



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής των πτητικών συστατικών του σαφράν  
*Crocus sativus* L. με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης



**Σπυριδούλα Ν. Μούζουλα**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Πέτρος Α. Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ 2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία**

Βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής των πτητικών συστατικών του σαφράν  
*Crocus sativus* L. με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης

“Optimization of the extraction method of the volatile components of  
*Crocus sativus* L. by Solid- Phase Microextraction (SPME)”

**Σπυριδούλα Ν. Μούζουλα**

Εξεταστική επιτροπή

Πέτρος Α. Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

## **Βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής των πτητικών συστατικών του σαφράν *Crocus sativus* L. με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης**

ΠΜΣ: Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το σαφράν είναι ένα καρύκευμα με φαρμακευτικές ιδιότητες, που προέρχεται από τα κόκκινα αποξηραμένα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* L, σημαντικό για την ελληνική οικονομία. Στη χώρα μας καλλιεργείται ευρέως στον Νομό Κοζάνης. Το σαφράν είναι ιδιαίτερα δημοφιλές, κυρίως λόγω των εξαιρετικών οργανοληπτικών του ιδιοτήτων, αφού συνδυάζει έντονο χρώμα, γεύση και ξεχωριστό άρωμα. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται κυρίως στις κροκίνες, την πικροκροκίνη και τη σαφρανάλη αντίστοιχα. Για την εμπορική εκμετάλλευση του προϊόντος, κρίνεται σημαντική η ανάπτυξη νέων μεθόδων, οι οποίες στοχεύουν στην ταχεία και οικονομική απομόνωση και παραλαβή των πτητικών του συστατικών.

Στην παρούσα μελέτη δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη σαφρανάλη, η οποία εκτός από τη συμβολή της στο άρωμα, αποτελεί και δείκτη ποιότητας του σαφράν. Συγκεκριμένα, η απομόνωση και η παραλαβή των πτητικών συστατικών του κρόκου έγινε με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Έπειτα, ακολούθησε η ανάλυση των συστατικών αυτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), η βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής της σαφρανάλης με την ανάπτυξη κατάλληλου μοντέλου με τη χρήση του περιστρεφόμενου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (RCCD) σε συνδυασμό με την μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων σαφράν σύμφωνα με τις ευρεθείσες βέλτιστες συνθήκες με στόχο την επικύρωση του μοντέλου RCCD-RSM. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε παραλαβή του αιθέριου ελαίου του σαφράν με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης (Clevenger). Εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία RCCD-RSM επιτεύχθηκε η παραλαβή της σαφρανάλης με μεγάλη εξοικονόμηση στην ποσότητα του δείγματος σαφράν καθώς και στο χρόνο της διαδικασίας ανάλυσης.

**Επιστημονική περιοχή:** Χημεία τροφίμων

**Λέξεις κλειδιά:** *Crocus sativus* L, σαφρανάλη, αέρια χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας, μικροεκχύλιση στερεάς φάσης, βελτιστοποίηση, μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης, σαφράν

## **Optimization of the extraction method of the volatile components of *Crocus sativus* L. by Solid-Phase Microextraction (SPME)**

*MSc Food Nutrition and Health*

*Department of Food Science and Human Nutrition*

Laboratory of General Chemistry

### **ABSTRACT**

Saffron is a spice with medical properties, derived from the red dried stigmas of the plant *Crocus sativus* L., important for the Greek economy. In our country, it is widely cultivated in the Prefecture of Kozani. Saffron is particularly popular mainly due to its excellent organoleptic properties, since it combines intense colour, taste and unique aroma. These properties are mainly attributed to crocins, picrocrocin and safranal, respectively. For the product's economic exploitation it is considered important, to develop new methods, which aim to the rapid isolation and recovery of its volatile components.

In the present study, special emphasis was given on safranal, which, apart from its contribution to the aroma, is also an indicator of saffron quality. In particular, the extraction of the volatile components of saffron was performed using the solid phase microextraction (SPME) method. Saffron volatile components were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). SPME conditions for the extraction of safranal were optimized by developing a suitable model using the rotatable central composite design (RCCD) combined with the response surface methodology (RSM). Saffron samples were then analyzed according to the optimized conditions with the aim of validating the RCCD-RSM model. In addition, the saffron essential oil was obtained by hydrodistillation (Clevenger). Using the RCCD-RSM methodology, the extraction of safranal was accomplished with significant savings in the saffron sample as well as analysis time.

**Scientific area:** Food chemistry

**Key words:** *Crocus sativus* L.; safranal; gas chromatography- mass spectrometry; solid-phase microextraction; optimization; response- surface methodology; saffron

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Πέτρο Ταραντίλη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να αναλάβω το συγκεκριμένο θέμα και να γίνω μέλος του εργαστηρίου του, καθώς και για την υπομονή, την συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι γνώσεις του στο συγκεκριμένο θέμα αλλά και η ειλικρινής προθυμία του και η μόνιμα καλή του διάθεση, ήταν καθοριστικής σημασία για εμένα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Χρήστο Παππά, για τις χρήσιμες και εύστοχες παρατηρήσεις και την βοήθεια του, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Μαρίνο Ξαγοράρη, για τη βοήθεια και τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ επίσης την υπέροχη κυρία Παναγιώτα Ρεβέλου, που ήταν πάντα εκεί για εμένα, για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε ψυχολογικό επίπεδο. Χωρίς την παρουσία της, η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας δεν θα ήταν εφικτή.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο μεγαλύτερο στήριγμα μου, τους γονείς μου Νίκο και Βασιλική και τους αδελφούς μου Γιώργο και Δημήτρη, για την ηθική και υλική βοήθειά τους καθώς και στους φίλους μου για την στήριξη και την κατανόηση τους όλον αυτό τον καιρό.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ιστορία και προέλευση του φυτού <i>Crocus sativus</i> .....	1
1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και καλλιέργεια του <i>C. sativus</i> .....	2
1.3 Το saffron .....	4
1.4 Η χημική σύσταση του saffron.....	6
1.5 Δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron.....	7
1.6 Η βιολογική δράση της σαφρανάλης .....	11
1.7 Το αιθέριο έλαιο .....	12
1.8 Η μέθοδος της υδροαπόσταξης .....	13
1.9 Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) .....	15
1.10 Η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) .....	17
2. Σκοπός της μελέτης .....	19
3. Πειραματικό μέρος.....	20
3.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	20
Δείγματα σαφράν .....	20
3.1.1 Ταυτοποίηση και ημιοσοτικοποίηση των πτητικών συστατικών του σαφράν με SPME-GC-MS και βελτιστοποίηση με RCCD-RSM .....	21
Υλικά & αντιδραστήρια .....	21
Συσκευές & όργανα.....	22
Μεθοδολογία SPME .....	22
Μέθοδος ανάλυσης GC-MS .....	23
Στατιστική επεξεργασία .....	24
3.1.2 Ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου σαφράν με GC-MS .....	25
Υλικά & αντιδραστήρια .....	25
Συσκευές & όργανα.....	25
Μεθοδολογία παραλαβής αιθερίου ελαίου.....	26

Μέθοδος ανάλυσης GC-MS .....	27
3.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	27
3.2.1 Ταυτοποίηση και ημιοσοτικοποίηση των πτητικών συστατικών του σαφράν με SPME-GC-MS και βελτιστοποίηση με RCCD-RSM .....	27
3.2.2 Βελτιστοποίηση της SPME με RCCD-RSM.....	34
Μοντέλο ημιοσοτικοποίησης .....	35
Μοντέλο %εμβαδού .....	39
3.3 Σχόλια-Συμπεράσματα .....	46
4. Βιβλιογραφία.....	47

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

<b>GC- MS</b>	Gas chromatography- Mass spectrometry	Αέρια χρωματογραφία- Φασματομετρία μάζας
<b>RSM</b>	Response Surface Methodology	Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης
<b>RCCD- RSM</b>	Rotatable central composite design- Response surface methodology	Περιστρεφόμενος κεντρικός σύνθετος
<b>SPME</b>	Solid- phase microextraction	Τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Μορφολογία <i>Crocus sativus</i> A) φυτό κρόκος B) τύποι ριζών C) φύλλα D) άνθος .....	3
Εικόνα 2 Saffron .....	5
Εικόνα 3 Η χημική δομή της κροκετίνης .....	8
Εικόνα 4 Οι χημικές δομές των κροκινών του κρόκου .....	9
Εικόνα 5 Σχηματική απεικόνιση υποβάθμισης της πικροκροκίνης .....	10
Εικόνα 6 Η χημική δομή της σαφρανάλης .....	10
Εικόνα 7 (1) 2,6,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιενυλ-1- καρβοξαλδεΰδη (2) 3,5,5- τριμεθυλο- 2-κυκλοεξεν-1-όνη (3) 2,6,6-τριμεθυλο-2-κυκλοεξεν-1,4-διόνη (4) 3,5,5-τριμεθυλο-3-κυκλοεξενυλ- 1- όνη (5) 3,7- διμεθυλο- 1,6- οκταδιεν- 3-όλη (6) [4,6 (E), 8(E)- μεγαστιγματριένιο] .....	13
Εικόνα 8 Συσκευή Clevenger .....	14
Εικόνα 9 GC-MS .....	22
Εικόνα 10 Μεθοδολογία SPME: A. Κονιορτοποιημένο δείγμα B: Ζύγιση δείγματος C: Προσθήκη διαλύτη D: Εισαγωγή σε υδατόλουτρο E: Εισαγωγή της ίνας στο φιαλίδιο F: Ανάλυση με GC-MS .....	23
Εικόνα 11 GC-MS Bruker .....	25
Εικόνα 12 Παραλαβή αιθέριου ελαίου με Clevenger .....	26
Εικόνα 13 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν χωρίς διαλύτη .....	28
Εικόνα 14 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν με διαλύτη C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O .....	29
Εικόνα 15 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν με διαλύτη H <sub>2</sub> O .....	30
Εικόνα 16 Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου σαφράν .....	32
Εικόνα 17 Διάγραμμα A) υπολοίπων B) Box- Cox .....	37
Εικόνα 18 Διαγράμματα contour αλληλεπίδρασης μεταξύ: A: Μάζας δείγματος και όγκου νερού B: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας C: Μάζας δείγματος και χρόνου D: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας E: Όγκου νερού και χρόνου F: Θερμοκρασίας και χρόνου .....	38
Εικόνα 19 Διάγραμμα A) Υπολοίπων B) Box- Cox .....	40
Εικόνα 20 Διαγράμματα contour αλληλεπίδρασης μεταξύ: A: Μάζας δείγματος και όγκου νερού B: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας C: Μάζας δείγματος και χρόνου D: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας E: Όγκου νερού και χρόνου F: Θερμοκρασίας και χρόνου .....	42
Εικόνα 21 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν με διαλύτη H <sub>2</sub> O που αναλύθηκε υπό τις βέλτιστες συνθήκες .....	45

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Τα κυριότερα χημικά συστατικά των σιγμάτων του σαφράν .....	6
Πίνακας 2 Δείγματα σαφράν τα οποία αναμίχθηκαν προς ένα ενιαίο τελικό δείγμα .....	20
Πίνακας 3 Δείγματα σαφράν τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευση του μοντέλου RCCD- RSM .....	21
Πίνακας 4 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από δείγμα χωρίς προσθήκη διαλύτη .....	28
Πίνακας 5 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από δείγμα με διαλύτη H <sub>2</sub> O.....	31
Πίνακας 6 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση αιθέριου ελαίου του σαφράν.....	33
Πίνακας 7 Κεντρικός σύνθετος συνδυασμός για τις 4 ανεξάρτητες μεταβλητές ( A,B,C,D) και οι πειραματικές τιμές για τη μεταβλητή απόκρισης (σαφρανάλη).....	34
Πίνακας 8 ANOVA για το τετραγωνικό μοντέλο της ημιοσοτικοποίησης της σαφρανάλης ....	36
Πίνακας 9 Βέλτιστες συνθήκες παραλαβής της σαφρανάλης για το μοντέλο ημιοσοτικοποίησης της σαφρανάλης.....	39
Πίνακας 10 ANOVA για το γραμμικό μοντέλο του %εμβαδού της σαφρανάλης .....	40
Πίνακας 11 Βέλτιστες συνθήκες παραλαβής σαφρανάλης για το μοντέλο του %εμβαδού .....	43
Πίνακας 12 Εμβασμό σαφρανάλης σε δείγματα που αναλύθηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες	44
Πίνακας 13 Μέσος όρος, Τυπική απόκλιση και διάστημα πρόβλεψης της σαφρανάλης με βάση τα 20 επιβεβαιωτικά δείγματα .....	45
Πίνακας 14 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση δείγματος σαφράν στις βέλτιστες συνθήκες .....	45

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Ιστορία και προέλευση του φυτού *Crocus sativus*

Ο κρόκος ο ήμερος (*Crocus Sativus* Linn.), ανήκει στο γένος *crocus*, στο είδος *sativus* και είναι πολυετές, ποώδες φυτό της οικογένειας *Iridiceae* (Ιριδώδη). Σύμφωνα με τον ελληνικό κώδικα τροφίμων και ποτών (2003), ως κρόκος ή Ζαφουρά ή Σαφράνι (saffron), χαρακτηρίζονται τα αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού (*C. Sativus*) που είναι απαλλαγμένα από τμήματα του στύλου ή άλλα μέρη του άνθους, καθώς και από στίγματα άλλων ειδών κρόκων ή άλλων λουλουδιών. Η ονομασία «σαφράν» προέρχεται από το αραβικό *za'faran*, που σημαίνει κίτρινο, ενώ η λέξη «*crocus*» είναι ελληνικής προέλευσης και συγκεκριμένα προέρχεται από τη λέξη κρόκος (Sampathu, Shivasankar, Lewis & Wood, 2009). Το σαφράν του εμπορίου, αποτελείται από το αποξηραμένο στίγμα με ένα μικρό μέρος του στύλου να επισυνάπτεται, ενώ θεωρείται το πιο ακριβό καρύκευμα παγκοσμίως, καθώς η διαδικασία της καλλιέργειας, της συγκομιδής και της επεξεργασίας του, θεωρούνται εντάσεως εργασίας αφού οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται δεν έχουν εξελιχθεί εδώ και δεκάδες χρόνια.

Η οικογένεια *Iridiceae*, υπάγεται στην τάξη των *Liliales* (Λειριανθών) και περιλαμβάνει περίπου 60 γένη με 800 είδη που φύονται σε εύκρατες και τροπικές περιοχές και διαιρείται σε τρεις υποοικογένειες: τα Κροκοειδή, τα Ιριδοειδή και τα Ιξιοειδή. Πρόκειται για πολυετείς πόες με βολβούς, βολβοκονδύλους ή ριζώματα και φύλλα συνήθως μακριά, ξιφοειδή ή γραμμοειδή (Φυτολογία, εκδοτική Αθηνών, 1983).

Ο κρόκος είναι ιθαγενές φυτό της ευρύτερης περιοχής της Μεσογείου και πιθανότατα προέρχεται από την Ελλάδα, τη Μικρά Ασία και την Περσία. Καλλιεργείται εκτενώς στην Ανατολή και στη λεκάνη της Μεσογείου από την ύστερη εποχή του Χαλκού. Οι Ρωμαίοι εισήγαγαν το σαφράν στη Μεγάλη Βρετανία και οι Άραβες στην Ισπανία. Εδώ και πολλά χρόνια καλλιεργούνταν κυρίως στο Ιράν και διακινούνταν σε διάφορα μέρη ανά τον κόσμο, λόγω της υψηλής ποιότητας και των ξεχωριστών οργανοληπτικών του ιδιοτήτων. Σήμερα, ο κρόκος καλλιεργείται κυρίως στο Ιράν, στην Ισπανία, στην Ινδία, στην Ελλάδα, στο Μαρόκο, στην Ιταλία, στην Τουρκία, στην Ελβετία, στο Ισραήλ και στο Πακιστάν, ενώ τελευταία έχουν γίνει προσπάθειες για εισαγωγή του καρυκεύματος και σε χώρες όπως οι ΗΠΑ, η Αυστραλία και η Αργεντινή. Η συνολική ετήσια παραγωγή κρόκου παγκοσμίως εκτιμάται σε 300 τόνους, με το Ιράν να συνεισφέρει περίπου στο

80%, ακολουθούμενο από την Ισπανία με 10-12% και την Ελλάδα με 2% (Kumar, Singh, Devi, Sharma, Singh, Ahuja, 2009). Αν και η παραγωγή του σαφράν στο Ιράν είναι συγκριτικά πολύ μεγαλύτερη, η χώρα με τις περισσότερες εξαγωγές και την παραγωγή του ποιοτικότερου σαφράν θεωρείται η Ισπανία (Raina, Agarwal, Bhatia, Gaur, 1996). Το συγκεκριμένο αυτό Ισπανικό σαφράν, ονομάζεται Mancha λόγω της γεωγραφικής του προέλευσης (Castilla la Mancha, Spain). Στην Ελλάδα, ο κρόκος καλλιεργείται στην περιοχή της Κοζάνης στα χωριά Κρόκος, Καρυδίτσα, Άνω Κόμη, το αποκλειστικό δικαίωμα συλλογής, συσκευασίας και διακίνησης του οποίου, έχει ο Αναγκαστικός Συνεταιρισμός Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Ο συνεταιρισμός ιδρύθηκε το 1971 και σήμερα απασχολεί περίπου 1000 άτομα με την ετήσια παραγωγή να αγγίζει τα 1.200-2.000 κρόκου. Ο κρόκος Κοζάνης αποτελεί προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας και Προέλευσης.

### 1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και καλλιέργεια του *C. sativus*

Το *Crocus Sativus* L., είναι ένα πολυετές βότανο χωρίς στελέχη, με σφαιροειδή κορμό 3 έως 5 cm σε διάμετρο, κάτω από το έδαφος. Πάνω από το έδαφος, κάθε κορμός παράγει έξι έως εννέα στενά φύλλα και ένα μακρόστενο σωληνοειδές λουλούδι μωβ χρώματος, που αποτελείται από 6 τμήματα ή πέταλα που εκτείνονται στην κορυφή, τα οποία προστατεύονται από υπόλευκα, μεμβρανώδη βράκτια. Στο κέντρο του άνθους βρίσκεται το ύπερο, που αποτελείται από μία ωθήκη μέσω της οποίας προβάλλει ο στύλος κίτρινου χρώματος. Το φυτό φτάνει τα 10 έως 25 cm σε ύψος, είναι τριπλοειδές επομένως δεν παράγει σπόρο και αναπτύσσεται από τους υπόγειους βολβούς του. Ως διπλοειδής πρόγονος του θεωρείται ο *Crocus cartwrightianus*, πιθανόν ιθαγενές φυτό της Κρήτης. Ο στύλος του φυτού, μήκους 5 cm διαιρείται σε ένα τρίλοβο στίγμα πορτοκαλοκόκκινου χρώματος μήκους 2,5 έως 3 cm (Mzabri, Addi, 2019). Ο κρόκος διαθέτει δύο τύπους ριζών που διαφέρουν μεταξύ τους δομικά και λειτουργικά: τις ινώδεις και λεπτές ρίζες στη βάση του μητρικού βολβού και τις συσταλτικές ρίζες στη βάση των πλευρικών, παραγόμενων από τον μητρικό, βολβών.



