



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

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βελτιστοποίηση της παραλαβής των μη πτητικών συστατικών του saffron (*Crocus sativus* L.) με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης



Ελένη Δ. Κουγιανού

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 παραλαβής των μη πτητικών συστατικών του saffron
(*Crocus sativus* L.) με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης

“Optimization of the recovery of the non-volatile components of saffron
(*Crocus sativus* L.) by the solid phase extraction method”

Ελένη Δ. Κουγιανού

Εξεταστική επιτροπή:

Πέτρος Α. Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Χρήστος Παππάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Βελτιστοποίηση της παραλαβής των μη πτητικών συστατικών του saffron (*Crocus sativus* L.) με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κόκκινα αποξηραμένα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* L., τα οποία αποτελούν το μπαχαρικό saffron, παρουσιάζουν αποδεδειγμένες φαρμακευτικές ιδιότητες καθιστώντας το μπαχαρικό αυτό εκτός από ένα λειτουργικό άρτυμα της παγκόσμιας κουζίνας, ως μια πιθανά αποτελεσματική θεραπεία για μια σειρά παθήσεων. Το saffron οφείλει τις ιδιότητες αυτές στις κύριες βιοδραστικές του ενώσεις, τις οποίες αποτελούν οι κροκίνες, η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη. Ειδικότερα οι κροκίνες και τα καροτενοειδή του φυτού είναι υπεύθυνα για το χρώμα του, η πικροκροκίνη για την χαρακτηριστική του γεύση και τέλος η σαφρανάλη αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό του αρώματός του.

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής μελέτης, ήταν η βελτιστοποίηση της διαδικασίας παραλαβής των μη πτητικών συστατικών του φυτού, δηλαδή των κροκίνων και της πικροκροκίνης. Ο λόγος για τον οποίο είναι σημαντικό να ληφθούν οι ουσίες αυτές στην μεγαλύτερη ποσότητα με την ταχύτερη και οικονομικότερη μέθοδο, είναι η διευκόλυνση της εμπορικής επεξεργασίας και διάθεσής τους, καθώς ο *Crocus sativus* L. ανήκει στην ενδημική χλωρίδα της χώρας μας και συγκεκριμένα της Κοζανίτικης υπαίθρου.

Στόχος μας ήταν η ανάπτυξη ενός στατιστικού μοντέλου το οποίο θα προτείνει τις βέλτιστες συνθήκες για την λήψη των ζητούμενων δευτερογενών μεταβολιτών. Για να πραγματοποιηθεί αυτός ο ερευνητικός στόχος, έγινε χρήση της μεθόδου εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction), η οποία αποτελεί ταχεία οδό στην εκλεκτική παραλαβή ενώσεων συνδυασμένη με τον κατάλληλο διαλύτη. Επιπλέον για να οριστούν οι ιδανικές πειραματικές παράμετροι, εφαρμόστηκε η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (response surface methodology).

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια.

(α) Παραλαβή βασισμένη σε συνθήκες της βιβλιογραφίας. Η αρχική εκχύλιση του δείγματος πραγματοποιήθηκε υδατοδιαλυτά σε λουτρό υπερήχων, και μετά την απομάκρυνση του στερεού υπολείμματος από αυτό, ακολούθησε η εκχύλιση στερεάς φάσης, λήφθηκε ο συνολικός όγκος του εκλούσματος τμηματικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με την χρήση διαλύματος ακετονιτριλίου (ACN) σε νερό, και στη συνέχεια τα κλάσματα αναλύθηκαν φασματοσκοπικά στο ορατό-υπέρυθρο φάσμα (UV-Vis), καθώς και μέσω της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

(β) Καθορισμός των τριών παραμέτρων που θα διαμορφώσουν το στατιστικό μοντέλο καθώς και του εύρους τους. Αναπτύχθηκαν δύο διαφορετικά μοντέλα, ένα για την πικροκροκίνη και ένα για τις κροκίνες με βάση τα ευρήματα του προηγούμενου σταδίου και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή των διαφορετικών συνδυασμών στις παραμέτρους που προέκυψαν από το στατιστικό πρόγραμμα επεξεργασίας, σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν ήταν ο όγκος του δείγματος (sample volume) σε mL, η περιεκτικότητα του διαλύτη σε ACN (aqueous ACN percent) εκφρασμένη σε ποσοστό % v/v, και ο όγκος του διαλύτη (aqueous ACN volume) σε mL. Για να εξεταστεί η πειραματική απόκριση, τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν φασματοσκοπικά στο ορατό-υπέυρυθρο φάσμα (UV-Vis), με τις τιμές απόκρισής τους να αποτελούν την απορρόφηση στα 257nm για την πικροκροκίνη και την απορρόφηση στα 440nm για τις κροκίνες.

(γ) Διαμόρφωση των βελτιστοποιημένων μοντέλων βάσει των τιμών απορρόφησης που λήφθηκαν από το παραπάνω στάδιο. Αφού καταγράφηκαν οι απορροφήσεις στο λογισμικό στατιστικής επεξεργασίας, έγινε εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών που προέκυψαν και ταυτόχρονη επιβεβαίωση τους σε 20 διαφορετικά φυτικά δείγματα. Η δοκιμή των βέλτιστων παραμέτρων εφαρμόστηκε χρησιμοποιώντας μια κοινή στήλη SPE για την παραλαβή της πικροκροκίνης αλλά και τις κροκίνες διαδοχικά, με στόχο την επιπλέον οικονομία των αναλώσιμων υλικών.

Επιπλέον το αρχικό φυτικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόρφωση των μοντέλων, αναλύθηκε μέσω των μεθόδων υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (LC-MS) και Q-TOF LC/MS ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των επιθυμητών ενώσεων σε αυτό.

Αποτέλεσμα των παραπάνω διαδικασιών ήταν η επιτυχής ανάπτυξη των επιθυμητών μοντέλων καθώς τόσο το μοντέλο της πικροκροκίνης, όσο και αυτό των κροκινών είναι στατιστικά σημαντικά και πρακτικά επαληθεύσιμα.

