92.3\%$), is presented in Fig. 3, demonstrating a clear discrimination between the two classes of samples. The corresponding S-plot (data not shown) evidenced a higher content of picrocrocin (buckets at 1.12, 1.16, 2.08, 4.28, and 10.04 ppm) and crocins (buckets at 1.96, 4.16, 5.40, 6.52, 6.64, 6.84, and 7.32 ppm) in authentic Greek saffron with respect to saffron adulterated with the bulking agents, which generally presented higher levels of fatty acids (buckets at 1.20 and 1.24 ppm) and buckets including specific plant adulterant signals. Our results were in agreement with previously published data (Yilmaz et al., 2010), reporting picrocrocin and glycosyl esters of crocetin as the most important markers for distinguishing authentic Iranian saffron from commercial saffron

purchased in different countries. It should be noted that ^1H NMR metabolite fingerprints revealed no marked differences between organic and conventional saffron samples, indicating potential uniformity of Greek saffron.

Successively an O2PLS-DA model was performed by considering all artificial mixtures containing 20% (w/w) plant adulterants. This model resulted in three predictive and three orthogonal components ($R^2X = 95.2\%$, $R^2Y = 97.6\%$, $Q^2 = 96\%$). By scoring the first and the third latent variables (Fig. 4), a clear classification of the adulterated saffron samples according to the plant adulterant used could be obtained.

The reliable capability in categorising unknown saffron samples as pure or adulterated is based on the possibility to obtain a stable and reliable model from supervised OPLS-DA. This critical aspect was checked by selecting training and test sets constituted by 35 and 15 samples, respectively, both including authentic and adulterated saffron. The new two-class OPLS-DA model performed on training set resulted in one predictive and two orthogonal components. The overall goodness of fit were $R^2X = 72.5\%$ and $R^2Y = 93.8\%$, with the overall cross validation coefficient of $Q^2 = 88.2\%$. On the basis of T2 and DModX tests, the created model resulted suitable for the prediction of authentic or adulterated saffron test set samples. The classification list represented in Table 1 highlighted the model performance in prediction capability; no adulterated sample from any of the four classes was assigned as pure saffron and all samples were correctly classified, by using a classification threshold of 0.6. Only the twelve adulterated test set samples were successively re-projected in the O2PLS-DA model, built on the 28 adulterated saffron samples comprising the training set, resulting in three predictive and two orthogonal components ($R^2X = 93\%$, $R^2Y = 96.7\%$, $Q^2 = 93.4\%$). T2 and DModX tests evidenced that the model created was suitable for the prediction of adulteration type for test set samples. The classification list shown in Table 2 presented all adulterated saffron samples correctly categorised.

In order to check the non randomness of the classification models, the permutation test was performed in the corresponding PLS-DA model for each of the OPLS-DA and O2PLS-DA models. The decreased values of both parameters R^2 and Q^2 (R^2 regression line and vertical axis intersection point of the Q^2 resulted in near zero

Table 1

Classification list for the 15 test set saffron samples (3 authentic and 12 spiked with the four different plant adulterants) re-projected onto the two-class OPLS-DA model (authentic and adulterated saffron) performed by considering a training set constituted by 35 samples (7 authentic and 28 spiked with the four different plant adulterants). Letters T, Sf, St, and G stand for turmeric, safflower, *C. sativus* stamens, and *G. jasminoides* fruit extract, respectively. Each test set sample was classified by means of a classification score (Y predicted) indicative of its representativeness. In bold the values exceeding the threshold of 0.6, chosen for the correct classification, are reported.

Type of sample	Y predicted adulterated saffron	Y predicted pure saffron
Adulterated saffron – Sf	1.04	–0.04
Adulterated saffron – Sf	0.98	0.02
Adulterated saffron – Sf	1.07	–0.07
Adulterated saffron – G	0.91	0.09
Adulterated saffron – G	1.02	–0.02
Adulterated saffron – G	0.99	0.01
Adulterated saffron – St	1.01	–0.01
Adulterated saffron – St	1.16	–0.16
Adulterated saffron – St	0.88	0.12
Adulterated saffron – T	0.82	0.18
Adulterated saffron – T	1	0
Adulterated saffron – T	0.82	0.18
Pure saffron	–0.06	1.06
Pure saffron	–0.04	1.04
Pure saffron	0.15	0.85

Table 2

Classification list for the 12 test set saffron samples (3 spiked saffron samples for each plant adulterant) re-projected onto the O2PLS-DA model (adulterated saffron) performed by considering a training set constituted by 28 samples (7 spiked saffron samples for each plant adulterant). Each test set sample was classified by means of a classification score (Y predicted) indicative of its representativeness. In bold the values exceeding the threshold of 0.6, chosen for the correct classification, are reported.

Type of adulteration	Y predicted safflower (Sf)	Y predicted gardenia (G)	Y predicted stamens (St)	Y predicted turmeric (T)
Sf	1.05	–0.04	–0.13	0.12
Sf	0.94	0.02	–0.08	0.12
Sf	0.95	–0.04	0.07	0.02
G	0.01	1.04	0.02	–0.06
G	0.03	1.07	0.05	–0.15
G	0.02	0.95	0.13	–0.1
St	0	–0.02	0.99	0.03
St	0.01	0	1.03	–0.04
St	0.02	0.13	0.73	0.12
T	0.03	–0.04	0	1.01
T	–0.01	–0.02	–0.15	1.18
T	0.01	–0.03	0.13	0.89

and negative values, respectively) confirmed the validity of the models.

In the present study, the capability of distinguishing authentic against adulterated saffron containing other plant material by untargeted NMR fingerprinting and chemometrics was evaluated for the first time. The approach demonstrated herein led to detect adulteration of pure Greek saffron with four frequently utilised plant-derived materials in two steps. The first OPLS-DA model successfully differentiated adulterated from authentic saffron, owing to specific secondary metabolites representing markers for saffron authenticity, while the O2PLS-DA model identified the type of plant adulterant occurring in the samples, when found adulterated. The good predictive capability of both models, as was verified by using a test set, strongly supported the validity of the protocol proposed. The suggested approach is very low demanding in terms of required amount of saffron, sample preparation and is endowed with high reproducibility and fast execution. Thus, it may be used for screening large commercial batches of Greek saffron, and it could be adaptable for the analysis of samples of different grade or diverse geographical origin after further study.

In conclusion, NMR metabolite fingerprinting proves to be efficient for determining and identifying fraudulent additions of bulking agents to saffron, considering the difficulties in detecting saffron fraud according to the ISO 3632 standard methods, especially when plant adulterants are involved and the spice is commercialised in powder form. The obtained results confirmed the combined use of ^1H NMR spectroscopy and multivariate data analysis as a valid and powerful tool to investigate quality and authenticity of food products.

Acknowledgements

Authors would like to thank European Science Foundation (ESF) through the COST Action FA1101 (Saffron-OMICS: OMICS TECHNOLOGIES FOR CROP IMPROVEMENT, TRACEABILITY, DETERMINATION OF AUTHENTICITY, ADULTERATION AND ORIGIN IN SAFFRON. <http://www.saffronomics.org>) for strengthening the collaboration between the groups involved in this work. The “Scientific Foundation A. De Marco” is acknowledged for financial support for L. R. Cagliani’s fellowship.

References

- 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*, 1525–1528.
- 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*, 323–328.
- Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., & Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, *20*, 341–351.
- Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A. M., Novella, J. L., & Alonso, G. L. (2006). Crocetin esters, picrocrocetin 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.
- Consonni, R., & Cagliani, L. R. (2010). Nuclear magnetic resonance and chemometrics to assess geographical origin and quality of traditional food products. In S. L. Taylor (Ed.), *Advances in food and nutrition research* (Vol. 59, pp. 87–165). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Inc.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., & Cogliati, C. (2012a). NMR based geographical characterization of roasted coffee. *Talanta*, *88*, 420–426.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., & Cogliati, C. (2012b). NMR characterization of saccharides in Italian honeys of different floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 4526–4534.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., & Cogliati, C. (2013). Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. *Food Control*, *32*, 543–548.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., Stocchero, M., & Porretta, S. (2009). Triple concentrated tomato paste: Discrimination between Italian and Chinese products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 4506–4513.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., Stocchero, M., & Porretta, S. (2010). Evaluation of the production year in Italian and Chinese tomato paste for geographical determination using O2PLS models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 7520–7525.
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, *60*, 95–107.
- Fotakis, C., Christodouleas, D., Kokkotou, K., Zervou, M., Zoumpoulakis, P., Moulos, P., et al. (2013). NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits. *Food Chemistry*, *138*, 1837–1846.
- Haghighi, B., Feizy, J., & Hemati Kakhki, A. (2007). LC determination of adulterated saffron prepared by adding styles colored with some natural colorants. *Chromatographia*, *66*, 325–332.
- Hagh-Nazari, S., & Keifi, N. (2007). Saffron and various fraud manners in its production and trades. *Acta Horticulturae*, *739*, 411–416.
- ISO (2010). *International standard ISO 3632-2: Saffron (Crocus sativus L.) test methods*. Geneva: The International Organization for Standardization.
- ISO (2011). *International standard ISO 3632-1: Saffron (Crocus sativus L.) specification*. Geneva: The International Organization for Standardization.
- Javanmardi, N., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Sharifi, A., & Hemati Kakhki, A. (2011). Identification of safflower as a fraud in commercial saffron using RAPD/SCAR marker. *Journal of Cell and Molecular Research*, *3*, 31–37.
- Longobardi, F., Ventrella, A., Bianco, A., Catucci, L., Cafagna, I., Gallo, V., et al. (2013). Non-targeted ^1H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries. *Food Chemistry*, *141*, 3028–3033.
- Lozano, P., Castellar, M. R., Simancas, M. J., & Iborra, J. L. (1999). Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *Journal of Chromatography A*, *830*, 477–483.

- Ma, X. Q., Zhu, D. Y., Li, S. P., Dong, T. T. X., & Tsim, K. W. K. (2001). Authentic identification of stigma croci (stigma of *Crocus sativus*) from its adulterants by molecular genetic analysis. *Planta Medica*, *67*, 183–186.
- Mannina, L., Sobolev, A., & Viel, S. (2012). Liquid state ^1H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *66*, 1–39.
- 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*, 10998–11004.
- Melnik, J. P., Wang, S., & Marcone, M. F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International*, *43*, 1981–1989.
- Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, *77*, 118–126.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., & Martín-Belloso, O. (2013). Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food. *Food Research International*, *54*, 1172–1183.
- Ordoudi, S. A., & Tsimidou, M. Z. (2004). Saffron quality: Effect of agricultural practices, processing and storage. In R. Dris & S. M. Jain (Eds.), *Production practices and quality assessment of food crops* (Vol. 1, pp. 209–260). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- 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*, 1873–1876.
- Saffron in Europe – White Book, 2007. URL [http://www.europeansaffron.eu/archivos/White book english.pdf](http://www.europeansaffron.eu/archivos/White%20book%20english.pdf). Accessed 04.06.14.
- Saladini, M., Lazzari, S., Pignedoli, F., Rosa, R., Spagnolo, F., & Ferrari, E. (2009). New synthetic glucosyl-curcuminoids, and their ^1H and ^{13}C NMR characterization, from *Curcuma longa* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, *64*, 224–229.
- Sampathu, S. R., Shivashankar, S., Lewis, Y. S., & Wood, A. B. (1984). Saffron (*Crocus sativus* Linn.) – Cultivation, processing, chemistry and standardization. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *20*, 123–157.
- Sánchez, A. M., Maggi, L., Carmona, M., & Alonso, G. L. (2011). Authentication of saffron spice (*Crocus sativus* L.). In S. Ebeler (Ed.), *Progress in authentication of food and wine. ACS symposium series* (Vol. 1081, pp. 309–331). Washington, DC: American Chemical Society.
- Tomassini, A., Capuani, G., Delfini, M., & Miccheli, A. (2013). NMR-based metabolomics in food quality control. In F. Marini (Ed.), *Chemometrics in food chemistry. Data handling in science and technology* (Vol. 28, pp. 411–447). Oxford, UK: Elsevier B.V.
- 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*, 126–131.
- Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., et al. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, *80*, 115–122.
- Winterhalter, P., & Straubinger, M. (2000). Saffron – Renewed interest in an ancient spice. *Food Reviews International*, *16*, 39–59.
- Yilmaz, A., Nyberg, N. T., Mølgaard, P., Asili, J., & Jaroszewski, J. W. (2010). ^1H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts. *Metabolomics*, *6*, 511–517.



Assessing saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant-derived adulterants by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy coupled with chemometrics



Eleftherios A. Petrakis, Moschos G. Polissiou*

Laboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, School of Food, Biotechnology and Development, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Str., 11855 Athens, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:

Saffron adulteration
Food authenticity
Food fraud
Quality control
Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy
Multivariate data analysis

ABSTRACT

Saffron, the dried red stigmas of the plant *Crocus sativus* L., is well-known as one of the most important and expensive spices worldwide. It is thus highly susceptible to fraudulent practices that employ, among others, plant-derived adulterants. This study presents an application of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometric techniques for evaluating adulteration of saffron with six characteristic adulterants of plant origin, i.e. *C. sativus* stamens, calendula, safflower, turmeric, buddleja, and gardenia. The proposed method involved a three-step process for the detection of adulteration as well as for the identification and quantification of adulterants. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was applied to perform authentication of saffron based on mid-infrared fingerprints (4000–600 cm^{-1}), resulting in 99% correct classification of pure saffron and saffron adulterated at 5–20% (w/w) levels. Adulterant identification in positive samples was performed with high sensitivity and specificity by a six-class PLS-DA model, with spectroscopic data from the region 2000–600 cm^{-1} . Subsequently, partial least squares (PLS) regression models were built for the quantification of each adulterant. By using synergy interval PLS (siPLS) for variable selection, models with improved performance were developed, with detection limits ranging from 1.0% to 3.1% (w/w). The results obtained illustrate that this strategy based on DRIFTS has the potential to complement existing methodologies for the rapid and cost-effective assessment of typical saffron frauds.

1. Introduction

Saffron, the dried red stigmas derived from the flowers of the cultivated plant *Crocus sativus* L., is a valuable and highly appreciated spice. It is renowned as a colouring and flavouring agent in food, while its ever growing usage in herbal formulations and other botanical products is associated with a wide range of health promoting properties [1,2]. Given its limited production due to the laborious process required, saffron comprises one of the most expensive spices throughout the world, and thereby is considered within the major candidates for economically motivated fraud, as it was recently reported [3,4]. Moreover, this spice is considerably vulnerable to adulteration when it is traded in powder form or when used as an ingredient to seasonings and other products [5,6].

The addition of a variety of less expensive and more readily available plant materials, mostly of inferior quality but similar in appearance, has been historically known as a common fraudulent practice. Previous reports indicate that cut and/or dyed *C. sativus*

stamens, *Calendula officinalis* L. petals (calendula), *Carthamus tinctorius* L. petals (safflower), and *Curcuma longa* L. powdered rhizomes (turmeric) are among the most frequently encountered materials as adulterants in saffron [5–9]. The latter three materials are also involved in mislabelling issues of commercial saffron [5,8]. *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extract (gardenia) as well as the dye extracted from *Buddleja officinalis* Maxim. flowers (buddleja) constitute two other emerging fraudulently added materials [8,9], considering that both extracts contain pigments similar to crocetin esters (crocin) present in saffron [8,10], and thus could be possibly concealed to a greater degree in the saffron matrix.

For the purposes of saffron trading, counterfeiting practices can be tackled by evaluating the purity and authenticity of a given product or by grading its quality. According to the ISO 3632 technical standard [11,12], the maximum mass fraction of foreign matter permitted in third-class products is 1% (w/w). Nonetheless, the relevant method described in [12] is based on microscopic examination that can be extremely time-consuming for screening large numbers of samples.

* Corresponding author.

E-mail address: mopol@aua.gr (M.G. Polissiou).

Additionally, the standard UV–vis spectrophotometric method of ISO 3632-2 for grading saffron, as it was recently demonstrated [13], may not reveal saffron adulteration with amounts up to 20% (w/w) of safflower, turmeric, or calendula. It is assumed that saffron authentication through established methodology is a challenging task, as saffron of higher quality may be intentionally blended with plant-derived substitutes to disguise fraud.

Currently, the majority of the methods developed for investigating saffron adulteration with bulking agents of plant origin rely on molecular techniques [6,9,14–16]. Albeit very sensitive, such methods usually require extensive sample preparation and cannot easily address adulteration with plant extracts, probably due to the absence of recoverable DNA [9]. High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with photodiode array (PDA) and electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) detection has also revealed the addition of plant adulterants at a minimum of 2–5% (w/w) [13]. Another recent study indicated the ability of an electronic nose system combined with principal component analysis (PCA) and artificial neural networks to differentiate non-adulterated and adulterated saffron [17]. The evaluation of adulteration with typical plant bulking agents can be rapidly performed by means of ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) metabolite fingerprinting, as it was very recently demonstrated [18]. This approach led to the development of reliable classification models for the detection and identification of adulterants, utilising the ^1H NMR data obtained from the DMSO- d_6 extracts of samples. The use of advanced spectroscopic techniques such as ^1H NMR may enable the rapid, non-destructive screening of quality and authenticity of a product with minimal or no sample preparation.

Infrared (IR) spectroscopy provides another versatile and cost-effective option for the high-throughput analysis of a diverse range of foods and herbs [19–24]. The increasingly recognised potential of portable/handheld IR spectroscopy renders this technique an effective fingerprinting tool [25] for either laboratory or on-site analysis along complex supply networks [26]. Within the techniques used for measurements over the mid-IR region, where structural information related to the fundamental vibrations occurs [22], diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) has proved its potential for the determination of quality and authenticity parameters of foods and herbs [27,28].

As regards saffron, Fourier transform mid infrared spectroscopy (FT-IR) was first employed for the characterisation of crocins and related apocarotenoids [29]. Thus far, several studies related to quality and authenticity issues of saffron using infrared spectroscopic techniques have been conducted [30–35]. By integrating DRIFTS or transmission FT-IR and multivariate data analysis, authentication of saffron in terms of geographical origin has been performed [31]. Also, transmission FT-IR spectroscopy has been used for detecting saffron deterioration due to ageing [32,33] and potential adulteration or contamination with several colorants. The latter application was explored by a recent study [34], which reported the capability of FT-IR spectroscopy combined with appropriate chemometric techniques to detect and quantify six different artificial colorants in Iranian saffron samples. The applicability of infrared spectroscopy for screening saffron adulteration with plant adulterants has also been investigated in another recent work [35], by making use of infrared spectroscopic imaging, two-dimensional correlation infrared spectroscopy and PCA. However, information from both near infrared (NIR) microspectroscopic imaging and transmission FT-IR was required and only one adulterant (i.e. safflower) was evaluated.

In the present work, the potential of DRIFTS in conjunction with chemometrics is examined for rapidly assessing adulteration in saffron at levels of practical interest. Supervised pattern recognition through partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was employed with a view to developing classification models for the detection of adulteration with six typical plant-derived materials, i.e. *C. sativus* stamens, calendula, safflower, turmeric, buddleja, and gardenia, as well

as for the identification of adulterants. Partial least squares (PLS) regression and variable selection methods were also used to quantify adulterant concentrations in saffron.

2. Materials and methods

2.1. Samples and chemicals

A set of 50 samples of Greek *C. sativus* dried stigmas, harvested in the years 2012 and 2013, was supplied by Kozani Saffron Producers Cooperative (Cooperative de Safran; Kozani, Greece). The Greek saffron samples belonged to the commercial category I, according to the ISO 3632 specifications [11], and consisted of both organic (n=28) and conventionally produced (n=22) samples, to increase the variability among them. Commercial samples of *C. sativus* stamens (branded as “Safraan”), safflower (branded as “Turkish saffron”), and turmeric (branded as “Like saffron”) were acquired from local markets. Dried calendula (pot marigold) petals, derived from flowers harvested in 2014, were provided by a local producer in Boeotia (central Greece). *G. jasminoides* fruit extract (single herb extract, Zhi Zi) was purchased from Plum Flower Brand (Anguo, China), while *B. officinalis* flower bud extract was acquired from Phytoextractum (Portland, OR, USA). The plant materials and extracts were placed in storage at 4 °C until use and maintained in the absence of light. Potassium bromide (KBr) for IR spectroscopy (>99%) and phosphorus pentoxide (98%) were purchased from Fisher Scientific (Leicestershire, UK).

2.2. Sample preparation

The saffron samples along with the plant-derived adulterants were initially ground to a fine powder (ca. 1 g) using an agate mortar and pestle, so as to minimise the effect of particle size on the quality of spectra [27]. Subsequently, a portion (ca. 0.05 g) of each sample was submitted to overnight drying under mild conditions (25 °C), by employing a glass vacuum desiccator containing phosphorus pentoxide as a desiccant. This drying step was carried out for each batch of samples before FT-IR analysis with the aim of reducing moisture content interference and obtaining good quality spectra (higher intensity and lower noise interference), thereby obviating the need for mixing samples with KBr. Preliminary tests showed that powdered saffron samples required a minimum of 12 h in order for their moisture content to decrease from a maximum of 10% to approximately 5% (w/w), as determined by the ISO 3632-2 standard method [12]. Artificial counterfeit mixtures (0.05 g) were prepared by combining and mixing thoroughly in the mortar, for 3 min, 10 representative saffron samples with each of the six adulterants at 5%, 10%, and 20% (w/w) adulteration levels. This subset of saffron samples was selected by applying the Kennard-Stone algorithm [36,37] for uniform sampling to the original spectroscopic data. Overall, 30 mixtures were used for each adulterant to define each of the six respective classes of adulterated saffron. All authentic Greek saffron samples available were included, to obtain a more balanced data set for classification purposes, and thus 230 samples were used in total.

2.3. FT-IR analysis

Diffuse reflectance (DR) measurements were performed using a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector, a Nichrome source and a KBr beamsplitter. The powdered samples (ca. 4 mg) were measured at least in triplicate against a dried KBr spectrum (background) in a dry, controlled atmosphere at 25 °C, using a Spectra-Tech (Thermo Scientific) sample microcup (3 mm diameter, 2 mm height) placed in the DRIFTS accessory (Spectra-Tech) for analysis. A total of 100 scans were co-added for each spectrum over the wavenumber range 4000–600 cm^{-1} , with a 4 cm^{-1} resolution. The DR

spectra from each sample were collected in DRIFTS mode and averaged using the spectrometer software (OMNIC 7.3, Thermo Scientific). In order to ensure optimum system performance, routine procedures, i.e. spectrometer aligning and fine-tuning of the DRIFTS sampling accessory, were followed prior to each batch of measurements. Intraday precision (repeatability) and interday (intermediate) precision were evaluated as described by Craig et al. [38]. To determine intraday precision, triplicate spectra of a given saffron sample were recorded every three hours, for a period of 12 h, while interday precision was determined by measuring spectra triplicates in five consecutive days. Both were evaluated according to the average relative standard deviations (RSD) among spectra. Intra- and interday precisions for DR measurements were $2.1 \pm 1.2\%$ and $3.9 \pm 0.8\%$, respectively.