Εικόνα 1 Μορφολογία *Crocus sativus* A) φυτό κρόκος B) τύποι ριζών C) φύλλα D) άνθος (Mzabri, Addi, 2019)

Μέσα στον κύκλο ζωής του κρόκου, η ανθοφορία εμφανίζεται από τον δεύτερο χρόνο της καλλιέργειας του και διαρκεί 4 με 5 εβδομάδες, κατά τους μήνες Σεπτέμβριο έως Νοέμβριο και ακολουθείται από ένα στάδιο ανάπτυξης του φυτού καθ' όλη τη διάρκεια του χειμώνα. Κατά τη διάρκεια της Άνοιξης, το φυτό αδρανοποιείται και οι βολβοί του περνούν σε ένα στάδιο το οποίο ονομάζεται λήθαργος, κατά το οποίο λαμβάνει χώρα κυτταρική διαίρεση (Renau-Morata et al., 2021).

Ο κρόκος αναπτύσσεται γενικά σε διάφορους τύπους εδαφών, αν και περισσότερο ευνοϊκά, είναι τα εδάφη με pH που κυμαίνεται από ουδέτερο έως ελαφρώς αλκαλικό και τα οποία διαθέτουν ικανοποιητικό ποσοστό αποστράγγισης προκειμένου να αποτραπεί μία πιθανή σήψη των βολβών του και επομένως υποβάθμιση της ποιότητάς του. Όξινα ή με υψηλό pH ασβεστώδη εδάφη είναι ακατάλληλα για την καλλιέργεια του κρόκου. Συνθήκες εκτενούς ξηρασίας υποβαθμίζουν επίσης την ποιότητα του φυτού, ενώ οι βροχοπτώσεις της Άνοιξης και του Φθινοπώρου ευνοούν την ανάπτυξή του. Η αμμώδης σύσταση του αργίλου του εδάφους και η υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο, δρουν εξίσου ευεργετικά στην ανάπτυξη του φυτού. Στην Ελλάδα, ο κρόκος καλλιεργείται σε υψόμετρο 600-700 μέτρα και κλίμα μεσογειακό με ψυχρό χειμώνα και θερμό καλοκαίρι. Το μέσο ύψος βροχής ανέρχεται σε 500 mm. Η φύτευση των βολβών γίνεται σε σειρές και λαμβάνει χώρα σε βάθος 25-30 cm, σε έδαφος το οποίο έχει προηγουμένως υποστεί κατεργασία ώστε να γίνει λεπτόκοκκο και από το οποίο έχουν αφαιρεθεί ζιζάνια ή οποιοδήποτε άλλο βλαβερό στοιχείο το οποίο θα μπορούσε να δράσει ανασταλτικά στην ανάπτυξη των βολβών. Η επιθυμητή απόσταση μεταξύ των βολβών είναι 11-13 cm και των σειρών 20-25 cm. Για τη φυτεία ενός στρέμματος χρειάζονται 250-350 κιλά βολβοί, οι οποίοι εν συνεχεία πολλαπλασιάζονται και γι' αυτό οι

καλλιέργειες ανανεώνονται κάθε 5-7 χρόνια (Gresta, Lombardo, Siracusa, Ruberto, 2008).

### 1.3 To saffron

Η διαδικασία παραγωγής του καρκεύματος θεωρείται πολύπλοκη και διαρθρώνεται σε τρία βασικά στάδια, τη συγκομιδή των άνθεων, τον διαχωρισμό των στίγμάτων και γενικότερα τον καθαρισμό τους από ξένες ύλες και τέλος, την ξήρανση και συντήρηση. Καθένα από αυτά τα στάδια επηρεάζεται έντονα από τις συνθήκες και την παράδοση της εκάστοτε περιοχής καλλιέργειας. Ο κρόκος αποτελείται από τρία τμήματα, τα οποία μετά τη συγκομιδή και πριν την ξήρανση, διαχωρίζονται χειρωνακτικά. Τα στίγματα που μοιάζουν με κλωστές κόκκινου χρώματος, τον στήμονα κίτρινου χρώματος και τα μωβ πέταλα. Κάθε ένα από αυτά τα μέρη μπορεί να έχει εμπορική αξία.

Τα στίγματα του κρόκου όταν ξηραθούν, αποτελούν το αγνό σαφράν του εμπορίου, οι στήμονες χρησιμοποιούνται ως βαφή όπως ενίοτε και τα πέταλα. Οι καλλιεργητές, είτε ξηραίνουν όλα τα μέρη, είτε μόνο τα στίγματα και τους στήμονες που έχουν υψηλότερη εμπορική αξία. Βιβλιογραφικά, έχουν σημειωθεί διάφορες μέθοδοι ξήρανσης, οι οποίες εξαρτώνται κυρίως από τον σκοπό χρήσης του προϊόντος που θα προκύψει. Εάν για παράδειγμα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως μπαχαρικό, τότε βασικός στόχος είναι η διατήρηση της γεύσης, ενώ αν η τελική χρήση αφορά φαρμακευτικούς σκοπούς τότε βασική θεωρείται η διατήρηση της ποσότητας των σημαντικότερων φαρμακευτικών ενώσεων του φυτού. Το σαφράν έχει έντονη μυρωδιά και χρώμα και πικρή αρωματική γεύση. Οι τρεις ενώσεις που ευθύνονται για τα χαρακτηριστικά αυτά, είναι η σαφρανάλη, η κροκίνη και η πικροκροκίνη αντίστοιχα. Γενικά μετά από κάθε κατεργασία ξήρανσης, είναι επιθυμητή η διατήρηση και η μεγιστοποίηση των ενώσεων αυτών που εμπλέκονται σε μία σειρά χημικών διεργασιών.

Η ξήρανση λοιπόν, διαδέχεται τη διαδικασία διαλογής με τη μεταφορά του κρόκου στο ξηραντήριο. Η ξήρανση πραγματοποιείται αργά το βράδυ και πρόκειται για το πιο βασικό και λεπτομερές στάδιο επεξεργασίας του κρόκου, το οποίο απαιτεί πείρα και μεγάλη ακρίβεια. Αν ο κρόκος ξηραθεί φυσικά, διατηρεί αναλλοίωτες τις χαρακτηριστικές ιδιότητες του και ταυτόχρονα το χρώμα και η οσμή του γίνονται πιο έντονα. Κρίνεται απαραίτητο, η ξήρανση να μη γίνεται παρουσία ήλιου, αλλά υπό σκιά προκειμένου να μην αλλοιωθούν τα αιθέρια έλαια και οι χρωστικές του. Τα δωμάτια ξήρανσης είναι σκοτεινά, ευάερα και θερμαίνονται με τη χρήση πετρελαίου, ξύλου ή

κάρβουνου. Λεπτά στρώματα των νωπών στιγμάτων του κρόκου, τοποθετούνται επάνω σε ειδικά τελάρα διαστάσεων 40x50 cm με δικτυωτή συρμάτινη ή μεταξωτή βάση. Η θερμοκρασία του δωματίου ξήρανσης διατηρείται αρχικά για 3 ώρες στους 15-20 °C και στη συνέχεια, με προοδευτική αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 40 °C, ο κρόκος στεγνώνει σε 8-12 ώρες. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγεται και το βασικό συστατικό του αιθερίου ελαίου, η σαφρανάλη. Αμέσως μετά την ξήρανση, το σαφράν είναι γυαλιστερό και ανθεκτικό στο άγγιγμα, όμως με την πάροδο του χρόνου, γίνεται πιο θαμπό και εύθραυστο. Την επόμενη μέρα, ο κρόκος φυλάσσεται σε πλαστικές σακούλες ή σε γυάλινα ή τενεκεδένια δοχεία προκειμένου να διατηρηθεί, σε επίπεδα υγρασίας 10-12 °C. Προτού το σαφράν παραδοθεί τελικά στον συνεταιρισμό, επιτελείται μια ακόμα διαδικασία καθαρισμού με σκοπό την απομάκρυνση των ξένων υλών που μεταφέρθηκαν στον κρόκο κατά το στάδιο της συγκομιδής και δεν αφαιρέθηκαν κατά τη διαλογή (Παπανικολάου Κ. 2005).



*Εικόνα 2 Saffron*

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος ξήρανσης που ακολουθείται από τους Έλληνες παραγωγούς διαφέρει από αυτές των άλλων χωρών και δεν περιλαμβάνει άμεση έκθεση του προϊόντος στο φως, γεγονός που συνδέεται άρρηκτα με την καταστροφή των καροτενοειδών χρωστικών του κρόκου. Στην Ινδία, στο Ιράν και στο Μαρόκο, τα στίγματα είτε αφυδατώνονται με την έκθεσή τους στον ήλιο για 3-5 μέρες έως ότου επιτευχθεί υγρασία 8-10%, είτε τοποθετούνται σε πανί αρχικά στον ήλιο και έπειτα στη σκιά για 7-10 ημέρες. Οι μέθοδοι αυτές, αποδίδουν μέτριες συγκεντρώσεις κροκίνης και πικροκροκίνης και χαμηλά επίπεδα σαφρανάλης, γεγονός που προκαλεί μία μεγάλη μείωση στη χρωστική τους ικανότητα και άρα υποβάθμιση του τελικού προϊόντος. Στην Ισπανία, τα στίγματα τοποθετημένα σε λεπτές στιβάδες 2-3 cm, ξηραίνονται σε κόσκινο το οποίο θερμαίνεται με τη χρήση σόμπας υγραερίου, κάρβουνου ή θερμαντικής εστίας.

Η επιθυμητή θερμοκρασία είναι 50-80 °C για 30-60 λεπτά έως ότου επιτευχθεί επίπεδο υγρασίας 5-15 °C (Skinner, Ghalehgholabbehbahani, Parker, Mirza, 2017).

#### 1.4 Η χημική σύσταση του saffron

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με τη χημική σύσταση του κρόκου, αφορούν κυρίως τα στίγματα του άνθους, καθώς από χημικής άποψης, είναι και αυτά που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Γενικά η χημική σύσταση του σαφράν θεωρείται πολύπλοκη. Το συγκεκριμένο καρύκευμα διαθέτει πρωτογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι απαντώνται παντού στη φύση, όπως υδατάνθρακες, μέταλλα, λίπη, βιταμίνες αμινοξέα και πρωτεΐνες. Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων, ανήκει σε διαφορετικές κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, προϊόντα μεταβολισμού σημαντικά για την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή του οργανισμού όπως καροτενοειδή, μονοτερπένια και φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένων κυρίως ανθοκυανινών. Στον Πίνακα που ακολουθεί, αναγράφονται προσεγγιστικά οι αναλογίες των κυριότερων συστατικών του κρόκου, τα οποία είναι υπεύθυνα και για τις ξεχωριστές ιδιότητες που του έχουν αποδοθεί ανά τους αιώνες (Rios, Recio, Giner, Manez, 1996; Sampathu et. al, 2009).

Πίνακας 1 Τα κυριότερα χημικά συστατικά των στιγμάτων του σαφράν

Συστατικά	Ποσοστό (%)
Νερό	8-15
Ανόργανες ουσίες	5-7
Λίπη	5-8
Πρωτεΐνες	12-13
Αναγωγικά σάκχαρα	20
Πεντοζάνες	6-7
Κόμμεα και Δεξτρίνες	9-10
Ελεύθερα σάκχαρα	Σε ίχνη
Γεντιοβιοσίδια	2-3



Ακατέργαστες ίνες	4-5
Αιθέρια έλαια	0,3
Τέφρα	6-7%

Οι Sampathu et. al (1984), σε μελέτες τους αναφέρουν και την παρουσία βιταμινών και πιο συγκεκριμένα ριβοφλαβίνη (3,4-5,6 μg/g) και θειαμίνη (0,3-0,4 μg/g). Επιπλέον, υποστηρίζουν την ύπαρξη πληθώρας καροτενοειδών χρωστικών, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνεται το λυκοπένιο, α- και β- καροτένιο και η ζεαξανθίνη. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί, ότι οι ποσότητες αυτές δύναται να διαφοροποιηθούν με τη μεταβολή παραμέτρων όπως είναι το έδαφος καλλιέργειας, οι συνθήκες συγκομιδής, το ποσοστό βροχόπτωσης-υγρασίας αλλά και οι διεργασίες συντήρησης και αποθήκευσης.

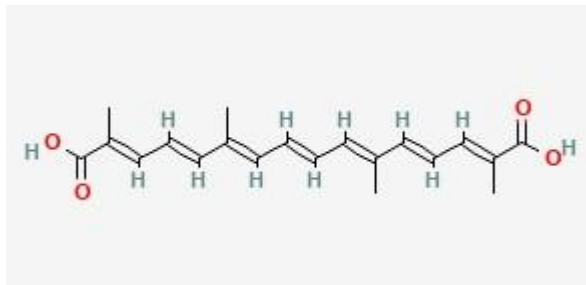
### 1.5 Δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron

Η εμπορική αξία του κρόκου εξαρτάται και επηρεάζεται από το χρώμα, τη γεύση και το άρωμα που προσδίδει. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες και η ποιότητα του κρόκου, διαμορφώνονται βάσει των συστατικών που αποτελούν και τους δευτερογενείς μεταβολίτες του. Η αυξημένη συγκέντρωση των ανωτέρω συστατικών, καθιστά καλύτερη την ποιότητα του κρόκου.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά, διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος αυτών, παράγονται σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξής τους και λειτουργούν ως μηχανισμοί άμυνας και επικοινωνίας. Οι βασικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του σαφράν, που καθορίζουν το κόκκινο χρώμα του, την πικρή γεύση και το έντονο άρωμα και άρα την ποιότητά του, είναι η κροκίνη, η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη αντίστοιχα.

Οι κροκίνες είναι καροτενοειδείς ενώσεις, γνωστές για τις χρωστικές τους ιδιότητες, γεγονός που αποδίδεται στην ιδιόμορφη υδατοδιαλυτή συμπεριφορά τους λόγω του υψηλού γλυκοζιτικού περιεχομένου τους, σε αντίθεση με τις περισσότερες οικογένειες καροτενοειδών. Αποτελούν το 3,5% του βάρους των στιγμάτων του φυτού και προσδίδουν πορτοκαλοκόκκινο χρώμα, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως φυσικές χρωστικές των τροφίμων. Πρόκειται για μονο-γλυκοζιτικούς ή δι-γλυκοζιτικούς εστέρες της κροκετίνης, με διάφορα τμήματα σακχάρων όπως γλυκόζη και γεντιοβιόζη και θεωρούνται θερμικά ασταθή και φωτοχημικά ευαίσθητα (Carmona, Zalacain, Sanchez, Novella, Alonso, 2006). Η κροκετίνη (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>), είναι ένα πολυενικό

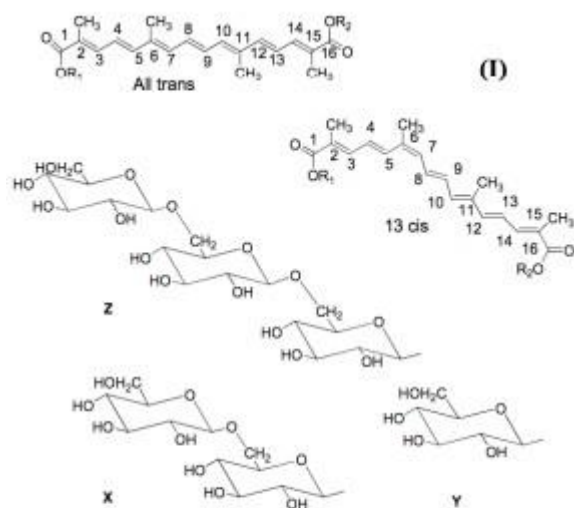
δικαρβοξυλικό οξύ, το οποίο είναι διαλυτό στα έλαια και αδιάλυτο στο νερό και στα περισσότερα οργανικά διαλύματα. Η κεντρική αλυσίδα αποτελείται από 16 άτομα άνθρακα με επτά διπλούς δεσμούς, ενώ στις θέσεις C-2, C-6, C-11, C-15, υπάρχουν διακλαδώσεις με μεθύλια.



Εικόνα 3 Η χημική δομή της κροκετίνης

Η κροκετίνη ανάλογα με την αναστροφή του μορίου στη θέση C-6, έχει *cis*- ή *trans*-διάταξη. Η εστεροποίησή της στα ακριανά καρβοξύλια της, γίνεται είτε με β-D γλυκόζη, είτε με β-D γεντιοβιόζη, δηλαδή δύο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα μέσω γλυκοζιτικού δεσμού β(1→6). Τα τμήματα αυτά δύναται να είναι τα ίδια και στα δύο άκρα ή να διαφέρουν (Tarantilis, Tsoupras, Polissiou, 1995). Η κύρια χρωστική του σαφράν, είναι ο διγεντιοβιοζυλεστέρας της κροκετίνης (C<sub>44</sub>H<sub>64</sub>O<sub>24</sub>) και προκύπτει όταν η κροκετίνη εστεροποιείται με δύο υδατοδιαλυτές γεντοβιόζες (σάκχαρα) (Tarantilis, Polissiou, Manfait, 1994). Η δομή της ένωσης μελετήθηκε κατά την περίοδο 1927-1931 όταν απομονώθηκε σε κρυσταλλική μορφή από τις ερευνητικές ομάδες των Karrer και Kuhn (Winterhalter, Straubinger, 2007).

Γενικά, η χημεία των κροκινών του κρόκου έχει μελετηθεί κατά καιρούς, κυρίως με τη μέθοδο HPLC, από διάφορους ερευνητές, οι οποίοι έχουν εντοπίσει και ταυτοποιήσει τόσο την παρουσία *cis* όσο και *trans* μορφών τους, οι κυριότερες από τις οποίες απεικονίζονται στην Εικόνα 4. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο ισομερισμός από την *trans* στη *cis* μορφή, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιείται κάθε φορά καθώς οι συζυγικοί διπλοί δεσμοί των καροτενοειδών του σαφράν, είναι πολύ ευαίσθητοι στο φως και στη θερμότητα και οι γλυκοζιτικοί δεσμοί υδρολύονται εύκολα με αλκαλικές και όξινες αντιδράσεις (Tarantilis et. al, 1994).