Επιστημονική περιοχή: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: σαφράν, *Crocus sativus* L., κρόκος Κοζάνης, Μεθοδολογία Επιφανειακών Αποκρίσεων, UV-Vis, HPLC, LC-MS, Q-TOF LC/MS

Optimization of the recovery of the non-volatile components of saffron (*Crocus sativus* L.) by the solid phase extraction method

*MSc Food, Nutrition and Health
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of General Chemistry*

ABSTRACT

The red dried stigmas of *Crocus sativus* L., which constitute the saffron spice, exhibit proven medicinal properties making this spice not only a functional seasoning in world cuisine, but also a potentially effective treatment for a number of ailments. Saffron owes these properties to its main bioactive compounds, which are crocins, picrocrocin and safranal. In particular, crocins, the plant's carotenoids, are responsible for its colour, picrocrocin for its characteristic flavour and safranal is the dominant component of its aroma.

The aim of the present laboratory study was to optimize the process of obtaining the non-volatile components of the plant, namely crocins and picrocrocin. The reason why it is important to obtain these substances in the largest quantity as fast and as economically effectively as possible, is to facilitate their commercial processing and disposal, as *Crocus sativus* L. belongs to the endemic flora of Greece and specifically of Kozani's countryside.

The aim of this research was to develop a statistical model that would suggest the optimal conditions for obtaining the requested secondary metabolites. To realize this research objective, the solid phase extraction method was used, which is a rapid route to the selective extraction of compounds combined with the appropriate solvent. In addition, to define the ideal experimental parameters, the response surface methodology was applied.

This procedure was carried out in three steps.

(a) Recovery of the components based on conditions found in the literature. The initial extraction of the sample was carried out in an aqueous solution by ultrasonic-assisted extraction, and after removing the solid residue from it, followed by solid phase extraction, the total volume of the eluate was obtained in sections in test tubes (3mL fraction volume), using acetonitrile (ACN) solution in water. Then, the fractions were analyzed by Ultraviolet-Visible spectroscopy (UV-Vis) as well as by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

(b) Determination of the three parameters that will form the statistical model and their ranges. Two different models were developed, one for picrocrocin and one for crocins based on the findings of the previous stage and then the different combinations were applied to the parameters obtained from the statistical processing program on a specific sample. The parameters chosen were the sample volume in mL, the aqueous ACN % v/v content, and the solvent volume (aqueous ACN volume) in mL. To

examine the experimental response, the extracts were analyzed by Ultraviolet-Visible spectroscopy, with the response values being the absorbance at 257 nm for picrocrocinn and the absorbance at 440 nm for crocins.

(c) Formulation of the optimized models based on the absorbance values obtained from the step above. After the absorptions were recorded in the statistical processing software, the resulting optimal conditions were applied and simultaneously confirmed on 20 different plant samples. The testing of the optimal parameters was applied to a common SPE column for the extraction of picrocrocinn as well as the crocins in order to achieve additional economy of consumables.

In addition, the initial plant sample used to formulate the models was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and Quadrupole Time-of-Flight (QTOF) Mass Spectrometry LC/MS to confirm the presence of the desired compounds. As a result of the above procedures, the desired models were successfully developed as both the picrocrocinn and crocin models are statistically significant and practically verifiable.

Scientific area: Food Chemistry

Key words: saffron, *Crocus sativus* L., Response Surface Methodology (RSM), UV-Vis, HPLC, LC-MS, Q-TOF LC/MS

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία».

Θα ήθελα να εκφράσω αρχικά τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Πέτρο Ταραντίλη, ο οποίος άκουσε με προσοχή τους μαθησιακούς μου στόχους και μου πρότεινε το κατάλληλο θέμα για να καταφέρω να τους επιτύχω. Μου έδειξε εμπιστοσύνη δίνοντας μου ένα αντικείμενο στο οποίο ο ίδιος έχει πραγματοποιήσει πολύ σημαντικό επιστημονικό έργο και με καθοδήγησε ώστε να ολοκληρώσω επιτυχώς αυτή την διατριβή, πάντα με την καλή διάθεση, το χαμόγελο και την κατανόηση που τον χαρακτηρίζουν. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής αυτής της ερευνητικής εργασίας για την συμβολή τους, τους κυρίους Χρήστο Παππά και Αθανάσιο Μαλλούχο.

Ακολούθως θέλω να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου Παναγιώτα Ρεβέλου, την οποία είχα την τύχη να γνωρίσω μέσα από τη διαδικασία εκπόνησης της διατριβής. Το αμείωτο ενδιαφέρον και η φιλική της στάση με βοήθησαν ιδιαίτερα ώστε να πραγματοποιήσω αυτή τη μελέτη. Για εμένα αποτελεί πρότυπο εργατικότητας και ανθρωπιάς και εκτιμώ βαθύτατα το γεγονός ότι μου μετέδωσε απλόχερα τις γνώσεις της. Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για την καλή πρόθεση να βοηθήσουν στη διεξαγωγή του πειράματος και ιδιαίτερα τον κ. Χαράλαμπο Κανάκη για τις συμβουλές του στην πραγματοποίηση της μελέτης μου, και τον υποψήφιο διδάκτορα Μαρίνο Ξαγοράρη για τη βοήθειά του.

Επιπλέον θα ήθελα ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού μας προγράμματος οι οποίοι μας δίδαξαν επιδεικνύοντας ιδιαίτερο ζήλο και ενδιαφέρον, καταφέροντας να μας χαρίσουν πολύτιμα εφόδια για την ακαδημαϊκή μας πορεία, αλλά και τις συμφοιτήτριές μου Χριστίνα, Ελένη, Μάρθα και Σοφία, οι οποίες αποτέλεσαν ιδανικούς συνοδοιπόρους σε αυτή την εκπαιδευτική διαδικασία.

Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τη μητέρα μου Αγγελική, την αδερφή μου Χριστίνα και τη γιαγιά μου Ελένη, για την ανιδιοτελή αγάπη και την υποστήριξη που μου χαρίζουν καθημερινά, τις καλές μου φίλες για την συμπαράσταση και την αφοσίωσή τους, και τον Διογένη που βρίσκεται πάντα δίπλα μου και με ενθαρρύνει σε κάθε μου βήμα.

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.