2.4. Multivariate data analysis

2.4.1. Unsupervised pattern recognition

PCA was used for preliminary exploratory analysis to visualise the sample distribution and investigate possible patterns owing to saffron purity or the type of adulterant used, by projecting the spectroscopic data in the multivariate space defined by orthogonal principal components. Additionally, the presence of potential outliers was also evaluated on the basis of Hotelling's T^2 values and Q residuals. Full DR spectra were used (1764 variables), while three data matrices (230×1764) were evaluated for PCA models, using (a) raw data or data treated (b) by Savitzky-Golay (SG) smoothing (window size of 15 points) followed by baseline correction, using the built-in function of OMNIC for automatic correction that utilises a second-order polynomial fitting through an iterative process (20 iterations); and (c) by absorbance normalisation following pre-treatment (b). In all cases, data were mean-centred before performing PCA.

2.4.2. Multivariate classification

PLS-DA, a supervised method for linear classification, was employed for both detecting adulteration and identifying the adulterant used. In PLS-DA, a PLS regression model is calculated relating the independent variables (X matrix of instrumental signals) to a class vector which is transformed into a binary (dummy) Y matrix [39,40]. The samples are then assigned to classes according to the predictions of the PLS model, with values ranging from 0 to 1, and the class threshold values defined on the basis of the Bayes' theorem [40]. Discrimination among the different groups can be achieved by using an appropriate number of latent variables (LVs), which are linear combinations of the original variables. The number of the LVs selected is considered as optimal when the cross validation error in classification is minimised.

To evaluate the predictive ability of PLS-DA models, cross validation was performed based on the venetian blinds (5 cross validation groups) procedure. The models were further validated using a test set. For this purpose, each data set was split into calibration and test sets, containing approximately 70% and 30% of the samples, respectively. The data splitting was achieved by using the Duplex algorithm [41], which provides representative selection while preserving the same diversity among calibration and test sets [42]. Samples with significantly high leverage values along with Hotelling's T^2 values and Q residuals well above 95% confidence limits were identified as outliers. The pre-processing options mentioned above for PCA were also evaluated for PLS-DA. All models were built after mean centering of DR spectroscopic data. Classification parameters such as the error rate, non-error rate, class specificity (true negative rate) and sensitivity (true positive rate), accuracy, and/or precision [40] were used to assess the quality of the models.

2.4.3. Multivariate calibration

Quantification of pure plant-derived adulterants in saffron samples was carried out using PLS regression [43]. Six different data matrices (40×1764) were employed, using 10 representative saffron (blank)

samples and 30 samples adulterated with each adulterant at 5%, 10%, and 20% (w/w) levels. The data pre-processing techniques evaluated were: (1) no further processing (raw data), (2) mean centering (MC), (3) multiplicative scatter correction (MSC), (4) MSC followed by MC, (5) standard normal variate (SNV), (6) SNV followed by MC, (7) first derivative followed by SG smoothing and MC, (8) second derivative followed by SG smoothing and MC, (9) SG smoothing followed by baseline correction (BC) and MC, (10) SG smoothing followed by BC and absorbance normalisation, and (11) SG smoothing followed by BC, absorbance normalisation, and MC.

Cross validation using the leave-one-out approach was employed to assess the predictive ability and estimate the optimal number of LVs for each model, based on the minimum root mean square error for cross validation (RMSECV). The performance of the models was further evaluated through parameters such as the root mean square errors for calibration (RMSEC) and prediction (RMSEP) of a test set of samples. The Duplex algorithm was used to split each data set into calibration (ca. 70%) and test (ca. 30%) sets. The detection of outliers was carried out by evaluating the leverages and the plot of Hotelling's T^2 distribution versus Q residuals.

After selection of the pre-processing technique that presented better performance, different wavenumber ranges were evaluated for model optimisation. Variable selection was also applied, using interval PLS (iPLS) and synergy interval PLS (siPLS) methods [44]. The objective of both methods is to find one or a few intervals of equal length that contain relevant information and give better predictions compared to full-spectrum range. The use of iPLS is intended to split the spectroscopic data into a defined number of intervals and calculate a local PLS model for each interval, while siPLS is allowed to develop PLS models based on all possible combinations of 2, 3, or 4 intervals [45]. The comparison of model performance was mainly based on RMSECV values and the associated number of LVs. However, RMSEP values were also considered for model selection.

2.4.4. Software

DR spectra were pre-processed using OMNIC 7.3 and TQ Analyst 8.0 (Thermo Scientific), while MATLAB 8.1 (The MathWorks, Natick, MA, USA) was employed for running algorithms and performing analysis of spectroscopic data with Classification toolbox [40] and PCA toolbox [46]. The use of iToolbox [44] for MATLAB enabled variable selection in PLS.

3. Results and discussion

FT-IR spectroscopy provides valuable information associated with the major saffron secondary metabolites, i.e. crocins and picrocrocin (Fig. S1 and S2), which can account for up to 50% (w/w) in dried stigmas [2]. As shown in Fig. 1, important spectral information for differentiating between saffron and other plant-derived materials can be extracted from the respective mid-infrared spectra, although common features can be found. The strong and broad absorption band centred at about 3350 cm^{-1} corresponds to the stretching vibration of hydroxyl ($-\text{OH}$) groups. The region $3000\text{--}2830\text{ cm}^{-1}$ presents two other common peaks due to C–H asymmetric and symmetric stretching. In the region of characteristic groups ($1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$), the bands observed are mostly related to the carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) group and the C=C bonds. Specifically, the stretching band of $\text{C}=\text{O}$ at approx. 1738 cm^{-1} is assigned to the aliphatic esters [35] present in the plant-derived materials, except for buddleja extract. This signal is particularly strong for the samples of calendula, safflower, and *C. sativus* stamens, indicating high concentrations of aliphatic esters. The absorption band at 1706 cm^{-1} is mainly attributed to the $\text{C}=\text{O}$ stretching mode of $-\text{COOR}$ groups in crocins [29,31], which are present primarily in saffron. This characteristic peak, occurring also for gardenia and buddleja extracts (Fig. 1b), shows that the conjugation system of crocins shifts the $\text{C}=\text{O}$ absorption to lower wavenumbers compared

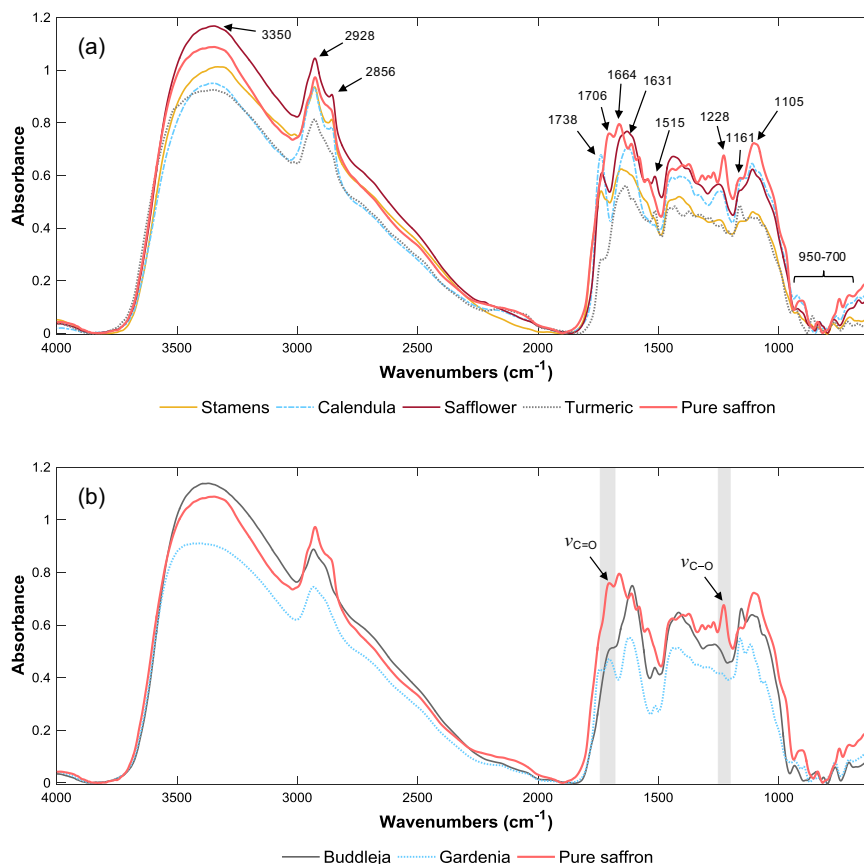


Fig. 1. Diffuse reflectance (DR) spectra obtained from (a) *C. sativus* stamens (yellow solid line), calendula (light blue dash dotted line), safflower (brown solid line), and turmeric (grey dotted line); (b) buddleja (grey solid line) and gardenia (light blue dotted line) extracts. In both panels, a representative DR spectrum of Greek saffron (red solid line) is included. Characteristic stretching vibrations (ν) related to crocins are highlighted in panel (b). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

with aliphatic esters [29]. The stretching vibration of C=O in –COOH group of amino acids can also contribute to this band [32]. Stretching modes of C=C group and conjugated C=O group (e.g. aldehydic C=O of picrocrocin) along with amide I band are located around 1664 cm^{-1} [32,47]. For calendula and safflower, the band related to the stretching of C=C group and/or conjugated C=O is shifted to ca. 1631 cm^{-1} (Fig. 1a), probably due to the longer conjugated systems of carotenoids or red and yellow (e.g. quinochalcone C-glycosides) pigments contained, respectively [13,47]. A shift of C=C stretching vibration is also observed for buddleja and gardenia extracts towards the region $1620\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$, which could be referred to C=C conjugation with aromatic ring. In the case of turmeric, the stretching vibrations of the conjugated C=O group (ketonic C=O of curcumin and other curcuminoids) and C=C group appear at ca. 1635 cm^{-1} and 1605 cm^{-1} , respectively [48]. The band at 1515 cm^{-1} , attributed to aromatic skeletal vibration that involves C=C stretching within the ring [35,47], is distinctive for safflower, turmeric, buddleja, and gardenia (Fig. 1).

The fingerprint region $1500\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ comprises bands mainly associated with the skeletal vibrations of the components, assigned to –CH₂–, –CH₃, –OH, C–C, C–O, and C–O–C groups [31]. Another characteristic vibration for saffron, attributed to the C–O stretching of C(=O)–O in ester groups of crocins, is responsible for the band at 1228 cm^{-1} [29]. The $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ range is mostly correlated with the presence of sugars and polysaccharides [31]. The signals occurring at about 1160 and 1105 cm^{-1} are generally assigned to the stretching vibrations of C–O groups in saccharides (e.g. in C–O–C of the sugar rings and glycosidic linkages of oligosaccharides) [29,31,32], while skeletal mode vibrations of the glycosidic linkages can be observed in the region $950\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ [27]. The bands shown between $970\text{--}920$, $890\text{--}810$, and $780\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ can also result from C–H (*trans*-),

aromatic C–H, and C–H (*cis*-) out-of-plane bending vibrations, respectively [32,47,48] (Fig. 2).

PCA was performed for preliminary exploration of possible differentiation according to the purity of saffron and the type of adulterant used as well as for detection of outliers. The use of SG smoothing and baseline correction for pre-processing DR spectra (Fig. S3b) was shown to provide comparatively better results, with the first two PCs explaining a total of 92.5% of the original variance; however, as revealed by the corresponding score plot (Fig. S4), differentiation of most samples was not possible, apart from those adulterated with calendula where relatively better separation was achieved. To improve the differentiation of samples, a strategy involving two steps was followed employing supervised classification by PLS-DA. Discrimination of pure and adulterated saffron samples was evaluated first, while identification of the plant-derived adulterant used in adulterated samples was subsequently examined.

For the detection of adulterated saffron, three PLS-DA models were initially evaluated on the basis of different pre-processing techniques, using data from the entire spectral region ($4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$). After removal of the outliers identified by PCA, the models were built by using 158 samples for calibration of the first two models and 157 samples for the model based on normalised data, while 70 samples were used in all cases as a test set. Table 1 shows that this fingerprinting approach gave the best results, i.e. the lowest errors and relatively low number of LVs, when SG smoothing and baseline correction were used for pre-processing DR spectra. The selected model was then optimised by removing two outliers identified in the calibration set and recalibrating. The main figures of merit for the optimised model, constructed with 156 samples for fitting and 70 samples for prediction (Table S1), are summarised in Table 2.

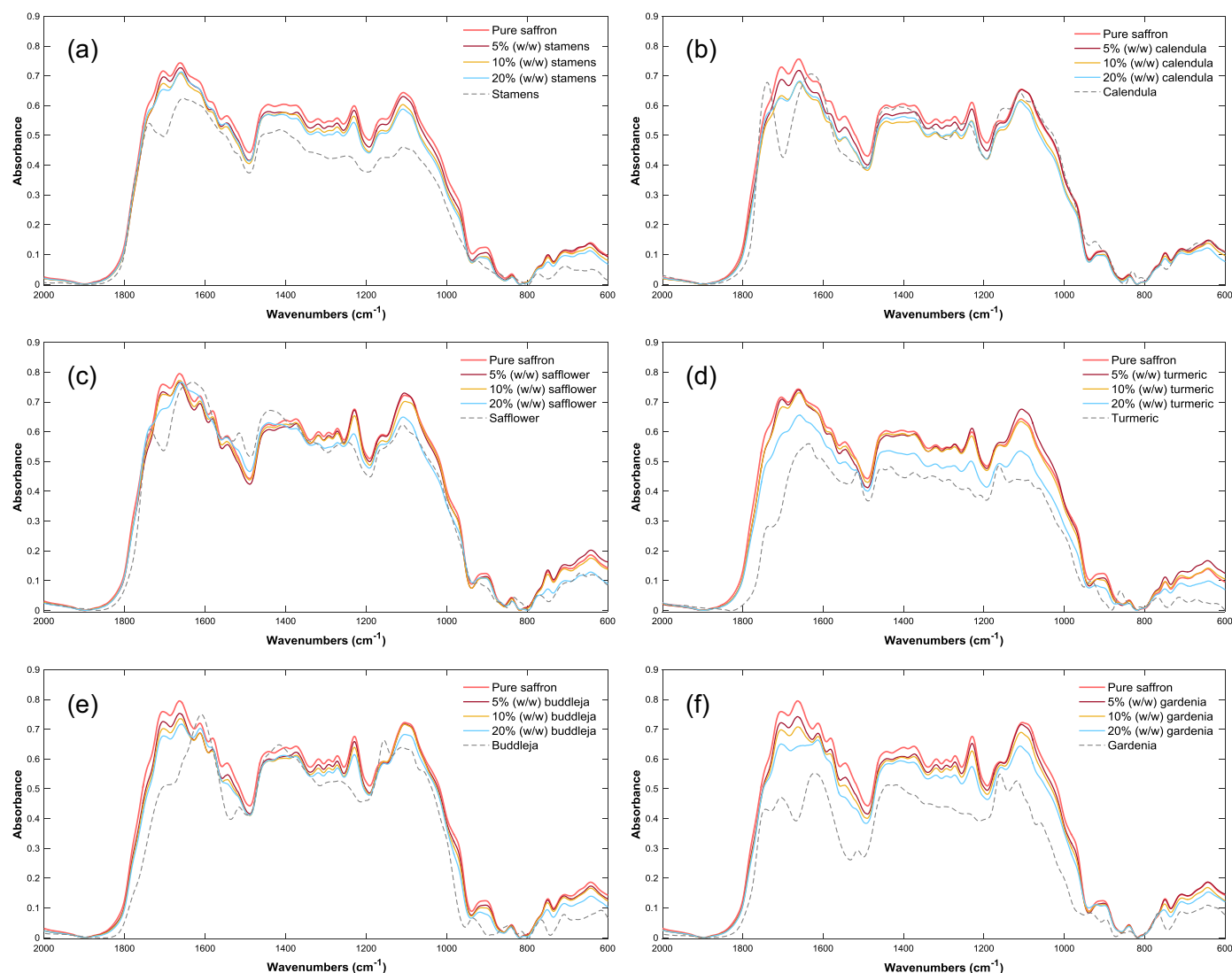


Fig. 2. Diffuse reflectance (DR) spectra of pure saffron (red solid line) and saffron adulterated with each adulterant at 5% (brown line), 10% (yellow line) and 20% (light blue line) levels, over the spectral region 2000–600 cm^{-1} . DR spectra of pure plant-derived materials (i.e. *C. sativus* stamens, calendula, safflower, turmeric, buddleja extract, and gardenia extract) are indicated in the respective panels (a) through (f) with a grey dashed line. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Performance results of the PLS-DA models developed using different pre-treatments of the DRIFTS data obtained from the full spectral range (4000–600 cm^{-1}).

Data pre-treatment ^a	LV		Non-error rate (%)	Error rate (%)	Accuracy (%)
i)	6	Fitting	97	3	97
		Cross validation	96	4	96
		Prediction	96	4	96
ii)	5	Fitting	99	1	98
		Cross validation	98	2	97
		Prediction	99	1	99
iii)	5	Fitting	98	2	97
		Cross validation	98	2	97
		Prediction	95	5	96

LV: latent variables.

^a i): mean centering of raw data; ii): mean centering of data after Savitzky-Golay (SG) smoothing and baseline correction (BC); iii): mean centering of data after SG smoothing, BC, and absorbance normalisation. The data pre-treatment selected is indicated in bold.

This two-class model explained 97% of the total variance (**X**), with the first two of the five LVs accounting for the 83% of the total variance. Notably high sensitivity and specificity rates were obtained (Table 2), while only two saffron samples adulterated with 5% (w/w) buddleja extract were misclassified as pure saffron in fitting and cross validation (Fig. 3). In both cases, the percentage of correctly classified samples was 99%. When the PLS-DA model was validated with the test set, all samples were correctly classified (Table 2). The predictive capability of the model was further evaluated by using an external test set, with reference saffron samples provided by Saffron-OMICS stakeholders (COST Action FA1101, www.saffronomics.org), consisted of samples from Greece (n=3), Italy (n=1), and Spain (n=5). All reference samples were correctly classified as pure saffron (Fig. S5), signifying the potential applicability of the model to saffron samples of different origin.

The regression coefficients as well as the loadings revealed that the variables contributing most to the increase of the pure saffron class response pertained to the typical absorption bands of crocins at 1706 and 1228 cm^{-1} , followed by the shoulders at about 1774 and 970 cm^{-1} as well as the band at 906 cm^{-1} . On the other hand, the variables associated with the bands at 3350, 2928, 2856, 1631, 1515, and 675 cm^{-1} along with the shoulder around 1060 cm^{-1} were responsible

Table 2

Classification parameters estimated for pure saffron and saffron adulterated with plant-derived adulterants by the two-class PLS-DA model.

	Error rate (%)	Pure saffron		Adulterated saffron	
		Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)
Fitting	1	98	100	100	98
Cross validation	1	98	100	100	98
Prediction	0	100	100	100	100

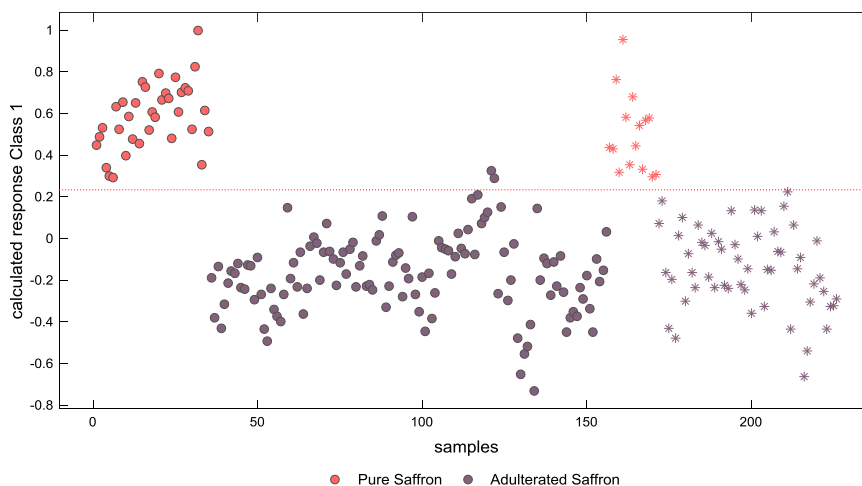


Fig. 3. PLS-DA classification plot for (a) pure saffron (red circles) and (b) saffron adulterated with six adulterants at 5%, 10%, and 20% (w/w) levels (purple circles). The samples of each class allocated in the test set are represented by asterisks of the respective colour. The red dotted line indicates the class threshold value. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

for the increase of the response related to the class of adulterated saffron.

The next step was to use PLS-DA for adulterant identification in adulterated saffron samples. In this respect, data from pre-processed DR spectra (SG smoothing and baseline correction) of adulterated samples were used. The model with the best performance was obtained by excluding the region 4000–2000 cm^{-1} , probably due to the fact that this region contains mostly common spectral features for all adulterated samples, which contributed for the increase of adulterated saffron class response, as indicated above. Conversely, the spectral region from 2000 to 600 cm^{-1} presents critical variations based on the characteristic bands of almost all adulterants examined (Fig. 2). This region has been also shown to contain the most discriminative spectral information for saffron authentication purposes, such as for determining geographical origin [31]. The samples used, after detection and removal of three outliers, were 123 in the calibration set and 54 in the test set. Detailed information about calibration and test sets is given in Table S2.

In this six-class PLS-DA model, the first two LVs explained 89.1% of variance, while nine LVs were used in total and accounted for the 99% of variance. The confusion matrix in Table S3 assembles the outputs of the model for the samples belonging to each class. The main results obtained in fitting, cross validation, and test set prediction are presented in Table 3; 99%, 98%, and 98% of samples were correctly classified, respectively. As “not assigned” samples were defined either the samples that were not recognised as members of any class or the samples assigned to more than one class [40]. These samples were not taken into account for the calculation of the classification parameters shown in Table 3. Considering also the not assigned samples, the correct classification percentages for fitting, cross validation, and prediction were 90%, 86%, and 91%, respectively. In Fig. 4, the classification plots of the six classes of adulterated samples are shown.

From the regression coefficients it was indicated that the class response of samples adulterated with *C. sativus* stamens increased

Table 3

Classification parameters estimated for the identification of plant-derived adulterants in adulterated saffron by the six-class PLS-DA model.