**Χημική δομή κροκινών (CRCs): γλυκοζυλεστέρες της κροκετίνης**

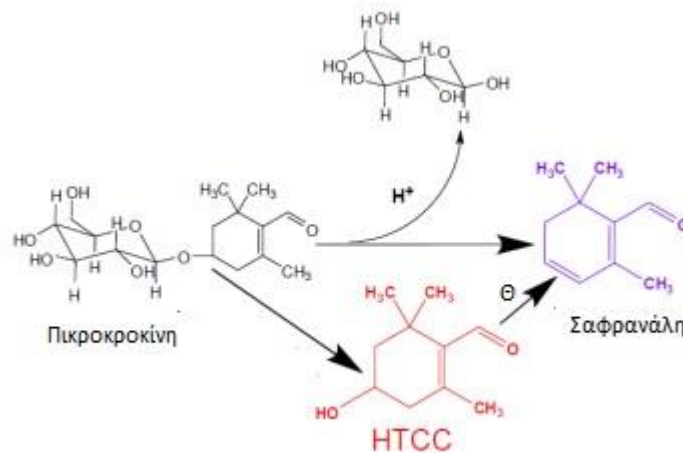
κροκίνη-5: R<sub>1</sub>= τρεις β-D-γλυκοζυλ (Z), R<sub>2</sub>= β-D-γεντιοβιοζυλ (X)  
κροκίνη-4: R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= β-D-γεντιοβιοζυλ (X)  
κροκίνη-3: R<sub>1</sub>= β-D-γεντιοβιοζυλ (X), R<sub>2</sub>= β-D-γλυκοζυλ (Z)  
κροκίνη-2: R<sub>1</sub>= β-D-γεντιοβιοζυλ (X), R<sub>2</sub>= H  
κροκίνη-2': R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= β-D-γλυκοζυλ (Z)  
κροκίνη-1: R<sub>1</sub>= β-D-γλυκοζυλ (Z), R<sub>2</sub>= H  
κροκετίνη (CRT): R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= H

*Εικόνα 4 Οι χημικές δομές των κροκινών του κρόκου*

Η πικροκροκίνη (4-(β-D-γλυκοπυρανοζυλοξυ)-2,6,6-τριμεθυλ-1-κυκλοεξάνιο-1-καρβοξαλδεϋδη)), η οποία είναι το δεύτερο σε αφθονία συστατικό της ξηρής ύλης του κρόκου (1-13%), είναι ένας άχρωμος γλυκοζίτης. Θεωρείται η κύρια πηγή της πικρής γεύσης του σαφράν, παρόλο που και άλλα συστατικά όπως τα φλαβονοειδή θεωρούνται επίσης υπεύθυνα για την πικρή γεύση του (Carmona & Alonzo, 2004). Η δομή της, αποσαφηνίστηκε για πρώτη φορά το 1934 από τους Kuhn και Winterstein ενώ η στερεοχημεία στο χειρόμορφο κέντρο του άγλυκου τμήματος, προσδιορίστηκε από τους Buchecker και Eugster το 1973 (Winterhalter, Straubinger, 2007).

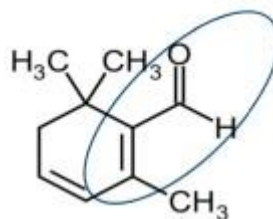
Η πικροκροκίνη, θεωρείται ότι προέρχεται από την ενζυματική αποικοδόμηση της ζεαξανθίνης, η απογλυκοζυλίωση της οποίας, οδηγεί στον σχηματισμό ενώσεων υπεύθυνων για το άρωμα του κρόκου, όπως η σαφρανάλη. Πιο συγκεκριμένα, συνήθως κατά την ξήρανση των στιγμάτων, η πικροκροκίνη διασπάται σε D-γλυκόζη και σαφρανάλη. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους, όπως φαίνεται και στο σχήμα που ακολουθεί (Kanakis, Daferera, Tarantilis, Polissiou, 2004):

- Με τη δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση και σχηματισμό του ενδιάμεσου προϊόντος HTCC (2,6,6-τριμεθυλ-4-υδροξυ-1-καρβοξαλδεΐδη-1-κυκλοεξάνιο), το οποίο με θέρμανση μετατρέπεται σε σαφρανάλη
- Απ' ευθείας από την πικροκροκίνη με όξινη υδρόλυση



Εικόνα 5 Σχηματική απεικόνιση υποβάθμισης της πικροκροκίνης

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί πως οι διαφορετικές μέθοδοι ξήρανσης των στιγμάτων, παίζουν σημαντικό ρόλο και προκαλούν μεταβολές στην ποσότητα σαφρανάλης του τελικού προϊόντος (Alonso, Salinas, Sanchez-Fernandez, Garijo, 2001). Η σαφρανάλη (2,6,6-τριμεθυλ-1,3-κυκλοεξαδιεν-1-καρβοξαλδεΐδη), που θεωρείται ένας ακόμα βασικός δευτερογενής μεταβολίτης του κρόκου, είναι κυρίως υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό του άρωμα, το οποίο δεν εντοπίζεται στα προσφάτως συλλεγμένα στίγματα, αλλά δημιουργείται κατά τη φάση της αποθήκευσής τους, μέσω ενζυματικής και θερμικής αποικοδόμησης. Πρόκειται για μία κυκλική μονοτερπενική αλδεΐδη, στην οποία έχουν αποδοθεί κατά καιρούς και διάφορες βιολογικές ιδιότητες, πολλές από τις οποίες σχετίζονται και με την ακόρεστη καρβονυλική της ομάδα, που θεωρείται και το δραστικό της τμήμα (Mardani, Maninang, Sarpong Appiah, Oikawa, Azizi, Fujii, 2019).



Εικόνα 6 Η χημική δομή της σαφρανάλης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η σαφρανάλη εκτός από μία φυσική αρωματική ουσία, μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ένας ευεργετικός φαρμακευτικός παράγοντας έναντι διαφόρων παθήσεων.

### 1.6 Η βιολογική δράση της σαφρανάλης

Από τα αρχαία χρόνια, ο κρόκος θεωρούνταν από τον Ιπποκράτη, τον Διοσκουρίδη και τον Γαληνό ότι έχει πληθώρα θεραπευτικών ιδιοτήτων. Υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα των στιγμάτων του κρόκου και οι επιδράσεις της σαφρανάλης στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχουν μελετηθεί εκτενώς, δίνοντας πολλά ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως έχει αντισπασμωδική και αντικαταθλιπτική δράση, αφού βοηθά στην έκκριση ντοπαμίνης και νορεπινεφρίνης. Επιπλέον, ενισχύει τις χωρικές γνωστικές ικανότητες έπειτα από χρόνια εγκεφαλική υποαιμάτωση ενώ δρα ευεργετικά στη μείωση του συνδρόμου στέρησης (withdrawal syndrome) ατόμων εξαρτημένων από ναρκωτικές ουσίες ή αλκοόλ (Hosseinzadeh, Jahanian, 2010). Συγκεκριμένα για το withdrawal syndrome, τα πειράματα έγιναν σε ποντικούς, στους οποίους προηγουμένως είχε χορηγηθεί μορφίνη. Βάσει των αποτελεσμάτων, η σαφρανάλη είχε τα ίδια αποτελέσματα με τη ναλοξόνη, γνωστή φαρμακευτική ουσία για την παρεμπόδιση της επίδρασης των οπιοειδών.

Η δράση των ελευθέρων ριζών, εμπλέκεται στη διαδικασία γήρανσης, στην αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δραστηριότητα, καθώς και στη διαδικασία επούλωσης πληγών. Οι Assimoroulou et. al, μελέτησαν τη δράση της σαφρανάλης στη σάρωση ελευθέρων ριζών ενός μεθανολικού εκχυλίσματος κρόκου, με τη χρήση μεθανόλης ως τυφλό δείγμα, ακολουθώντας τη μέθοδο DPPH. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη σημαντική αντιοξειδωτική δράση της σαφρανάλης, καθώς σε εκχύλιμα 500 ppm σε μεθανόλη, η αποτελεσματικότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών έφτασε στο 34%. Η σημαντική αυτή δράση, πιθανότατα οφείλεται στην ικανότητα της σαφρανάλης να «δωρίζει» ένα άτομο υδρογόνου, προς σταθεροποίηση της ελεύθερης ρίζας DPPH (Kurechi, Kikugawa, Kato, Numasato, 1980).

Με βάση τα στοιχεία από την παραδοσιακή ιατρική, μελετήθηκε η δράση της σαφρανάλης από υδατικά εκχυλίσματα σαφράν, στη θεραπεία της αϋπνίας και του άγχους με διάφορες δοκιμές. Το γενικό συμπέρασμα που προέκυψε, ήταν όπως η σαφρανάλη παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα με τη γνωστή ηρεμιστική ουσία διαζεπάμη και

επομένως μπορεί να συνδεθεί με ορισμένους τύπους της οικογένειας των βενζοδιαζεπινών καθώς επίσης και ότι εμφάνισε αγχολυτική δράση και αύξησε τον συνολικό χρόνο ύπνου με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Hosseinzadeh, Noraie, 2009).

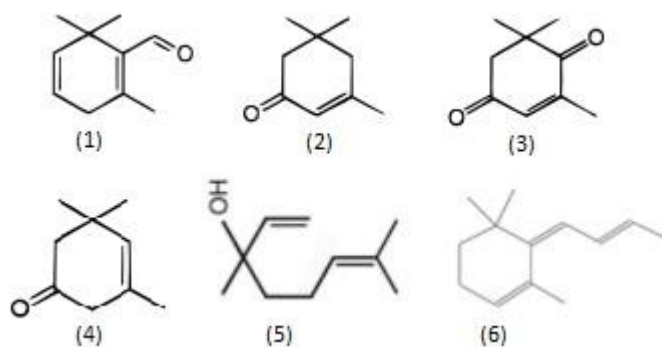
Τέλος, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση της σαφρανάλης με τη Δοκιμή διάχυσης δίσκου έναντι των μικροοργανισμών *S. enterica serovars*, *S. aureus*, *S. aureus* 6538P και *E. coli*. Η σαφρανάλη, δεν διαθέτει τόσο ισχυρή αντιμικροβιακή δύναμη ώστε να δράσει από μόνη της κατά αυτών των βακτηρίων, αποτελεί ωστόσο ενισχυτικό παράγοντα άλλων ουσιών στην αντιμετώπιση αυτών (Pintado, Miguel, Acevedo, Nozal, Novella, Rotger, 2011).

### 1.7 Το αιθέριο έλαιο

Η σαφρανάλη εκτός του ενδιαφέροντος που παρουσιάζει λόγω του πολύπλοκου βιοχημικού προφίλ της, είναι και το κύριο πτητικό συστατικό του αιθερίου ελαίου του κρόκου που προσδίδει τις πικάντικες αρωματικές νότες, καθώς αποτελεί το 30-70% της συγκέντρωσής του (Maggi et. al, 2009). Το αιθέριο έλαιο και οι πτητικές αρωματικές ενώσεις που εμφανίζονται κατά την έναρξη της συγκομιδής, καθώς και η μεταβολή του αρωματικού προφίλ κατά τη διάρκεια της ξήρανσης και της αποθήκευσης, είναι οι δύο παράγοντες που επηρεάζουν το χαρακτηριστικό άρωμα του κρόκου. Οι πτητικές ενώσεις του σαφράν έχουν υπάρξει αντικείμενο μελέτης πολλών επιστημόνων ανά τον κόσμο, οι οποίοι έχουν εξετάσει δείγματα από διάφορες περιοχές και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα σημαντικότερα εξ' αυτών τα οποία απαντώνται σχεδόν σε όλα τα εξεταζόμενα δείγματα, είναι τα παρακάτω (Tarantilis, Polissiou, 1997; Kanakis et. al, 2004; Karabagias, Koutsomprou, Liakou, Kontakos, Kontominas, 2017; Urbani, Blasi, Chiesi, Maurizi, Cossignani, 2015; D' Auria, Mauriello, Luigi- Rana, 2002):

- 2,6,6-τριμεθυλο-1,3-κυκλοεξαδιεν-1-καρβοξαλδεϋδη (σαφρανάλη)
- 2,6,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιενυλ-1-καρβοξαλδεϋδη (ισομερές σαφρανάλης)
- 3,5,5-τριμεθυλο- 2- κυκλοεξεν-1-όνη (ισοφορόνη)
- 2,6,6-τριμεθυλο- 2- κυκλοεξεν-1,4-διόνη (4- κετο-ισοφορόνη)
- 3,5,5-τριμεθυλο- 3- κυκλοεξενυλ-1-όνη (ισομερές ισοφορόνης)
- 3,7-διμεθυλο-1,6-οκταδιεν-3-όλη (λιναλοόλη)
- [4,6(E), 8(E)-μεγαστιγμα- τριένιο]

Οι χημικές δομές των ανωτέρω συστατικών, απεικονίζονται στην Εικόνα 7. Θα πρέπει να σημειωθεί, πως τα πτητικά συστατικά καθώς και οι ποσότητες αυτών ενδέχεται να παρουσιάζει ορισμένες μεταβολές ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης, επεξεργασίας καθώς και με τη μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Για παράδειγμα, η ποσότητα της σαφρανάλης που παραλήφθηκε από αιθέριο έλαιο με τη μέθοδο MSDE (microsimultaneous hydro-distillation extraction) ήταν περισσότερη από αυτή που παραλήφθηκε με εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (ultrasound-assisted extraction-USE), στην οποία κύρια ένωση ήταν η HTCC (Kanakis et. al, 2004; Jalali-Heravi, Parastar, Ebrahimi- Najafabadi, 2009). Επιπλέον, η ισοφορόνη βρέθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα σε δείγματα τα οποία είχαν υποστεί ξήρανση σε πιο «δραστικές» συνθήκες (55 °C, 95 min), ενώ το ποσοστό της 4-κετο -ισοφορόνης, αυξήθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας αλλά μειώθηκε με την παράταση του χρόνου θέρμανσης (Maggi, Carmona, Zalacain, 2009).



Εικόνα 7 (1) 2,6,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιενυλ-1- καρβοξυαλδεΰδη (2) 3,5,5- τριμεθυλο-2- κυκλοεξεν-1-όνη (3) 2,6,6-τριμεθυλο-2-κυκλοεξεν-1,4-διόνη (4) 3,5,5-τριμεθυλο-3-κυκλοεξενυλ- 1- όνη (5) 3,7- διμεθυλο- 1,6- οκταδιεν- 3-όλη (6) [4,6 (E), 8(E)- μεγαστιγμα-τριένιο]

### 1.8 Η μέθοδος της υδροαπόσταξης

Για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τα αποξηραμένα στίγματα του *Crocus sativus*, πολύ συχνά χρησιμοποιείται η μέθοδος της υδροαπόσταξης (Water Distillation ή Hydrodistillation, HD). Πρόκειται για μία απλή μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται εδώ και πάρα πολλά χρόνια και έχει ως κύριο γνώρισμα την άμεση επαφή του φυτικού υλικού με το νερό και την εξ' ολοκλήρου κάλυψή του από αυτό (Tandon, 2008). Η παλαιότερη αναφορά ενός αιθέριου ελαίου που παράγεται με μία μέθοδο που μοιάζει με συμβατική υδροαπόσταξη, περιγράφεται από τον Arnald de Villanova στα τέλη του 12<sup>ου</sup> ή στις αρχές

του 13<sup>ου</sup> αιώνα. Πριν από αυτό, υπάρχουν αναφορές από την αρχαιότητα από τους Ρωμαίους και τους Έλληνες, ωστόσο παραμένει άγνωστο εάν χρησιμοποιούσαν την υδροαπόσταξη για παραλαβή αιθερίου ελαίου ή υποπροϊόντα αυτών, διαδικασία που θα μπορούσε να επιτευχθεί με μεγαλύτερη ευκολία (Sadgrove, Jones, 2015).

Σε εργαστηριακό επίπεδο η παραλαβή των αιθερίων ελαίων με υδροαπόσταξη επιτυγχάνεται κυρίως με τη χρήση της συσκευής Clevenger. Η γυάλινη αυτή συσκευή, αποτελείται από μία φιάλη, έναν θερμαινόμενο μανδύα και μία αποστακτική συσκευή τύπου Clevenger η οποία καταλήγει σε έναν βαθμονομημένο κυλινδρικό σωλήνα.



*Εικόνα 8 Συσκευή Clevenger*

Το φυτικό υλικό το οποίο πρόκειται να αποσταχθεί, τοποθετείται μαζί με τον απαιτούμενο όγκο νερού μέσα στη φιάλη. Έπειτα, η φιάλη τοποθετείται σε θερμαινόμενο μανδύα, ο οποίος αποτελεί το μέσο θέρμανσης του μείγματος και από πάνω τοποθετείται η αποστακτική συσκευή Clevenger η οποία συνδέεται με τον ψυκτήρα. Το φυτικό υλικό στη φιάλη απορροφά το νερό και το αιθέριο έλαιο από τα κύτταρα του φυτικού υλικού απελευθερώνεται εξαιτίας της θερμότητας (Schmidt, 2010). Οι υδρατμοί που σχηματίζονται συμπαρασύρουν το αιθέριο έλαιο και οδηγούνται στον ψυκτήρα όπου και υγροποιούνται. Το μείγμα αυτό νερού και αιθερίου ελαίου, συλλέγεται στον βαθμονομημένο κυλινδρικό σωλήνα. Εκεί, επειδή το αιθέριο έλαιο δεν είναι υδατοδιαλυτό, συγκεντρώνεται στην επάνω στοιβάδα, ως ελαφρύτερο του νερού (Ahmad et. al, 2015). Εδώ ακριβώς εντοπίζεται και ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου, καθώς σε περίπτωση που το έλαιο έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό θα χαθεί μαζί με το υδρόλυμα. Επιπλέον, αν και η μέθοδος θεωρείται απλή και οικονομική, είναι αρκετά χρονοβόρα και ενδέχεται με τη συνεχή θέρμανση νερού και φυτικού υλικού, η σύσταση



του αιθερίου ελαίου να αλλοιωθεί ελαφρώς και πολλά πτητικά συστατικά να χαθούν (Mohamadi, Shamspur, Mostafavi, 2013).

### 1.9 Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME)

Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης ή SPME, αναπτύχθηκε από τον Pawliszyn και τους συνεργάτες του το έτος 1989, σε μία προσπάθεια να αρθούν οι περιορισμοί που έθεταν άλλες τεχνικές ευρέως χρησιμοποιούμενες έως τότε, όπως η SPE (τεχνική εκχύλισης στερεής φάσης) και LLE (εκχύλιση υγρού- υγρού) (Belardi, Pawliszyn, 1989). Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου, εντοπίζεται στην πολύ καλή ικανότητα ανάλυσης, σε συνδυασμό με την απλότητα και το χαμηλό κόστος ενώ εφαρμόζεται για την ανάλυση μίας μεγάλης ποικιλίας ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων καθώς και δειγμάτων τροφίμων. Τα πτητικά συστατικά συλλέγονται και αναλύονται σε ένα μόνο βήμα, χωρίς τη χρήση διαλυτών, μέσω μίας ίνας κατασκευασμένης από διοξείδιο του πυριτίου επικαλυμμένης με ένα ειδικό πολυμερικό υλικό (στατική φάση). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία (GC) ή φασματομετρία μάζας (GC/MS), ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία (HPLC) προς ανάλυση μη πτητικών ή θερμικά ασταθών ενώσεων (Vas, Vekey, 2004).