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|--|----|
| Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 7 |
| 1.1. Προέλευση και ιστορικά στοιχεία..... | 7 |
| 1.2. Βοτανική περιγραφή..... | 8 |
| 1.3. Καλλιέργεια, συλλογή και επεξεργασία..... | 10 |
| 1.4. Χημική σύσταση..... | 13 |
| 1.5. Βιοδραστικές ενώσεις..... | 14 |
| 1.6. Φαρμακολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες..... | 18 |
| 1.7. Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology) και Πειραματικός σχεδιασμός (Design of experiment)..... | 20 |
| Κεφάλαιο 2: ΣΚΟΠΟΣ..... | 21 |
| Κεφάλαιο 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 22 |
| 3.1. Υλικά και μέθοδοι..... | 22 |
| 3.1.1. Δείγματα..... | 22 |
| 3.1.2. Διαδικασία εκχύλισης των μη πτητικών συστατικών του saffron με υπερήχους..... | 23 |
| 3.1.3. Διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)..... | 24 |
| 3.1.4. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)..... | 28 |
| 3.1.5. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (LC-MS)..... | 30 |
| 3.1.6. Μεθοδολογία Αποκριτικών Επιφανειών..... | 32 |
| 3.1.7. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με αναλυτή τετραπόλου-χρόνου πτήσης ιόντων LC-Q-TOF/MS..... | 35 |
| 3.2. Αποτελέσματα - Συζήτηση..... | 37 |
| 3.2.1. Ανάλυση με HPLC..... | 37 |
| 3.2.2 Ανάλυση με LC/MS..... | 40 |
| 3.2.3. Επαλήθευση μοντέλου πικροκροκίνης..... | 45 |
| 3.2.4. Επαλήθευση μοντέλου κροκινών..... | 51 |
| 3.2.5. Ανάλυση με LC-Q-TOF/MS..... | 58 |
| Κεφάλαιο 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 61 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 62 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 68 |

Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Προέλευση και ιστορικά στοιχεία

Η επιστημονική ονομασία *Crocus sativus* L. αποδίδεται στον ήμερο κρόκο (εικόνα 1.1.), το φυτό από του οποίου τα στίγματα παράγεται το σαφράν, ή αλλιώς ζαφορά. Το σαφράν αποτελεί ένα σπάνιο άρτυμα με πολλές ιδιότητες και μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον για τη χώρα μας.

Το γένος *Crocus* περιλαμβάνει περίπου 160 είδη που απαντώνται στην Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή και τη Βόρεια Αφρική και χρησιμοποιούνται κυρίως ως καλλωπιστικά φυτά σε όλο τον κόσμο για τα πολύχρωμα άνθη τους (Moratalla-López et al., 2019). Στη χώρα μας υπάρχουν 23 είδη, εκ των οποίων τα 9 είναι ενδημικά, ευδοκιμούν δηλαδή μόνο στην Ελλάδα (Νικητίδης, 2019).



Εικόνα 1.1. *Crocus sativus* L. , Κρόκος ο ήμερος

Οι αναφορές σχετικά με το φυτό πηγαίνουν πίσω στην αρχαία εποχή, όπου συναντώνται τόσο σε έργα τέχνης όσο και σε ιστορικά κείμενα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τοιχογραφία της Μινωικής περιόδου, με τις κροκοσυλλέκτριες που αποκαλύφθηκε στον οικισμό Ακρωτήρι της Σαντορίνης (Εικόνα 1.2.), ενώ παράλληλα ο κρόκος συμπεριλαμβανόταν στα ιδεογράμματα της γραμμικής Β, και είναι πιθανόν να αποτυπώθηκε επίσης στον περίφημο δίσκο της Φαιστού.



Εικόνα 1.2. Οι κροκοσυλλέκτριες

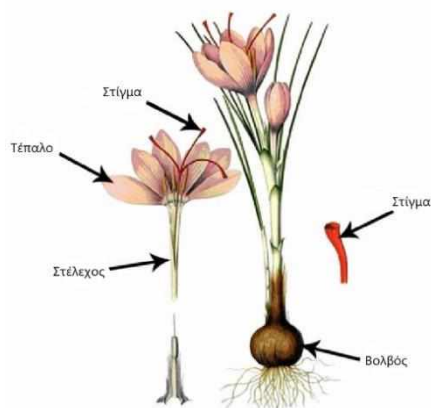
Επιπλέον ο ποιητής Όμηρος, ο πατέρας της βοτανικής Θεόφραστος, οι γιατροί Διοσκουρίδης και Γαληνός, ο γεωσιγνώστης Αθηναίος και ο γεωγράφος Στράβωνας αναφέρουν τον κρόκο στα κείμενά τους λόγω των ιδιοτήτων του.

Όσον αφορά την προέλευση της λέξης κρόκος, υποστηρίζεται ότι αποτελεί δάνειο από κάποια σημιτική γλώσσα και συγκεκριμένα ότι προέρχεται από τη λέξη *karkom*. Όμως μια διαφορετική προσέγγιση υποστηρίζει ότι ο κρόκος προέρχεται από την «κρόκη», την αρχαία λέξη για το υφάδι (νήμα), μιας και τα αποξηραμένα στίγματα του κρόκου θυμίζουν τις κλωστές από τα υφάδια (Νικητίδης, 2019). Αποτελεί ένα από τα πιο αγαπητά μπαχαρικά στον κόσμο, και είναι το μοναδικό που μπορεί να μεταδώσει ταυτόχρονα χρώμα, γεύση και άρωμα στα τρόφιμα (Moratalla-López et al., 2019).

1.2. Βοτανική περιγραφή

Ο κρόκος αποτελεί ένα ποώδες πολυετές φυτό, το οποίο φτάνει σε ύψος 10 έως 25 cm και αναπτύσσεται από τους βολβούς του (Mzabri et al., 2019). Το φυτό αυτό παραμένει αδρανές κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και η ανθοφορία του εμφανίζεται το φθινόπωρο, όταν όλα τα άλλα φυτά ετοιμάζονται να προστατευτούν από τις κακουχίες του χειμώνα.