	Error rate (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Precision (%)	Not assigned ^a (%)
<i>Fitting</i>	1				9
Stamens		100	94	100	
Calendula		100	100	100	
Safflower		100	100	100	
Turmeric		99	100	95	
Buddleja		100	100	100	
Gardenia		100	100	100	
<i>Cross validation</i>	2				12
Stamens		100	94	100	
Calendula		100	100	100	
Safflower		99	100	94	
Turmeric		99	94	94	
Buddleja		100	100	100	
Gardenia		100	100	100	
<i>Prediction</i>	2				7
Stamens		100	86	100	
Calendula		100	100	100	
Safflower		100	100	100	
Turmeric		100	100	100	
Buddleja		100	100	100	
Gardenia		98	100	90	

^a Not assigned samples were the samples not recognised as members of any class or classified in more than one class [40]. These samples have not been considered for the calculation of error rate, specificity, sensitivity, and precision.

mainly due to the variables related to the shoulders occurring around 1774 and 1572 cm^{-1} , while important variables for the class of samples adulterated with calendula were those representing the bands at 1738

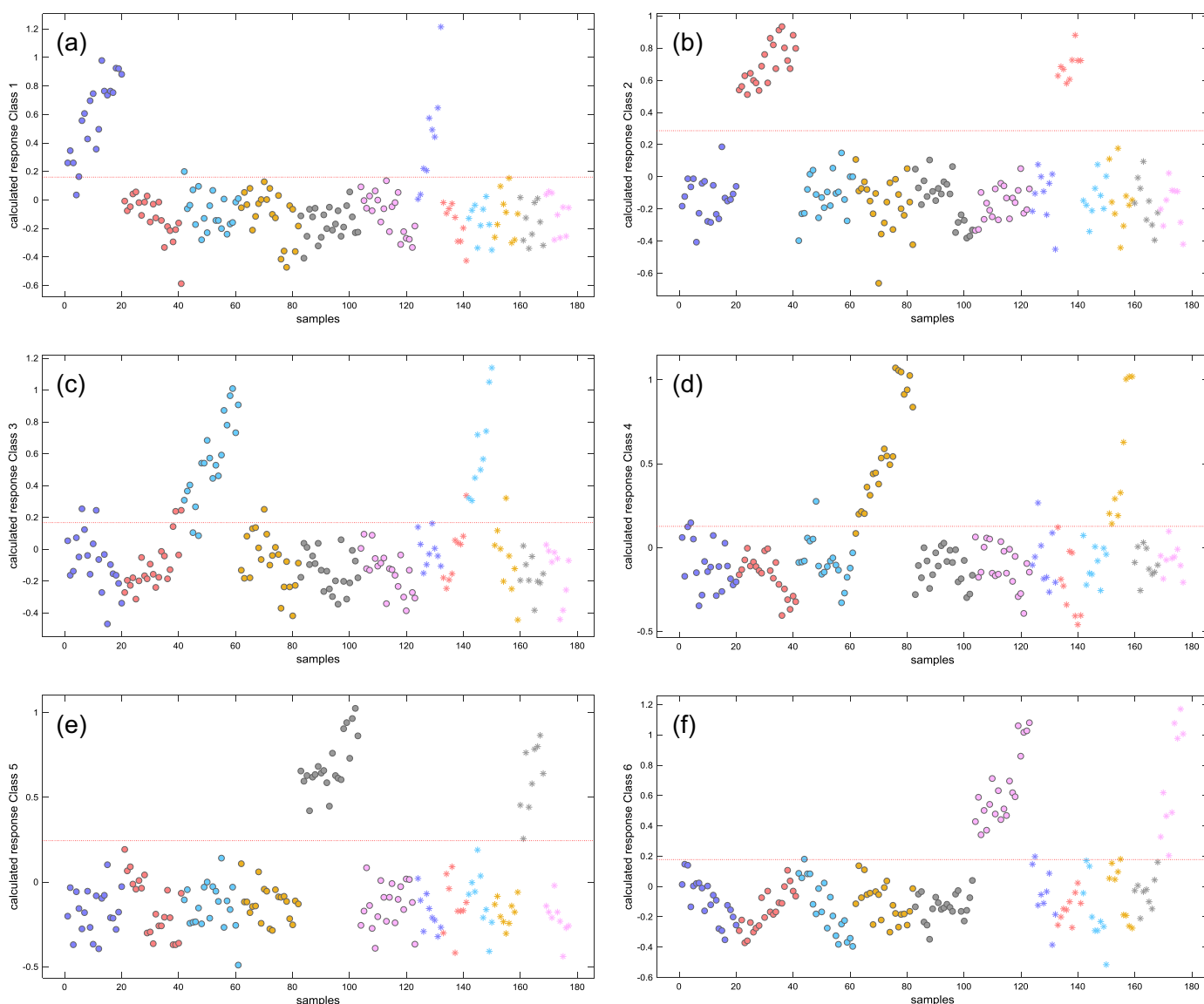


Fig. 4. PLS-DA classification plots for the six classes of adulterated saffron according to the type of adulterant: (a) *C. sativus* stamens (class 1; blue circles), (b) calendula (class 2; red circles), (c) safflower (class 3; light blue circles), (d) turmeric (class 4; yellow circles), (e) buddleja extract (class 5; grey circles), and (f) gardenia extract (class 6; pink circles). The test set samples of each class are represented by asterisks of the respective colour. The red dotted lines indicate the class threshold values. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and 1664 cm^{-1} . As for the class of samples containing safflower, the variables associated with the bands at 1615 , 1446 , 1250 , and 1105 cm^{-1} , together with the variables of the regions at about 1495 and 964 cm^{-1} , were shown to be the most distinguishable. The bands at 1635 , 1515 , 1163 , 934 and 861 cm^{-1} were related to important variables for the identification of samples adulterated with turmeric. Also, the discrimination between the class of samples adulterated with buddleja extract and all the other classes was enhanced mainly due to the variables representing the band at 1706 cm^{-1} and the region at about 1654 cm^{-1} . With respect to the samples adulterated with gardenia extract, the variables of the regions at 1745 and 1628 cm^{-1} as well as the variables related to the bands at 1160 and 767 cm^{-1} had a positive contribution to the class response.

For the quantification of each plant-derived adulterant, PLS models were built after removal of outliers. In the cases of *C. sativus* stamens and safflower, one and two outliers were removed, respectively, whereas in any of the PLS models developed for the four other adulterants no outliers were detected. For validation of each PLS model, 12 samples out of 40 (for stamens 39; for safflower 38) were selected by the Duplex algorithm as a test set. The remaining samples

of each data set were used for model calibration and cross validation. Different pre-processing techniques were evaluated using the full spectral range ($4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$). The results attained for model merits were shown to be better in almost all cases, especially for the calibration set, when first derivative followed by SG smoothing and mean centering was employed (Table S4). Thus it was selected as the most appropriate technique for pretreating DR spectra. Despite the fact that other techniques provided in some cases models with slightly lower RMSEP values, the number of LVs was higher or the cross validation performance in terms of correlation coefficient (r_{cv}) and RMSECV values was comparatively inferior.

The performance of the selected PLS models was further evaluated by using different spectral subdivisions along with iPLS and siPLS variable selection approaches. For both iPLS and siPLS, different numbers of intervals were assessed (i.e. 10, 15, 20, 30, and 40), while all possible combinations of 2, 3, or 4 intervals were examined in the case of siPLS. Table S5 presents the best variable selection options for each adulterant. In all cases, the models that presented better performance in both calibration and validation were based on siPLS. Listed in Table 4 are results from the different spectral ranges

Table 4

Performance results of PLS models for the quantification of each saffron adulterant examined using different wavenumber ranges.

Adulterant	Spectral range (cm ⁻¹)	LV	r _c	RMSEC (%)	RMSEP (%)	r _{cv}	RMSECV (%)
Stamens	4000–600	4	0.99	1.07	2.38	0.83	4.43
	3200–2700 and 2000–600	4	0.99	1.10	2.31	0.83	4.20
	2000–600	3	0.99	1.29	2.16	0.89	3.77
	1963–1626 and 941–771	4	0.99	1.09	1.75	0.94	2.94
Calendula	4000–600	4	0.99	0.88	1.53	0.93	3.05
	3200–2700 and 2000–600	7	0.99	0.49	1.58	0.93	3.01
	2000–600	3	0.99	1.05	1.52	0.90	3.31
	1508–1396 and 1167–1055	4	0.99	0.69	0.94	0.97	3.00
Safflower	4000–600	4	0.99	1.11	1.69	0.80	5.16
	3200–2700 and 2000–600	4	0.99	1.12	1.28	0.86	4.19
	2000–600	5	0.99	0.88	1.34	0.90	3.51
	1539–1456 and 858–773	5	0.99	0.70	1.11	0.96	2.22
Turmeric	4000–600	4	0.99	0.72	1.39	0.98	2.11
	3200–2700 and 2000–600	3	0.99	0.79	1.47	0.98	1.68
	2000–600	3	0.99	0.82	1.53	0.98	1.64
	1624–1286 and 941–771	4	0.99	0.57	1.26	0.99	1.44
Buddleja	4000–600	6	0.99	0.38	1.29	0.99	1.84
	3200–2700 and 2000–600	6	0.99	0.41	1.21	0.99	1.80
	2000–600	6	0.99	0.43	1.20	0.99	1.86
	1624–1456 and 941–771	3	0.99	0.69	1.23	0.99	1.45
Gardenia	4000–600	3	0.99	0.57	0.97	0.99	1.19
	3200–2700 and 2000–600	3	0.99	0.63	1.05	0.99	1.19
	2000–600	3	0.99	0.62	1.01	0.99	1.13
	1794–1626 and 1113–943	3	0.99	0.62	1.01	0.99	1.12

LV: latent variables; r_c: calibration correlation coefficient; r_{cv}: cross validation correlation coefficient; RMSEC, RMSEP, RMSECV: root mean square errors of calibration, prediction, and cross validation, respectively. Bold values indicate the models selected based on best subset selection by synergy interval PLS (siPLS).

examined and the best subsets suggested for each adulterant by siPLS (Fig. S6–S11). In general, the siPLS/PLS models indicated improved predictive ability compared to the models obtained using data from different ranges. Also, the correlation coefficient for prediction (r_v) equalled 0.98 for stamens and 0.99 for all other adulterants. Although the full-spectrum PLS model for gardenia provided comparable results to the siPLS/PLS model, the latter appears to contain the most relevant information that can be helpful in spectroscopic interpretation.

The limits of detection (LODs) were calculated according to a novel IUPAC-consistent estimator that adopts the form of a detection interval [49]. The LOD lower and upper interval values for each adulterant obtained from the respective siPLS/PLS models are listed in Table 5. Analytical sensitivity (γ) of each model was additionally calculated. The inverse of γ (γ⁻¹) provides an estimation of the minimum concentration difference that each siPLS/PLS model can distinguish, by taking into account the random instrumental noise as the only source of error [50]. The values obtained ranged from 0.2% to 0.6% (w/w), as shown in Table 5.

By comparing the LODs determined for calendula (1.9–2.6% w/w), safflower (2.1–2.8% w/w), and turmeric (1.0–1.6% w/w) with those

Table 5

Comparison of LOD and analytical sensitivity values obtained for each adulterant by siPLS/PLS in the concentration range 0–20% (w/w).

Adulterant	I	LOD range [min-max] (%)	γ (1/%)	γ ⁻¹ (%)
Stamens	27	2.2–3.1	1.8	0.5
Calendula	28	1.9–2.6	1.9	0.5
Safflower	26	2.1–2.8	1.8	0.6
Turmeric	28	1.0–1.6	4.0	0.2
Buddleja	28	1.1–1.6	3.7	0.3
Gardenia	28	1.1–1.5	4.2	0.2

I: number of calibration samples; LOD: limit of detection calculated according to Ref. [49]; γ: analytical sensitivity; γ⁻¹: inverse of γ.

previously reported by employing HPLC with PDA and/or ESI-MS detection [13], namely 5% (w/w) for calendula or safflower and 2% (w/w) for turmeric, it is implied that the proposed approach may enable detection at comparable or even lower levels of plant-derived adulterants in saffron. Therefore, the positive influence of spectral pre-processing and variable selection in sensitivity and overall improvement of PLS models is highlighted.

4. Conclusions

The increasing concern of producers, retailers, and consumers for authenticity of valuable products such as saffron underlines the need for high-throughput analytical methods that allow, from a practical point of view, for the rapid screening of potential adulterations. Once the adulteration is detected and the adulterant is identified, quantification is also required to estimate the level of adulteration. This study sought to establish a simple and versatile approach for the detection, identification, and quantification of six emerging adulterants of saffron by utilising DRIFTS spectroscopic data. DRIFTS is a non-destructive technique that requires only a small amount and minimal preparation of saffron samples. The methodology reported herein, following a three-step process, confirms the practical suitability of DRIFTS integrated with chemometric analysis as a green, cost-effective alternative for the rapid assessment of saffron adulteration with plant-derived adulterants. The possibility of portable or handheld instrumentation may further enhance the potential of this approach for on-site analysis and fraud detection within long and complicated supply chains.

Acknowledgments

The authors would like to thank the European Science Foundation (ESF) through the COST Action FA1101 (Saffron-OMICS: OMICS TECHNOLOGIES FOR CROP IMPROVEMENT, TRACEABILITY, DETERMINATION OF AUTHENTICITY, ADULTERATION AND

ORIGIN IN SAFFRON. <http://www.saffronomics.org>) for motivating and supporting this work. The “Kozani Saffron Producers Cooperative (Cooperative de Safran)” is acknowledged for kindly providing the saffron samples.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.talanta.2016.10.072.

References

- J.P. Melnyk, S. Wang, M.F. Marcone, Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: saffron, *Food Res. Int.* 43 (2010) 1981–1989.
- A. Kyriakoudi, S.A. Ordoudi, M. Roldán-Medina, M.Z. Tsimidou, Saffron, a functional spice, *Austin J. Nutr. Food Sci.* 3 (2015) 1059.
- J.C. Moore, J. Spink, M. Lipp, Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010, *J. Food Sci.* 77 (2012) 118–126.
- R. Johnson, Food Fraud and "Economically Motivated Adulteration" of Food and Food Ingredients, Report R43358, Washington, D.C., 2014.
- S. Hagh-Nazari, N. Keifi, Saffron and various fraud manners in its production and trades, *Acta Hort.* 739 (2007) 411–416.
- A. Torelli, M. Marieschi, R. Bruni, Authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) in different processed, retail products by means of SCAR markers, *Food Control* 36 (2014) 126–131.
- Saffron in Europe, White Book. ([http://www.europeansaffron.eu/archivos/White book english.pdf](http://www.europeansaffron.eu/archivos/White%20book%20english.pdf)), 2007 (accessed 16.10.16).
- A.M. Sánchez, L. Maggi, M. Carmona, G.L. Alonso, Authentication of saffron spice (*Crocus sativus* L.), in: S.E. Ebeler, G.R. Takeoka, P. Winterhalter (Eds.), *Progress in Authentication of Food and Wine*, ACS Symposium Series Vol. 1081, American Chemical Society, Washington, DC, 2011, pp. 309–331.
- G. Soffritti, M. Busconi, R.A. Sánchez, J.-M. Thiercelin, M. Polissiou, M. Roldán, J.A. Fernández, Genetic and epigenetic approaches for the possible detection of adulteration and auto-adulteration in saffron (*Crocus sativus* L.) spice, *Molecules* 21 (2016) 343.
- Y.-H. Liao, P.J. Houghton, J.R.S. Hoult, Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 1241–1245.
- The International Organization for Standardization, International Standard ISO 3632-1: Saffron (*Crocus sativus* L.) specification, Geneva, 2011.
- The International Organization for Standardization, International Standard ISO 3632-2: Saffron (*Crocus sativus* L.) test methods, Geneva, 2010.
- L. Sabatino, M. Scordino, M. Gargano, A. Belligno, P. Traulo, G. Gagliano, HPLC/PDA/ESI-MS evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration, *Nat. Prod. Commun.* 6 (2011) 1873–1876.
- M. Marieschi, A. Torelli, R. Bruni, Quality control of saffron (*Crocus sativus* L.): development of SCAR markers for the detection of plant adulterants used as bulking agents, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 10998–11004.
- M. Zhao, Y. Shi, L. Wu, L. Guo, W. Liu, C. Xiong, S. Yan, W. Sun, S. Chen, Rapid authentication of the precious herb saffron by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25370.
- C. Jiang, L. Cao, Y. Yuan, M. Chen, Y. Jin, L. Huang, Barcoding melting curve analysis for rapid, sensitive, and discriminating authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) from its adulterants, *BioMed. Res. Int.* 2014 (2014) (Article ID 809037).
- K. Heidarbeigi, S.S. Mohtasebi, A. Foroughirad, M. Ghasemi-Varnamkhasi, S. Rafiee, K. Rezaei, Detection of adulteration in saffron samples using electronic nose, *Int. J. Food Prop.* 18 (2015) 1391–1401.
- E.A. Petrakis, L.R. Cagliani, M.G. Polissiou, R. Consonni, Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting, *Food Chem.* 173 (2015) 890–896.
- R. Karoui, G. Downey, C. Blecker, Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships - a review, *Chem. Rev.* 110 (2010) 6144–6168.
- M.Y. Talpur, H. Kara, S.T.H. Sherazi, H.F. Ayyildiz, M. Topkafa, F.N. Arslan, S. Naz, F. Durmaz, Sirajuddin, Application of multivariate chemometric techniques for simultaneous determination of five parameters of cottonseed oil by single bounce attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, *Talanta* 129 (2014) 473–480.
- D. Cozzolino, The role of vibrational spectroscopy as a tool to assess economically motivated fraud and counterfeit issues in agricultural products and foods, *Anal. Methods* 7 (2015) 9390–9400.
- S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, B.-K. Cho, A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration, *Trends Food Sci. Technol.* 46 (2015) 85–98.
- J.S. Rooney, A. McDowell, C.J. Strachan, K.C. Gordon, Evaluation of vibrational spectroscopic methods to identify and quantify multiple adulterants in herbal medicines, *Talanta* 138 (2015) 77–85.
- C. Black, S.A. Haughey, O.P. Chevallier, P. Galvin-King, C.T. Elliott, A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: the oregano approach, *Food Chem.* 210 (2016) 551–557.
- D.I. Ellis, V.L. Brewster, W.B. Dunn, J.W. Allwood, A.P. Golovanov, R. Goodacre, Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 5706–5727.
- D.I. Ellis, H. Muhamadali, S.A. Haughey, C.T. Elliott, R. Goodacre, Point-and-shoot: rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis – moving out of the laboratory and into the food supply chain, *Anal. Methods* 7 (2015) 9401–9414.
- N. Reis, A.S. Franca, L.S. Oliveira, Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics, *Talanta* 115 (2013) 563–568.
- D. Saltas, C.S. Pappas, D. Daferera, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, Direct determination of rosmarinic acid in *Lamiaceae* herbs using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 3235–3241.
- P.A. Tarantilis, A. Beljebbar, M. Manfait, M. Polissiou, FT-IR, FT-Raman spectroscopic study of carotenoids from saffron (*Crocus sativus* L.) and some derivatives, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 54 (1998) 651–657.
- A. Zalacain, S.A. Ordoudi, E.M. Diaz-Plaza, M. Carmona, I. Blázquez, M.Z. Tsimidou, G.L. Alonso, Near-infrared spectroscopy in saffron quality control: determination of chemical composition and geographical origin, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9337–9341.
- E. Anastasaki, C. Kanakis, C. Pappas, L. Maggi, C.P. del Campo, M. Carmona, G.L. Alonso, M.G. Polissiou, Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis, *Eur. Food Res. Technol.* 230 (2010) 571–577.
- S.A. Ordoudi, M. de los Mozos Pascual, M.Z. Tsimidou, On the quality control of traded saffron by means of transmission Fourier-transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy and chemometrics, *Food Chem.* 150 (2014) 414–421.
- R. Consonni, S.A. Ordoudi, L.R. Cagliani, M. Tsiangali, M.Z. Tsimidou, On the traceability of commercial saffron samples using ¹H NMR and FT-IR metabolomics, *Molecules* 21 (2016) 286.
- S. Karimi, J. Feizy, F. Mehrjo, M. Farrokhnia, Detection and quantification of food colorant adulteration in saffron sample using chemometric analysis of FT-IR spectra, *RSC Adv.* 6 (2016) 23085–23093.
- J.-B. Chen, Q. Zhou, S.-Q. Sun, Adulteration screening of botanical materials by a sensitive and model-free approach using infrared spectroscopic imaging and two-dimensional correlation infrared spectroscopy, *J. Mol. Struct.* 1124 (2016) 262–267.
- R.W. Kennard, L.A. Stone, Computer aided design of experiments, *Technometrics* 11 (1969) 137–148.
- M. Daszykowski, B. Walczak, D.L. Massart, Representative subset selection, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 91–103.
- A.P. Craig, A.S. Franca, L.S. Oliveira, J. Irudayaraj, K. Iteleji, Application of elastic net and infrared spectroscopy in the discrimination between defective and non-defective roasted coffees, *Talanta* 128 (2014) 393–400.
- M. Barker, W. Rayens, Partial least squares for discrimination, *J. Chemom.* 17 (2003) 166–173.
- D. Ballabio, V. Consonni, Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA, *Anal. Methods* 5 (2013) 3790–3798.
- R.D. Snee, Validation of regression models: methods and examples, *Technometrics* 19 (1977) 415–428.
- F. Westad, F. Marini, Validation of chemometric models – a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 893 (2015) 14–24.
- P. Geladi, B.R. Kowalski, Partial least-squares regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1–17.
- L.Norgaard, The iToolbox for MATLAB, KVL, Denmark. (<http://www.models.life.ku.dk>), July 2004 (accessed 16.10.16).
- C.M. Andersen, R. Bro, Variable selection in regression—a tutorial, *J. Chemom.* 24 (2010) 728–737.
- D. Ballabio, A. MATLAB, toolbox for principal component analysis and unsupervised exploration of data structure, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 149 (2015) 1–9.
- G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: tables and Charts*, third edition, John Wiley & Sons Ltd, England, 2004.
- S. Dhakal, K. Chao, W. Schmidt, J. Qin, M. Kim, D. Chan, Evaluation of turmeric powder adulterated with metanil yellow using FT-Raman and FT-IR spectroscopy, *Food* 5 (2016) 36.
- F. Allegrini, A.C. Olivieri, IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7858–7866.
- M.A.M. Silva, M.H. Ferreira, J.W.B. Braga, M.M. Sena, Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy, *Talanta* 89 (2012) 342–351.



Analytical Methods

Sudan dyes in adulterated saffron (*Crocus sativus* L.): Identification and quantification by ^1H NMREleftherios A. Petrakis^a, Laura R. Cagliani^b, Petros A. Tarantilis^a, Moschos G. Polissiou^a, Roberto Consonni^{b,*}^aLaboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, School of Food, Biotechnology and Development, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Str., 11855 Athens, Greece^bInstitute for Macromolecular Studies, NMR Laboratory, National Research Council, v. A. Corti 12, 20133 Milan, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2015

Received in revised form 1 February 2016

Accepted 23 August 2016

Available online 30 August 2016

Chemical compounds studied in this article:

Sudan I (PubChem CID: 5858445)

Sudan II (PubChem CID: 5354447)

Sudan III (PubChem CID: 5379348)

Sudan IV (PubChem CID: 5876571)

Chloroform-d (PubChem CID: 71583)

Keywords:

Saffron

Quality control

Sudan dyes

 ^1H and ^{13}C NMR

qHNMR

Adulteration

ABSTRACT

Saffron, the dried red stigmas of *Crocus sativus* L., is considered as one of the most expensive spices worldwide, and as such, it is prone to adulteration. This study introduces an NMR-based approach to identify and determine the adulteration of saffron with Sudan I–IV dyes. A complete ^1H and ^{13}C resonance assignment for Sudan I–IV, achieved by two-dimensional homonuclear and heteronuclear NMR experiments, is reported for the first time. Specific different proton signals for the identification of each Sudan dye in adulterated saffron can be utilised for quantitative ^1H NMR (qHNMR), a well-established method for quantitative analysis. The quantification of Sudan III, as a paradigm, was performed in varying levels (0.14–7.1 g/kg) by considering the NMR signal occurring at 8.064 ppm. The high linearity, accuracy and rapidity of investigation enable high resolution ^1H NMR spectroscopy to be used for evaluation of saffron adulteration with Sudan dyes.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sudan dyes constitute a family of lipophilic azo-compounds, widely used in industries as colouring agents in products such as textiles, plastics, waxes, and polishes. The International Agency for Research on Cancer categorises the dyes Sudan I–IV as Group 3 carcinogens (IARC, 1975) and their use in food is not approved in most countries, including the European Union (Commission Decision, 2005). However, numerous notifications reported to the EU rapid alert system (RASFF) have demonstrated the illegal presence of these dyes in a range of foodstuffs, including saffron, since 2003.