Η συσκευή SPME η οποία είναι πολύ απλή, μοιάζει με μία τροποποιημένη σύριγγα και περιλαμβάνει έναν μηχανισμό συγκράτησης της ίνας και έναν αγωγό εντός του οποίου εισέρχεται και προστατεύεται η ίνα. Η στατική φάση της ίνας μπορεί να είναι είτε ένα πολυμερικό υγρό υψηλής μοριακής μάζας, είτε ένα στερεό υλικό με υψηλό πορώδες. Υπάρχουν δύο τυπικές εφαρμογές δειγματοληψίας, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη θέση που τοποθετείται η ίνα στο δείγμα, δηλαδή είτε στο εσωτερικό του δείγματος, είτε στην υπερκείμενη αέρια φάση του. Στην πρώτη περίπτωση, η ίνα εμβαπτίζεται στο δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι ένα υγρό διάλυμα και το πολυμερικό υλικό επίστρωσης, λειτουργεί προσροφητικά, παγιδεύοντας τις αναλυόμενες ουσίες. Πρωτού συμβεί αυτό, θα πρέπει να έχει προηγηθεί μία επαρκής ανάδευση του δείγματος με στόχο την ταχύτερη αλληλεπίδραση πτητικών συστατικών και ίνας, καθώς συχνά αυτά τα συστατικά εμφανίζουν χαμηλό συντελεστή διάχυσης. Στη δεύτερη περίπτωση, τα πτητικά συστατικά θα πρέπει να έχουν διαχυθεί εντός του εσωτερικού διάκενου του φιαλιδίου όπου εμπεριέχεται το δείγμα (Pillonel, Bosetw, Tabacchi, 2002). Η διαδικασία της δειγματοληψίας περιλαμβάνει δύο στάδια:

- Προσρόφηση των πτητικών συστατικών από την SPME ίνα
- Εκρόφηση των πτητικών συστατικών από την SPME ίνα

Η SPME ίνα είναι τοποθετημένη στη βελόνη μίας σύριγγας ειδικού τύπου. Στο πρώτο στάδιο η ίνα μέσω ενός εμβόλου, εξέρχεται από τη βελόνη και εισέρχεται στο φιαλίδιο μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος (septum), όπου έρχεται σε επαφή με το προς ανάλυση δείγμα ή την υπερκείμενη φάση του για συγκεκριμένο χρόνο με αποτέλεσμα την κατακράτηση των πτητικών συστατικών στην ίνα. Κατά το δεύτερο στάδιο, η ίνα επανέρχεται στη βελόνη, αφαιρείται από το φιαλίδιο και εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο. Εκεί, τα προσροφημένα πτητικά συστατικά, απελευθερώνονται μέσω θερμικής εκρόφησης και συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο του χρωματογράφου στην τριχοειδή στήλη όπου και λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός τους.

Εφαρμόζοντας την τεχνική SPME και προκειμένου να διατηρηθεί η ακρίβεια στην επαναληψιμότητα, θα πρέπει προϋποθέσεις όπως η θερμοκρασία εκχύλισης, ο τρόπος ανάδευσης του δείγματος και οι συνθήκες εκρόφησης των πτητικών συστατικών να διατηρούνται σταθερές. Επειδή στο προς ανάλυση δείγμα δεν εισάγεται κάποιος διαλύτης, οι εγχύσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε λειτουργία μη διαμοιρασμού (splitless mode) με αποτέλεσμα την εισαγωγή όλης της ποσότητας των πτητικών συστατικών στην τριχοειδή στήλη και αύξηση της ακρίβειας της μεθόδου (Vas, Vekey, 2004).

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που καθορίζουν την απόδοση και την επιτυχία της μεθόδου SPME, είναι ο τύπος και το πάχος του πολυμερικού υλικού επικάλυψης της ίνας. Η επιλογή αυτή γίνεται με βάση την μοριακή μάζα των επιθυμητών προς ανάλυση πτητικών καθώς και με τη συγγένεια που εμφανίζουν τα συστατικά λόγω της πολικότητάς τους με το προσροφητικό υλικό της ίνας καθώς επιδιώκεται η χρήση πολικών υλικών για πολικούς αναλύτες, μη πολικά υλικά για μη πολικούς αναλύτες όπως συμβαίνει και στην αέρια χρωματογραφία. Το πολυμερικό υλικό των ινών είναι συνήθως είτε ένα καθαρό υγρό πολυμερές όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), είτε ένας πολυακρυλικός εστέρας (PA) είτε υγρά πολυμερή (PDMS, Carbowax) που έχουν εμποτιστεί σε στερεά πορώδη υλικά όπως Carboxen, Divinylbenzene (DVB) ή μείγμα DVB- Carboxen.

### 1.10 Η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM)

Οι εφαρμογές του στατιστικού σχεδιασμού στο περιβάλλον των βιομηχανιών ξεκίνησαν την δεκαετία του 1930, ωστόσο τον καταλυτικό ρόλο έπαιξε η ανάπτυξη της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης (RSM).

Η μέθοδος αυτή εισήχθη από τους G.E.P Box και E.P Wilson το 1952. Πρόκειται για μία τεχνική βελτιστοποίησης, σύμφωνα με την οποία οι Box και Wilson προτείνουν τη χρήση ενός πολυωνύμου για τη βελτίωση της απόκρισης (εξαρτώμενη μεταβλητή) με βάση τη μεταβλητή πρόβλεψης (ανεξάρτητη μεταβλητή). Η βελτιστοποίηση μίας μεθόδου αφορά την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών στην απόδοση μίας διαδικασίας, έτσι ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερη απόκριση. Διαπιστώθηκε πως το μοντέλο αυτό, αποτελεί μία προσέγγιση, όχι ακριβή, που όμως μπορεί να εκτιμηθεί και να εφαρμοστεί εύκολα ακόμα και όταν δεν διατίθενται αρκετές πληροφορίες για τη διαδικασία. Η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης περιλαμβάνει ένα σύνολο τεχνικών οι οποίες είναι χρήσιμες για την ανάπτυξη σχέσεων μεταξύ της απόκρισης ( $y$ ) και ενός συνόλου παραγόντων ( $x_1, x_2, x_3, \dots$ ). Οι μεταβλητές αυτές μπορεί να είναι είτε ποσοτικές είτε ποιοτικές. Με την εφαρμογή της RSM είναι εφικτή η εύρεση των μεταβλητών που επηρεάζουν περισσότερο την απόκριση  $y$  καθώς και τις βέλτιστες τιμές των παραγόντων  $x$ , έτσι ώστε η απόκριση  $y$  να προσεγγίζει τη βέλτιστη ονομαστική τιμή, η μεταβλητότητα της  $y$  να είναι μικρή και να επιτευχθεί η ελαχιστοποίηση της επίδρασης των μη ελεγχόμενων μεταβλητών (Montgomery, 2012).

Η απαρχή της RSM εκτιμάται με τη χρήση Αποκριτικών Επιφανειών σύμφωνα με την οποία, για το μοντέλο πρώτης τάξης υπάρχει ο ορθογώνιος σχεδιασμός που προτάθηκε από τους Box και Wilson, ενώ για τα μοντέλα δεύτερης τάξης υπάρχει ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design – CCDs) και ο σχεδιασμός τριών επιπέδων (Box – Behnken designs, BBDs) των Box και Behnken (Myers, Montgomery, 2002). Ο πιο διαδεδομένος ωστόσο είναι ο πειραματικός σχεδιασμός CCD, για τον οποίο απαιτείται ένας αριθμός πειραμάτων που δίνεται από τη σχέση  $N=2k + 2k + C_p$ , όπου  $k$  είναι ο αριθμός των παραγόντων και ( $C_p$ ) ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου. Παρόλα αυτά, όταν το πλήθος των παραγόντων προς μελέτη είναι μεγάλο, η εφαρμογή του CCD καθίσταται δύσκολη καθώς απαιτείται η διεξαγωγή πολλών πειραμάτων σε διαφορετικές συνθήκες. Ο σχεδιασμός Box-Behnken είναι πιο απλός και οι παράγοντες μελετώνται σε τρία επίπεδα. Αν υπάρχει ανάγκη για γνώση των

αποκρίσεων σε ακραίες τιμές, τότε ο σχεδιασμός αυτός δεν ενδείκνυται καθώς αποφεύγεται η διενέργεια πειραμάτων κάτω από ακραίες συνθήκες από τα οποία μπορεί να προκύψουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα (Box, Draper, 2007).

Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να εφαρμόζονται οι τρεις βασικές αρχές που διέπουν τον πειραματικό σχεδιασμό. Η πρώτη αφορά την επανάληψη, κατά την οποία διεξάγεται ένας ανεξάρτητος αριθμός επαναλήψεων των πειραμάτων με όλους τους συνδυασμούς μεταβλητών ώστε να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία των μετρήσεων αλλά και η εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος. Η δεύτερη αφορά τη λήψη πλήρως τυχαιοποιημένων δεδομένων, δηλαδή τυχαία κατανομή του πειραματικού υλικού και τυχαία σειρά πειραμάτων έτσι ώστε να αποφευχθούν τα συστηματικά σφάλματα. Η τρίτη βασική αρχή αφορά τα πειράματα σε ομοειδή δεδομένα (blocks). Τα πειράματα αυτά πραγματοποιούνται όταν οι επαναλήψεις των μετρήσεων δεν είναι δυνατόν να διεξαχθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες και ως στόχο έχει τη βελτίωση της ακρίβειας των πειραμάτων δημιουργώντας ομάδες με ομοειδή δεδομένα.

## 2. Σκοπός της μελέτης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το σαφράν ξεχωρίζει τόσο για τις ξεχωριστές οργανοληπτικές του ιδιότητες όσο και για τις φαρμακευτικές, ενώ πρόκειται για προϊόν με σημαντικό ρόλο στην οικονομία της χώρας μας.

Οι ιδιότητες αυτές, αποδίδονται κυρίως στους μεταβολίτες του σαφράν όπως αυτοί περιγράφηκαν, δηλαδή στις κροκίνες που είναι υπεύθυνες για το έντονο χρώμα και στη σαφρανάλη και την πικροκροκίνη που είναι υπεύθυνες για το άρωμα και τη γεύση αντίστοιχα. Προκειμένου οι ενώσεις αυτές να αξιοποιηθούν εμπορικά, κρίνεται σημαντικό να αναπτυχθούν νέες, ταχείες και οικονομικές μέθοδοι για την απομόνωση και την παραλαβή τους.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η απομόνωση και η παραλαβή των πτητικών ενώσεων του σαφράν με τη χρήση της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase microextraction-SPME), η ανάλυση τους με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) και η βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής (SPME) με έμφαση στη σαφρανάλη. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ο περιστρεφόμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (RCCD) σε συνδυασμό με την μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM). Αναπτύχθηκαν 2 μοντέλα RCCD-RSM με μεταβλητή απόκριση τη σαφρανάλη. Στο πρώτο μοντέλο η σαφρανάλη υπολογίστηκε σε mg/g (ημιποσοτικοποίηση με εσωτερικό πρότυπο) και στο δεύτερο εκφράστηκε σε % εμβαδόν. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε παραλαβή του αιθέριου ελαίου του σαφράν με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης (Clevenger), με στόχο τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο SPME.

### 3. Πειραματικό μέρος

#### 3.1 Υλικά και Μέθοδοι

##### Δείγματα σαφράν

Για την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αποξηραμένων στιγμάτων ελληνικού κρόκου προερχόμενα από φυτά *Crocus sativus L.* η συγκομιδή των οποίων έλαβε χώρα κατά τα έτη 2016, 2017, 2018 και 2019. Τα δείγματα ξηράθηκαν με την παραδοσιακή μέθοδο ξήρανσης, κατά την οποία τοποθετούνται σε τελάρα με μεταξωτή βάση όπου ξηραίνονται σε θερμοκρασία 25-30 °C για 12 έως 14 ώρες. Τα δείγματα αυτά χορηγήθηκαν από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης.

Για τα πειράματα βελτιστοποίησης της μεθόδου SPME καθώς και για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου του σαφράν με υδροαπόσταξη Clevenger, αναμίχθηκαν 14 δείγματα σαφράν (Πίνακας 2) από τα έτη συγκομιδής 2016 και 2017. Τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν σε ιγδίο πορσελάνης και ομογενοποιήθηκαν με σκοπό τη λήψη ενιαίου δείγματος επαρκούς ποσότητας για την πραγματοποίηση των ανωτέρω πειραμάτων.

Πίνακας 2 Δείγματα σαφράν τα οποία αναμίχθηκαν προς ένα ενιαίο τελικό δείγμα

<b>Δείγμα 1</b>	Συμβατικός 2016
<b>Δείγμα 2</b>	Εσοδ. 2016
<b>Δείγμα 3</b>	Εσοδ. 2016
<b>Δείγμα 4</b>	Εσοδ. 2016
<b>Δείγμα 5</b>	Bio Suisse 2017
<b>Δείγμα 6</b>	Εσοδ. 2017
<b>Δείγμα 7</b>	Extra Bio 2017
<b>Δείγμα 8</b>	Extra Bio EU 2017
<b>Δείγμα 9</b>	Bio EU 2017
<b>Δείγμα 10</b>	Εσοδ. 2017
<b>Δείγμα 11</b>	Συμβατικός εσοδ. 2017
<b>Δείγμα 12</b>	Extra Bio EU 2017
<b>Δείγμα 13</b>	Εσοδ. 2017
<b>Δείγμα 14</b>	Bio Suisse 2017

Μετά την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών από το μοντέλο RCCD-RSM για την απομόνωση της σαφρανάλης με SPME, χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα σαφράν (Πίνακας 3) από τα έτη συγκομιδής 2018 και 2019 με σκοπό την επαλήθευση των

προτεινόμενων συνθηκών SPME του μοντέλου RCCD-RSM. Τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν σε ιγδίο πορσελάνης.

*Πίνακας 3 Δείγματα σαφράν τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευση του μοντέλου RCCD- RSM*

<b>Δείγμα 1</b>	Extra Bio EU 2018
<b>Δείγμα 2</b>	Extra Bio 2018
<b>Δείγμα 3</b>	Extra Bio 2018
<b>Δείγμα 4</b>	Extra Bio 2018
<b>Δείγμα 5</b>	Bio EU 2018
<b>Δείγμα 6</b>	Extra Bio 2018
<b>Δείγμα 7</b>	Extra Bio 2018
<b>Δείγμα 8</b>	Standard 2018
<b>Δείγμα 9</b>	Extra Bio 2018
<b>Δείγμα 10</b>	Standard 2018
<b>Δείγμα 11</b>	Bio EU 2019
<b>Δείγμα 12</b>	Bio Suisse 2019
<b>Δείγμα 13</b>	Extra Bio 2019
<b>Δείγμα 14</b>	Extra Bio 2019
<b>Δείγμα 15</b>	Standard 2019
<b>Δείγμα 16</b>	Extra Bio EU 2019
<b>Δείγμα 17</b>	Standard 2019
<b>Δείγμα 18</b>	Standard 2019
<b>Δείγμα 19</b>	Bio EU 2019
<b>Δείγμα 20</b>	Bio EU 2019

### 3.1.1 Ταυτοποίηση και ημιποσοτικοποίηση των πτητικών συστατικών του σαφράν με SPME-GC-MS και βελτιστοποίηση με RCCD-RSM

#### Υλικά & αντιδραστήρια

- ❖ Δείγματα σαφράν
- ❖ Κυκλοεξανόνη (καθαρότητα 99%)
- ❖ Διαιθυλαιθέρας (καθαρότητα GC-MS 99,5%)
- ❖ Απεσταγμένο νερό
- ❖ Μηχανική πιπέτα 1-10  $\mu$ L
- ❖ Γυάλινο σιφώνιο μέτρησης 10 mL
- ❖ Γυάλινα φιαλίδια των 15 mL με βιδωτό πώμα και ελαστικό παρέμβυσμα PTFE/σιλικόνης.
- ❖ Ίνα διβινυλοβενζολίου/καρβοξενίου/πολυδιμεθυλοσιλοξανίου 1 cm (DVB/ CAR/ PDMS) (Supelco, Bellefonte, ΗΠΑ)

## Συσκευές & όργανα

- ❖ Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαντική πλάκα (Guardian 5000, Ohaus Scale Corp.)
- ❖ Αέριος χρωματογράφος Thermo GC-TRACE ultra συνδεδεμένος με φασματόμετρο μαζών Thermo DSQ II (Thermo Scientific Inc., Waltham, ΗΠΑ) (Εικόνα 9)



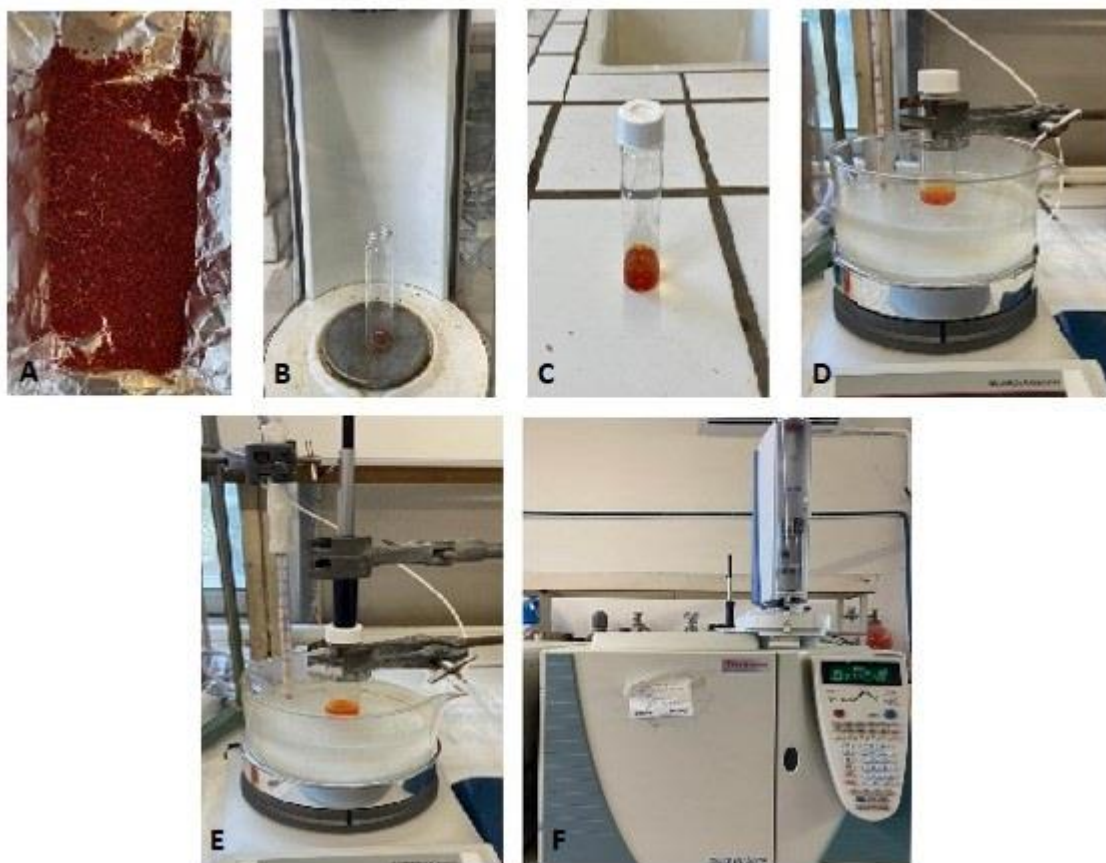
Εικόνα 9 GC-MS

## Μεθοδολογία SPME

Η μεθοδολογία SPME που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων έχει ως εξής: Διαφορετικές ποσότητες κονιορτοποιημένου σαφράν ζυγίζονται με ακρίβεια και τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο 15 mL με PTFE/silicone septa. Έπειτα, προστίθενται 7  $\mu$ L κυκλοεξανόνης ως εσωτερικό πρότυπο (μόνο για το μοντέλο της ημιποσοτικοποίησης) και ποσότητα απιονισμένου νερού (pH=7). Το μείγμα εισάγεται σε υδατόλουτρο όπου αναδεύεται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η βελόνα της ίνας SPME εισάγεται στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου όπου και παραμένει σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, για διαφορετικό χρόνο ανάλογα την επανάληψη και έπειτα αποσύρεται από το φιαλίδιο και εισάγεται στον εισαγωγέα (inlet) του αέριου χρωματογράφου. Μετά το πέρας των απαιτούμενων επαναλήψεων, τα δεδομένα



συλλέγονται και με την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης, ανευρίσκονται οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων.