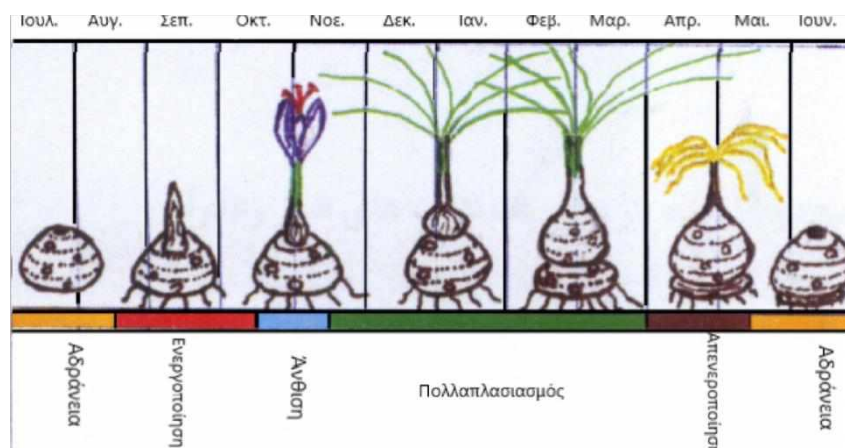
Στο άνθος του κρόκου, τα πέταλα και τα σέπαλα είναι μη διαφοροποιημένα και ονομάζονται τέπαλα. (Εικόνα 1.3.) Το άνθος του έχει έξι τέπαλα, τρεις κίτρινους στήμονες και έναν λευκό νηματοειδούς μορφής που καταλήγει σε ένα κόκκινο στίγμα το οποίο χωρίζεται σε τρία νήματα. (Moratalla-López et al., 2019)



Εικόνα 1.3. Τα μέρη του φυτού

Ο κρόκος αποτελεί το μοναδικό γνωστό φυτό που χρησιμοποιεί τα ίδια του τα στίγματα για την εξάπλωσή του. Αδυνατεί να αναπαραχθεί φυσικά, και έτσι εξαρτάται από τον ανθρώπινο χειρισμό και τη φροντίδα για την επιβίωσή του.

Ορισμένοι συγγραφείς έχουν ορίσει πέντε ή έξι στάδια για να περιγράψουν τον βιολογικό κύκλο του (Εικόνα 1.4.), ο οποίος διαρκεί δύο χρόνια από τη στιγμή που σχηματίζονται οι οφθαλμοί μέσα στο φυτό, φθάνοντας στην πλήρη ανάπτυξή του ένα χρόνο αργότερα και τελικά στην εξαφάνισή του για να δώσει τη σειρά του σε έναν ή περισσότερους απογόνους (Alonso et al., 2012).



Εικόνα 1.4. Στάδια ανάπτυξης του κρόκου (Bazoobandi et al., 2020)

1.3. Καλλιέργεια, συλλογή και επεξεργασία

Ο μεγαλύτερος παραγωγός παγκοσμίως αυτή τη στιγμή είναι το Ιράν, το οποίο παρέχει σχεδόν το 90% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής κρόκου. Η Ινδία, η Ελλάδα, το Μαρόκο, η Ισπανία, η Ιταλία και η Τουρκία ασχολούνται επίσης με την παραγωγή του (Moratalla-López et al., 2019).

Στη χώρα μας, ο κρόκος καλλιεργείται αποκλειστικά στην περιοχή της Κοζάνης, και συγκεκριμένα στα χωριά Κρόκος, Καρυδίτσα και Άνω Κόμη, με το προϊόν συλλογής τους να διαθέτει Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ), λόγω της υψηλής του ποιότητας.

Σε αυτή την αξιολογη ποιότητα συντελούν οι ιδιαίτερες εδαφοκλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, σε συνδυασμό με τις εξειδικευμένες γνώσεις για την καλλιέργεια και τη συγκομιδή του από τους παραγωγούς.

Πριν από τη φύτευση, το έδαφος πρέπει να καθαριστεί πλήρως από ζιζάνια, να οργωθεί σε βάθος 25-30 cm και να αφεθεί να ξεκουραστεί από λίγες εβδομάδες έως και ολόκληρο τον χειμώνα. Για την αποφυγή μυκητιακών μολύνσεων, οι βλαστοί μπορούν να απολυμανθούν πριν από τη φύτευση με βύθιση για περίπου 5 λεπτά στα φυτοφάρμακα «benomil», «captan» ή σε διάλυμα χαλκού.

Η σπορά γίνεται συνήθως με το χέρι (Εικόνα 1.5.). Οι μεγαλύτερου μεγέθους κόρμοι (βολβοί) έχουν τεκμηριωμένα θετική επίδραση στην παραγωγή του μπαχαρικού (Gresta et al., 2008).

Η φύτευση των κόρων γίνεται τα διαστήματα Μάιο έως Ιούνιο ή Αύγουστο έως Σεπτέμβριο. Όταν ο κρόκος φυτεύεται Μάιο-Ιούνιο η παραγωγή είναι ικανοποιητική από τον πρώτο χρόνο. Στην περίπτωση όμως που φυτευτεί Αύγουστο-Σεπτέμβριο δεν προλαβαίνει ν' ανθίσει ή ανθίζει αργά και σε πολύ μικρό ποσοστό. Το σύστημα φύτευσης που εφαρμόζεται είναι το γραμμικό, το οποίο γίνεται με όργανο σε βάθος 18 έως 20 εκατοστά. Οι κόρμοι θα πρέπει να φυτεύονται όσο το δυνατόν βαθύτερα ώστε μπορούν έτσι να διατηρηθούν για περισσότερα χρόνια στο ίδιο χωράφι.



Εικόνα 1.5. Όργωμα της γης και φύτευση των κόρμων

Τα άνθη του κρόκου συγκομίζονται το Φθινόπωρο, από το πρώτο δεκαήμερο του Οκτώβρη ως και αρχές Νοέμβρη. Οι καιρικές συνθήκες του καλοκαιριού μπορούν να επηρεάσουν την έναρξη της ανθοφορίας του φυτού, η οποία διαρκεί 15 - 20 ημέρες.

Λόγω της ευαισθησίας του άνθους στις καιρικές συνθήκες πρέπει να μαζεύεται μέσα σε τρεις το πολύ μέρες, καθώς χάνει γρήγορα την τρυφερότητά του και έτσι δυσχεραίνεται η συγκομιδή. Οι συλλογείς κόβουν τα άνθη στη βάση των πετάλων (Εικόνα 1.6.), αφού προηγουμένως τα στρίψουν ελαφρά ώστε να διευκολύνεται ο διαχωρισμός των πετάλων από τα στίγματα και τους στήμονες (Πανικολάου, 2005).



Εικόνα 1.6. Χειρωνακτική συλλογή των ανθέων του κρόκου

Αφού τα άνθη συλλεχθούν στο χωράφι, στη συνέχεια μεταφέρονται στο λιχνιστίρι όπου τοποθετούνται σταδιακά και με τη βοήθεια του αέρα γίνεται η απομάκρυνση των σιγμάτων και των στημόνων από τα τέπαλα (Εικόνα 1.7.).