Saffron, the spice obtained from the dried red stigmas of *Crocus sativus* L., is particularly liable to deliberate adulteration because it is considered as one of the most expensive spices worldwide (Moore, Spink, & Lipp, 2012). This spice is traditionally used for colouring and flavouring food and is endowed with a range of health promoting benefits (Winterhalter & Straubinger, 2000). Because of its high price and the production constraints, saffron

has experienced various types of adulteration throughout the years (Hagh-Nazari & Keifi, 2007). Nowadays, the addition of artificial colourants is a common way of fraud. The quality control of saffron typically involves the determination and quantification of colourants suspected as potential adulterants. As a general rule, artificial colourants should be absent from saffron according to the ISO 3632 standards (ISO, 2010, 2011). However, ISO 3632-2 (ISO, 2010) provides chromatographic (i.e. TLC, HPLC) test methods for artificial water-soluble acid colourants but not for fat-soluble compounds, such as the banned Sudan dyes, that may be used for improving appearance of old and inferior quality saffron. Adulteration of saffron with synthetic dyes has been the subject of rather limited studies, with keen emphasis on water-soluble colourants such as erythrosine, ponceau 4R, and tartrazine (Hajimahmoodi et al., 2013; Lozano, Castellar, Simancas, & Iborra, 1999; Ordoudi & Tsimidou, 2011; Zalacain, Ordoudi, Blázquez et al., 2005; Zougagh, Ríos, & Valcárcel, 2005). The only method reported so far for the detection of Sudan dyes in saffron has been developed by Ates, Mittendorf, and Senyuva (2011) using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) and cloud point extraction.

* Corresponding author.

E-mail address: roberto.consonni@ismac.cnr.it (R. Consonni).

Today, there is a steady growth in reports concerning Sudan dyes detection mainly in chilli or curry powder and related food products. The majority of the analytical methods developed are based on LC coupled with UV–Visible (UV–vis), photodiode array (PDA), or MS detection (Rebane, Leito, Yurchenko, & Herodes, 2010; Zhu et al., 2014). The main drawbacks of such chromatographic techniques are that they may be time-consuming and usually require sample manipulation. To overcome these handicaps, spectroscopic techniques that provide rapidity, reliability and ease of use could be applied.

Recent studies have successfully examined the potential of spectroscopic techniques such as Fourier transform mid-infrared (Ordoudi, de los Mozos Pascual, & Tsimidou, 2014), near-infrared (Zalacain, Ordoudi, Díaz-Plaza et al., 2005), Raman (Anastasaki et al., 2010), UV–vis (Maggi et al., 2011) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Cagliani, Culeddu, Chessa, & Consonni, 2015; Ordoudi et al., 2015; Petrakis, Cagliani, Polissiou, & Consonni, 2015; Sobolev et al., 2014; Yilmaz, Nyberg, & Jaroszewski, 2011; Yilmaz, Nyberg, Mølgaard, Asili, & Jaroszewski, 2010) to assess saffron quality and authenticity parameters. UV–vis spectroscopy, which is routinely used in saffron quality control, can be used for detecting Sudan dyes in saffron although it provides rather low sensitivity, as the detectable adulteration is 5 g/kg for Sudan I and II and 2 g/kg for Sudan III and IV, respectively (Sánchez, Maggi, Carmona, & Alonso, 2011). The ability of high resolution ^1H NMR combined with chemometrics to detect possible contamination of culinary spices including turmeric, curry, and mild or hot paprika with Sudan I–IV dyes has been recently demonstrated (Di Anibal, Callao, & Ruisánchez, 2011; Di Anibal, Ruisánchez, & Callao, 2011).

Over the past years, ^1H NMR spectroscopy has also attracted considerable attention as an efficient quantitative tool (Pauli, Gödecke, Jaki, & Lankin, 2012). The recent development of NMR spectrometers with high-field magnets as well as the advances in the probe technology have enabled the analysis of numerous compounds in low concentrations, with high precision and accuracy (Bharti & Roy, 2012; Ohtsuki et al., 2013). As the signal integral is directly proportional to the associated number of protons, the quantification of the molecule under investigation can be easily performed by evaluating the integral ratio with a reference molecule. The lack of necessity for isolation and purification of the target component and the quantification capability using solely a well-resolved signal are also among the key advantages that quantitative ^1H NMR (qHNMR) offers. To our knowledge, the feasibility of qHNMR for the determination of Sudan dyes in spices and other foodstuffs has not yet been explored.

This paper introduces a simple, rapid and reliable method for the identification of the banned Sudan dyes I–IV in adulterated saffron by employing high resolution ^1H NMR spectroscopy. A complete ^1H and ^{13}C NMR assignment for all Sudan dyes was achieved by extensive use of NMR experiments, like two-dimensional total correlation spectroscopy (TOCSY), heteronuclear single quantum coherence (HSQC), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC), and two-dimensional heteronuclear single quantum coherence – total correlation spectroscopy (HSQC-TOCSY). The application of qHNMR is proposed herein for the quantification of Sudan III in adulterated saffron in levels that may practically impact the visual colour, without requiring elaborate sample preparation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Sudan I standard (dye content: $\geq 95\%$) was acquired by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), while Sudan II (90%) and Sudan IV

($\geq 80\%$) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Sudan III (analytical standard purity: $\geq 96\%$ HPLC) was acquired from Fluka (Steinheim, Germany). Chloroform (99.96 atom % D) was purchased from Euriso-Top (Saclay, France).

2.2. Standard solutions

The Sudan III standard was accurately weighed in the amount of 4 mg and dissolved in 1 mL of CDCl_3 as a stock solution, which was stored at 4°C in the dark. Intermediate working solution at 0.36 mg/mL was prepared by serially diluting the stock solution with CDCl_3 .

2.3. Sample preparation

An authentic Greek saffron sample (harvest 2012) of commercial category I, according to the ISO 3632 specifications, was provided by Kozani Saffron Producers Cooperative (Cooperative de Safran). Spiked saffron samples were prepared by adding the Sudan III working solution to the selected sample, firstly at 1.4, 3.6, and 7.1 g/kg concentration levels (Di Anibal, Callao et al., 2011; Di Anibal, Ruisánchez et al., 2011) and then at 0.14, 0.36, and 0.71 g/kg. The latter three concentration levels were used to check the sensitivity of the ^1H NMR method. All concentrations are within the range of adulterated spices, as suggested by the American Spice Trade Association (ASTA, 2005). Accurately weighed quantities (10 mg) of pure saffron, pure Sudan I–IV dyes, and the spiked saffron samples with Sudan III were dissolved in 600 μL of CDCl_3 and stirred for 3 min at room temperature. After 10 min, they were submitted to centrifugation at 12100g for 10 min and then 500 μL aliquots of the supernatant were transferred into 5 mm NMR tubes for analysis.

2.4. NMR analysis

All spectra were recorded on a Bruker AV600 spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Karlsruhe, Germany), operating at 14.09 T and equipped with a 5-mm inverse probe with a z-gradient at 300 K.

2.4.1. Quantitative ^1H NMR (qHNMR)

^1H NMR spectra were recorded under quantitative conditions using a 90° pulse experiment, collecting 128 scans over 32 K data points and a relaxation delay of 40 s. The quantification of Sudan III dye in the CDCl_3 extracts of spiked saffron samples, at various concentration levels, could be carried out with a molarity-based quantification approach by using a calibration curve with a standard solution of whichever Sudan dye acquired under identical conditions used for all spiked saffron samples; in the present case Sudan II has been considered. Moreover, the residual solvent signal (0.04% of CHCl_3 in CDCl_3) in spiked saffron samples was adopted as internal reference and the Sudan III (purity grade $\geq 96\%$) content was calculated by using the following equation (Bharti & Roy, 2012):

$$W_{SIII} = \frac{I_{SIII}}{I_{std}} \times \frac{N_{std}}{N_{SIII}} \times \frac{M_{SIII}}{M_{std}} \times \frac{P_{std}}{P_{SIII}} \times W_{std} \quad (1)$$

where I, N, M, P and W are signal integral value, number of protons generating the selected signal for integration, molar mass, purity and weight of Sudan III (SIII) and the reference standard (std) used, respectively.

The Sudan III content (g/kg) of spiked saffron samples was calculated using the following formula:

$$\text{Content (g/kg)} = \frac{W_{SIII} \times 1000}{W_{sample}} \quad (2)$$

with W_{sample} being the weight of the spiked saffron sample (0.010 g).

2.4.2. ^{13}C NMR

^{13}C NMR spectra of the Sudan I–IV samples were acquired with 1024 transients and 64 K points covering 34000 Hz and a pulse width of 11 μs (90° pulse) with the inverse-gated decoupling pulse sequence from a Bruker library, to avoid the hetero-nuclear Overhauser effect derived from proton decoupling.

2.4.3. Two-dimensional NMR

Two-dimensional homo- and hetero-nuclear correlation NMR spectra (DQF-COSY – Double Quantum Filtered – COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, and HSQC-TOCSY) were acquired for Sudan I–IV spectra assignment. Spectra were typically acquired with 11 and 231 ppm over 2048 and 256 data points in proton and carbon dimensions, respectively. TOCSY spin lock was set at 80 ms with the direct heteronuclear coupling constant at 145 Hz.

2.4.4. NMR data processing

Exponential line broadening of 0.3 and 1.2 Hz was applied as resolution enhancement function for ^1H and ^{13}C spectra, respectively; zero-filling to 32 K (^1H) and 64 K (^{13}C) prior to Fourier transformation (TOPSPIN v. 3.0 software; Bruker Biospin GmbH Rheinstetten, Karlsruhe, Germany) was used. Manual phase adjustment and baseline correction were carefully performed. The spectra were referenced to the residual solvent signal at 7.260 ppm for ^1H and 77.16 ppm for ^{13}C spectra, respectively.

3. Results and discussion

The analysis of the ^1H NMR spectra of CDCl_3 extracts for Sudan I–IV dyes showed the majority of signals in the aromatic region, with the only exception for methyl signals of Sudan II and Sudan IV dyes located in the aliphatic region. Notwithstanding the crowded aromatic region resulted increased according to the molecular complexity, the full resonance assignment has been achieved for both proton and carbon atoms, for the first time, by

the analysis of homo- and heteronuclear bi-dimensional spectra of all Sudan dyes dissolved in CDCl_3 , as reported in Table 1 (labeling according to Fig. 1). The combined use of HSQC, HMBC, and HSQC-TOCSY allowed us to resolve assignment ambiguities due to spectral overlap in ^1H NMR spectra (Figs. S1–S4 in Supplementary data). All the aromatic signals of Sudan I–IV dyes occur in the spectral region between 6.750 and 8.650 ppm where no significant signals in the pure saffron spectrum are present (Fig. 2), thus enabling to monitor a selected spectral region for the detection of aromatic dyes. Additionally, Fig. 2 reports a red grid highlighting specific proton resonances that allowed univocal identification of each Sudan dye in adulterated saffron: proton 3 at 6.870 ppm for Sudan I, proton 8 at 8.618 ppm for Sudan II, protons 2' and 6' overlapped at 8.064 ppm for Sudan III, and proton 6' at 8.181 ppm for Sudan IV.

The quantification of the dye was evaluated by adopting the qHNMR requirements, concerning the NMR acquisition and processing procedures (Bharti & Roy, 2012). The primary requirement, the presence of one non-overlapping signal of the molecule to be quantified by integration (Beyer, Schollmayer, & Holzgrabe, 2010), was met in our case for at least one signal within all Sudan dyes, revealing high specificity and selectivity.

To check the linearity of quantification within the adopted range for the presence of colourant addition, solutions consisting of Greek saffron sample of certain origin were spiked with Sudan III working solution, at six different concentrations: 0.14, 0.36, 0.71, 1.4, 3.6, and 7.1 g/kg (Fig. S5 in Supplementary data). The quantification of Sudan III was carried out by considering the resonance at 8.064 ppm accounting for two diphenylazo protons (2' and 6'). This signal was integrated for all saffron samples spiked with Sudan III, and referred to the residual solvent signal. The calibration curve shown in Fig. 3A was generated based on the integral values and the corresponding amount of dye, obtaining a correlation coefficient of 0.999, thus confirming the high linearity of the measurements. These integral values were used to calculate, according to the equations (1) and (2) previously reported, the concentration of Sudan III with respect to the internal reference

Table 1
 ^1H and ^{13}C NMR assignments for Sudan I–IV dyes dissolved in CDCl_3 .

Atom	SUDAN I		SUDAN II		SUDAN III		SUDAN IV	
	^1H ppm	^{13}C ppm	^1H ppm	^{13}C ppm	^1H ppm	^{13}C ppm	^1H ppm	^{13}C ppm
1	–	130.22	–	130.57	–	131.14	–	131.66
2	–	171.99	–	170.57	–	175.66	–	176.47
3	6.870	124.95	6.925	124.64	6.818	125.73	6.810	125.90
4	7.713	140.20	7.724	139.41	7.719	141.61	7.690	141.62
5	7.598	128.76	7.619	128.69	7.583	129.01	7.554	129.36
6	7.393	125.86	7.391	125.55	7.421	126.58	7.401	126.57
7	7.552	129.00	7.557	128.81	7.549	129.41	7.561	128.97
8	8.564	121.87	8.618	121.72	8.547	122.22	8.537	122.12
9	–	133.75	–	133.72	–	133.61	–	133.56
10	–	128.21	–	128.09	–	128.45	–	128.32
1'	–	144.94	–	141.19	–	151.02	–	143.72
2'	7.738	118.74	–	137.97	8.064	124.80	–	150.92
3'	7.481	129.73	7.098	131.91	7.828	118.52	7.825	125.71
4'	7.304	127.57	–	129.74	–	146.00	–	128.38
5'	7.481	129.73	7.159	128.27	7.828	118.52	7.930	122.98
6'	7.738	118.74	7.966	116.00	8.064	124.80	8.181	116.13
1''	–	–	–	–	–	152.95	–	138.34
2''	–	–	–	–	7.945	123.06	–	151.00
3''	–	–	–	–	7.538	129.29	7.648	115.53
4''	–	–	–	–	7.486	131.20	7.275	126.52
5''	–	–	–	–	7.538	129.29	7.362	131.02
6''	–	–	–	–	7.945	123.06	7.349	131.42
Me'	–	–	2.377	21.34	–	–	2.602	17.71
Me''	–	–	2.527	17.71	–	–	2.747	17.76

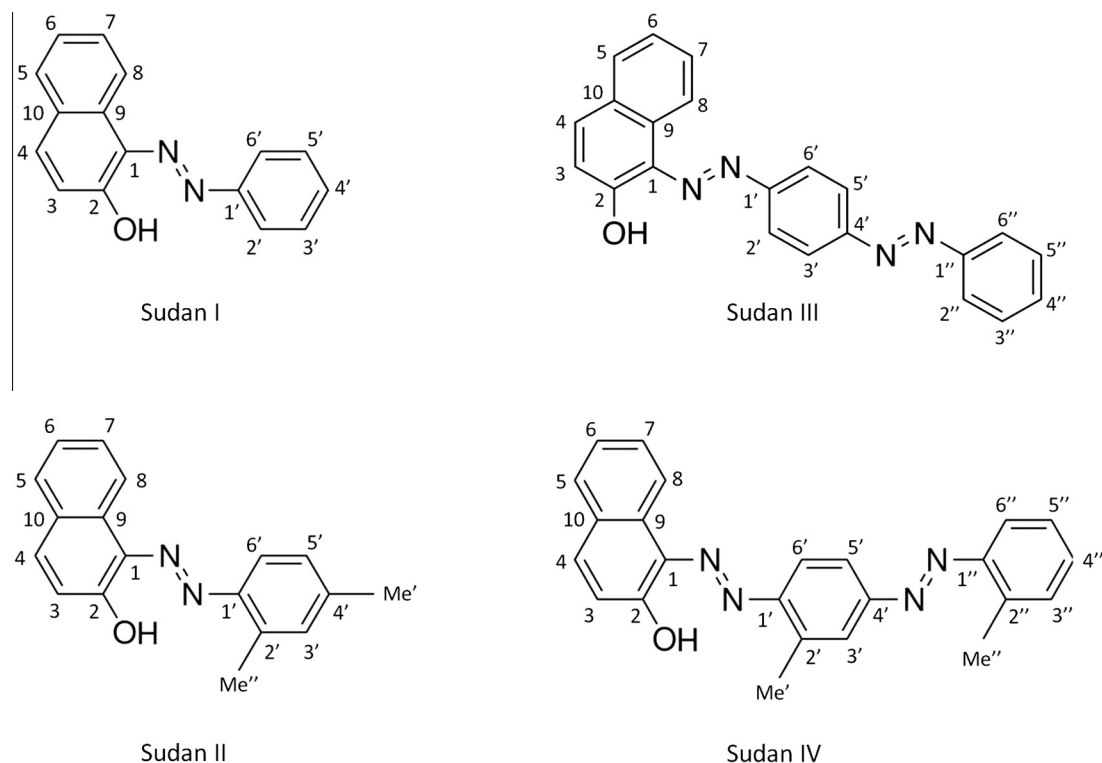


Fig. 1. Structure and labelling scheme for Sudan I–IV dyes analysed.

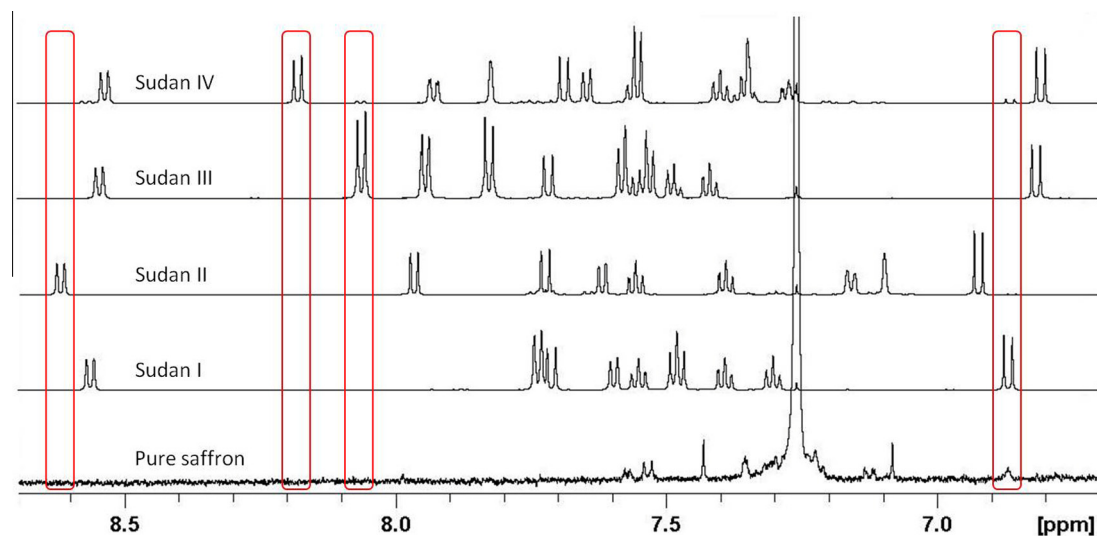


Fig. 2. Aromatic region of ¹H NMR spectra of Sudan I–IV dyes and the pure Greek saffron analysed. From the bottom to the top pure saffron, Sudan I, Sudan II, Sudan III, and Sudan IV are represented. Specific signals for the identification of each Sudan dye in adulterated saffron are highlighted with the red grid. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

represented by the residual solvent signal of CHCl₃ (0.04%) in CDCl₃, as shown in Fig. 3B, and similarly resulted in a correlation coefficient of 0.999.

Alternatively, the quantification of Sudan III could be achieved by considering an external quantified reference standard. The results obtained considering a Sudan II standard solution (purity grade 90%) were here reported. In particular, the well isolated resonance of the naphthol proton 8, occurring at 8.618 ppm, was chosen for the molarity-based quantification. Also in this case, the results obtained in the concentration range of 0.14–7.1 g/kg indi-

cated high linearity. Fig. 4 reports the calibration curve resulting in a correlation coefficient of 0.998. In both procedures, the quantification of Sudan III in saffron was calculated evaluating a single isolated resonance of the aromatic moiety for this dye and this principle will be achievable for the other members of Sudan family, easily identifiable in saffron by monitoring specific isolated proton signals, as previously discussed and highlighted in Fig. 2. The further quantification could be feasible by taking into proper account the number of corresponding protons, according to the full resonance assignment reported here for the first time. As a matter of

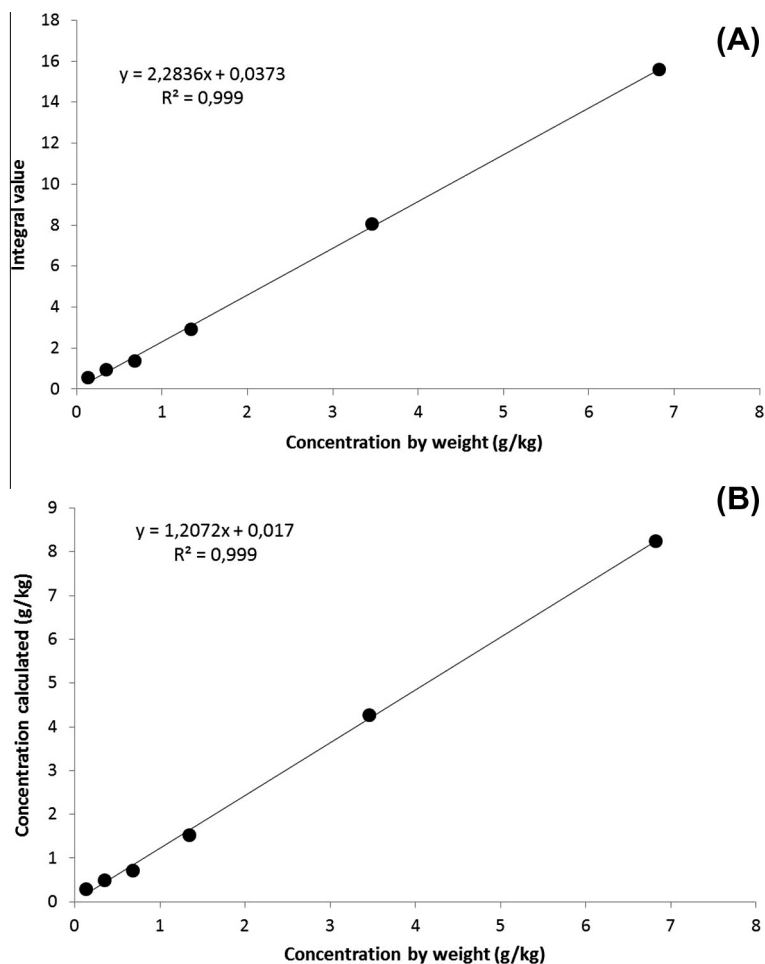


Fig. 3. Concentration by weight of Sudan III (g/kg) in adulterated saffron (in the range of 0.14–7.1 g/kg) vs (A) integral values and (B) concentration calculated (g/kg) for Sudan III considering the signal at 8.064 ppm scaled to the residual CHCl_3 signal at 7.260 ppm.