*Εικόνα 10 Μεθοδολογία SPME: A. Κονιορτοποιημένο δείγμα B: Ζύγιση δείγματος C: Προσθήκη διαλύτη D: Εισαγωγή σε υδατόλουτρο E: Εισαγωγή της ίνας στο φιαλίδιο F: Ανάλυση με GC-MS*

### Μέθοδος ανάλυσης GC-MS

Πριν από την ανάλυση του εκάστοτε δείγματος πραγματοποιήθηκε η μέθοδος «clean» για 12,5 λεπτά με τις εξής συνθήκες: παραμονή στους 40 °C για 2 λεπτά και αύξηση στους 250 °C με ρυθμό 20°C/λεπτό. Η θερμοκρασία εισόδου (inlet) στο GC ήταν 260 °C για 3 λεπτά στη λειτουργία μη διαμοιρασμού (splitless) με επένδυση εγχυτήρα 0,8 mm (SGE International Pty Ltd, Αυστραλία). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν χαμηλής πολικότητας της εταιρείας Restek (Rtx – 5MS) διαστάσεων 30 m (μήκος) x 0,25 mm (εσωτερική διάμετρος) x 0,25 μm (πάχος υμενίου) (Restek, Bellefonte, PA, ΗΠΑ). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με ταχύτητα 1 mL/min. Η διάρκεια του προγράμματος

ανάλυσης ήταν συνολικά 42,33 λεπτά. Αρχικά, η στήλη παρέμεινε για 6 λεπτά στους 40 °C, θερμάνθηκε ως τους 120 °C με ρυθμό 5 °C/min, έπειτα στους 160 °C με ρυθμό 3 °C/min και έφτασε στην τελική θερμοκρασία των 250 °C με ρυθμό 15 °C όπου και διατηρήθηκε για 1 λεπτό.

Σχετικά με τις συνθήκες MS η θερμοκρασία πηγής ήταν 240 °C, η θερμοκρασία τετραπόλου 150 °C, η θερμοκρασία γραμμής διαβίβασης του ανιχνευτή ήταν 290 °C και το εύρος μαζών m/z 35-650.

Το σύνολο των χρωματογραφημάτων επεξεργάστηκε με τη χρήση του λογισμικού XCALIBUR (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, ΗΠΑ). Η ταυτοποίηση των κορυφών πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των δεικτών κατακράτησης (retention index) και των φασμάτων μάζας των εκλουσμένων ενώσεων με εκείνα της βιβλιοθήκης Wiley 275 και Adams. Ο υπολογισμός των δεικτών κατακράτησης έγινε χρησιμοποιώντας πρότυπα n-αλκάνια (C8-C20) (Supelco, Bellefonte, PA, ΗΠΑ). Για την ημιποσοτικοποίηση της σαφρανάλης, το εμβαδό της κορυφής των ενώσεων διαιρείται με αυτό του εσωτερικού προτύπου (7  $\mu$ L κυκλοεξανόνης) και η αναλογία που προκύπτει, πολλαπλασιάζεται με την αρχική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου.

### Στατιστική επεξεργασία

Ο πειραματικός σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Design-Expert 11.0.5.0 software (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Χρησιμοποιήθηκε περιστρεφόμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (RCCD) 5 επιπέδων σε συνδυασμό με την μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) με 4 ποσοτικούς παράγοντες (A: ποσότητα δείγματος σαφράν, B: όγκος προστιθέμενου νερού στο φιαλίδιο, C: θερμοκρασία παραμονής του φιαλιδίου στο υδατόλουτρο, D: χρόνος παραμονής της ίνας στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου) και μία μεταβλητή απόκρισης (περιεκτικότητα σε σαφρανάλη). Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της καταλληλότητας του μοντέλου, η οποία στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε από τα δεδομένα απόκρισης 20 δειγμάτων σαφράν, που αναλύθηκαν υπό τις βελτιωμένες πειραματικές συνθήκες που προτάθηκαν από το μοντέλο RCCD-RSM.

### 3.1.2 Ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου σαφράν με GC-MS

#### Υλικά & αντιδραστήρια

- ❖ Δείγματα σαφράν
- ❖ Νερό
- ❖ Θεικό μαγνήσιο
- ❖ Ακετόνη
- ❖ Σύριγγα 5 mL
- ❖ Φίλτρα σύριγγας Agilent Cartiva, μέγεθος πόρων 0,45  $\mu\text{M}$ , διάμετρος 25 mm, πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)

#### Συσκευές & όργανα

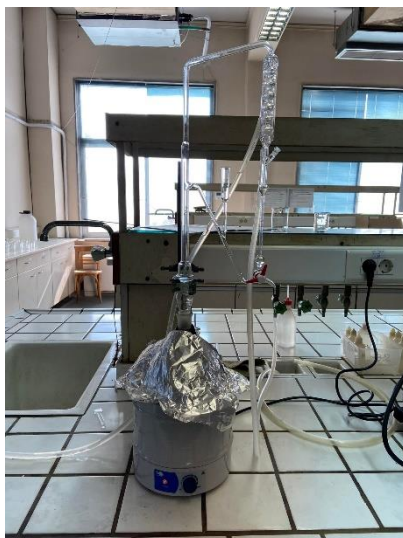
- ❖ Συσκευή Clevenger
- ❖ Θερμομανδύας
- ❖ Αέριος χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματόμετρο μαζών Bruker SCION 436-GC/MS και αυτόματο δειγματολήπτη CP-8400



*Εικόνα 11 GC-MS Bruker*

## Μεθοδολογία παραλαβής αιθερίου ελαίου

Από την τελική ποσότητα αποξηραμένων στιγμάτων σαφράν των ετών 2016 και 2017 που παρουσιάστηκαν ωρίτερα (Πίνακας 2), ζυγίστηκαν 100 g, στα οποία προστέθηκαν 500 mL νερού. Το τελικό μείγμα προστέθηκε σε συσκευή Clevenger (Εικόνα 11) προκειμένου να γίνει η παραλαβή του αιθερίου ελαίου ενώ η φιάλη καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο όπως φαίνεται στη φωτογραφία για αποτελεσματικότερη θέρμανση του φυτικού υλικού και προστασία από τυχόν φωτοξείδωση.



Εικόνα 12 Παραλαβή αιθέριου ελαίου με Clevenger

Μετά το πέρας 4 ωρών δεν παρατηρείται καμία αύξηση της ποσότητας του αιθέριου ελαίου που έχει συλλεχθεί στην συσκευή, συνεπώς η διαδικασία σταματά. Αμέσως μετά, προστίθεται ως ξηραντικό θειϊκό μαγνήσιο ( $MgSO_4$ ), καθώς ως υγροσκοπικό απορροφά την περιττή υγρασία. Η τελική ποσότητα του αιθερίου ελαίου κρόκου που συλλέχθηκε ήταν 0,3 mL. Για την ποιοτική ανάλυση του αιθερίου ελαίου με τη χρήση αέριου χρωματογράφου με φασματομέτρο μάζας, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Από την τελική ποσότητα αιθέριου ελαίου που συλλέχθηκε, με χρήση μηχανικής πιπέτας παραλήφθηκαν 10  $\mu L$  τα οποία εν συνεχεία αραιώθηκαν με 990  $\mu L$  ακετόνης. Από το αραιωμένο πλέον δείγμα, λήφθηκαν 30  $\mu L$  στα οποία προστέθηκαν 970  $\mu L$  ακετόνης. Το τελικό διάλυμα αναδεύτηκε καλά σε vortex και ακολούθησε η ανάλυσή του με GC-MS.

## Μέθοδος ανάλυσης GC-MS

Η αναλυτική τριχοειδής στήλη Rxi-5 Sil ms, ήταν διαστάσεων 30 m x 0,25 mm, id 0,25 μm. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) με ταχύτητα 1 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ρυθμίστηκε στους 220 °C. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν 60 °C και προοδευτικά με ρυθμό 3 °C/min έφτασε στην τελική θερμοκρασία των 240 °C. Η θερμοκρασία πηγής ιονισμού ήταν 230 °C στα 70 eV, 40-400 m/z.

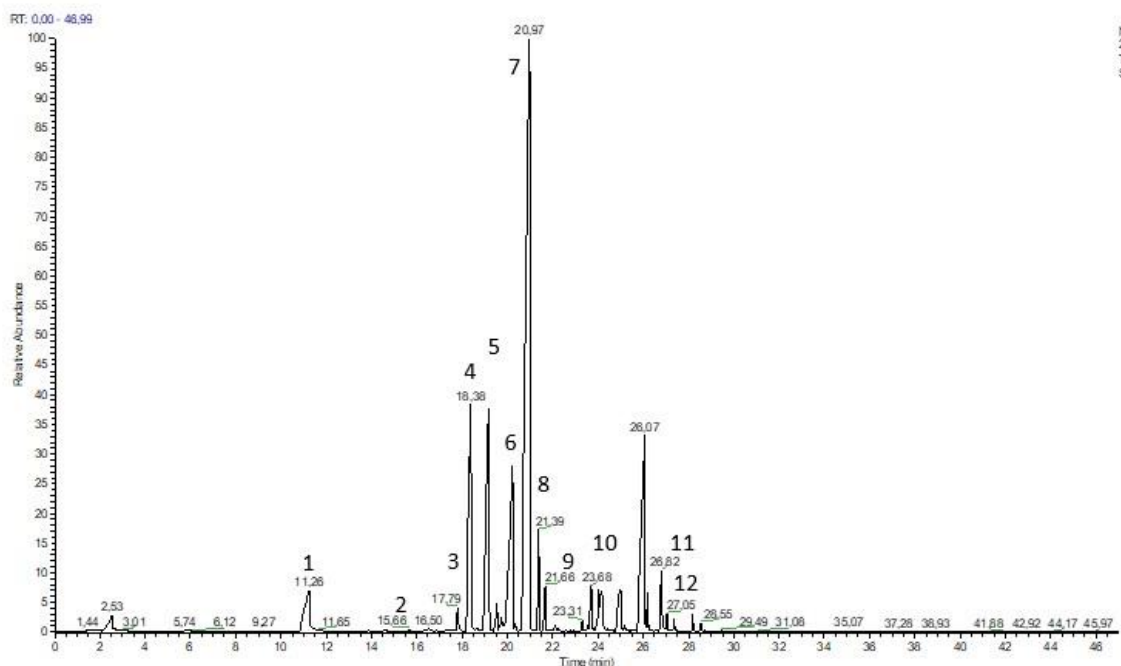
### 3.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

#### 3.2.1 Ταυτοποίηση και ημιποσοτικοποίηση των πτητικών συστατικών του σαφράν με SPME-GC-MS και βελτιστοποίηση με RCCD-RSM

Για τα πειράματα SPME παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικά δοκιμαστικά δείγματα, έχοντας ως κύριο στόχο, την εύρεση καταλληλότερου διαλύτη για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης σε σαφρανάλη:

- I. Δείγμα χωρίς διαλύτη
- II. Δείγμα με διαλύτη νερό
- III. Δείγμα με διαλύτη διαιθυλαιθέρα

Το πρώτο δοκιμαστικό δείγμα προς ανάλυση, παρασκευάστηκε σύμφωνα με τους D' Archivio, Pietro, Maggi & Rossi (2018) ως εξής: Ζυγίστηκαν 20,3 mg σκόνης αποξηραμένων στιγμάτων κρόκου τα οποία τοποθετήθηκαν απουσία διαλύτη, σε γυάλινο φιαλίδιο 15 mL με PTFE/silicon spectra. Ακολούθησε υδατόλουτρο στους 45 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η ίνα εισήχθη στον αέριο χρωματογράφο από τον οποίο παραλήφθηκε το χρωματογράφημα και οι αντίστοιχες ενώσεις στον Πίνακα 4 που ακολουθεί.



Εικόνα 13 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν χωρίς διαλύτη

Πίνακας 4 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από δείγμα χωρίς προσθήκη διαλύτη

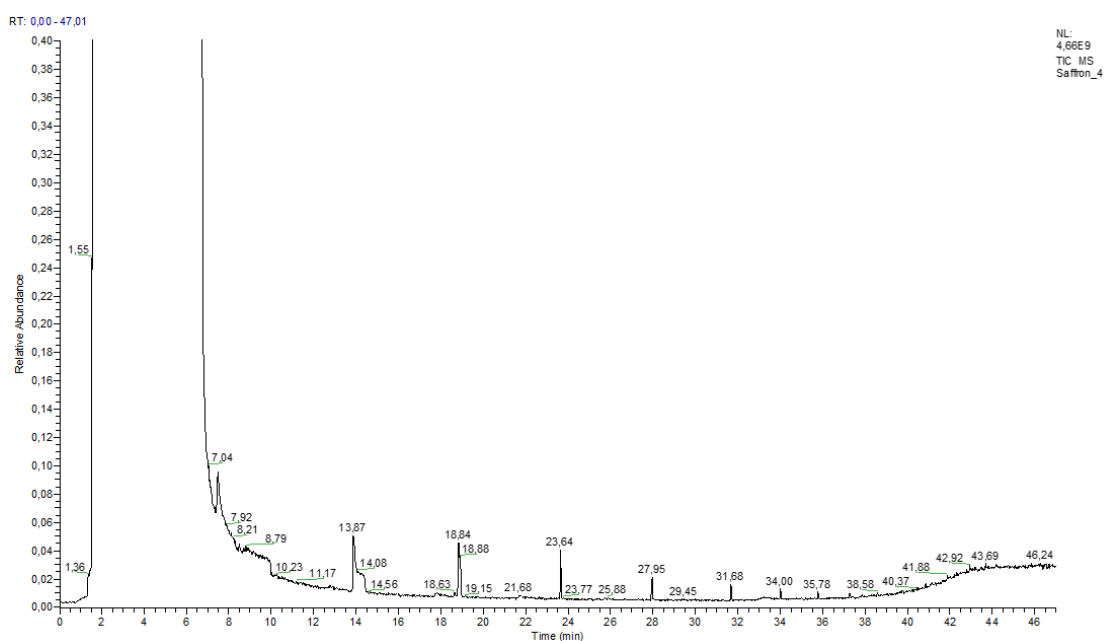
Αρ. Κορυφής	Χρόνος κατακράτησης	Ένωση	%Εμβαδό
<b>1</b>	11,26	2(5H) Φουρανόνη	4,8
<b>2</b>	15,66	3,5,5 – τριμεθυλοκυκλοεξεν -1 - ονη	0,1
<b>3</b>	17,79	7,7- διμεθυλδικυκλο [4.1.0]-επταν-2- ενκαρβοξαλδεϋδη	0,8
<b>4</b>	18,38	Ισοφορόνη	11,8
<b>5</b>	19,19	2,6,6- τριμεθυλο-2- κυκλοεξεν- 1,4- διόνη	15,2
<b>6</b>	20,24	2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξαν- 1,4- διόνη	12,4
<b>7</b>	<b>20,97</b>	<b>Σαφρανάλη</b>	<b>49,6</b>
<b>8</b>	21,39	2,6,6- τριμεθυλο-2,4-κυκλοεπταδιεν- 1- όνη	2,2
<b>9</b>	23,31	2,6,6- τριμεθυλο-2- κυκλοεξεν- 1,4- διόνη	0,3

<b>10</b>	24,12	3,5,5- τριμεθυλ- 2-κυκλοεξ-2 -ονη	2,1
<b>11</b>	27,05	2,6,6- τριμεθυλ- 1-κυκλοεξενυλ-1-βουτανόνη	0,4
<b>12</b>	27,36	-unknown-	0,3

Οι ενώσεις 1,2,4,5,6,7 με κύρια επίσης τη σαφρανάλη, ανιχνεύονται και στο Ιταλικό σαφράν σε μελέτη των D' Archivio et.al, οι οποίοι ανέλυσαν την σύσταση του σαφράν με τη μέθοδο SPME, χρησιμοποιώντας ένα πολυδιμεθυλοσιλοξανίου 100 μm (Supelco, Bellafonte, PA, USA).

Ωστόσο, όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα, προέκυψε μη ικανοποιητική ποσότητα σαφρανάλης (~50%) και έτσι κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη κατάλληλου διαλύτη με σκοπό την αύξηση του %εμβαδού της. Η σαφρανάλη, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, είναι το βασικό συστατικό υπεύθυνο για το άρωμα, γεγονός που καθιστά την εκχύλιση και ανάλυσή της εξαιρετικά χρήσιμη για την κατηγοριοποίηση του σαφράν ως προς την εμπορική του ποιότητα και αξία.