Εικόνα 1.7. Το λίχνισμα

Ακολουθεί το λεγόμενο «πουράτισμα» (Εικόνα 1.8.) κατά τη διάρκεια του οποίου διαχωρίζονται τα κίτρινα μέρη (στήμονες) από τα κόκκινα (στίγματα), ώστε να ληφθούν τα κόκκινα στίγματα τα οποία αποτελούν το καρύκευμα του σαφράν.



Εικόνα 1.8. Το πουράτισμα

Τέλος τα στίγματα ξηραίνονται με μια διαδικασία η οποία απαιτεί πείρα, μεγάλη προσοχή και τέχνη. Κατά το στάδιο αυτό αναπτύσσονται το χρώμα και το άρωμα. Η ξήρανση δεν θα πρέπει να γίνεται στον ήλιο αλλά κάτω από σκιά για να μην αλλοιώνονται τα αιθέρια έλαια και οι χρωστικές του κρόκου. Τα στίγματα απλώνονται σε ένα λεπτό στρώμα 4-5 mm σε δίσκους 40 × 50 cm με τον πυθμένα τους καλυμμένο με μεταξωτό ύφασμα. Οι δίσκοι αυτοί, σε απόσταση 50 cm μεταξύ τους, τοποθετούνται σε κατακόρυφες στήλες (Εικόνα 1.9.) εντός χώρων που έχουν προετοιμαστεί για την αφυδάτωση με θερμοκρασία δωματίου που διατηρείται μεταξύ 35 και 45 °C και σχετική υγρασία που δεν υπερβαίνει ποτέ το 50 % (Alonso et al., 2012). Ο κρόκος στεγνώνει σε 8-12 ώρες. Την επόμενη μέρα συσκευάζεται σε συνθήκες υγρασίας 10-12 °C, μέχρι την παράδοση του στο συνεταιρισμό αφού προηγουμένως καθαριστεί από τα υπολείμματα των στημόνων ή άλλες ξένες ουσίες που μεταφέρθηκαν στον κόκκινο κρόκο κατά το στάδιο της συγκομιδής και δεν απομακρύνθηκαν στο στάδιο της διαλογής. Η εργασία

του καθαρισμού διαρκεί από έναν έως τρεις μήνες, ανάλογα με την παραγωγή της χρονιάς (Παπανικολάου, 2005).



Εικόνα 1.9. Ξήρανση του κρόκου σε ελεγχόμενες συνθήκες

1.4. Χημική σύσταση

Καθότι τα αποξηραμένα στίγματα του κρόκου κατέχουν ένα ευρύ φάσμα ιατρικών χρήσεων, αυτά έχουν υποβληθεί σε μια πληθώρα φυτοχημικών και βιοχημικών αναλύσεων και έχουν απομονωθεί ποικίλα βιοδραστικά συστατικά από αυτά.

Πίνακας 1.1. Προσεγγιστική ανάλυση του σαφράν (Srivastava et al., 2010)

| Συστατικό | Μάζα % (m/m) |
|-----------------------------|---------------------|
| Υδατοδιαλυτές ενώσεις | 53,0 |
| Κόμμεα | 10,0 |
| Πεντοζάνες | 8,0 |
| Πηκτίνες | 6,0 |
| Άμυλο | 6,0 |
| α-κροκίνη | 2,0 |
| Καροτενοειδή | 1,0 |
| Λιπίδια | 12,0 |
| Μη πτητικά έλαια | 6,0 |
| Πτητικά έλαια | 1,0 |
| Πρωτεΐνες | 12,0 |
| Τέφρα | 6,0 |
| Τέφρα διαλυτή σε HCl | 0,5 |
| Νερό | 10,0 |
| Φυτικές ίνες (ακατέργαστες) | 5,0 |

Πίνακας 1.2. Ποσοστιαία χημική σύσταση του σαφράν (Srivastava et al., 2010)

| Συστατικό | Μάζα % (m/m) |
|------------------|---------------------|
| Υδατάνθρακες | 12,0-15,0 |
| Νερό | 19,0-14,0 |
| Πολυπεπίδια | 11,0-14,0 |
| Κυτταρίνη | 4,0-7,0 |
| Λιπίδια | 3,0-8,0 |
| Ανόργανα άλατα | 1,0-1,5 |
| Μη αζωτούχα | 40,0 |

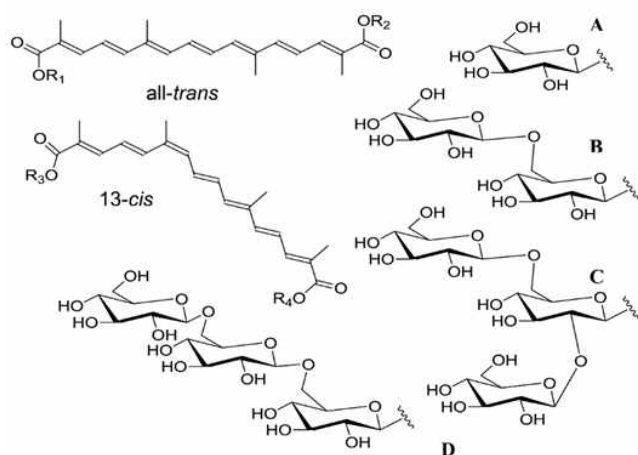
Η χημική ανάλυση των στιγμάτων του *C. sativus* έδειξε την ύπαρξη περίπου 150 πτητικών και μη πτητικών ενώσεων. Όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις, αυτές αποτελούνται από περισσότερα από 34 συστατικά, τα οποία ανήκουν στις ομάδες των τερπενίων, των τερπενικών αλκοολών και των εστέρων τους, με την σαφρανάλη να αποτελεί το κύριο πτητικό συστατικό. Τα μη πτητικά συστατικά περιλαμβάνουν τις κροκίνες, την κροκετίνη, την πικροκροκίνη και τα φλαβονοειδή (κερκετίνη και καμφερόλη) (Pitsikas, 2016).

1.5. Βιοδραστικές ενώσεις

Η διαδικασία της αφυδάτωσης απελευθερώνει τις χαρακτηριστικές ενώσεις των στιγμάτων του κρόκου ή πιθανώς ακόμη και να τις παράγει. Οι πιο σημαντικές ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, αυτές που είναι υπεύθυνες για το χρώμα, τη γεύση και το άρωμα (Alonso et al., 2012).