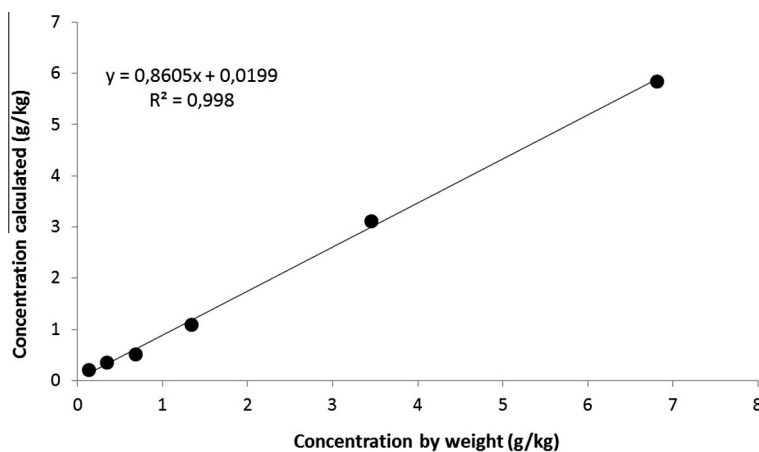


Fig. 4. Concentration by weight of Sudan III (g/kg) in adulterated saffron (in the range of 0.14–7.1 g/kg) vs concentration calculated (g/kg) for Sudan III considering the signal at 8.064 ppm scaled to the standard solution of Sudan II considering proton signal at 8.618 ppm.

fact, the use of an organic solvent like chloroform did not allow detection of any possible interfering signals for components of saffron containing aromatic rings.

The proposed procedure presents some advantages in comparison with data fusion approaches (Di Anibal, Callao et al., 2011) that require meta-spectrum and multivariate data analysis; in

the present work a single spectrum is required, obtained with high reproducibility and linearity of the response, allowing a single evaluation without the use of a set of representative samples necessary for statistical treatment. Moreover, the use of high resolution ^1H NMR measurements allowed the detection of a lower concentration of Sudan III (0.14 g/kg) in saffron, when compared

to other spectroscopic techniques like UV–vis where the dye was detected at levels as low as 2 g/kg (Sánchez et al., 2011). Thus, the outcome of this procedure can be complementary to previous achievements (Ates et al., 2011).

Finally, the quantification of Sudan dyes could be performed by considering either an internal (CHCl₃) or an external reference, most likely a standard solution of any Sudan dye. In our opinion, the direct use of solvent as a reference for quantification is preferable to preparing a standard solution of dye, as experimental time is being reduced and both calibrant (solvent) and analyte (Sudan dye) are subjected to identical experimental conditions, minimising possible deviations. Another possible option could be to use a known concentration of a standard molecule added to the solution, with particular requirements like the absence of overlapping peaks in the regions of interest and no interference with the molecule to be quantified (Mavromoustakos, Zervou, Bonas, Kolocouris, & Petrakis, 2000). The lowest concentration quantified by qHNMR was as low as 0.14 g/kg; considering that the levels of adulteration that make practical economic sense exceed 0.12 g/kg and may reach 1 g/kg (ASTA, 2005), the method here proposed seems to be a valid tool for the detection of Sudan (I–IV) adulteration in saffron. The high linearity, accuracy and rapidity of investigation enable this approach to be used for evaluation of saffron adulteration with Sudan dyes. The main advantage of using NMR is the minimal sample preparation and null chemical treatment. In this respect, water-soluble artificial colourants, usually analysed by other spectroscopic techniques, such as UV–vis, and liquid chromatography, could be investigated as well, avoiding the drawbacks of sample pre-treatment and the additional problems derived from the matrix effect that might influence the chromatographic resolution. In view of this, chloroform appears to be the most suitable solvent to detect possible adulterations with lipophilic molecules, while in case of hydrophilic or bio-adulterants (Petrakis et al., 2015), DMSO will be the proper candidate for these investigations.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge European Science Foundation (ESF) through the COST Action FA1101 (Saffron-OMICS: OMICS TECHNOLOGIES FOR CROP IMPROVEMENT, TRACEABILITY, DETERMINATION OF AUTHENTICITY, ADULTERATION AND ORIGIN IN SAFFRON. <http://www.saffronomics.org>) for strengthening the collaboration between the groups involved in this work, through the Short Term Scientific Mission (STSM) visit of E.A. Petrakis to ISMAC in Milan, Italy. The “A. De Marco” scientific foundation is acknowledged for funding L.R. Cagliani.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.078>.

References

- Anastasaki, E. G., Kanakis, C. D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., et al. (2010). Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6011–6017.
- ASTA (American Spice Trade Association). Sudan Red and related dyes – White Paper, 2005. <<http://www.astaspice.org/files/public/SudanWhitePaper.pdf>> [Accessed 29.01.16].
- Ates, E., Mittendorf, K., & Senyuva, H. (2011). LC/MS Method using cloud point extraction for the determination of permitted and illegal food colors in liquid, semiliquid, and solid food matrices: Single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 94, 1853–1862.
- Beyer, T., Schollmayer, C., & Holzgrabe, U. (2010). The role of solvents in the signal separation for quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52, 51–58.
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAc – Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5–26.
- Cagliani, L. R., Culeddu, N., Chessa, M., & Consonni, R. (2015). NMR investigations for a quality assessment of Italian PDO saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Control*, 50, 342–348.
- Commission Decision (2005). Commission decision 2005/402/EC of 23 May 2005 on emergency measures regarding chilli, chilli products, curcuma and palm oil. *Official Journal of the European Union*, L135, 34–36.
- De Nino, A., Di Donna, L., Maiuolo, L., Mazzotti, F., & Sindona, G. (2008). Synthesis of deuterium-labeled azo dyes of the Sudan family. *Synthesis*, 3, 459–463.
- Di Anibal, C. V., Callao, M. P., & Ruisánchez, I. (2011b). ¹H NMR and UV-visible data fusion for determining Sudan dyes in culinary spices. *Talanta*, 84, 829–833.
- Di Anibal, C. V., Ruisánchez, I., & Callao, M. P. (2011a). High-resolution ¹H Nuclear Magnetic Resonance spectrometry combined with chemometric treatment to identify adulteration of culinary spices with Sudan dyes. *Food Chemistry*, 124, 1139–1145.
- Hagh-Nazari, S., & Keifi, N. (2007). Saffron and various fraud manners in its production and trades. *Acta Horticulturae*, 739, 411–416.
- Hajimahmoodi, M., Afsharimanesh, M., Moghaddam, G., Sadeghi, N., Oveisi, M. R., Jannat, B., et al. (2013). Determination of eight synthetic dyes in foodstuffs by green liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30, 780–785.
- IARC (1975). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some aromatic azo compounds* (Vol. 8), (pp. 224–231). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- ISO (2010). International Standard ISO 3632–2: Saffron (*Crocus sativus* L.) Test Methods. Geneva: The International Organization for Standardization.
- ISO (2011). International Standard ISO 3632–1: Saffron (*Crocus sativus* L.) Specification. Geneva: The International Organization for Standardization.
- Lozano, P., Castellar, M. R., Simancas, M. J., & Iborra, J. L. (1999). Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *Journal of Chromatography A*, 830, 477–483.
- Maggi, L., Sánchez, A. M., Carmona, M., Kanakis, C. D., Anastasaki, E., Tarantilis, P. A., et al. (2011). Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry*, 127, 369–373.
- Mavromoustakos, T., Zervou, M., Bonas, G., Kolocouris, A., & Petrakis, P. (2000). A novel analytical method to detect adulteration of virgin olive oil by other oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 405–411.
- Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77, 118–126.
- Ohtsuki, T., Sato, K., Furusho, N., Kubota, H., Sugimoto, N., & Akiyama, H. (2013). Absolute quantification of dehydroacetic acid in processed foods using quantitative ¹H NMR. *Food Chemistry*, 141, 1322–1327.
- Ordoudi, S. A., Cagliani, L. R., Lalou, S., Naziri, E., Tsimidou, M. Z., & Consonni, R. (2015). ¹H NMR-based metabolomics of saffron reveals markers for its quality deterioration. *Food Research International*, 70, 1–6.
- 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.
- 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 & Contaminants: Part A*, 28, 417–422.
- Pauli, G. F., Gödecke, T., Jaki, B. U., & Lankin, D. C. (2012). Quantitative ¹H NMR: Development and potential of an analytical method – An update. *Journal of Natural Products*, 75, 834–851.
- Petrakis, E. A., Cagliani, L. R., Polissiou, M. G., & Consonni, R. (2015). Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chemistry*, 173, 890–896.
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). <<http://ec.europa.eu/food/safety/rasff>> Accessed 29.01.16.
- Rebane, R., Leito, I., Yurchenko, S., & Herodes, K. (2010). A review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrices. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2747–2757.
- Sánchez, A. M., Maggi, L., Carmona, M., & Alonso, G. L. (2011). Authentication of saffron spice (*Crocus sativus* L.). In: S. Ebeler et al. (Eds.), *Progress in Authentication of Food and Wine* (pp. 309–331). ACS Symposium Series, Vol. 1081. Washington, DC: American Chemical Society.
- Sobolev, A. P., Carradori, S., Capitani, D., Vista, S., Trella, A. A., Marini, F., & Mannina, L. (2014). Saffron samples of different origin: An NMR study of microwave-assisted extracts. *Foods*, 3, 403–419.
- Winterhalter, P., & Straubinger, M. (2000). Saffron – Renewed interest in an ancient spice. *Food Reviews International*, 16, 39–59.
- Yilmaz, A., Nyberg, N. T., & Jaroszewski, J. W. (2011). Metabolic profiling based on two-dimensional J-resolved ¹H NMR data and parallel factor analysis. *Analytical Chemistry*, 83, 8278–8285.
- Yilmaz, A., Nyberg, N. T., Mølgaard, P., Asili, J., & Jaroszewski, J. W. (2010). ¹H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts. *Metabolomics*, 6, 511–517.
- 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 & Contaminants*, 22, 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, 9337–9341.
- Zhu, Y., Zhao, B., Xiao, R., Yun, W., Xiao, Z., Tu, D., & Chen, S. (2014). Simultaneous determination of 14 oil-soluble synthetic dyes in chilli products by high performance liquid chromatography with a gel permeation chromatography clean-up procedure. *Food Chemistry*, 145, 956–962.
- 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, 133–138.

NMR SPECTROSCOPIC STUDIES IN SAFFRON AUTHENTICITY AND QUALITY
(WITHIN THE FRAME SAFFRONOMICS Cost action FA1101)

R. Consonni*, L. R. Cagliani*, M. G. Polissiou[§], E. A. Petrakis[§], M. Z. Tsimidou[#], S. Ordoudi[#]

*Institute for Macromolecular Study, v. Bassini 15, 20133 Milan, Italy.

[§] Laboratory of Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75,11855, Athens, Greece.

[#] Aristotle University of Thessaloniki, School of Chemistry, Laboratory of Food Chemistry and Technology, 54124, Thessaloniki, Greece.

1 INTRODUCTION

Saffron, the most expensive spice in the world market, is according to the trade standard ISO 3632¹ obtained from the pistils of *Crocus sativus* L. flowers after drying. Drying is carried out by producers by rather traditional treatments. The latter differ comparatively from each other according to geographical origin². The high market value of the material is mainly related to labor cost as the cultivation is not mechanized yet, despite the many centuries of known use in foods and ethnopharmacology. Saffron comes from only a few areas of the world, Iran being the major producer in Asia. India comes next whereas growing is the interest in neighboring to them countries (Afghanistan, China). In Europe, the use of pistils of crocuses, which are now studied as possible progenitors of the sterile triploid *C. sativus*, is evidenced in the frescoes of Akrotiri (Santorini, Greece) and ancient Greek and Roman literature. Production is currently coming from producer associations in Kozani region (Greece) and Castilla la Mancha (Spain). The respective products (Krokos Kozanis and Azafrán de Castilla la Mancha) have been registered as PDO products. A revival of the cultivation is observed in certain regions of Italy and in particular Sardinia, Abruzzo and Tuscany received PDO stamp (Turri - Villanovafranca - S. Gavino Monreale, L'Aquila and S. Gimignano) while small farmers are present elsewhere. Among Maghreb countries, Morocco presents activity in organized saffron production. The interest in cultivation is expanded within and beyond Europe though the limitation of legally traded *C. sativus* corms is an obstacle. Plant material from nurseries has not been always found effective in daughter corm yield, number of flowers per corm and length of pistils.

COST ACTION FA11001 SaffronOMICS (2011-2015) according to the Memorandum of Understanding (www.saffronomics.org) is a concerted cross-project and a multidisciplinary approach that succeeded so far in bringing together experts, who jointly address issues of authenticity, quality control and origin of saffron among the many other objectives. High throughput techniques such as NMR, that facilitate the examination of plant metabolites, are also aimed for saffron within the SaffronOMICS frame. NMR techniques present a great

potential to establish new criteria for the above-mentioned issues beyond those proposed by ISO 3632 trade standard and literature applications of other spectroscopic techniques (e.g. UV-Vis, fluorescence, Near Infrared, Mid Infrared).

ISO 3632 established quality criteria for authenticity, quality and origin control using spectroscopic methods, exclusively based on spectrophotometric measurements. NMR and other spectroscopic techniques, hereafter presented, are largely adopted because of their fast and nondestructive properties.

2 SPECTROSCOPIC INVESTIGATIONS OF SAFFRON

2.1. UV-Vis Spectrometry

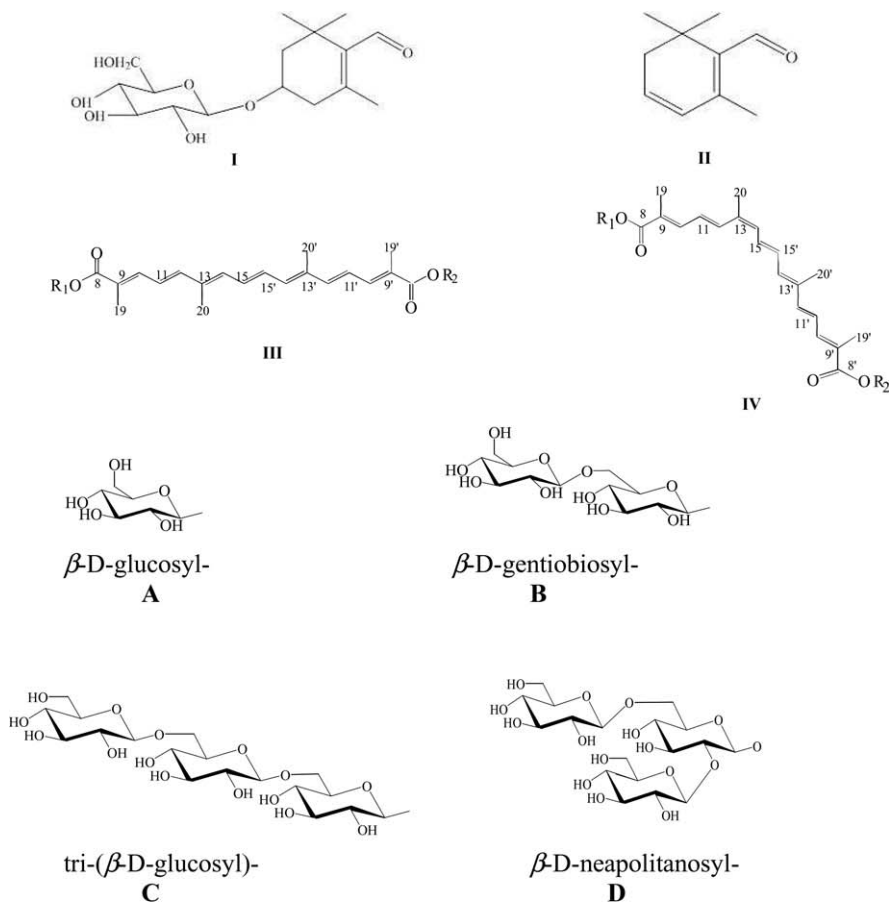
UV-Vis spectrometry has been applied to tentatively quantify quality characteristics for the commercial categories of saffron in filaments, cut filaments and powder form (Table 1).

Table 1 Saffron quality characteristics and specifications according to ISO 3632-1¹.

Quality characteristics	Specifications	
	Filaments and cut filaments	Powder
Moisture and volatile matter content,%, max	12	10
E1% 257nm on dry basis, min (due to the absorbance of picrocrocin)		
Category I	70	70
Category II	55	55
Category III	40	40
E1% 330 nm, on dry basis (due to the absorbance of safranal)		
Min	20	20
Max	50	50
E1% 440nm, on dry basis, min (due to the absorbance of crocins)		
Category I	200	200
Category II	170	170
Category III	120	120

These quality criteria are set for the three major attributes of saffron as spice, i.e. (a) the coloring strength due to the presence of a group of water soluble apocarotenoids, the crocins; (b) the aroma strength expressed as safranal and (c) the flavour strength expressed as picrocrocin. Expression of quantitative results is as E 1% at λ_{max} . Chemical structures of the major compounds responsible for the above-mentioned quality attributes are given in Fig. 1.

The major crocin is *trans*-4-GG, representing more than 60% of the total crocetin esters⁴. In the case of superior quality products, crocetin esters represent 20 - 37 % w/w of dry weight of saffron^{4,5}. Picrocrocin content^{4,6} (7 - 27 % w/w) together with that of total crocins normally account for 50% of saffron dry weight. It is evident that the product is quite rich in these secondary metabolites currently appreciated for their beneficial properties against Alzheimer and cardiovascular diseases⁷, gastric disorders, depression etc. A typical spectrum of an aqueous extract is given in Fig.2.



Moiety	Compound	Named as
$R_1 = R_2 = B$	Crocetin-di-(β -D-gentiobiosyl) ester (Crocetin 1)	<i>trans</i> or <i>cis</i> -4-GG
$R_1 = C, R_2 = B$	Crocetin-tri-(β -D-glucosyl)-(β -D-gentiobiosyl) ester	<i>trans</i> or <i>cis</i> -5-tG
$R_1 = D, R_2 = B$	Crocetin-(β -D-gentiobiosyl)-(β -D-neapolitanosyl) ester	<i>trans</i> or <i>cis</i> -5-nG
$R_1 = B, R_2 = A$	Crocetin-(β -D-gentiobiosyl)-(β -D-glucosyl) ester	<i>trans</i> or <i>cis</i> -3-Gg
$R_1 = R_2 = A$	Crocetin-di-(β -D-glucosyl) ester	<i>trans</i> or <i>cis</i> -2-gg
$R_1 = B, R_2 = H$	Crocetin-mono-(β -D-gentiobiosyl) ester	<i>trans</i> or <i>cis</i> -2-G
$R_1 = A, R_2 = H$	Crocetin-mono-(β -D-glucosyl) ester	<i>trans</i> or <i>cis</i> -1-g

Figure 1 Chemical structures of picrocrocin (I), safranal (II) and major esters of *trans*- (III) and *cis*-crocetin (IV) present in *C. sativus* polar extracts. Nomenclature is by Carmona et al.³

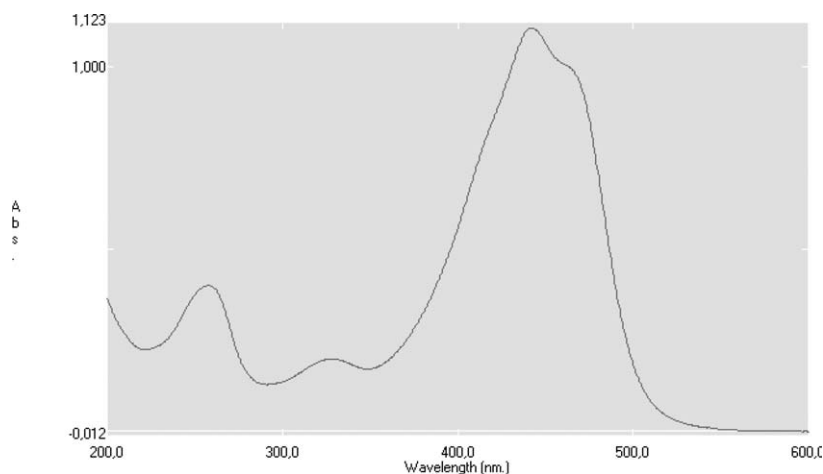
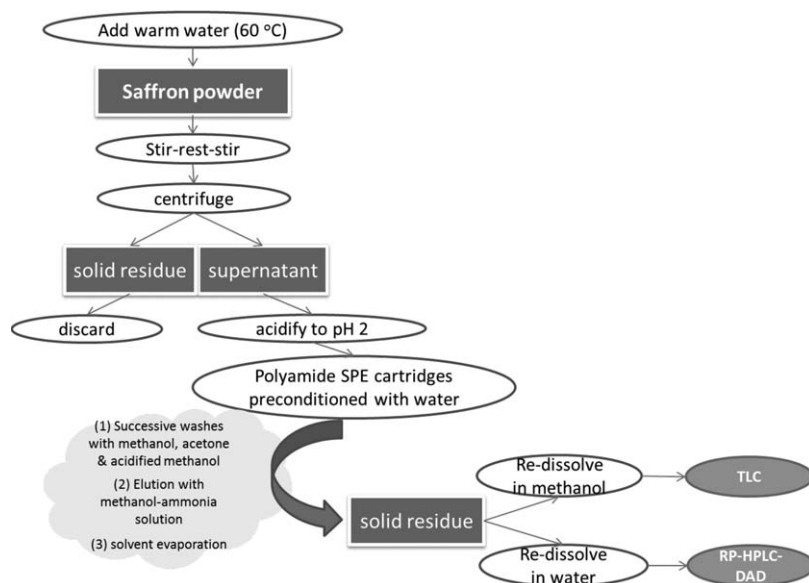


Figure 2 Typical UV-Vis spectrum of saffron aqueous extracts

Authenticity issues reported in the same trade standard are related with methods for ensuring the absence of artificial colorants (yellow and red synthetic acidic ones). These colorants are isolated after a well-defined protocol (Scheme 1) and are then characterized by TLC (screening) and RP-HPLC coupled with a diode array detector (DAD).



Scheme 1 Flow diagram of the sample pretreatment for the detection of artificial colorants in saffron, according to ISO 3632 specifications⁸

Adulterants like Sudan dyes, or other plant material such as gardenia, safflower and buddleja flowers are not considered in the trade standard. Origin issues are not addressed either in the

ISO 3632 specifications or in any national legislation. To this extent there is an obvious lack of support of PDO products by objective means.

Advances in knowledge on saffron composition along with new available analytical tools and global market trends have led a substantial body of international research to focus on the improvement of the ISO standard specifications and methods. For example, it is well documented by means of chromatographic analysis that absorbance values at 257 nm and 330 nm are not specific for picrocrocin and safranal, respectively^{3,9,10}. Alternative protocols for the spectrophotometric estimation of picrocrocin and safranal content have been recently proposed by Alonso and co-workers^{11,12} based on calculation of the ΔE_{pic} index or extraction with less polar solvents, respectively.

The ISO-proposed procedure for the extraction of saffron active metabolites seems to also attract the interest of researchers. Apart from solid-liquid extraction with different kinds of solvents¹³⁻¹⁵, nano-emulsions¹⁶ or molecularly imprinted polymer solid-phase extraction¹⁷ have been proposed the last years. In all cases, UV-Vis absorption values were monitored during optimization experiments.

Considering the detection of artificial colorants in saffron, the latest version of the ISO 3632-2 trade standard⁸ suggests an alternative sample pretreatment protocol in case “the HPLC chromatograms are unacceptably contaminated by peaks due to the natural pigments of saffron”. This protocol is actually a modification of that described few years earlier by Zalacain et al.¹⁸. The original procedure allows direct detection of the exogenous dyes by means of 2nd derivative UV-Vis spectra instead of applying the ISO TLC method. The method was found inappropriate for erythrosine and carminic acid due to low recoveries during sample pretreatment. To partially overcome the limitations of detecting pH-sensitive dyes such as erythrosine, Ordoudi and Tsimidou¹⁹ suggested that fluorescence properties of suspected saffron extracts could be investigated. On the basis of measurements at 532 nm excitation/548 nm emission wavelengths, traces of erythrosine in saffron (0.04 mg/Kg) were detected even in the presence of other synthetic dyes. It is worth noting that so far, applications of fluorescence spectroscopy to saffron analysis are extremely rare²⁰.