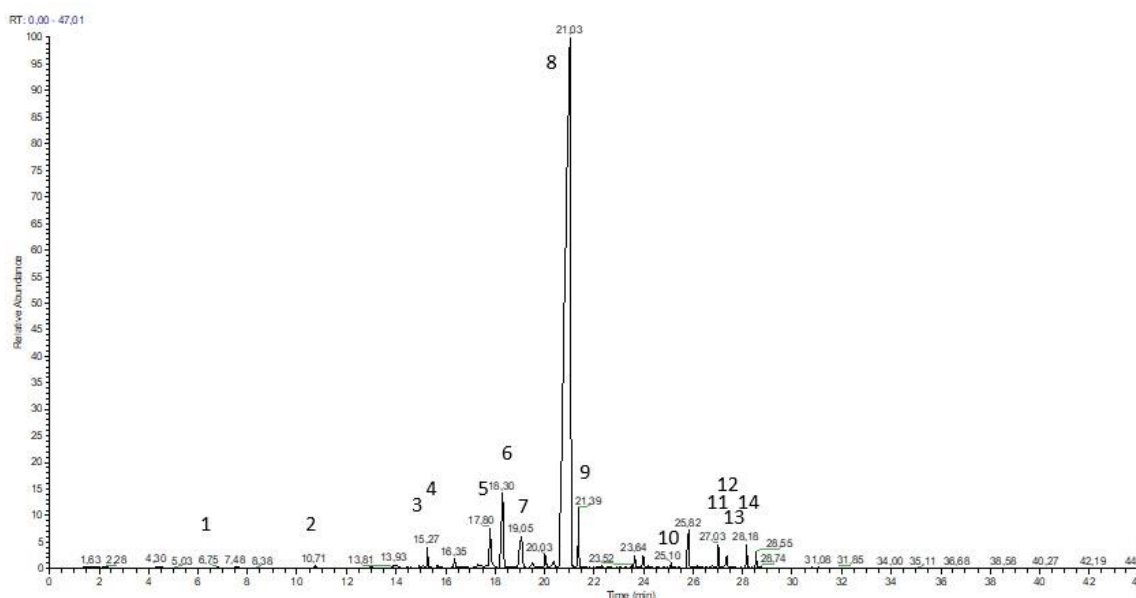
Στην επόμενη δοκιμή, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης διαιθυλαιθέρας ( $C_4H_{10}O$ ) 99,5%, όμως όπως είναι εμφανές και από το αντίστοιχο χρωματογράφημα, το %εμβαδό της κορυφής που αντιστοιχεί στη σαφρανάλη ήταν εξαιρετικά μικρό. Η μεγάλη κορυφή που παρατηρείται, αντιστοιχεί στον διαλύτη.



Εικόνα 14 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν με διαλύτη  $C_4H_{10}O$

Κάτι τέτοιο, θα μπορούσε να αποδοθεί στη μεγάλη πτητικότητα που χαρακτηρίζει τον διαθλαιθέρα, γεγονός που οδήγησε σε κορεσμό της χρησιμοποιούμενης ίνας και επομένως αδυναμία να προσροφήσει άλλες πτητικές ενώσεις, με κύρια τη σαφρανάλη.

Στο τρίτο κατά σειρά δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το νερό. Ο συγκεκριμένος διαλύτης επιλέχθηκε αφενός για την προσδοκώμενη αύξηση της παραλαμβανόμενης ποσότητας σαφρανάλης και αφετέρου για να προσομοιωθούν οι συνθήκες μαγειρέματος του σαφράν. Πράγματι, στη δοκιμή που ακολούθησε, η παρουσία του νερού ως διαλύτη, αύξησε στο χρωματογράφημα την περιοχή της σαφρανάλης σημαντικά (84,5%), επομένως το νερό κρίθηκε ως κατάλληλος διαλύτης για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Παρατίθεται το σχετικό χρωματογράφημα καθώς και οι αντίστοιχες ενώσεις που αντιστοιχούν σε αυτό στον Πίνακα 5.



Εικόνα 15 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν με διαλύτη H<sub>2</sub>O



Πίνακας 5 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από δείγμα με διαλύτη H<sub>2</sub>O

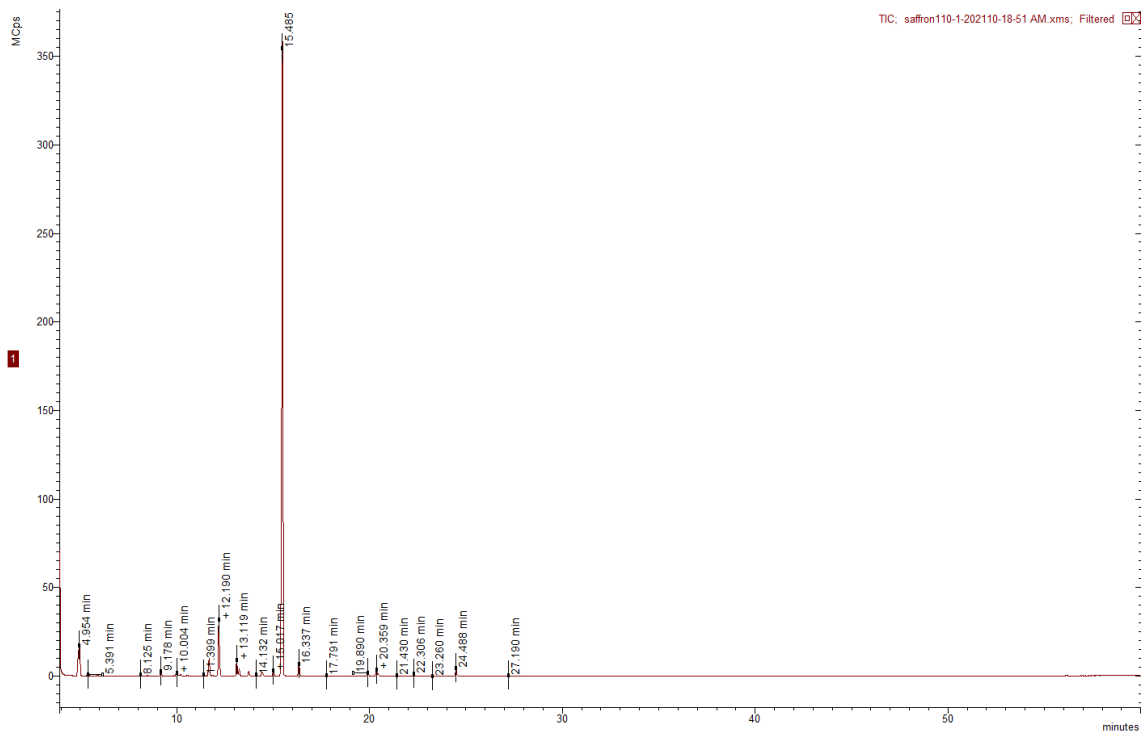
Αρ. Κορυφής	Χρόνος κατακράτησης	Ένωση	%Εμβαδό
1	6,75	Εξανάλη	0,1
2	10,71	Επτανάλη	0,2
3	15,27	1-μεθυλο-4-(2-προπ-ενυλο)-κυκλοεξένιο (λεμονένιο)	0,8
4	15,66	3,5,5-τριμεθυλο-κυκλοεξεν-1-όνη	0,2
5	17,8	7,7-διμεθυλ-δικυκλο[4.1.0]-επταν-2- εν-καρβοξαλδεΐδη	2,4
6	18,3	Ισοφορόνη	4,6
7	19,05	2,6,6-τριμεθυλο- 2- κυκλοεξεν-1,4- διόνη	2,8
8	21,03	<b>Σαφρανάλη</b>	<b>84,5</b>
9	21,39	2,6,6-τριμεθυλο-2,4-κυκλοεπταδιεν- 1-όνη	2,0
10	25,1	(4,6(E),8(E),μεγαστίγμα-τριένιο	0,1
11	27,03	2,6,6-τριμεθυλ- 1- κυκλοεξενυλ-1- βουτανόνη	0,8
12	27,28	2,6,6-τριμεθυλ- 1- κυκλοεξενυλ-1- βουτανόλη	0,1
13	27,36	- Unknown-	0,5
14	28,18	4-(2,6,6-τριμεθυλο-1-κυκλοεξεν- 1- υλο)-3 -βουτεν- 2-όνη (β-ιονόνη)	0,8

Παρατηρείται ότι ενώσεις όπως η 3,5,5-τριμεθυλο-κυκλοεξεν-1-όνη, η ισοφορόνη, η 2,6,6-τριμεθυλο-2,4-κυκλοεπταδιεν-1-όνη και φυσικά η σαφρανάλη, ανιχνεύονται τόσο στο δείγμα χωρίς διαλύτη όσο και στο δείγμα με διαλύτη H<sub>2</sub>O.

Σε επόμενο βήμα και αφού αποφασίστηκε ότι το νερό ανταποκρίνεται ικανοποιητικά ως διαλύτης, παρασκευάστηκε μείγμα αποξηραμένων στιγμάτων σαφράν των ετών 2016 και 2017. Συγκεκριμένα, περιεχόμενο από τα δείγματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, συλλέχθηκαν και αναμείχθηκαν προκειμένου να δημιουργηθεί μία ποσότητα κατάλληλη, τόσο για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο Clevenger όπως περιεγράφηκε νωρίτερα, όσο και για τη διαδικασία των πειραμάτων παραλαβής και εκχύλισης των πτητικών συστατικών του σαφράν με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Σχετικά με τη δεύτερη κατά σειρά μέθοδο, η ομογενοποίηση και

κονιορτοποίησή των στιγμάτων προς δημιουργία σκόνης, έγινε με το χέρι με τη βοήθεια πορσελάνινου ιγδίου.

Κατόπιν ανάλυσης του αιθέριου ελαίου, το ποσοστό της σαφρανάλης υπολογίστηκε σε 75% ενώ τα κύρια πτητικά συστατικά που εντοπίστηκαν με τα αντίστοιχα εμβάδα των κορυφών τους στο χρωματογράφημα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.



Εικόνα 16 Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου σαφράν

Πίνακας 6 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση αιθέριου ελαίου του σαφράν

Χρόνος κατακράτησης (min)	Πτητική ένωση	%εμβαδό
5,39	2- επτανόλη	0,23
9,18	3- κυκλοεξεν-1-όνη	0,58
10,00	Βενζαλδεΐδη	0,56
11,40	Λιναλοόλη	0,18
11,68	2,6,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιενυλ-1-καρβοξαλδεΐδη	1,98
12,19	Ισοφορόνη	6,24
13,12	2,6,6-τριμεθυλο-2-κυκλοεξεν-1,4-διόνη	1,64
13,24	2-υδροξυ- 3,5,5-τριμεθυλο- 2-κυκλοεξενυλ-1-όνη	0,81
15,49	<b>Σαφρανάλη</b>	<b>75,00</b>
16,34	4- μεθυλενο-3,5,5- τριμεθυλο-2-κυκλοεξενυλ-1-όνη	1,29
21,43	[4,6 (Z), 8 (Z) μεγαστιγμα-τριένιο]	0,10
24,49	4-(2,6,6- τριμεθυλο – κυκλοεξεν- 1-υλο)-3 -βουτεν- 2-όνη	0,94
27,19	<i>trans</i> -β-ιονόνη	0,08

Η παραλαβή και η ανάλυση των πτητικών συστατικών του κρόκου, έγινε με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης που περιεγράφηκε εκτενέστερα νωρίτερα. Από το ομογενοποιημένο και κονιορτοποιημένο δείγμα σκόνης που παρασκευάστηκε, πραγματοποιήθηκαν συνολικά 30 επαναλήψεις (runs). Οι επαναλήψεις αυτές αφορούν την παραλαβή και εκχύλιση των πτητικών συστατικών με τη μέθοδο SPME, την ανάλυση αυτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας και εν συνεχεία, τη βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής με την ανάπτυξη κατάλληλου μοντέλου με τη χρήση της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης.

Αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα RCCD-RSM. Στο πρώτο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε ως μεταβλητή απόκρισης η συγκέντρωση της σαφρανάλης (mg/g) που υπολογίστηκε με ημιποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο κυκλοεξανόνη. Η ποσότητα του εσωτερικού προτύπου που προστέθηκε (7  $\mu$ L) βρέθηκε πειραματικά έπειτα από δοκιμές. Στο δεύτερο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε ως μεταβλητή απόκρισης το % εμβαδόν της σαφρανάλης.

### 3.2.2 Βελτιστοποίηση της SPME με RCCD-RSM

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (RCCD), ο οποίος επιτρέπει την ανάλυση των παραγόντων του πειράματος σε 5 επίπεδα με μικρό σφάλμα πρόβλεψης. Οι παράγοντες του πειράματος που διερευνήθηκαν για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για τη μεγιστοποίηση της παραλαβής της σαφρανάλης ήταν τέσσερις. Το A: μάζα του δείγματος, B: ο όγκος του νερού, C: η θερμοκρασία και D: ο χρόνος παραμονής της ίνας στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου. Ως μεταβλητή απόκρισης ορίστηκε η ποσότητα σαφρανάλης σε mg/g δείγματος ή % εμβαδόν.

Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν με τυχαία σειρά, προκειμένου να μειωθεί η επίδραση μη ελεγχόμενων μεταβλητών. Ο συγκεκριμένος σχεδιασμός που πραγματοποιήθηκε, περιλαμβάνει 16 παραγοντικά σημεία, 8 αξονικά και 6 κεντρικά σημεία ενώ η τιμή του  $\alpha$ , ορίστηκε σε  $\alpha=2$ .

Πίνακας 7 Κεντρικός σύνθετος συνδυασμός για τις 4 ανεξάρτητες μεταβλητές ( A,B,C,D) και οι πειραματικές τιμές για τη μεταβλητή απόκρισης (σαφρανάλη)

Επανάληψη	A: μάζα δείγματος (mg)	B: Όγκος νερού (mL)	C: Θερμοκρασία (°C)	D: χρόνος παραμονής ίνας (min)	Σαφρανάλη (mg/g)	%εμβαδό σαφρανάλης
1	15	4	45	40	29,9	95,3
2	35	4	45	20	9,3	95,5
3	35	2	45	40	3,5	93,4
4	15	4	55	40	18,5	94,6
5	15	2	55	20	132,1	94,6
6	25	3	50	30	10,4	94,9
7	35	4	55	20	5,2	94,7
8	25	3	40	30	13,6	95,4
9	15	4	45	20	28,5	96,2
10	35	4	45	40	9,9	94,8
11	15	2	45	40	23,4	95,4
12	25	5	50	30	12,2	94,9
13	25	3	50	30	12,5	95,1
14	25	3	60	30	5,0	92
15	25	3	50	50	8,9	93,6
16	15	2	45	20	19,7	94,9
17	35	2	45	20	6,4	94,7
18	25	3	50	30	11,5	94,7
19	45	3	50	30	4,3	93,9
20	5	3	50	30	76,0	94,4

21	15	4	55	20	16,9	94,9
22	35	2	55	20	4,9	94,4
23	25	3	50	10	8,9	95,4
24	35	2	55	40	3,3	93,2
25	15	2	55	40	11,1	92,9
26	35	4	55	40	5,1	93,1
27	25	1	50	30	5,6	93,1
28	25	3	50	30	9,2	94,3
29	25	3	50	30	7,7	93,9
30	25	3	50	30	8,5	94,6

### Μοντέλο ημιποσοτικοποίησης

Σχετικά με το μοντέλο της ημιποσοτικοποίησης, για να επιτευχθεί καλύτερη γραμμικότητα, εφαρμόστηκε αντίστροφος μετασχηματισμός των δεδομένων (Inverse Transform). Στη συνέχεια επιλέχθηκε το τετραγωνικό μοντέλο με συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ) 0,9241, ενώ οι τιμές για τον προσαρμοσμένο και τον προβλεπόμενο συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ) ήταν 0,8796 και 0,6874, αντίστοιχα. Έτσι, το ζητούμενο τετραγωνικό μοντέλο περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση, όπου  $Y =$  (1/σαφρανάλη) και  $A, B, C, D$ , η μάζα του δείγματος, ο όγκος του νερού, η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής της ίνας αντίστοιχα:

$$Y = 0,1032 + 0,0670A - 0,0232B + 0,0224C + 0,0122D - 0,0215AB + 0,0118AC + 0,0098AD + 0,0097BC - 0,0195BD + 0,0039CD + 0,0039A^2 + 0,0060B^2 + 0,0073C^2 + 0,0013D^2$$

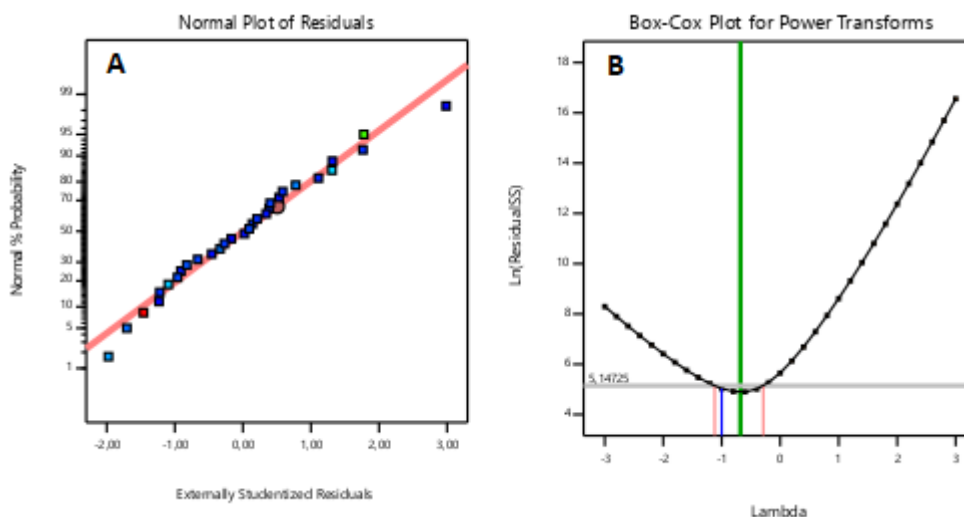
Από τους συντελεστές των παραγόντων της παραπάνω εξίσωσης αλλά και από την Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 8), γίνεται αντιληπτό ότι ο βασικότερος παράγοντας είναι η μάζα του δείγματος και συγκεκριμένα αύξηση αυτής, συνεπάγεται μείωση της ποσότητας της σαφρανάλης. Ακολουθούν κατά σειρά σημαντικότητας ο όγκος του νερού, η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής της ίνας.

Με την παραδοχή ότι ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις εφαρμογής της ANOVA, ο πίνακας που προκύπτει σχετικά με το μοντέλο της ημιποσοτικοποίησης είναι ο παρακάτω Πίνακας 8.