Κροκίνες:

Οι κροκίνες αποτελούν τις ουσίες που ευθύνονται κυρίως για το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα των στιγμάτων του κρόκου. Ένα ασυνήθιστο αποκαροτενοειδές, το οποίο ονομάζεται κροκετίνη ($C_{44}H_{64}O_{24}$, 8,8'-διαπο-Ψ,Ψ'-καροτινοδιοϊκό οξύ), και το οποίο εστεροποιείται με ένα ή δύο μόρια σακχάρου γλυκόζης, γεντιοβιόζης ή νεαπολιτανόζης, (Εικόνα 1.10.) εντοπίζεται στα στίγματα του *Crocus sativus* L. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για τις χρωστικές τους ιδιότητες λόγω της ιδιαίτερης υδατοδιαλυτής συμπεριφοράς τους, σε αντίθεση με αυτές που εμφανίζουν οι περισσότερες οικογένειες καροτενοειδών ((Carmona et al., 2006).



| | R₁ | R₂ |
|---|----------------------|----------------------|
| Κροκετίνη | H | H |
| <i>trans</i> -(β-D-γλυκοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | H | A |
| <i>trans</i> -δι-(β-D-γλυκοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | A | A |
| <i>trans</i> -(β-D-γεντιοβιοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | H | B |
| <i>trans</i> -(β-D-γλυκοζυλο)- (β-D-γεντιοβιοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | A | B |
| <i>trans</i> -δι-(β-D-γεντιοβιοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | B | B |
| <i>trans</i> -(β-D-γλυκοζυλο)- (β-D-νεαπολιτανοζυλο)εστέρας της κροκετίνης | A | C |
| <i>trans</i> -(β-D- γεντιοβιοζυλο)-(β-D-νεαπολιτανοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | B | C |
| <i>trans</i> -τρι-(β-D-γλυκοζυλο)-(β-D-νεαπολιτανοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | D | C |
| | R₃ | R₄ |
| <i>cis</i> -δι-(β-D-γλυκοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | A | A |
| <i>cis</i> -(β-D-γεντιοβιοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | H* | B* |
| <i>cis</i> -(β-D-γλυκοζυλο)- (β-D-γεντιοβιοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | A* | B* |
| <i>cis</i> -δι-(β-D-γεντιοβιοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | B | B |
| <i>cis</i> -(β-D-γλυκοζυλο)- (β-D-νεαπολιτανοζυλο)εστέρας της κροκετίνης | A* | C* |
| <i>cis</i> -(β-D- γεντιοβιοζυλο)-(β-D-νεαπολιτανοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | B* | C* |
| <i>cis</i> -τρι-(β-D-γλυκοζυλο)-(β-D-νεαπολιτανοζυλο) εστέρας της κροκετίνης | D* | C* |

Εικόνα 1.10. Χημική δομή της κροκετίνης και των εστέρων της κροκετίνης (*ανταλλάξιμα) (A. M. Sánchez & Winterhalter, 2013)

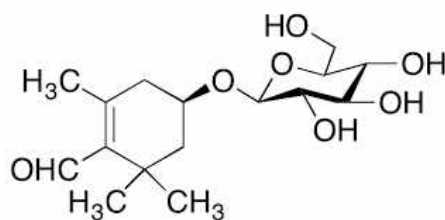
Οι κροκίνες διακρίνονται επίσης σε δύο στερεοϊσομερή, όπου στο ένα όλοι οι διπλοί δεσμοί στην αλυσίδα της κροκετίνης είναι *trans* και το άλλο σχηματίζεται με έναν *cis* διπλό δεσμό στον άνθρακα C₁₃ της μοριακής αλυσίδας. Με τα έως τώρα ερευνητικά δεδομένα, είναι γνωστή η ύπαρξη οκτώ διαφορετικών κροκινών, τόσο σε *cis*- όσο και σε *trans*- μορφή. Η κύρια κροκίνη των στιγμάτων του κρόκου είναι η *trans*-4-GG κροκίνη (Carmona et al., 2006). Οι *cis* εστέρες της κροκετίνης έχουν, σε σύγκριση με τα *trans* διαμορφωμένα ισομερή τους, χαμηλότερο σημείο τήξης, και εμφανίζουν μια πρόσθετη ζώνη απορρόφησης στα 324 nm περίπου, με μέγιστο τα 435 nm αντί για τα 440 nm στο φάσμα UV-Vis. Ο καρπός της γαρδένιας (*Gardenia jasminoides* Ellis) αποτελεί επίσης πηγή εστέρων της κροκετίνης, και κατά συνέπεια χρησιμοποιείται για την νοθεία του σαφράν (A. M. Sánchez & Winterhalter, 2013). Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των διαφόρων γλυκοσιδικών τμημάτων και των *cis*-/*trans*- ισομερών μορφών των κροκινών μπορεί να βοηθήσει στην πιστοποίηση, τον ποιοτικό έλεγχο, την τυποποίηση και την ιχνηλασιμότητα της διαδικασίας των προϊόντων του κρόκου (Bian et al., 2020).

Η πρώτη αναφορά στην κροκίνη έγινε από τον Aschoff το 1818, ο οποίος της έδωσε και το όνομά της. Η περιεκτικότητα σε εστέρες κροκετίνης αντιπροσωπεύει το 16%-28% του κρόκου, ενώ σε ορισμένες χρονιές συγκομιδής μπορεί να φτάσει έως και το 30% (Moratalla-López et al., 2019).

Πικροκροκίνη:

Η ένωση η οποία θεωρείται από το 1930 ως κυρίως υπεύθυνη για την πικρή γεύση του κρόκου είναι η πικροκροκίνη, η αλλιώς 4-(-D-γλυκοκυρανοσυλοξυ)-2,6,6-τριμεθυλ-1-κυκλοεξεν-1-καρβαλδεΰδη, C₁₆H₂₆O₇.

Είναι διαλυτή σε πολικούς διαλύτες, πιο διαλυτή στο νερό παρά σε υδροαλκοολικά διαλύματα και αδιάλυτη σε μη πολικά. Η δομή της πικροκροκίνης προσδιορίστηκε από τους Khun και Winterstein το 1934 (Εικόνα 1.11) (Maggi et al., 2010).