2.2. Infrared and Raman spectroscopy

Infrared and Raman spectroscopy are versatile, non-destructive analytical techniques that provide spectral fingerprints of many analytes. Both vibrational techniques are rapid, inexpensive and require minimal or no sample preparation²¹⁻²⁴. The available studies report their successful applications for characterization and verification of the quality and authenticity of saffron.

Over the last few decades, Fourier transform Infrared spectroscopy (FT-IR) has been used to characterize and assess quality of saffron. Tarantilis et al. reported the FT-IR spectra of crocetin esters (crocins) and their derivatives, di-methyl-crocetin (DMCRT) and crocetin (CRT),²⁵ where characteristic absorbance bands in the spectral regions from 1706 to 1664 cm^{-1} (C=O stretching vibrations) and from 1243 to 1228 cm^{-1} (C-O stretching vibrations) were observed. Several studies followed, examining quality parameters and authentication of saffron by means of Mid Infrared or Near Infrared spectroscopy. Fourier transform Mid Infrared spectroscopy (FT-MIR) in conjunction with multivariate analysis has been employed for the geographical determination of 250 saffron samples from four countries, i.e. Greece, Iran, Italy and Spain²⁶. FT-MIR spectra were recorded either in diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) mode for powdered saffron samples or in transmission mode, using ZnSe windows, with reference to non-polar (diethyl ether) saffron extracts. The latter proved more suitable for the geographical identification of the samples. In particular, the application of canonical discriminant analysis (DA) to the spectroscopic data of diethyl ether extracts in the region 2000-700 cm^{-1} resulted in 77.2% correct classification

of samples. The second derivative of the same spectral region provided even better results, as 93.6% of the samples were correctly classified. Additionally, the first two discriminant functions explained the 93.4% of the total variance, with function 1 differentiating Italian samples from all the others; function 2 accounted for the discrimination among the three remaining groups of samples. Italian samples were best characterized by the spectral region associated with the ester carbonyl group, at around 1746 cm^{-1} . This clearly appears because the Italian samples came from Sardinia, where stigmas are traditionally wetted with extra virgin olive oil and thus triglycerides occur in those samples. The process is known as “feidatura” and takes place before drying the stigmas in order to enhance their preservation and appearance. The spectral region assigned to C=C stretching at around 1600 cm^{-1} and the band at 1670 cm^{-1} that is attributed to the aldehyde carbonyl group of safranal were responsible for the differentiation among the samples from Greece, Iran and Spain.

FT-MIR proves to be an efficient technique for dealing with saffron fraud issues as revealed so far within the framework of Saffronomics (COST Action FA1101). Very recently, the application of FT-MIR combined with multivariate analysis was reported to be very useful for monitoring storage effects and detection of deterioration of saffron due to ageing²⁷. A total of 52 saffron samples were used, including both fresh and aged samples, split in reference and test sets. The spectra were recorded in transmission mode using KBr discs. Principal component analysis (PCA) was carried out by considering spectroscopic data of selected characteristic bands in the region $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, with the first two latent variables accounting for the 95% of the total variance (PC1 = 63% and PC2 = 32%). To investigate correlations among the data obtained by HPLC analysis and the PC score values, multiple linear regression (MLR) analysis was also performed, suggesting 35.7% and 52.3% of the variance in PC1 and PC2 values, respectively, due to the variance in the levels of all the major apocarotenoids occurring in saffron samples. Also, picrocrocin content represented 25.5% and 39.9% of the observed variance, respectively. The study concludes that the band at 1028 cm^{-1} , linked with the presence of glucose moieties, as well as the intensities in the region $1175\text{-}1157\text{ cm}^{-1}$, which relate to the breakage of glycosidic bonds, are characteristic for detecting deterioration of commercial saffron.

The potential of FT-NIR spectroscopy has been examined for the determination of chemical composition along with the geographical discrimination of 111 saffron samples originated in Greece, Iran and Spain²⁸. Near-infrared spectroscopic data were acquired in reflectance mode and principal component regression (PCR) was performed using reference data obtained by UV-Vis spectrophotometry and HPLC with diode array detection (HPLC-DAD). The results obtained by calibrating and validating the corresponding PCR models indicated the ability of FT-NIR combined with multivariate analysis to determine moisture and volatile content, coloring strength, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (250 nm) and $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (330 nm) as well as the content of the five main crocetin esters and picrocrocin. DA was carried out to separate the samples according to their origin, providing high percent recognition for each group; 100% for Iranian samples and approximately 95% for Greek and 88% for Spanish ones. Additionally, it was reported that Iranian samples were the most different, while Greek and Spanish samples appeared more similar. The first and the second discriminant functions explained 83.8% and 12.2% of the total variance, respectively. Fourier transform Raman (FT-Raman) spectroscopy has provided significant information for the characterization of saffron-related carotenoids over the past years. The FT-Raman analysis of crocetin esters, DMCRT and CRT has revealed two main peaks near 1540 and 1166 cm^{-1} assigned to C=C and C-C stretching modes, respectively²⁵. FT-Raman spectra are complementary to those obtained by FT-IR concerning the structural information provided for these compounds. FT-Raman has also been employed for the characterization of the *cis-trans* carotenoids contained in saffron²⁹. The spectra recorded for the major isomers isolated from saffron, all-*trans*- and 13-*cis*-Crocetin-di-(β -D-gentiobiosyl)

ester, presented substantial differences. A strong single peak at 1535 cm^{-1} is present for the all-*trans* isomer, whereas for the 13-*cis* isomer this peak shifts to 1547 cm^{-1} and another peak is observed at 1581 cm^{-1} . For the all-*trans* isomer a medium peak at 1165 cm^{-1} and a weak peak at 1209 cm^{-1} are also observed, while for the 13-*cis* isomer there is another characteristic peak at 1138 cm^{-1} and the intensity of the peak at 1166 cm^{-1} is decreased. A more recent study involved dispersive Raman spectroscopy coupled with multivariate regression for the determination of crocetin esters content and coloring strength of saffron³⁰. In this quantitative approach, Raman spectra of 114 ground saffron samples from four different countries (i.e. Greece, Iran, Italy and Spain) were used. Calibration and validation sample sets were extracted and calibration models using partial least squares (PLS) regression were developed for determining both parameters, in the spectral region $1700\text{-}955\text{ cm}^{-1}$. The number of PLS factors used for the quantification of crocetin esters was six (accounting for 98% of the model variability), while four factors were used for the coloring strength (accounting for 96% of the model variability). PLS models were validated using leave one out cross validation procedure ($r = 0.97$, RMSECV = 1.09 for crocetin esters and $r = 0.93$, RMSECV = 14.5 for coloring strength). Both models allowed accurate predictions, compared with HPLC-DAD and UV-Vis reference data, indicating that the suggested approach can be used for rapid screening of saffron quality.

2.3. NMR spectroscopy

NMR spectroscopy is a well-known spectroscopic technique largely employed because of its intrinsic structural characterization properties. Beyond this feature, the possibility to detect several classes of chemical compounds within a single experiment, without the need of any chemical sample derivatization encodes additional advantages to NMR spectroscopy thus encouraging the application in food analysis. The amount of data obtained from the NMR spectra could be easily handled by the multivariate statistical approaches, broadly appeared in the last years, allowing clustering of samples according to several aims. As already pointed out, a part from the chemical characterization of the chemical components, other information about origin, ageing and unwanted components are strongly required in order to increase the quality requirements of foods.

The first NMR data about a group of constituents of saffron, was reported by Wittwer³¹ in late 1975 on isolated glycosyl esters of crocetin from saffron. The evidence of a geometrical isomer of crocin was reported by Speranza³², highlighting the spectroscopic characterization of 13-*cis* crocins together with the most abundant all *trans*-crocins in a Greek saffron sample. In this work, crocins were previously isolated by HPLC and further structurally characterized by NMR, thus confirming the hypothesized structure. These isomers were successively characterized by means of other spectroscopic techniques like UV-Vis and FT Raman³³. Pfister and co-workers³⁴ elucidated the structure of two new glycosyl esters of crocetin in both *Crocus sativus* L. and *Gardenia jasminoides* Ellis, being crocetin (β -gentiobiosyl)(β -neapolitanosyl) and crocetin di(β -neapolitanosyl) ester. The structural characterization of crocetin glycosides was always the main aim of other studies. Van Calsteren³⁵ investigated the HPLC extracted and purified crocetin derivatives from *Gardenia jasminoides* and *Crocus sativus* by UV-Vis and NMR spectroscopies. In this work the authors confirmed the structural characterization of different carotenoids, in particular extracts dissolved in both DMSO and methanol/benzene mixture, four glycosides were characterized for gardenia: a) all-*trans*-crocetin di(β -*D*-gentiobiosyl) ester b) all-*trans*-crocetin β -*D*-gentiobiosyl- β -*D*-glucosyl ester c) all-*trans*-crocetin mono(β -*D*-gentiobiosyl) ester and d) 13-*cis*-crocetin β -*D*-gentiobiosyl- β -*D*-glucosyl ester. Additionally, six glycosides were characterized for saffron: a) all-*trans*-crocetin di(β -*D*-gentiobiosyl) ester b) all-*trans*-crocetin (β -*D*-gentiobiosyl- β -*D*-glucosyl ester c) all-*trans*-crocetin di(β -*D*-glucosyl) ester d) all-*trans*-crocetin mono(β -*D*-

gentiobiosyl) ester e) 13-*cis*-crocetin di(β -*D*-gentiobiosyl) ester f) 13-*cis*-crocetin β -*D*-gentiobiosyl- β -*D*-glucosyl ester. All these derivatives were also supported by mass spectrometry analysis.

Interestingly, crocetin and corresponding glycosyl esters were isolated from a wild *Crocus* species, *Crocus haussknechtii* Boiss, and investigated by different techniques, including NMR³⁶. It was found a similar carotenoid composition with *C. sativus*, thus suggesting this species as a potential source of saffron.

During these last years, the chemical analysis of mixtures in food extracts moved towards metabolomics rather than a classical approach based on chemical isolation followed by structure elucidation.

This choice relies on the easier sample preparation, and especially on the possibility to detect several classes of chemical compounds in their original ratio simultaneously. In this direction, appeared quite recently the NMR works of Yilmaz^{37,38}, based on the metabolic fingerprinting of saffron extracts with the aim to distinguish among authentic Iranian saffron and commercial samples obtained from retail stores in Denmark, Sweden and Turkey.

The reported data suggested the possibility to obtain the desired discrimination by PCA and Parallel Factor analysis by using mono and two dimensional NMR data respectively. Unfortunately the authors did not report a detailed metabolite content, like different crocetin esters, and only partial resonance assignment was performed. Analysis of NMR spectra for different groups of samples revealed the presence of food additive (E1518) in one group, while in other groups the presence of bio-adulterants, like *C. sativus* stigmata, *Curcuma longa* and *Carthamus tinctorius* flowers were detected.

Within the frame of SaffronOMICS COST Action FA1101, our group started an NMR based metabolic profiling study of saffron with different aims. We have analyzed saffron extracts in different solvents and from different origins in order to put light in the quality determination of this valuable food product. Here we present the preliminary study performed in water extracts of Italian PDO saffron samples, with the aim of metabolite characterization. Additionally, commercial saffron bought in Italian markets and samples bought in other countries were analysed by comparison.

3 METHODS AND RESULTS

3.1 NMR analysis

A total number of 20 saffron samples were investigated by ¹H NMR: 8 Italian PDO, 4 from other countries (1 from Thailand, 1 from Morocco, 1 from Turkey and 1 from India) and 8 commercial saffron bought in Italy. Concerning the Italian PDO samples, all harvested in 2005, 3 were from Consortium of L'Aquila, 1 from S. Gimignano, 3 from Sardinia and 1 was from Florentine hills (producers refused the obtained registration as PDO product). Samples from other countries were bought in 2006 in local markets while the 8 Italian commercial saffron samples were directly bought in stores in 2006 and had no indication of origin or harvesting year on the label. All samples were stored in the same conditions (in dark at room temperature) up to the spectral data acquisition. Two replicates were taken for each sample, prepared in double after sample homogenization to reduce sample variability and check the NMR measurement reproducibility. About 8 mg of saffron were dissolved in 600 μ L of deuterated water. Samples were then centrifuged at 12100 rcf for 10 minutes and 500 μ L of the supernatant was used for the NMR analysis. All ¹H-NMR spectra have been recorded on a Bruker DMX 500 spectrometer (Bruker Biospin GmbH Rheinstetten, Karlsruhe, Germany) operating at 11.7 T and equipped with a 5-mm reverse probe with z-gradient. Spectra were recorded at 300 K, with a spectral width of 7500 Hz and 32K data points. Solvent suppression was achieved by applying a presaturation scheme with low power radiofrequency irradiation

for 1.2 s. Spectra were Fourier transformed without any resolution enhancement function and manually corrected for phase and baseline with ACD/Spec Manager (ACD Labs, version 11, Toronto, Canada) software. Spectra in water solution were referenced to trimethylsilyl (2,2,3,3- $^2\text{H}_4$) propionate (TSP) external standard. Good spectra alignment for bucket integration was obtained using the α -glucose signal at 5.23 ppm. Spectra were reduced to integrated regions (buckets) of 0.04 ppm width by an intelligent bucketing procedure, covering the spectral region between 11.26 and 0.50 ppm, followed by manual correction of buckets for shifted signals. Complete spectrum area was used for calibration after exclusion of residual water region between 4.61 and 5.03 ppm. NMR data were imported into SIMCA-P+ 12 (Umetrics, Umea, Sweden) for Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis (OPLS-DA) using "pareto" as data pretreatment. All models were cross validated.

^1H NMR spectrum of PDO saffron in water solution, showed the dominant resonances of the largely abundant components content: at low field the singlet of the aldehydic proton of 2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde moiety at 9.98 ppm, typically observed for picrocrocin and the group of broad signals between 6 and 7.4 ppm relative to double bonds of crocetin glycosides, these latter scarcely dissolved in this solvent. At high field the ^1H spectrum is dominated by the very intense methyls of picrocrocin at 1.21, 1.23 and 2.15 ppm; other signals of picrocrocin were occurring at 1.59, 1.87, 2.37, 2.75, and 4.20 ppm as confirmed by TOCSY and HSQC experiments. Glycosidic moieties could be identified in the anomeric region of ^1H NMR spectra, indicating the presence of both glucosyl and gentiobiosyl esters of crocetin, overlapped in a broad signal at 5.64 ppm, free α and β -glucose at 5.23 and 4.64 ppm respectively while at 4.62 ppm glucosyl of picrocrocin. These assignments were confirmed by comparison with HSQC saffron spectrum and those of reference substances. Samples bought in Thailand, Turkey, India and Morocco resulted depleted of picrocrocin content. In particular, those from India and Morocco present a specific spin system, consisting of signals at 1.14, 3.63 and 3.72 ppm. This unknown compound is largely present in these samples and further investigations are in progress.

The integrated buckets of all spectra constituted the data matrix for multivariate statistical analysis. Initially, PCA was performed by considering all saffron samples: by scoring the first two PC's, a clear differentiation was achieved. All Italian PDO and commercial saffron bought in Italy grouped on the right side of the score plot. Conversely, samples of other countries resulted in the opposite direction and in particular saffron samples from India and Morocco clustered on the top while samples from Turkey and Thailand on the bottom. The corresponding loading plot highlighted sugars (buckets at 3.80, 3.69, 3.74 and 3.97 ppm) and unknown compounds (buckets at 1.11 and 1.90 ppm) as the characteristic metabolites for these latter samples: conversely, all PDO and commercial samples bought in Italy resulted strongly characterized by buckets at 1.17, 1.84, 2.10, 3.36 and 3.44 ppm corresponding to picrocrocin.

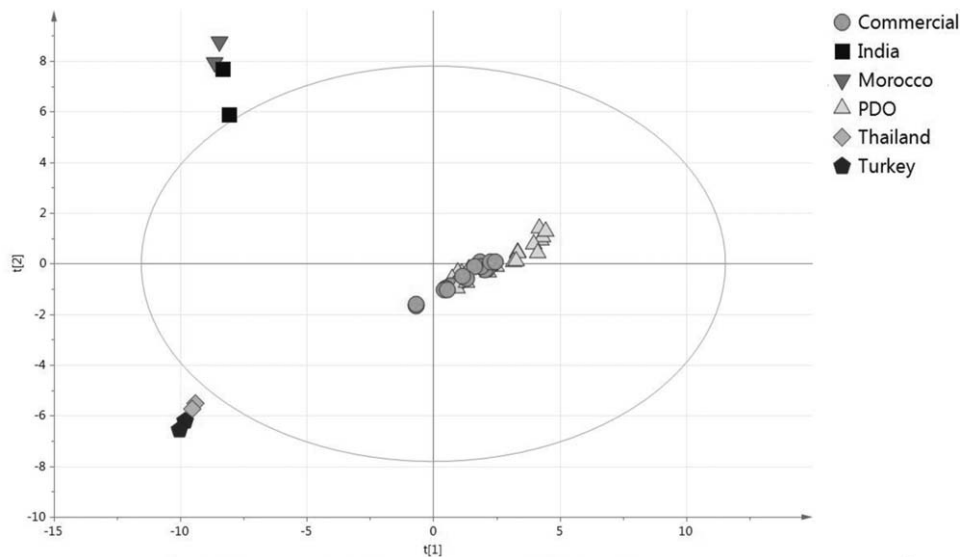


Figure 3 PCA score plot representing the first two PC's of all saffron samples ($R^2=90.7\%$ with $Q^2=77.4\%$)

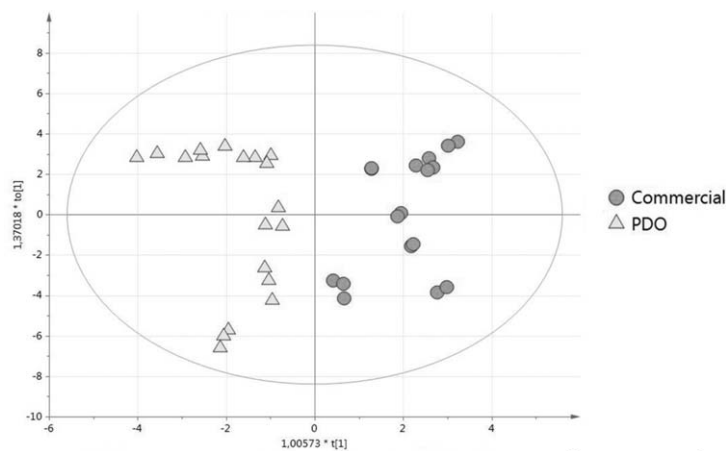


Figure 4 OPLS-DA score plot of commercial and PDO samples ($R^2X=75.4\%$, $R^2Y=82.2\%$, $Q^2=62.1\%$)

After this explorative PCA was performed with all samples, a two-class OPLS-DA was implemented by considering PDO and commercial saffron bought in Italy, to highlight compositional differences between them. From the score plot represented in Fig. 4, a clear differentiation was achieved. The analysis of the S-plot, highlighted NMR signals responsible for the separation between the two groups of samples; in particular picrocrocin resulted the characteristic compound for the PDO samples (buckets at 1.17, 1.84, 2.10 and 9.95 ppm), indicating the high quality of these products.

4 CONCLUSIONS

Saffron is a very valuable spice and for this reason it is exposed to large quality manipulation, including plant, colorant and chemical additions. As pointed out previously, ISO regulations do not address origin issues and this is no longer acceptable, especially in the view of PDO products and open trade markets, that strongly require analytically supported origin declarations. Moreover, plant tissues containing apocarotenoids, like *Gardenia jasminoides* Ellis, could impair the spectrophotometric quantifications. In order to compensate this evident limitation, advanced spectroscopic techniques such as the abovementioned ones need to be applied since they have already been recognized as objective analytical tools able to detect frauds, verify authenticity and even establish origin of PDO products.

References

- 1 International Organization for Standardization. Saffron (*Crocus sativus* L.) specifications. Geneva (Switzerland): ISO 2011, ISO/TS 3632-1.
- 2 S. A. Ordoudi and M. Z. Tsimidou, *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*, R. Dris, S. M. Jain, (Eds.), Kluwer Academic Publ. Dordrecht, Netherlands 2004, 209-260.
- 3 M. Carmona, A. Zalacain, A. M. Sánchez, J. L. Novella and G. L. Alonso, *J. Agric. Food Chem.*, 2006a, **54**, 973.
- 4 A. M. Sánchez, M. Carmona, M. Prodanov and G. L. Alonso, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 7293.
- 5 M. Lage and C. L. Cantrell, *Scientia Horticulturae*, 2009, **121**, 366.
- 6 C. P. Del Campo, M. Carmona, L. Maggi, C. D. Kanakis, E. G. Anastasaki, P. A. Tarantilis and G. L. Alonso, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 1305.
- 7 S. H. Alavizadeh and H. Hosseinzadeh, *Food Chem. Toxicol.* 2014, **64**, 65.
- 8 International Organization for Standardization, Saffron (*Crocus sativus* Linnaeus) Test methods. Geneva (Switzerland): ISO 2010, ISO/TS 3632-2.
- 9 A. M. Sánchez, M. Carmona, M. Prodanov and G. L. Alonso, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 7293.
- 10 P. A. Tarantilis, G. Tsoupras and M. G. Polissiou, *J. Chromatogr. A*, 1995, **699**, 107.
- 11 C. P. Del Campo, M. Carmona, L. Maggi, C. D. Kanakis, E. G. Anastasaki, P. A. Tarantilis, M. G. Polissiou and G. L. Alonso, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 1305.
- 12 L. Maggi, A. M. Sánchez, M. Carmona, C. D. Kanakis, E. Anastasaki, P. A. Tarantilis, M. G. Polissiou and G. L. Alonso, *Food Chem.*, 2011, **127**, 369.
- 13 A. M. Sani and S. Mohseni, *Nutr. Food Sci.*, 2014, **44**, 2.
- 14 A. Kyriakoudi, A. Chrysanthou, F. Mantzouridou and M. Z. Tsimidou, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **755**, 77.
- 15 O. Orfanou and M. Z. Tsimidou, *Food Chem.* 1996, **57**, 463.
- 16 B. Mokhtari and K. Pourabdollah, *Indian J. Chem. Techn.*, 2013, **20**, 222.
- 17 S. A. Mohajeri, H. Hosseinzadeh, F. Keyhanfar and J. Aghamohammadian, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 2302.
- 18 A. Zalacain, S. A. Ordoudi, I. Blázquez, E. M. Díaz-Plaza, M. Carmona, M. Z. Tsimidou and G. L. Alonso, *Food Addit. Contam.*, 2005, **22**, 607.
- 19 S. A. Ordoudi and M. Z. Tsimidou, *Food Addit. Contam. Part A*, 2011, **28**, 417.
- 20 V. Vickackaite, A. Romani, D. Pannacci and G. Favaro, *Int. J. Photoen.* 2004, **6**, 175.
- 21 G. Downey, *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 1998, **17**, 418.
- 22 L. M. Reid, C. P. O'Donnell and G. Downey, *Trends Food Sci. Tech.*, 2006, **17**, 344.
- 23 D. I. Ellis, V. L. Brewster, W. B. Dunn, J. W. Allwood, A. P. Golovanov and R. Goodacre, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 5706.