Πίνακας 8 ANOVA για το τετραγωνικό μοντέλο της ημιποσοτικοποίησης της σαφρανάλης

Πηγή μεταβλητότητας	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο άθροισμα τετραγώνων	Κριτήριο F	<i>p-value</i>
<b>Μοντέλο</b>	0,1576	14	0,0113	16,14	0,0001
<b>A-Μάζα δείγματος</b>	0,1077	1	0,1077	154,34	0,0001
<b>B- Όγκος νερού</b>	0,0130	1	0,0130	18,60	0,0006
<b>C-Θερμοκρασία</b>	0,0121	1	0,0121	17,34	0,0008
<b>D-Χρόνος παραμονής ίνας</b>	0,0036	1	0,0036	5,16	0,0383
<b>AB</b>	0.0074	1	0.0074	10.61	0.0053
<b>AC</b>	0.0022	1	0.0022	3.19	0.0945
<b>AD</b>	0.0015	1	0.0015	2.21	0.1577
<b>BC</b>	0.0015	1	0.0015	2.14	0.1639
<b>BD</b>	0.0061	1	0.0061	8.75	0.0098
<b>CD</b>	0.0002	1	0.0002	0.3453	0.5655
<b>A<sup>2</sup></b>	0.0004	1	0.0004	0.5960	0.4521
<b>B<sup>2</sup></b>	0.0010	1	0.0010	1.39	0.2564
<b>C<sup>2</sup></b>	0.0015	1	0.0015	2.09	0.1685
<b>D<sup>2</sup></b>	0.0000	1	0.0000	0.0666	0.7999
<b>Έλλειψη προσαρμογής</b>	0,0087	10	0,0009	2,42	0,1705

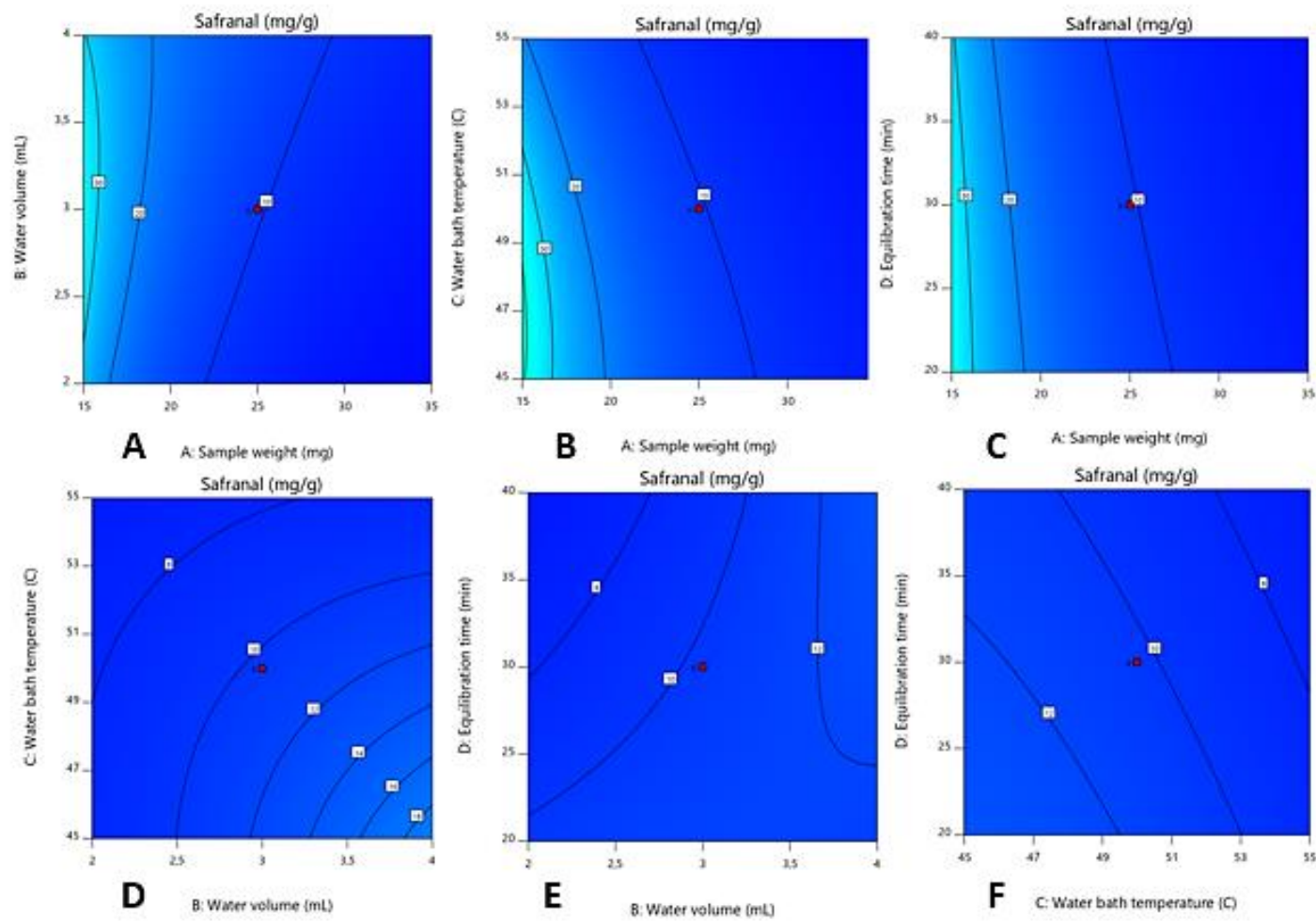
Το μοντέλο είναι σημαντικό, καθώς  $p\text{-value} < 0,05$ . Επιπλέον, όσο μικρότερη τιμή έχει το  $p\text{-value}$  κάθε παράγοντα, τόσο περισσότερο θεωρείται ότι συνεισφέρει. Συνεπώς, παρατηρείται και επαληθεύεται ότι πιο σημαντικός παράγοντας είναι η μάζα του δείγματος, ακολουθούμενο από τον όγκο του νερού, τη θερμοκρασία και τέλος, τον χρόνο παραμονής της ίνας. Η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit), που εκφράζει τα σφάλμα του μοντέλου, δεν θεωρείται σημαντική, καθώς  $p\text{-value} = 0,1705 > 0,05$ .



Εικόνα 17 Διάγραμμα A) υπολοίπων B) Box- Cox

Στο διάγραμμα υπολοίπων (residuals) (Εικόνα 7A), οι μεταβλητές απόκρισης φαίνεται να μην αποκλίνουν από τις παραδοχές για το τετραγωνικό μοντέλο το οποίο εφαρμόστηκε, ενώ από το Box-Cox test (Εικόνα 7B) προέκυψε ότι ο αντίστροφος μετασχηματισμός που εφαρμόστηκε ήταν κατάλληλος για τα δεδομένα.

Τα διαγράμματα contour που ακολουθούν, είναι χρήσιμα για την εύρεση του εύρους των παραγόντων που μεγιστοποιούν τη μεταβλητή απόκρισης, καθώς και για τη σημαντικότητα καθενός εξ' αυτών. Έτσι, είναι εμφανές πως για την αύξηση της απόδοσης σε σαφρανάλη η μάζα του δείγματος θα πρέπει να μην υπερβαίνει τα 16 mg και ο όγκος του νερού να φτάνει τα 4 mL (περιοχή με γαλάζιο χρώμα) (Εικόνα 8A). Ομοίως, εάν η θερμοκρασία υπερβεί τους 53 °C θα υπάρξει μείωση στην ποσότητα σαφρανάλης (Εικόνα 8B) ενώ ο χρόνος παραμονής της ίνας στον υπερκείμενο χώρο, θα πρέπει να είναι προσεγγιστικά στα 40 min (Εικόνα 8C).



Εικόνα 18 Διαγράμματα contour αλληλεπίδρασης μεταξύ: A: Μάζας δείγματος και όγκου νερού B: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας C: Μάζας δείγματος και χρόνου D: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας E: Όγκου νερού και χρόνου F: Θερμοκρασίας και χρόνου



Για το μοντέλο της ημιποσοτικοποίησης, από το λογισμικό Design Expert, προέκυψαν οι βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή της σαφρανάλης, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9 Βέλτιστες συνθήκες παραλαβής της σαφρανάλης για το μοντέλο ημιποσοτικοποίησης της σαφρανάλης

<b>Μάζα δείγματος</b>	15 mg
<b>Όγκος νερού</b>	4 mL
<b>Θερμοκρασία</b>	45 °C
<b>Χρόνος παραμονής της ίνας</b>	40 min

### Μοντέλο % εμβαδού

Όπως και προηγουμένως, στο δεύτερο μοντέλο όπου μελετήθηκε το %εμβαδό, οι παράγοντες του πειράματος που διερευνήθηκαν για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της διαδικασίας ήταν τέσσερις. Η μάζα του δείγματος, ο όγκος του νερού, η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής της ίνας. Ως μεταβλητή απόκρισης ορίστηκε η ποσότητα σαφρανάλης εκφρασμένη σε %εμβαδό.

Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση είναι το γραμμικό, όπως περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση, όπου  $Y = \%$ εμβαδό σαφρανάλης, και A, B, C, D οι κωδικοποιημένες μεταβλητές για τη μάζα του δείγματος, τον όγκο του νερού, τη θερμοκρασία και τον χρόνο παραμονής της ίνας αντίστοιχα:

$$Y = 94,44 - 0,2558A + 0,3750B - 0,6181C - 0,4528D$$

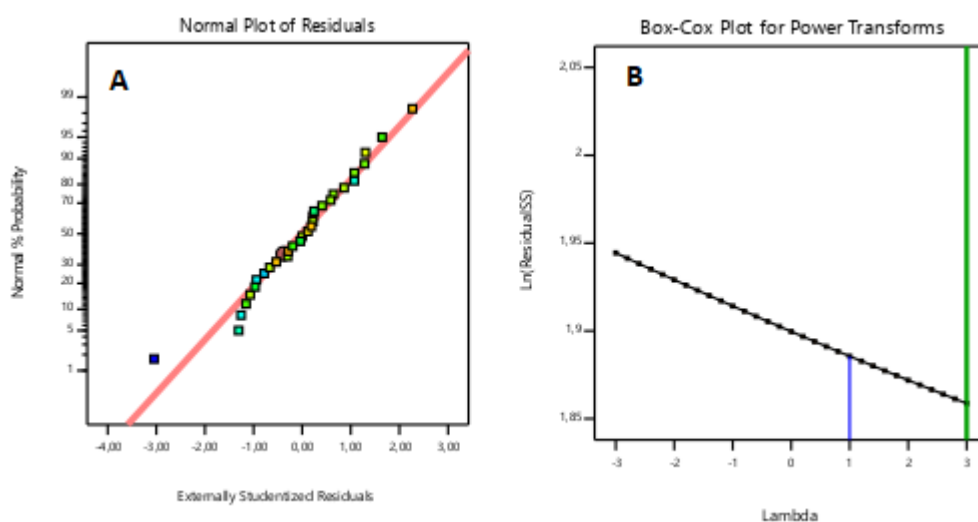
Σε αυτή την περίπτωση και λαμβάνοντας υπόψιν τους συντελεστές των μεταβλητών, ο πιο σημαντικός παράγοντας φαίνεται να είναι η θερμοκρασία, καθώς με αύξηση αυτής το %εμβαδό της σαφρανάλης μειώνεται. Ακολουθούν κατά σειρά σημαντικότητας ο χρόνος παραμονής της ίνας, ο όγκος του νερού και η μάζα του δείγματος.

Με την παραδοχή ότι ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις εφαρμογής ANOVA test, ο πίνακας που προκύπτει σχετικά με το μοντέλο του %εμβαδού είναι ο παρακάτω:

Πίνακας 10 ANOVA για το γραμμικό μοντέλο του %εμβαδού της σαφρανάλης

Πηγή μεταβλητότητας	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο άθροισμα τετραγώνων	Κριτήριο F	P-value
Μοντέλο	19,04	4	4,76	18,05	0,0001
A-Μάζα δείγματος	1,57	1	1,57	5,96	0,0221
B- Όγκος νερού	3,37	1	3,37	12,80	0,0015
C-Θερμοκρασία	9,17	1	9,17	34,98	0,0001
D-Χρόνος παραμονής ίνας	4,92	1	4,92	5,16	0,0002
Έλλειψη προσαρμογής	5,76	20	0,2882	1,75	0,2801

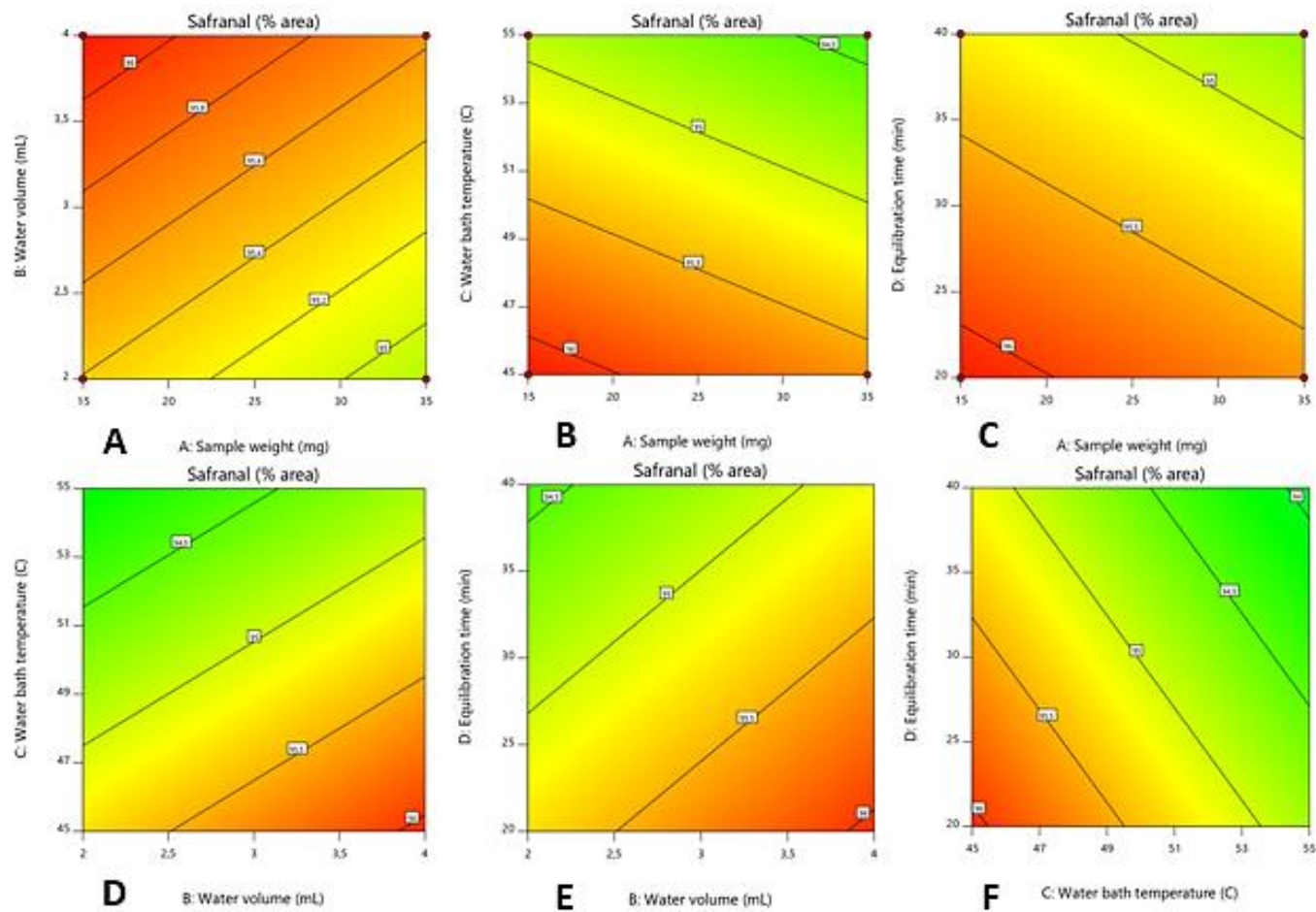
Το μοντέλο είναι σημαντικό, καθώς  $p\text{-value} < 0,05$ . Επιπλέον, όσο μικρότερη τιμή έχει το  $p\text{-value}$  κάθε παράγοντα, τόσο περισσότερο θεωρείται ότι συνεισφέρει. Συνεπώς, παρατηρείται και επαληθεύεται ότι πιο σημαντικός παράγοντας είναι η θερμοκρασία, ακολουθούμενη από τον χρόνο παραμονής της ίνας στον υπερκείμενο χώρο, τον όγκο του νερού και τη μάζα του δείγματος. Η έλλειψη προσαρμογής, που εκφράζει τα σφάλμα του μοντέλου, δεν θεωρείται σημαντική, καθώς  $p\text{-value} = 0,2801 > 0,05$ .



Εικόνα 19 Διάγραμμα A) Υπολοίπων B) Box- Cox

Στο διάγραμμα υπολοίπων (Εικόνα 19A), οι μεταβλητές απόκρισης φαίνεται να μην αποκλίνουν από τις παραδοχές για το γραμμικό μοντέλο το οποίο εφαρμόστηκε, γεγονός

που επιβεβαιώνεται και από το box- cox test (Εικόνα 19B), με  $\lambda=1$  το οποίο δηλώνει πως δεν είναι απαραίτητο να γίνει κάποιος μετασχηματισμός.



Εικόνα 20 Διαγράμματα contour αλληλεπίδρασης μεταξύ: A: Μάζας δείγματος και όγκου νερού B: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας C: Μάζας δείγματος και χρόνου D: Μάζας δείγματος και θερμοκρασίας E: Όγκου νερού και χρόνου F: Θερμοκρασίας και χρόνου

Στα διαγράμματα contour, από την Εικόνα 10Α φαίνεται ότι αύξηση του όγκου του νερού στα 4 mL και μείωση της μάζας του δείγματος στα 15 mg οδηγεί σε αύξηση της μεταβλητής απόκρισης, δηλαδή της σαφρανάλης. Επιπλέον, στην Εικόνα 10B φαίνεται πως η βέλτιστη θερμοκρασία παραλαβής της σαφρανάλης είναι περίπου 45 °C, ενώ περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας καθώς και αύξηση του χρόνου παραμονής της ίνας στον υπερκείμενο χώρο, έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη μεταβλητή απόκρισης.