Εικόνα 1.11. Χημική δομή της πικροκροκίνης

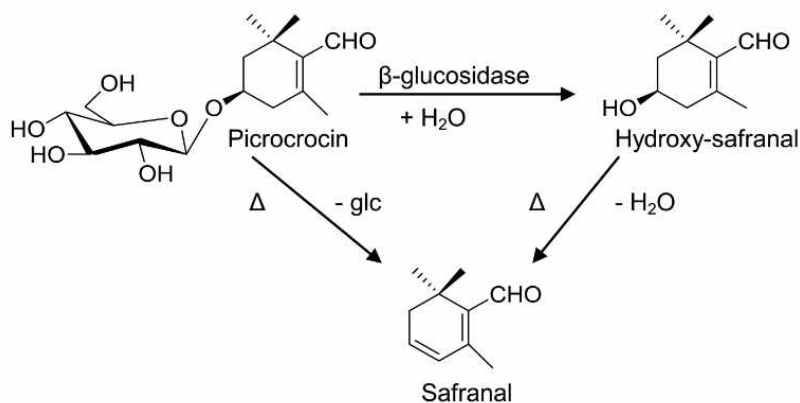
Η περιεκτικότητα σε πικροκροκίνη κυμαίνεται μεταξύ 7%-16% στα αποξηραμένα στίγματα του *Crocus sativus*, ενώ είναι δυνατόν να βρεθούν δείγματα που φθάνουν μέχρι και το 20% (Moratalla-López et al., 2019).

Η πικροκροκίνη έδειξε υψηλή σταθερότητα στην μελέτη κινητικής της αποικοδόμησής της σε υδατικά εκχυλίσματα κρόκου κατά τη θερμική επεξεργασία από 5 έως 70 °C, καθώς και την αποικοδόμηση της απομονωμένης πικροκροκίνης σε νερό στους 100 °C (Sánchez et al., 2011).

Το φάσμα UV της παρουσιάζει μια χαρακτηριστική ευρεία ζώνη απορρόφησης στα 250 nm που οφείλεται στην α,β-ακόρεστη κυκλοαλδεΐδη του μορίου. Η οξείδωση της αλδεϋδικής ομάδας δίνει την όξινη μορφή της πικροκροκίνης και έτσι μια ζώνη απορρόφησης του α,β-ακόρεστου κυκλικού οξέος στα 246 nm εμφανίζεται στο φάσμα UV (Tarantilis et al., 1995).

Σαφρανάλη:

Όσον αφορά το πτητικό μέρος του κρόκου, αποτελείται από δεκάδες ενώσεις, μεταξύ των οποίων η σαφρανάλη (2,6,6-τριμεθυλο-1,3-κυκλοεξαδιεν-1-καρβοξαλδεΐδη, C₁₀H₁₄O) είναι η κύρια ένωση η οποία συμβάλλει στο άρωμά του.



Εικόνα 1.12. Δημιουργία της σαφρανάλης από την πικροκροκίνη (Sánchez & Winterhalter, 2013).

Η σαφρανάλη είναι η αγλυκόνη της πικροκροκίνης, η οποία δημιουργείται είτε μέσω μιας διαδικασίας ενζυματικής/αφυδάτωσης δύο σταδίων που περιλαμβάνει το ενδιάμεσο προϊόν HTCC (4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-1-κυκλοεξέν-1-καρβοξαλδεΐδη,

C₁₀H₁₆O₂) είτε απευθείας με θερμική αποικοδόμηση (Εικόνα 1.12.) (Moratalla-López et al., 2019). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για την πραγματοποίηση αυτής της μετατροπής σε συνθήκες χαμηλού pH (A. M. Sánchez & Winterhalter, 2013).

Διαθέτει χαρακτηριστική UV ζώνη απορρόφησης στα 310 nm. Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της πικροκροκροκίνης δίνει την πρόδρομη ουσία ισοφορόνη (3,5,5-τρι-μεθυλ-2-κυκλοεξέν-1-ονη), η οποία έχει περιγραφεί ως συστατικό του πτητικού μέρους του κρόκου (Tarantilis et al., 1995).

Εκτός από τις παραπάνω, ο κρόκος διαθέτει και άλλες βιοδραστικές ενώσεις, όπως οι κεμπφερόλες και οι γλυκοζίτες τους. Το περιάνθιο των ανθέων του κρόκου (τέπαλα) διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά που αποτελούνται κυρίως από ανθοκυανίνες και φλαβονόλες. Εκτός από την κεμπφερόλη και τους γλυκοζίτες της κεμπφερόλης, στα φύλλα του *C. sativus* υπάρχουν και άλλες φλαβονόλες, όπως η κερκετίνη και οι φλαβόνες (λουτεολίνη, τρικίνη, ακακετίνη, απιγενίνη και σκουτελαρεΐνη), ενώ παρουσιάζονται και οι γλυκοζίτες τους. Οι ανθοκυανίνες είναι υπεύθυνες για το ελκυστικό χρώμα των τέπαλων, μεταξύ των οποίων οι γλυκοζίτες δελφινιδίνης, πετουνιδίνης και μαλβιδίνης αντιπροσωπεύουν το 30% της συνολικής περιεκτικότητας των φαινολικών ενώσεων στο περικόκρο (Moratalla-López et al., 2019).

1.6. Φαρμακολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες

Παρόλο που ο κρόκος χρησιμοποιείται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων ως μπαχαρικό, εντοπίζονται σε αυτόν μια ποικιλία φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Αυτό είναι ο λόγος για τον οποίο ο κρόκος έχει χαρακτηριστεί ως ένα λειτουργικό μπαχαρικό. Υπάρχουν πολυάριθμα κεφάλαια βιβλίων και άρθρα ανασκόπησης που επικεντρώνονται στις σημαντικότερες βιολογικές δράσεις του, οι οποίες εξετάζονται είτε με *in vivo*, *ex vivo* ή *in vitro* μελέτες (Jafari et al., 2020). Αποτέλεσμα της αποδεδειγμένα θετικής επίδρασης του σαφράν στον οργανισμό είναι η παγκόσμια κυκλοφορία ποικίλων διατροφικών συμπληρωμάτων βασισμένων στα οφέλη του (Εικόνα 1.13.). Τα συμπληρώματα αυτά στοχεύουν στην διαχείριση του stress, τη μείωση του αισθήματος κόπωσης, τη διατήρηση θετικής διάθεσης, την καλή λειτουργία του νευρικού συστήματος αλλά και τη ρύθμιση της όρεξης.