- 24 D. Cozzolino, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2012, **47**, 518.
- 25 P. A. Tarantilis, A. Beljebbar, M. Manfait and M. G. Polissiou, *Spectrochim. Acta A*, 1998, **54**, 651.
- 26 E. Anastasaki, C. Kanakis, C. Pappas, L. Maggi, C. P. del Campo, M. Carmona, G. L. Alonso and M. G. Polissiou, *Eur. Food Res. Technol.*, 2010, **230**, 571.
- 27 S. A. Ordoudi, M. De Los Mozos Pascual and M. Z. Tsimidou, *Food Chem.*, 2014, **150**, 414.
- 28 A. Zalacain, S. A. Ordoudi, E. M. Díaz-Plaza, M. Carmona, I. Blázquez, M. Z. Tsimidou and G. L. Alonso, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 9337.
- 29 M. K. Assimiadis, P. A. Tarantilis and M. G. Polissiou, *Appl. Spectrosc.*, 1998, **52**, 519.
- 30 E. G. Anastasaki, C. D. Kanakis, C. Pappas, L. Maggi, A. Zalacain, M. Carmona, G. L. Alonso and M. G. Polissiou, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 6011.
- 31 F. Wittwer and H. Pfander, *Helv. Chim Acta*, 1975, **58**, 1608.
- 32 G. Speranza and G. Dadà, *Gazzetta Chimica Italiana*, 1984, **114**, 189.
- 33 M. K. Assimiadis, P. A. Tarantilis and M. G. Polissiou, *Spectros. Biol. Mol.: Modern Trends*, 1997, 495.
- 34 S. Pfister, P. Meyer, A. Steck and H. Pfander, *J. Agric. Food Chem.* 1996, **44**, 2612.
- 35 M. R. Van Calsteren, M. C. Bissonnette, F. Cormier, C. Dufresne, T. Ichi, J. C. Y. Le Blanc, D. Perreault and I. Roewer, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 1055.
- 36 T. Radjabian, A. Saboora, H. Naderimanesh and H. Ebrahimzadeh, *J. Food Sci, Technol.- Mysore*, 2001, **38**, 324.
- 37 A. Yilmaz, N. T. Nyberg, P. Molgasrd, J. Asili and J. W. Jaroszewski, *Metabol.*, 2010, **6**, 511.
- 38 A. Yilmaz, N. T. Nyberg and J. W. Jaroszewski, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 8278.

Authenticity of Food

R Consonni, Institute for Macromolecular Studies (ISMAC), Milan, Italy

K Astraka, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

LR Cagliani, Institute for Macromolecular Studies (ISMAC), Milan, Italy

N Nenadis, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

E Petrakis and M Polissiou, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	LTQ-Orbitrap	Linear trap quadrupole-Orbitrap mass spectrometer
ATR	Attenuated total reflectance	LTQ-TOF	Linear trap quadrupole-time of flight mass spectrometer
CE	Capillary electrophoresis	MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
COI	Cytochrome- <i>c</i> oxidase subunit I	MAS	Magic angle spinning
CP-MAS	Cross polarization-magic angle spinning	MIR	Mid-infrared
DART	Direct analysis in real time	MRM	Multiple reaction monitoring
DESI	Desorption electrospray ionization	MS	Mass spectrometry
DRIFTS	Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy	MS ³	Triple-stage mass spectrometry
EASI	Easy ambient sonic-spray ionization	MS ⁿ	Multistage mass spectrometry
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	MSI	Multispectral imaging
ESI	Electrospray ionization	MS/MS	Tandem mass spectrometry
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer	NIR	Near-infrared
FT-MIR	Fourier transform mid-infrared	NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
FWHM	Full width at half maximum	NMRI	Nuclear magnetic resonance imaging
GC	Gas chromatography	PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
HCA	Hierarchical cluster analysis	PCA	Principal component analysis
HPLC	High-performance liquid chromatography	PCR	Polymerase chain reaction
HR	High resolution	PCR-RFLP	Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism
HRM	High-resolution melting	PTR-MS	Proton transfer reaction-mass spectrometry
HR-MAS	High-resolution magic angle spinning	Q-Orbitrap	Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer
HRMS	High-resolution mass spectrometer	QqLIT	Quadrupole linear ion trap
HSI	Hyperspectral imaging	QqQ	Triple quadrupole
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry	QqTOF	Quadrupole time-of-flight mass spectrometer
IR	Infrared	SERRS	Surface-enhanced resonance Raman scattering
IRMS	Isotope-ratio mass spectrometry	SERS	Surface-enhanced Raman scattering
IT	Ion trap	SNIF	Site-specific natural isotope
LC	Liquid chromatography	SRM	Selected reaction monitoring
LDA	Linear discriminant analysis	TOF-MS	Time-of-flight mass spectrometer
LF	Low field	TRS	Transmission Raman spectroscopy
LOD	Limit of detection	Vis	Visible
LOQ	Limit of quantification		
LTQ-FT-ICR	Linear trap quadrupole-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer		

Introduction

Food authenticity is of great importance for consumers, food authorities, and food industry because incorrect labeling of foods could be related to various types of fraudulent practices. Diseases related to foodstuff consumption raised the awareness

around aspects like geographic origin and agricultural practices. Food authentication became an important issue and has been faced with different analytical approaches like DNA-based technologies, infrared spectroscopy, isotope analysis, separation techniques, mass spectrometry, and NMR. Several 'omics' definitions appeared for the holistic understanding of

different molecular aspects like function, physiology, and pathophysiology of plants and mammals. One above all, namely, 'metabolomics' offers information on the global metabolite composition (metabolome) of a given biological system and its dynamic response towards stimuli. Most suited analytical techniques appears to be NMR, mass, and hyphenated chromatographic techniques (LC-MS, GC-MS, LC-DAD-NMR/MS, etc.), and the high-throughput qualitative screening of a biological sample is defined with the widely accepted term 'metabolic profiling.' The large amount of data obtained by these analytical techniques requires the use of multivariate statistical analysis for sample comparison and discrimination analysis. In this article, selected applications in food authenticity assessment are presented.

Mass Spectrometry

Mass spectrometry (MS) holds a central position in food analysis, and its applications expand in food authenticity-related studies (i.e., traceability or determination of geographic origin and adulteration). MS methods currently yield higher sensitivity when compared to other spectroscopic techniques such as NMR, which normally detects medium- to high-abundance metabolites. MS-based analysis may be targeted or nontargeted. Targeted analysis is a conventional analysis where the method is developed based on standards. Nontargeted analysis theoretically allows the detection and characterization of any compound present in the sample. Two different analytical approaches are followed in nontargeted analysis:

- 'Metabolic profiling' refers to the analysis of a class of chemically related compounds or is associated with a particular metabolic pathway.
- 'Metabolic fingerprinting' refers to the analysis of the total set of metabolites, avoiding focus against certain classes of compounds. When individual metabolites are not identified, 'metabolite fingerprinting' is used for a rapid classification of samples.

In targeted analysis or in metabolic profiling study, selective extractions are needed, and usually, mass spectrometry is coupled to a separation technique such as LC for semipolar compounds; GC for thermally stable, volatile, and semivolatile compounds; or CE for ionic, weakly ionic, and polar metabolites. Data from MS coupled to a separation technique contain the extra information of retention/migration time. MS/MS has been the cornerstone technique for targeted analysis. Several publications on the applications of MS/MS in the detection of contaminants for food quality and safety purposes are present. The QqQ and the IT mass spectrometers give nominal masses and perform MS/MS. The QqQ-MS/MS is one of the most popular instruments for the analysis of complex food samples because of its high sensitivity, selectivity, and specificity for identification and for its quantitation capabilities when operated in MRM mode. The use of new-generation fast-switching QqQ and the hybrid fast-switching QqLIT mass spectrometers significantly enlarges the number of analytes that can be detected in a single MS/MS run up to 200 compounds with 2 SRM transitions. In addition, the IT can be operated in enhanced product ion mode and can perform MS³ for the

characterization of unknowns. To this direction, UPLC-Q-LIT-MS was applied for nontargeted screening and structure identification of the banned azo dye Allura Red AC and its photodegradation products in a beverage. Initially, a nontargeted screening with enhanced MS (EMS) in full scan mode was carried out as a survey scan. When the signal of a detected compound exceeded a defined threshold, the acquisition of both enhanced resolution (ER) and enhanced product ion spectrum (EPI) was automatically activated. In EMS mode, the third quadrupole works as an ion trap, accumulating the ions of interest, while in the ER mode, the isotope ratio is confirmed, and in the EPI mode, the ion trap is used to provide higher abundance of product ions through an enhanced MS/MS scan. The chemical structures of the unknown species formed in the photodegradation process were proposed on the basis of the molecular mass.

HRMSs operating in full scan mode like TOF-MS, Orbitrap-MS, and FT-ICR-MS provide high selectivity and sensitivity and through accurate mass measurements can provide possible identification of unknown compounds and are therefore suitable for nontargeted analysis. High-speed GC-TOF-MS was applied in nontargeted analysis and in particular the fingerprinting of volatile compounds. More than 100 compounds could be identified in coffee in only 7.9 min, and through PCA statistical evaluation, the geographic origin of samples could be determined. Identification was performed by the comparison between experimental and reference/library mass spectra and the comparison between experimental and literature retention indexes. Recently introduced hybrid mass spectrometers such as QqTOF, Q-Orbitrap, and TOF-TOF combine the features of tandem mass spectrometry and accurate mass measurement of fragment ions as an additional tool for confirmation. Additionally, with the hybrids LTQ-TOF, LTQ-Orbitrap, and LTQ-FT-ICR mass spectrometers, multistage MSⁿ can be used for structural elucidation. LTQ-Orbitrap was applied for the determination of the polyphenolic profiles of unifloral honeys where a total of 43 compounds were detected in less than 5 min and samples were classified according to their botanical origin. Although the chromatographic profiles obtained were similar for all samples, there was a significant difference in the content of some polyphenolic compounds. Floral markers were suggested and honeys derived from perennial plants and from annual plants could be discriminated. Some phenolics were identified and quantified using the available standards, while in the absence of standards, the identification of the corresponding compounds was based on the search for the [M-H]⁻ deprotonated molecule together with the interpretation of its fragmentations with the help of an Internet database of accurate mass spectrometry data as a reference library. The identification of four different phenolics with almost identical masses was able through the high-sensitivity accurate mass scan. This example points out the main advantages of hybrid mass spectrometry compared to triple quadrupole MS to the screening and identification of unknown compounds, the possibility of using exact mass to calculate the most favorable elemental composition, and the determination of the accurate mass of the product ions in the MSⁿ data-dependent scan. When the objective is metabolic fingerprinting, the extraction protocol should be nonselective or direct analysis without sample preparation should be followed through direct infusion or measurements on the surface of samples. To this direction, ambient

ionization MS techniques, such as DART, DESI, EASI, and PTR-MS, broke through in the past few years, apart from ESI and APCI sources commonly used with LC and GC, and their applications in foodomics are still being explored. DART-TOF-MS was successfully applied to recognize the origin of beers without any sample preparation and no prior separation procedures. By the same technique, the different olive oil categories could be differentiated, and in addition, olive oil adulteration with hazelnut oil could be revealed. The polar and triacylglycerol profiles were acquired, and additions of 6% and 15% (v/v) hazelnut oil could be detected, respectively. EASI was used to estimate the quality of nut oils through their triacylglycerol profiles. The method allowed the identification of authentic oils and adulterated oils with 5% soybean oil in a few minutes and without sample preparation. PTR-MS allows monitoring of volatile organic compounds (VOCs) through the soft chemical ionization technique used and, although a rather new technique, its capabilities in the field of geographic origin have already been explored in wine, truffles, and Grana cheese. When applied in olive oils, the country of origin could be by 86% classified correctly, 74% of samples were successfully classified according to region of origin, and the district of origin yielded a success rate of only 52%. MALDI-TOF-MS is a widely used technique for the analysis of protein and peptide biomarkers (proteomics) primarily separated through electrophoresis but has become a popular method for direct analysis applied to small molecules. MALDI-TOF-MS has been used to detect adulteration in bovine milk powder with 10% (m m^{-1}) of non-milk fats and oils through their triacylglycerol profiles and also to determine both qualitatively and quantitatively melamine and its derivatives. Melamine could be determined with an LOQ down to $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ and with the limited dried-droplet sample preparation. Significant limitations of direct MS analysis is the ionization suppression and its effect on sensitivity caused by the presence of multiple chemical species and other matrix components that have considerable impact on the ionization of metabolites and also the overlapping of MS signals of isobaric molecules such as structural isomers or enantiomers.

Finally, ICP-MS can also be used to perform food authentication through the elemental composition of food. The fact that isotopic composition of the constituents of agricultural products depends on geographic origin and on production-related factors has made IRMS another promising approach used for assessing traceability. Both techniques have been successfully applied to wines to examine the influences of geographic origin, year of vintage, grape cultivar, and meteorologic conditions.

In any case, the amount of data provided mainly from fingerprinting strategies is of great complexity, and the use of specific software for data treatment is of utmost importance. Usual data-processing steps involve peak detection, integration, data alignment, and normalization before scaling and multivariate statistical analysis.

NMR Spectroscopy

Nuclear magnetic resonance (NMR) is a spectroscopic technique that allows the analysis of samples in all physical states, providing detailed information at molecular level. A single

experiment led to analyze several classes of chemical compounds in a noninvasive, highly reproducible way and in a pretty low experimental time. Materials, like foods as well, could be in different aggregation states: crystalline, amorphous, liquid-like, or liquid. Depending on these states, different NMR techniques could be applied, starting from solid-state NMR, going through NMR imaging, and finishing with liquid state. Technology allowed a big drop in the field strength of the magnets: the field strength could vary from very few fraction of tesla up to latest 1.2 gT. Different NMR techniques and instrument requirements result in different data: high resolution (HR), low resolution or low field (LF), high-resolution magic angle spinning (HR-MAS), imaging (NMRI), and site-specific natural isotope fractionation (SNIF) NMR. HR allows both qualitative and quantitative analyses of samples as well as molecular structure determinations in solution; data obtained from complex matrices like foods enable great potentiality in food metabolomics as a tool for monitoring product quality and authenticity. Several studies that appeared in the literature have focused on the combined use of NMR spectroscopy and chemometrics, dealing with geographic origin or quality determination of foodstuffs, olive oil and wine being the major targets. From the NMR point of view, the ^1H NMR spectrum of olive oil is dominated by fatty acid signals. For a deeper evaluation of the minor components, such as aldehydes, terpenes, and sterols, accurate spectra recording conditions need to be applied. The first article concerning the geographic characterization of extra-virgin olive oil (EVOO) samples investigated different olive varieties coming from four Italian regions. PCA and HCA performed on selected ^1H NMR resonances due to minor components such as sterols, *n*-alkanals, *trans*-2-alkanals, and other compounds led to a very good sample classification according to the origin. Many other studies followed investigating virgin or extra-virgin olive oils of different harvests and cultivars, from different Mediterranean areas, obtaining a good discrimination by applying different statistical protocols on ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR, and/or isotopic ratios from ^{13}C and ^2H data. The high prices of EVOOs led to adulteration practices with cheaper oils. In this context, a methodology to detect the presence of a percentage of at least 10% of sunflower and red palm oils in EVOOs was proposed, by employing a low-field (0.25 T) unilateral NMR method, performing a non-destructive analysis through sealed bottles. Many other studies focused on the chemometric analysis of NMR metabolite fingerprinting data of wine to investigate provenance, vintage, aging, or grape cultivar. NMR spectroscopy has been employed to analyze other food matrices to assess authenticity, quality, and geographic origin, to detect adulteration, and to assess safety, among them being beer, fruit juice, balsamic and traditional balsamic vinegar of Modena, tea, dairy products, meat, fish, cereals, vegetables, tomato paste, honey, and coffee (Figures 1 and 2). The role of HR NMR in liquid state applied to food chemistry is growing progressively during these last years even though, as far as we know, NMR has never been accomplished as an official analytical methodology, with the only exception of olive oil quality determination for Lazio region in Italy, obtained with a regional law in late 2001.

NMRI is mainly applied to investigate texture or fluid motions/distribution in foods. The relatively low spectral resolution attainable from these studies is largely compensated by

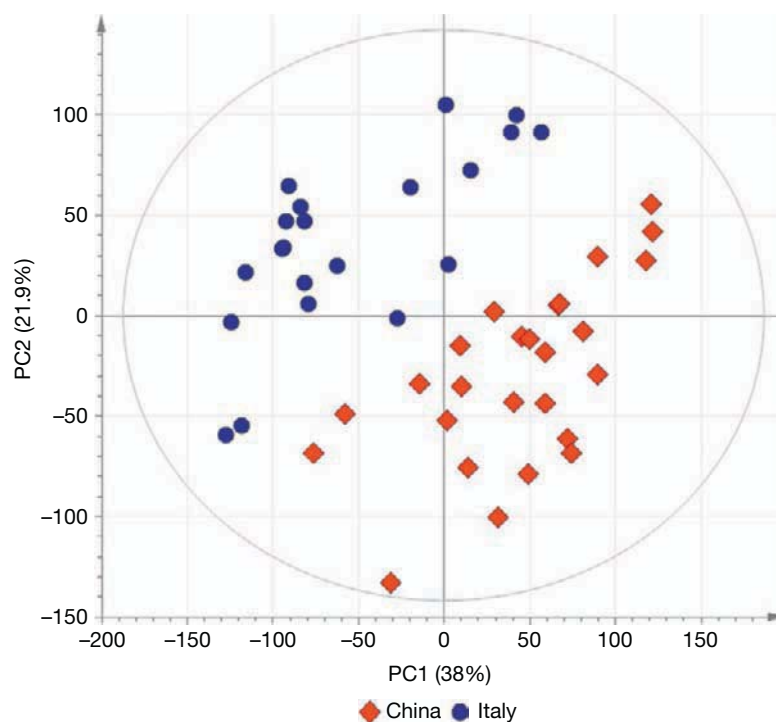


Figure 1 Geographic discrimination between 21 Italian (blue dots) and 26 Chinese (red diamonds) triple-concentrated tomato paste samples by performing PCA analysis on ^1H NMR data. Reproduced from Consonni, R. and Cagliani, L. R. (2010). Nuclear Magnetic Resonance and chemometrics to assess geographical origin and quality of traditional food products. *Advances in Food & Nutrition Research* **59**, 87–165.

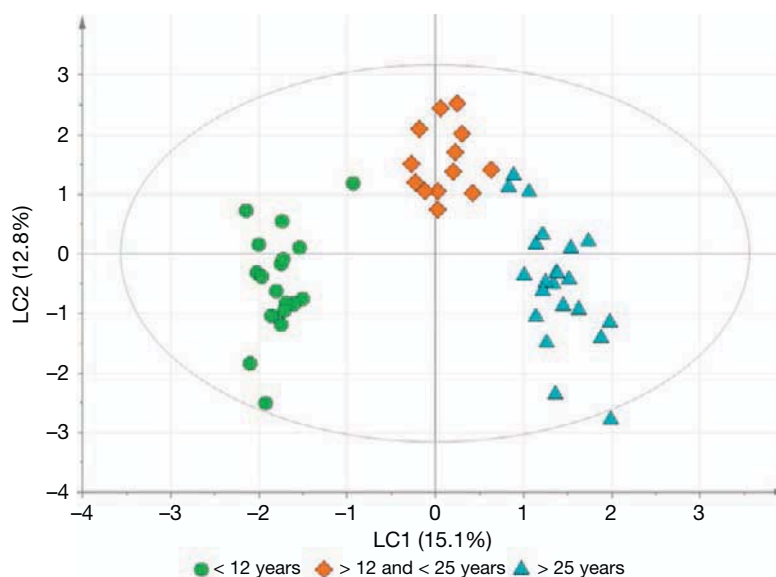


Figure 2 Score plot of hierarchical PLS-DA analysis performed on ^1H NMR data of 53 balsamic and traditional balsamic vinegar of Modena: 18 balsamic (green dots), 13 traditional <12 and >25 years (orange diamonds) and 22 traditional >25 years (blue triangles).

3-D images acquired on the basis of relaxation parameters or chemical shift selective values. Water/oil distribution investigations can be easily performed by NMRI, thus allowing maturation studies as well as microstructural studies and compounds/water distribution in intact foods. In the last years, solid-state NMR became a routine spectroscopy in food science, overcoming several technical aspects present in the

early stage of this spectroscopy, going through magic angle spinning (MAS), ^{13}C cross polarization (CP-MAS), and ^1H high-resolution magic angle spinning (HR-MAS). This NMR spectroscopy was formerly applied to synthetic polymers, in the solid state, to approach crystalline organization. Flour and polysaccharides polymorphisms were first investigated in food analysis, but then, other solid foods were investigated as well.

The last mention is for SNIF-NMR, a relatively old technique, firstly introduced by Prof. G.J. Marten at the University of Nantes more than 20 years ago (patented in 1981) as the most powerful stable isotope techniques in beverage authentication and now the official method of the International Organization of Vine and Wine (OIV) and AOAC International for detecting sugar addition to fruit juice and the natural origin of vanillin. This technique is based on the detection of nonrandom distribution of deuterium in organic molecules.

Vibrational Spectroscopy

Vibrational spectroscopic techniques, both infrared (IR) absorption and Raman scattering, are based on the vibrational transitions of the molecules contained in a sample. In IR spectroscopy, the energy of these transitions is provided by radiation in the IR regions of the electromagnetic spectrum, between the visible and the microwave wavelengths, with mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) being among the most useful in food authentication studies, as revealed by a large number of related reports. The MIR region lies between 2500 and 25000 nm ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), while the range of wavelengths for NIR is from 780 to 2500 nm (approx. $12820\text{ to }4000\text{ cm}^{-1}$). For a particular vibration to be IR active, it must exhibit a change in dipole moment during the vibration. Different chemical bonds absorb at different wavelengths depending on the atoms connected, the surrounding molecules, and the type of vibration occurring. MIR may be used to study fundamental (i.e., stretching and bending) vibrations and associated rotational–vibrational structure, while the higher-energy NIR can excite overtones or combination bands mainly due to the fundamental bonds involving hydrogen atoms. Even though the spectrum obtained by NIR contains more complex structural information comprising broad, overlapped peaks, it may be a characteristic of a sample and may act as a ‘fingerprint.’ MIR spectra, apart from the peaks associated with characteristic vibrations of the functional groups, contain also the molecular fingerprint region ($1500\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) with well-defined bands that could provide spectral features useful to identify a sample. The spectral peaks observed in case of MIR are narrow, often sharper, and better resolved than NIR. Sample presentation may take a variety of forms depending on the physical state of sample, including reflectance, transmittance, transfluctance, or fiber optics with respect to NIR. In MIR, sampling techniques include transmission-based methods using transmission cells (e.g., KBr disks and ZnSe windows) and methods in reflectance mode, such as attenuated total reflectance (ATR) and diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS). The introduction of Fourier transform technique in vibrational spectroscopy has increased its use in food analysis, as there is no scan speed limitation compared to the original dispersive instruments. FT-IR is a powerful tool for food authentication due to its capability to obtain information about many constituents simultaneously in a single spectral analysis. The combined use of FT-IR with multivariate analysis has been applied to distinguish extra-virgin olive oils from four different European countries. A similar approach has been used for the discrimination of 250 saffron samples from Greece ($n=40$), Iran ($n=87$),

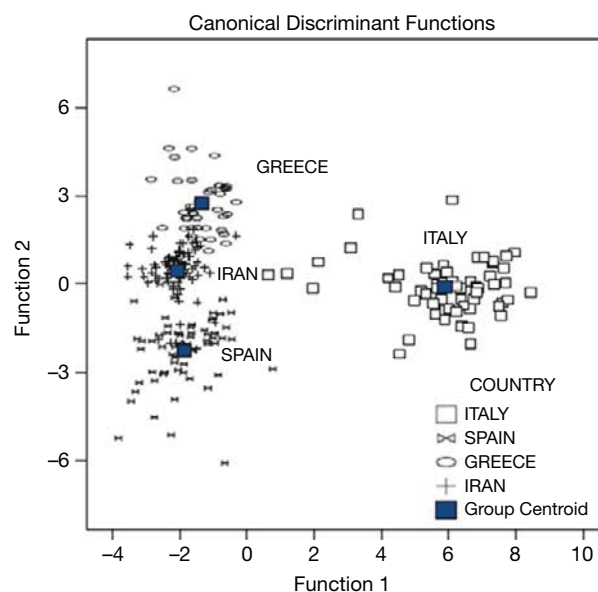


Figure 3 Plot obtained by stepwise canonical discriminant analysis of 250 saffron samples from four different countries, that is, Greece, Iran, Italy, and Spain, based on FT-IR analysis of their volatile extracts. Reproduced with permission from Anastasaki et al. (2010). *European Food Research and Technology* **230**, 71–577.