Για το μοντέλο του %εμβαδού, από το λογισμικό design expert που χρησιμοποιήθηκε, προέκυψαν οι βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή της σαφρανάλης οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

*Πίνακας 11 Βέλτιστες συνθήκες παραλαβής σαφρανάλης για το μοντέλο του %εμβαδού*

<b>Μάζα δείγματος</b>	15 mg
<b>Όγκος νερού</b>	4 mL
<b>Θερμοκρασία</b>	45 °C
<b>Χρόνος παραμονής της ίνας</b>	20 min

Οι D' Archivio et al. και Di Donato et al. μελέτησαν επίσης την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και του χρόνου παραμονής της ίνας στον υπερκείμενο χώρο, χρησιμοποιώντας ωστόσο σχεδιασμό τριών επιπέδων. Και στις δύο αυτές μελέτες ο βέλτιστος χρόνος παραμονής ήταν στα 30 λεπτά ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 45 °C για την πρώτη ομάδα ερευνητών και 50 °C για τη δεύτερη ομάδα. Στην παρούσα μελέτη, η ποσότητα του δείγματος σαφράν καθώς και προσθήκη νερού ως διαλύτη, φαίνεται να έπαιξαν καθοριστικό ρόλο για την παραλαμβανόμενη ποσότητα σαφρανάλης, ενώ βιβλιογραφικά φαίνεται να υπάρχει έλλειψη αναφορών σχετικά με την επίδραση αυτών των παραγόντων. Οι D' Archivio et al. χρησιμοποίησαν μεγαλύτερες ποσότητες σαφράν 20-40 mg ενώ άλλες ερευνητικές ομάδες ακόμα μεγαλύτερες 50 (Karabagias, Koutsoumprou, Liakou, Kontakos, Kontominas, 2017), 100 mg (D'Auria, Mauriello, Rana, 2004; Du, Wang, Hu, Yao, 2008; Tahri et. al, 2015; D'Auria, Mauriello, Racioppi, Rana, 2006) παράγοντας που αυξάνει κατά πολύ το κόστος της ανάλυσης.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, το μοντέλο RSM προτείνει τη χρήση μόλις 15 mg, ποσότητας ικανής για την ανάλυση του δείγματος με SPME-GC-MS. Συγκρίνοντας λοιπόν, τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών μοντέλων πειραμάτων που αναπτύχθηκαν, προέκυψε ότι η βέλτιστη επιλογή είναι η χρήση του δεύτερου μοντέλου με το % εμβαδόν (Πίνακας

11). Αυτό συμβαίνει, διότι εφαρμόζοντας ένα μοντέλο RSM, στόχος είναι η βέλτιστη απόδοση με τη μεγαλύτερη δυνατή «οικονομία» χρόνου, δείγματος και λοιπών παραγόντων, συνεπώς το δεύτερο μοντέλο υπερτερεί έναντι του πρώτου, καθώς ο χρόνος παραμονής της ίνας μειώνεται από τα 40 στα 20 λεπτά εξοικονομώντας αρκετό χρόνο.

Στη συνέχεια, έχοντας βρει τον βέλτιστο συνδυασμό συνθηκών για την παραλαβή της σαφρανάλης, ακολούθησε ένας νέος κύκλος 20 επιβεβαιωτικών πειραμάτων στις συνθήκες αυτές, με δείγματα που επίσης χορηγήθηκαν από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης, η συγκομιδή των οποίων έλαβε χώρα κατά τα έτη 2018 και 2019. Συγκεκριμένα τα δείγματα αποξηραμένων στιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και η απόδοση σε σαφρανάλη του καθενός από αυτά εκφρασμένη σε %εμβαδό, παρουσιάζονται στον Πίνακα 12:

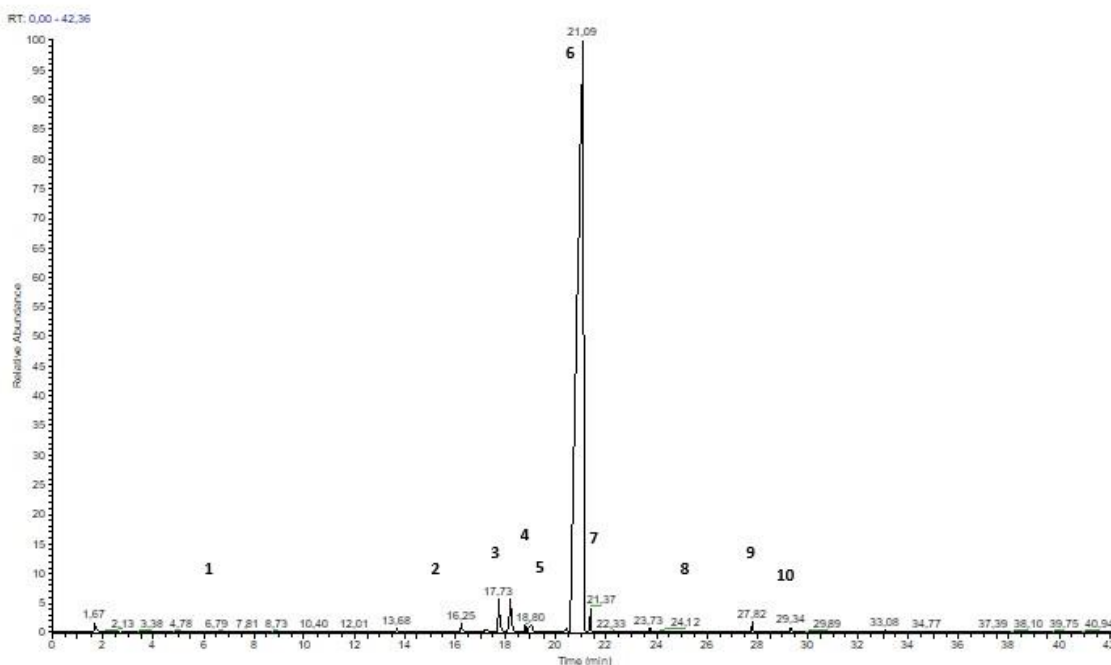
*Πίνακας 12 Εμβαδό σαφρανάλης σε δείγματα που αναλύθηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες*

<b>Δείγμα 1</b>	Extra Bio EU 2018	92,9%
<b>Δείγμα 2</b>	Extra Bio 2018	94,2%
<b>Δείγμα 3</b>	Extra Bio 2018	94,2%
<b>Δείγμα 4</b>	Extra Bio 2018	94,9%
<b>Δείγμα 5</b>	Bio EU 2018	94,3%
<b>Δείγμα 6</b>	Extra Bio 2018	94,6%
<b>Δείγμα 7</b>	Extra Bio 2018	94,0%
<b>Δείγμα 8</b>	Standard 2018	94,9%
<b>Δείγμα 9</b>	Extra Bio 2018	95,7%
<b>Δείγμα 10</b>	Standard 2018	94,9%
<b>Δείγμα 11</b>	Bio EU 2019	95,4%
<b>Δείγμα 12</b>	Bio Suisse 2019	95,3%
<b>Δείγμα 13</b>	Extra Bio 2019	95,9%
<b>Δείγμα 14</b>	Extra Bio 2019	94,9%
<b>Δείγμα 15</b>	Standard 2019	94,3%
<b>Δείγμα 16</b>	Extra Bio EU 2019	95,5%
<b>Δείγμα 17</b>	Standard 2019	95,9%
<b>Δείγμα 18</b>	Standard 2019	94,9%
<b>Δείγμα 19</b>	Bio EU 2019	96,0%
<b>Δείγμα 20</b>	Bio EU 2019	94,5%

Πίνακας 13 Μέσος όρος, Τυπική απόκλιση και διάστημα πρόβλεψης της σαφρανάλης με βάση τα 20 επιβεβαιωτικά δείγματα

Μεταβλητή απόκρισης	Προβλεπόμενος Μ.Ο.	Τυπική απόκλιση	95% κατώτερο διάστημα πρόβλεψης	Μ.Ο. δεδομένων	95% ανώτερο διάστημα πρόβλεψης
Σαφρανάλη	96,1	0,513	95,6	95,1	96,7

Ενδεικτικά, παρατίθεται ένα χρωματογράφημα από το παραπάνω σετ πειραμάτων με τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν μέσω της ανάλυσης GC-MS (Εικόνα 11).



Εικόνα 21 Χρωματογράφημα δείγματος σαφράν με διαλύτη H<sub>2</sub>O που αναλύθηκε υπό τις βέλτιστες συνθήκες

Πίνακας 14 Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση δείγματος σαφράν στις βέλτιστες συνθήκες

Αρ. κορυφής	Χρόνος κατακράτησης	Ένωση	%Εμβαδό
1	6,1	Εξανάλη	0,1
2	15,54	3,5,5-τριμεθυλο-κυκλοεξεν-1-όνη	0,1
3	17,73	2,6,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιενυλ-1-καρβοξαλδεϋδη	1,9
4	18,19	Ισοφορόνη	1,1

<b>5</b>	18,9	2,6,6- τριμεθυλο- 2- κυκλοεξεν-1,4-διόνη	0,2
<b>6</b>	<b>21,09</b>	<b>Σαφρανάλη</b>	<b>95,7</b>
<b>7</b>	21,37	4- μεθυλενο- 3,5,5-τριμεθυλο-2-κυκλοεξενυλ-1-όνη	0,6
<b>8</b>	25,42	[4,6 (Z), 8 (Z) μεγαστιγμα-τριένιο]	0,1
<b>9</b>	27,82	2,6,6- τριμεθυλ-1- κυκλοεξενυλ-2-βουτανόνη	0,2
<b>10</b>	29,34	4- (2,6,6-τριμεθυλο-1-κυκλοεξεν-1-υλο)-3-βουτεν-2-όνη (β-ιονόνη)	0,2

### 3.3 Σχόλια-Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για τη μέθοδο SPME κρίθηκε μεγάλης σημασίας προκειμένου να παραληφθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα σαφρανάλης από το κάθε δείγμα. Η αρχική επιλογή του διαιθυλαιθέρα ως διαλύτη, οδήγησε σε μη ανίχνευση σαφρανάλης. Η δοκιμή με διαλύτη νερό, αύξησε το ποσοστό της σαφρανάλης σε ~84,5% (Πίνακας 5) ενώ το ποσοστό αυτό χωρίς τη χρήση διαλύτη, άγγιζε μόλις το 49,6% (Πίνακας 4). Στα επιβεβαιωτικά πειράματα το ποσοστό αυτό αυξήθηκε περαιτέρω και έφτασε το 95,7% (Πίνακας 12), ποσοστό μεγαλύτερο και από αυτό που λήφθηκε από την ανάλυση του αιθέριου ελαίου, δηλαδή 75% (Πίνακας 6).

Γενικά, τα αποτελέσματα της μελέτης με χρήση των βέλτιστων συνθηκών που προέκυψαν από τη μεθοδολογία RSM έδωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό σαφρανάλης που θα μπορούσε να ληφθεί, ένωση πολύ σημαντική για το σαφράν αφού παρουσιάζει μεγάλη βιοδραστικότητα, συνεισφέρει περισσότερο από κάθε άλλη στο άρωμα του και φυσικά αποτελεί δείκτη ποιότητάς του. Τα παραπάνω επιτεύχθηκαν με μεγάλη εξοικονόμηση στην ποσότητα δείγματος καθώς και σε χρόνο της διαδικασίας ανάλυσης.



#### 4. Βιβλιογραφία

**Ahmad B.**, Yussof Z., Awang B., Azizi M., Bin F., Rudin M., Saiful M., Bin H., Zait M., Hafizufikry M., Rosian B., Zaki M., (2005). Hydrodistillation process in extracting of agarwood essential oil. Technology and Innovation national conference. Sarawak Malayisa

**Alonso G. L.**, Salinas M. R., Sanchez-Fernandez M. A., Garijo, J., (2001). Composition of crocins and picrocrocin from spanish saffron (*Crocus sativus* L.) Journal of Food Quality. 219-233

**Belardi RG**, Pawliszyn J. Water Pollution Research Journal Can., 1989; 24: 179

**Box**, G.E.P., Draper, N.R. Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses, 2nd Ed., John Wiley & Sons, 2007

**Carmona M.**, Zalacain A., Sanchez A.M., Novella J.L., Alonso G.L., (2006). Crocetin Esters, Picrocrocin and its Related Compounds Present in *Crocus Sativus* and *Gardenia jasminoides* Fruits. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC- ESI- MS Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54, 973-979.

**D' Auria M.**, Mauriello G., Rana G.L., (2004). Volatile organic compounds from saffron. Flavour and Fragrance Journal. 17-23

**D'Auria, M.**; Mauriello, G.; Racioppi, R.; Rana, G.L. (2006) Use of SPME-GC-MS in the Study of Time Evolution of the Constituents of Saffron Aroma: Modifications of the Composition During Storage. J. Chromatogr. Sci. , 44, 18–21

**D' Archivio A.A.**, Di Pietro L., Maggi M.A., Rossi L., (2018). Optimization Using Chemometrics of HS- SPME/ GC-MS Profiling of Saffron Aroma and Identification of Geographical Volatile Markers. Eur. Food Res. Technol. 2018, 244, 1605-1613

**Di Donato F.**, D'Archivio A.A., Maggi M.A., Rossi, L. Detection of Plant-Derived Adulterants in Saffron (*Crocus sativus* L.) by HS-SPME/GC-MS Profiling of Volatiles and Chemometrics. Food Anal. Methods **2021**, 14, 784–796.

**Du H.**, Wang J., Hu Z., Yao X., (2008). Quantative Structure- Retention Relationship Study of the Constituents of Saffron Aroma in SPME- GC- MS Based on the Projection Pursuit Regression Method. 360-365

**Gresta F.**, Lombardo G.M., Siracusa L., Ruberto G., (2008). Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28, 95-112.

**Hosseinzadeh H.**, Jahanian Z. Effect of *Crocus sativus* L (saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res* . 2010;24:726–730. [[PubMed](#)]

**Hosseinzadeh H.**, Noraei N., (2009). Anxiolytic and Hypnotic effect of *Crocus sativus* Aqueous extract and its constituents, Crocin and Safranal in mice. Wiley Interscience. 778-774

**Jalali-Heravi, M.**; Parastar, H.; Ebrahimi-Najafabadi, H. Characterization of volatile components of Iranian saffron using factorial-based response surface modeling of ultrasonic extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 6088–6097

**Kanakis Ch.**, Daferera D., Tarantilis P. A., Polissiou M., (2004). Qualitative Determination of Volatile Compounds and Quantitative Evaluation of Safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 4515-4521.

**Karabagias, I.K.**; Koutsoumpou, M.; Liakou, V.; Kontakos, S.; Kontominas, M.G. (2017) Characterization and Geographical Discrimination of Saffron from Greece, Spain, Iran, and Morocco Based on Volatile and Bioactivity Markers, Using Chemometrics. *Eur. Food Res. Technol.*, 243, 1577–1591

**Kumar R.**, Singh V., Devi K., Sharma M., Singh M.K., Ahuja P.S., (2008). State of Art of Saffron (*Crocus sativus* L.) Agronomy: A Comprehensive Review. *Food Reviews International*. 44-85

**Kurechi T.**, Kikugawa K, Kato T, Numasato T. 1980. Studies on the antioxidants.13. Hydrogen donating capability of antioxidants to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Chem Pharm Bull* 28: 2089–2093

**Maggi L.**, Carmona M., Campo C. P., Kanakis C., Anastasaki E., Tarantilis P., Polissiou M., Alonso G. (2009). Worldwide market screening of saffron volatile composition. Wiley Interscience

- Maggi, L.**; Carmona, M.; Zalacain, A.; et al. Changes in saffron volatile profile according to its storage time. *Food Research International* 2010, 43, 1329–1334
- Mardani H.**, Maninang J., Appiah K.S., Oikawa Y., Azizi M., Fujii Y. (2019). Evaluation of Biological Response of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) and Weeds to Safranal Allelochemical of Saffron (*Crocus sativus*) by Using Static Exposure Method. *Molecules* 2019
- Mohamadi M.**, Shamspur T., Mostafavi A., 2013. Comparison of microwave assisted distillation and conventional hydrodistillation in the essential oil extraction of flowers *Rosa damascena* Mill. *Journal of Essential oil research*, 55-61 pp.
- Montgomery, D. C.**, Design and analysis of experiments. Eighth edition (2012) – John Wiley, New York
- Myers, R. H.** and Montgomery, D. C., Response Surface Methodology (2002) – John Wiley, New York
- Mzabri B.**, Addi M., Berrichi A., (2019). Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*). *Cosmetics* 69
- Pillonel, J. L.**, Bossetw O., Tabacchi R., 2002. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile, a review. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35, 1-14
- Pintado C.**, Miguel A., Acevedo O., Nozal L., Novela J., Rotger R., (2011). Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage. *Food control* 22, 638-642.
- Raina B.**, Agarwal S., Bhatia A., Gaur G.,(1996). Changes in Pigments and Volatiles of Saffron (*Crocus sativus*L) During Processing and Storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 27-32.
- Renau-Morata B.**, Nebauer S., Gracia- Carpintero V., Canizares J., Gomez- Minguet E., Mozos M., Molina R., (2021). Flower induction and development in saffron: Timing and hormone signalling pathways. *Industrial Crops and Products* 164
- Rios J. L.**, Recio M. C., Giner R. M., Manez S. (1996). An update review of saffron active constituents. *Phytotherapy Research* vol. 10, 198-193.

**Sadgrove** N., Jones G., (2015). A contemporary introduction to essential oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Journal Agriculture* issn: 2077-0472, (pp. 48-102).

**Sampathu** S.R, Shivashankar S., Lewis Y.S., Wood A.B., (2009). Saffron (*Crocus Sativus* Linn.) -Cultivation, processing, chemistry and standardization. *Journal of Food Science and Nutrition*. 123-157.

**Schmidt** E, 2010. Production of essential oils. In: Baser, K.H.C and Buchbauer, G, *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, United states of America. 991 pp

**Skinner** M., Ghalehgolabbehbahani A., Parker B., Misza K.Z., (2017). Drying Saffron. North American Center for Saffron Research and Development University of Vermont, Burlington

**Tahri**, K.; Bougrini, M.; Saidi, T.; Tiebe, C.; El Alami-El Hassani, N.; El Bari, N.; Hübert, T.; Bouchikhi, B. (2015) Determination of Safranal Concentration in Saffron Samples by Means of VE-Tongue, SPME-GC-MS, UV-Vis Spectrophotometry and Multivariate Analysis. In *Proceedings of the 2015 IEEE SENSORS*, Busan, Korea, pp. 1–4

**Tandon** S, 2008. Distillation technology for essential oils. In: Handa, S.S., Khanuja S.P.S., Longo, G. and Rakesh D.D (eds). *Extraction technologies for Medicinal and Aromatic plants*. International centre for Science and High Technology. Trieste, Italy. pp. 260.

**Tarantilis** P. A., Polissiou M., (1997). Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus* L.) *J. Agric. Food Chem*, 459-462.

**Tarantilis** P.A., Tsoupras G., Polissiou M., (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 699, 107-118.

**Tirillini** B., Pagiotti R., Menghini L., Miniati E., (2011). The volatile Organic Compounds from Tepals and Anthers of Saffron Flowers (*Crocus Sativus* L.). *Journal of Essential Oil Research*. 37-41

**Winterhalter P., Straubinger M., (2007).** Saffron: renewed interest in an ancient spice.  
Food Reviews International

**Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, (2003),** Τόμος 2,  
Κεφάλαιο IV, άρθρο 42, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα

**Παπανικολάου Κ., (2005).** Συμβατική και βιολογική καλλιέργεια του κρόκου στην  
περιοχή της Κοζάνης. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή  
Γεωπονικών Επιστημών. Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού  
Περιβάλλοντος.

**Φυτολογία,** εκδοτική Αθηνών, 1983