Italy ($n=60$), and Spain ($n=63$). The mid-IR spectra of saffron filament samples and their nonpolar volatile extracts were collected and 93.6% of the samples were correctly classified. Overall, the correct classification rates for samples from Greece, Iran, Italy, and Spain were 90.0, 89.5, 96.7, and 98.4%, respectively (Figure 3).

NIR has allowed the identification of maturity, origin, and variety of white wine grapes. Two varieties, Chardonnay and Viura, were tested and 97.2% of grapes were correctly classified according to their variety, while the correct classification of Chardonnay grapes according to their origin was 79.2%. The application of NIR spectroscopy in combination with Vis spectroscopy and chemometrics has been investigated for the geographic classification of wine. Different multivariate methods were used to classify Australian and Spanish Tempranillo red wines according to their geographic origin, and the best models reported correctly classified 100 and 84.7% of the Australian and Spanish wine samples, respectively.

As regards Raman spectroscopy, the samples are excited with a source of monochromatic radiation that may be in the visible (Vis) or NIR regions of the electromagnetic spectrum. While IR spectroscopy detects vibrations during which the electrical dipole moment changes, Raman spectroscopy is based on the detection of vibrations during which the polarizability changes. Bonds that connect two similar parts of a molecule (e.g., C=C group) tend to be more active in Raman than in IR spectroscopy, as the symmetrical stretches are more intense in Raman spectra. On the other hand, groups such as C=O, N–H, and O–H, with strong mid-IR absorption bands, present very weak vibrations in Raman spectroscopy, since the bonds are only weakly polarizable. Thus, water is practically ‘invisible’ in the Raman spectroscopy, which is quite useful for

water-based foods. However, dispersive Raman spectroscopy suffers from interference by fluorescence. The use of NIR laser sources can prove beneficial, while FT-Raman instrumentation with an excitation source at 1064 nm results in significantly lower fluorescence and photochemical degradation of samples. Complementary information on fundamental vibrational modes can be obtained from Raman and MIR spectra, since some vibrations are detected primarily by MIR and others primarily by Raman scattering. Raman spectroscopy is becoming increasingly important in food analysis. Significant work has been undertaken to evaluate authenticity and possible adulteration of olive oil. FT-Raman spectroscopy coupled with multivariate calibration has been applied for determining adulteration of Greek extra-virgin olive oils (EVOOs) with sunflower oil at levels lower than 5% by weight. By employing Raman spectroscopy and PCA, pure EVOOs can be distinguished from EVOOs adulterated with hazelnut oil. In addition, the combination of Raman spectroscopy with chemometrics has been evaluated for authenticating the PDO labels of six French virgin olive oils (VOOs) and for determining the fatty acid and triacylglycerol (TAGs) compositions of VOOs. According to the classification model built, 92.3% of French PDOs and 100% of PDO samples made with only one principal cultivar were correctly classified. Raman spectroscopy has been similarly investigated to confirm botanical and geographic origin of European honey, indicating that the major differences among the honey samples were mainly due to their botanical origin. Among the more advanced Raman techniques, surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS) present many advantages for the development of selective and sensitive analytical procedures. SERS is a very sensitive technique, employing roughened metal substrates (e.g., gold and silver nanoparticles or surfaces) to largely enhance the Raman scattering signal (typically 10^{3-6} over conventional Raman scattering). Another advantage is that fluorescence is quenched from adsorbed molecules, and also, positive identification of an analyte or an analyte mixture may be provided with high selectivity. As a key example, SERS combined with multivariate statistical approaches has been used for the reliable quantification of the banned food dye Sudan I in chili powder over the range of 10^{-3} to 10^{-4} mol l⁻¹. Other modern techniques include transmission Raman spectroscopy (TRS), confocal Raman microscopy, and Raman sensing using fiber optics. Both Raman and IR spectral profiles are currently used for hyperspectral (HIS) or multispectral imaging (MSI). IR and Raman are also emerging techniques in 2-D correlation spectroscopic approach, which employs MIR, NIR, and Raman spectroscopic probes.

During the last two decades, the number of reports on the use of NIR, Raman, and mainly MIR spectroscopy for food authenticity issues (i.e., adulteration, geographic origin, production process, and traceability) has increased significantly. The range of applications includes various foods and beverages such as cereal and cereal products, coffee, dairy products, edible oils and fats, fish, fruits and vegetables, fruit juices, honey, meat and meat products, spices, and wine. By integrating vibrational spectroscopy with multivariate data analysis (chemometrics) strategies, potential analytical tools are developed for industries and regulatory agencies. Such methods are time-saving and nondestructive, require minimal or no sample pretreatment, and enable the cost-effective characterization of samples during the

development, processing, quality control, and inspection of foodstuffs. Handheld, portable FT-IR and Raman instruments are also becoming more widely available to bring the benefits of these techniques out of the laboratory. Vibrational spectroscopy may not eliminate the need for more sophisticated analyses, but compared to classical reference methods that typically rely on 'wet chemistry,' it can provide greener analytical methods for screening samples prior to further examination.

Separation Techniques

Among the separation techniques, liquid chromatography, gas chromatography, and capillary electrophoresis make feasible separation and identification of almost any kind of compounds present in a food sample, thanks to continuous advances in both separation and detection capabilities. Their wide applicability in quality control laboratories due to such an efficiency and the affordable capital cost made them candidates to examine food conformity with their label, namely, the origin (geographic and varietal species) and/or the production practice (organic vs conventional). Groups of compounds (targeted analysis), or even the whole spectra/electropherogram serving as a 'fingerprint' containing the maximum information (nontargeted analysis), are examined usually with pattern recognition methods (supervised or unsupervised) to identify possible marker(s) for food authenticity. Nonetheless, the validity of the findings depends on the experimental design of sampling (number, number of harvests, sampling areas, etc.).

The geographic origin and the cultivar employed for virgin olive oil production are often related to its health benefits and the particular sensory properties. Thus, finding markers that could address these two issues became of high importance to protect both the producers and the consumers. This is highlighted by the fact that even for products officially registered as, for example, protected designation of origin (PDO), the availability of a certain analytical method to verify the claim in the label is not necessarily available. The profile of triacylglycerols (TAGs) and that of fatty acids (FA) have been used since many decades for geographic origin discrimination between countries or regions within the same country. Characteristic example is the discrimination of 10 main producing areas in Greece based on the FA content of 1293 samples belonging to 24 harvests after treatment with nonlinear discriminant analysis. The data from both profiles have been even combined to increase classification efficiency. The composition of FA and TAGs is genetically determined; however, pedoclimatic conditions and agronomical practices may have a certain influence justifying their usefulness. Sterols, hydrocarbons, aliphatic alcohols, and sesquiterpenes have also been used, and lately, polar phenolics have also been proposed. All these markers can be detected by GC and HPLC techniques following in most cases official protocols but coupling data to chemometric treatment (Figure 4).

Olive oils produced in different countries are usually facile to be distinguished even based solely on FAs. Focusing on studies regarding PDOs in the same country, the findings are rather controversial. Sesquiterpenes, namely, α -muurolene and α -farnesene contents except for discriminating Apulian from foreign oils, were found suitable to differentiate subbrands of Terra di Bari PDO oils produced in the neighboring areas of the

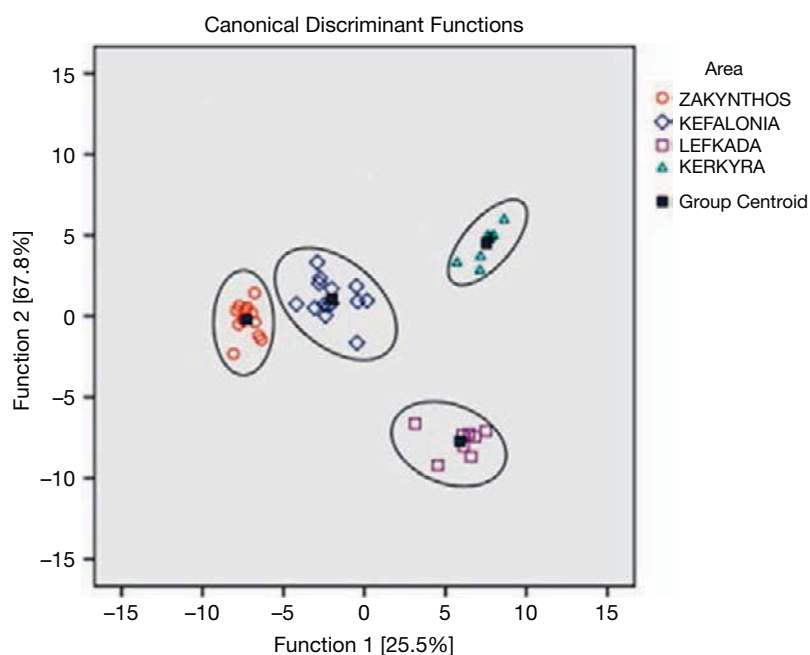


Figure 4 Classification of olive oil samples from western Greece according to geographic origin using selected volatile compositional data. Reproduced with permission from Poularekou et al. (2011). *Journal of Chromatography A* **1218**, 7534–7542.

Apulian region. However, such a finding derived from the analyses of 21 samples and data was considered preliminary. In a study with a larger amount of samples (914 samples and three production seasons), the discrimination of the Ligurian PDOs ($n = 210$) from oils of other regions in Italy as well as from other countries ($n = 704$) based on volatile profile obtained with solid-phase microextraction/GC-ion trap MS resulted in properly recognized and predicted with 90.1% and 81.1%, respectively. These findings were achieved using artificial neural network as a tool. Other studies point out that discrimination may be a difficult task and overlapping can take place in cases where PDOs are produced in close geographic regions and derive from the same cultivar or from a mixture of cultivars presenting compositional similarities (coupage). For example, studies carried out over a 6-year harvest period for five French PDOs showed that Aix-en-Provence and Vallée des Baux derived via blending of same cultivars even at different portions could not be clearly distinguished with the combined information of TAGs and FAs. Such a difficulty was also stressed regarding the analysis of Spanish PDOs for two consecutive harvest years. The oils produced in the various provinces of Andalusia presented overlapping even if 64 compounds obtained by GC and HPLC (fatty acids, sterols, alcohols, and hydrocarbons) were treated with LDA. In the same study, however, the importance of sophisticated statistical approach combined with a multidisciplinary strategy was demonstrated. Thus, employing artificial neural network improved significantly the classification (>90%). Even so, the findings for PDOs presented the highest error of prediction in comparison to those related to sample discrimination from other countries, regions, and provinces.

Similarly, regarding the botanical origin (cultivar), a single marker is also difficult to be proposed due to the complexity of the oil matrix and the variety of factors affecting its composition. The markers with discrimination power are rather

comparable to those used for the geographic origin and consequently determined with the same separation methods. It has been stressed however that though FAs and TAGs provide basic information for the cultivars, minor components such as sitosterol and avenasterol, tyrosol and hydroxytyrosol, (E)-hex-2-enal, lutein, and β -carotene can be more informative for the botanical origin differentiation.

Consistent markers capable of differentiating oils on the basis of cultivation practice are not yet available. However, due to the growing interest in organic olive oil by the consumers, further studies are under way.

Concerning wine authenticity studies, phenolic compounds, biogenic amines, and volatiles have been proposed as useful markers, and within phenolic compounds, both flavonoids and nonflavonoids have been identified. Significant is the contribution of anthocyanin as markers to differentiate European from South American wines. These compounds are determined with LC. Usually, studies regard different countries; nevertheless, there are some concerning different zones. For example, using the content of 13 phenolic compounds and chemometrics, the discrimination of wines from three different Spanish appellations, namely, Penedes, Rioja, and Ribera del Duero, was feasible with a classification rate higher than 96%. As evidenced, characteristic markers were, for example, gallic acid for Penedes, *trans*-coumaroyl tartaric and *trans*-caffeoyl tartaric acids for Rioja, and the flavonol myricetin for Ribera del Duero wine samples. The multivariate curve resolution (MCR) technique allows the resolution of the chromatographic peaks obtained assisting more accurate quantification of phenolics and increasing the information via revealing the presence of coeluting peaks. The application of sub-2 μ particle columns that allows the separation of several isomers seems to be important. With the latter material and LC-MS/MS analysis of phenolic compounds, several wines

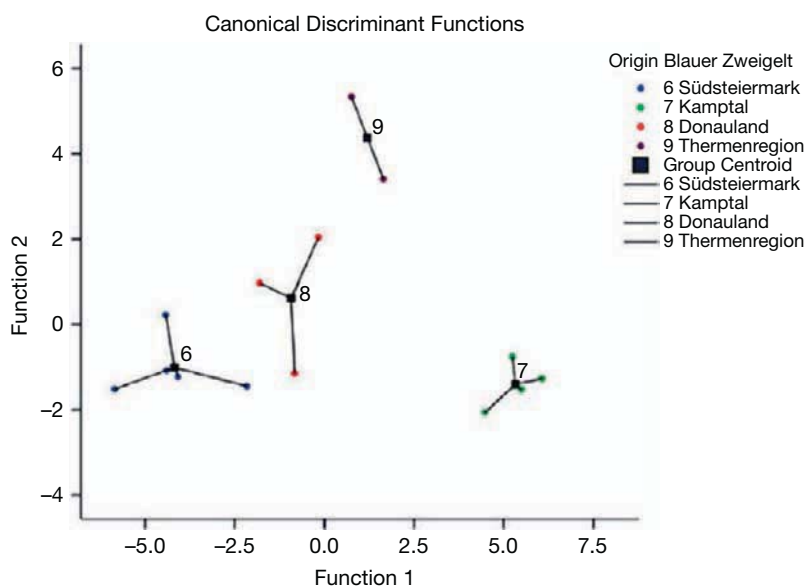


Figure 5 Geographic origin-based discriminant analysis of the grape variety Blauer Zweigelt originating from the region Südsteiermark, Kamptal, Donauland, and Thermenregion (Austria) based on LC–MS/MS phenol analysis. Reproduced with permission from Jaitz et al. (2010). *Food Chemistry* **122**, 366–372.

from 11 Austrian regions could be classified employing multivariate statistics (Figure 5).

Nonetheless, there are also various studies where phenolic compounds are combined with other compositional data (ethanol, calcium, etc.) within the frame of multistrategic approaches for efficient classifications as exemplified for a series of rose Spanish PDO wines, namely, Ribera del Duero, Rioja, Valdepeñas, and La Mancha. The combination with data regarding the levels of biogenic amines made feasible differentiation of wines from different regions of Italy such as Basilicata (cis-resveratrol, total polyphenols, spermidine, and tryptamine), Calabria and Campania (agmatine and trans-resveratrol), and Puglia (cadaverine, ethanolamine, histamine, putrescine, and tyramine) regions. Wine volatiles have been shown adequate for the geographic origin of monovarietal wines from the Azores, Canary Islands, and Madeira islands. The volatile pattern was obtained with solid-phase extraction/GC–MS and treated with chemometrics.

Similar markers have been proposed for the discrimination of grape wine varieties, though among the most recommended are the volatiles. A useful approach to discriminate wines from white grape varieties is based on the determination of shikimate content and the protein profile analysis, whereas for red wines, the shikimate content combined with anthocyanin profile. Shikimate can be determined with the combination of C18 and a cation exchange column according to the method suggested by the International Organization of Vine and Wine, whereas proteins and anthocyanins with CE and high-performance reverse-phase chromatography, respectively.

Information about possible discrimination between organic and conventional wines is rather scarce. Biogenic amines have been reported to be lower in organic wines, whereas phenolic compounds and other compositional parameters were not able to make a clear discrimination despite some quantitative

differences. Further studies are on the way to obtain more consistent results.

DNA-Based Technology

A growing consciousness of the food composition led to an increased DNA-based investigations for food authentication also due to the bovine spongiform encephalopathy (BSE) crisis. The incorrect labeling of foods could represent a commercial fraud, and moreover, the nondeclared potential allergens content could cause health problems for consumers. The majority of works was focused on DNA analysis employing polymerase chain reaction (PCR) to amplify specific areas of DNA that could be analyzed with different methods such as the commonly spread electrophoresis techniques.

The application of PCR in authentication of food involves mostly analysis of meat-based foods, fish, and seafood products, which are highly priced foodstuff often susceptible to adulteration. Several studies concerned the detection of different kinds of not declared meat in foods; a species-specific PCR assay targeting mitochondrial D-loop region for the identification of pork in raw, heat-treated samples and in adulterated ones up to 0.1% has been developed. Furthermore, by PCR amplification of the COI gene and detection of species-specific sequences by hybridization, a multidetection test for the identification of different meat species like pork, beef, lamb, horse, cat, dog, and mouse has been achieved resulting in a suitable method for routine inspections. The identification of fish species is usually based on morphological analysis, but this approach resulted however very difficult and not suited to investigate fishes available in the market. As a matter of fact, fishes are often sold in pieces or have been subjected to processes altering the natural aspect. In this context, several DNA-based methods, mainly based on the amplification of

mitochondrial DNA, have been developed, allowing the detection and even the differentiation of closely related fish species. PCR-RFLP technique followed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was proposed for the identification and the discrimination of ten salmon species based on the amplification of a region of the cytochrome *b* mitochondrial gene. Furthermore, the differentiation of closely related species of flatfish such as the sole and Greenland halibut was achieved by species-specific PCR targeting a nuclear gene and by PCR-RFLP of a mitochondrial gene. Moreover, DNA-based methods have been applied for authenticity assessment of dairy products as well, allowing the identification of milks from different biological sources such as the identification of bovine milk in buffalo dairy products. This was achieved by using a high-resolution melting (HRM) as post-PCR method allowing the detection and the quantification of bovine milk in buffalo mozzarella, butter, cream, yogurt, and other buffalo products. The same approach, resulting in a very cost-efficient high-throughput method, has been employed successfully to check the authenticity of Leguminosae species, grapevine cultivars, and PDO sweet cherry cultivar (*Tragana Edessis*) and to differentiate *Citrus* species and hybrids and bilberry from other berry species. DNA-based methods are also used to detect genetically modified organisms (GMOs) or food allergens; for example, rice, maize, and soybean were investigated and the presence of potential food allergens in, for example, almond and hazelnut was searched in foods. In this context, a tetraplex real-time PCR method was used very recently to quantify simultaneously traces of four allergens such as soy bean, celery, and white and brown mustard in commercially available foods. This latter approach resulted in a powerful method for routine analysis being time-saving with respect to singleplex real-time PCR systems. Finally, DNA analysis is furthermore employed for detecting gluten, normally evaluated with protein analysis, in declared 'gluten free' foods, resulting in most of the cases comparable to ELISA test. In conclusion, the latest results obtained with the most adopted analytical techniques have been presented, highlighting their great potentiality in food authenticity issues. These studies pave the way for possible future investigations aimed to increase the knowledge in food science.

See also: Chemometrics; Chromatography: Combined Chromatography and Mass Spectrometry; Chromatography: Focus on Multidimensional GC; Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography; Consumer Protection Legislation; Food Fraud; Infrared Spectroscopy: Applications; Mass Spectrometry: Applications; Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation; Spectroscopy: Types.

Further Reading

- Castro-Puyana M and Herrero M (2013) Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. *Trends in Analytical Chemistry* 52: 74–87.
- Consonni R and Cagliani LR (2010) Nuclear Magnetic Resonance and chemometrics to assess geographical origin and quality of traditional food products. *Advances in Food & Nutrition Research* 59: 87–165.
- Druml B and Cichna-Markl M (2014) High resolution melting (HRM) analysis of DNA: Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* 158: 245–254.
- Ellis DI, Brewster VL, Dunn WB, et al. (2012) Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews* 41: 5706–5727.
- Herrero M, Simó S, García-Cañás V, Ibáñez E, and Cifuentes A (2012) Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrometry Reviews* 31: 49–69.
- Janin M, Medini S, and Técher I (2014) Methods for PDO olive oils traceability: state of art and discussion about the possible contribution of strontium isotopic tool. *European Food Research and Technology* 239: 745–754.
- Karabasanavar NS, Singh SP, Kumar D, and Shebannavar SN (2014) Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. *Food Chemistry* 145: 530–534.
- Lin CC, Fung LL, Chan PK, et al. (2014) A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. *Meat Science* 96: 922–929.
- Luber F, Demmel A, Pankofer K, Busch U, and Engel KH (2015) Simultaneous quantification of the food allergens soy bean, celery, white mustard and brown mustard via combination of tetraplex real-time PCR and standard addition. *Food Control* 47: 246–253.
- Luykx D and Van Ruth S (2008) An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry* 107: 897–911.
- Mafra I, Ferreira IMPLVO, Beatriz M, and Oliveira PP (2008) Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology* 227: 649–665.
- Montealegre C, Alegre MLM, and Garcia-Ruiz C (2009) Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 28–38.
- Schlesier K, Fahl-Hassek C, Forina M, et al. (2009) Characterisation and determination of the geographical origin of wines. Part I: overview. *European Food Research and Technology* 230: 1–13.
- Tomassini A, Capuani G, Delfini M, and Miccheli A (2013) NMR-Based metabolomics in food quality control. *Data Handling in Science and Technology* 28: 411–447.
- Wang X, Wang S, and Cai Z (2013) The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 52: 170–185.
- Xu Z, Morris RH, Bencsik M, and Newton MI (2014) Detection of virgin olive oil adulteration using low field unilateral NMR. *Sensors* 14: 2028–2035.

Relevant Websites

- <http://www.efsa.europa.eu> – European Food Safety Authority (EFSA).
- <http://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/food-authenticity-and-quality> – European Commission, Joint Research Center (JRC).
- <http://www.fao.org> – Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- <http://ec.europa.eu/food/safety/rasff> – European Commission, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF).
- <http://www.foodfraud.org> – U.S. Pharmacopeial Convention (USP) Food Fraud Database.
- <http://www.moniqa.eu/authenticity> – MoniQA Network, Food Authenticity Working Group.