Εικόνα 1.13. Διατροφικά συμπληρώματα με βάση το σαφράν σε μορφή εκχυλίσματος σε κάψουλα, σκόνης των στιγμάτων σε κάψουλα, σε τσίχλα και σε ζελεδάκια.

Όσον αφορά τις εργαστηριακές μελέτες, πιο συγκεκριμένα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού έχουν μελετηθεί για τις αγχολυτικές επιδράσεις τους μέσω παρέμβασης στον υποδοχέα $GABA_A$ (Pitsikas & Tarantilis, 2020), για τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ιδιότητες τόσο των μεταβολιτών του όσο και ίδιου του *Crocus sativus* L. (Hatziagariou et al., 2019), αλλά και τις ογκοκατασταλτικές του ιδιότητες, οι οποίες τον καθιστούν ως έναν φυσικό αντικαρκινικό παράγοντα (Kakouri et al., 2017).

Επιπλέον μελέτες έχουν αναδείξει την αποτελεσματικότητά του *Crocus sativus* L. στη θεραπεία της ήπιας έως μέτριας μορφής κατάθλιψης [χορήγηση κάψουλας αιθανολικού εκχυλίσματος σε ασθενείς] (Akhondzadeh et al., 2005), την αποτελεσματικότητά στην ανακούφιση των συμπτωμάτων του προεμμηνορρυσιακού συνδρόμου (PMS) [χορήγηση κάψουλας αιθανολικού εκχυλίσματος σε γυναίκες ασθενείς] (Agha-Hosseini et al., 2008), την πρόληψη των γαστρικών διαταραχών μέσω αύξησης των επιπέδων της γλουταθειόνης και ταυτόχρονης μείωσης της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων στο γαστρικό βλεννογόνο [χορήγηση ακατέργαστου εκχυλίσματος σαφράν, κροκινών και σαφρανάλης σε αρουραίους] (Kianbakht & Mozaffari, 2009), αλλά και τον ρόλο της επίδρασης των κροκινών στο μεταβολισμό της γλυκόζης και τη

διαχείριση της ινσουλίνης [έκθεση εμβρύων Zebrafish σε υδατικό διάλυμα κροκινών] (Kakouri et al., 2020).

Οι παραπάνω αποτελούν μόνο ένα ενδεικτικό κομμάτι των ερευνών οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί τόσο για το σαφράν όσο και για τις βιοδραστικές ενώσεις του.

1.7. Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology) και Πειραματικός σχεδιασμός (Design of experiment)

Η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) μας προσφέρει εργαλεία πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiment, DoE), ώστε να λάβουμε την βέλτιστη απόδοση στην παραλαβή των ζητούμενων σε εμάς ουσιών. Η RSM βασισμένη σε μαθηματικά μοντέλα καταφέρνει να συνδυάσει όλες τις πειραματικές αποκρίσεις μέσω βελτιστοποιημένων προσεγγίσεων, ώστε να οδηγήσει στην ανακάλυψη των κατάλληλων σημείων με τις ιδανικές προδιαγραφές στο μικρότερο κόστος.

Με τον όρο βελτιστοποίηση της μεθόδου ορίζεται η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών και επιπέδων των πειραματικών παραγόντων στην απόδοση μιας διαδικασίας (ενός συστήματος ή ενός προϊόντος), με σκοπό να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερη απόκριση, ποιότητα και λειτουργία (Πετρίδης, 2016).

Η φύση των εφαρμογών της μεθοδολογίας αποκριτικών επιφανειών έχει συνήθως διαδοχική μορφή. Έτσι, έχουμε αρχικά τη δημιουργία μιας βασικής ιδέας βασισμένης στο ποιοι παράγοντες ή ποιες μεταβλητές είναι πιο πιθανό να παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στη μελέτη της αποκριτικής επιφάνειας. Αυτή η διαδικασία συνήθως οδηγεί σε ένα πείραμα σχεδιασμένο να εξετάζει αυτούς τους παράγοντες παραβλέποντας τους μη σημαντικούς. Ένα τέτοιο είδος πειραματισμού ονομάζεται πείραμα διαλογής (screening experiment). Ο σκοπός αυτής της διαλογής των παραγόντων είναι να μειωθεί ο αριθμός των υποψήφιων μεταβλητών που θα μπορούσαν να είναι σημαντικές στην επεξήγηση της απόκρισης, ούτως ώστε τα μεταγενέστερα πειράματα να είναι πιο αποδοτικά ενώ ταυτόχρονα θα απαιτούν λιγότερες εκτελέσεις (runs) (Ορφανίδου, 2014).

Κεφάλαιο 2: ΣΚΟΠΟΣ

Το σαφράν είναι ένα εμβληματικό προϊόν, σημαντικό για την οικονομία της χώρας μας με αποδεδειγμένες φαρμακευτικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται κυρίως σε συστατικά του όπως οι κροκίνες, η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη. Για την εμπορική εκμετάλλευση αυτών των ενώσεων είναι σημαντικό να αναπτυχθούν ταχείες μέθοδοι απομόνωσης και παραλαβής τους με χαμηλό κόστος. Αντικείμενο της μελέτης είναι η απομόνωση και παραλαβή των μη πτητικών συστατικών του κρόκου (κροκίνες και πικροκροκίνη) με τη χρήση της εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και η βελτιστοποίηση της μεθόδου παραλαβής με την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM).

Πιο αναλυτικά, η πειραματική μελέτη για την ανάπτυξη του στατιστικού μοντέλου το οποίο θα δίνει τις βέλτιστες συνθήκες για την λήψη των ζητούμενων μη πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια.

Παραλαβή βασισμένη σε συνθήκες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία. Λήφθηκε ο συνολικός όγκος του εκλούσματος τμηματικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες (όγκος κλάσματος 3 mL), και στη συνέχεια τα κλάσματα αναλύθηκαν φασματοσκοπικά στο UV-Vis, καθώς και μέσω της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Καθορισμός των τριών παραμέτρων που θα διαμορφώσουν το στατιστικό μοντέλο καθώς και του εύρους τους. Αναπτύχθηκαν δύο διαφορετικά μοντέλα, ένα για την πικροκροκίνη και ένα για τις κροκίνες με βάση τα ευρήματα του προηγούμενου σταδίου και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή των διαφορετικών συνδυασμών στις παραμέτρους που προέκυψαν από το στατιστικό πρόγραμμα επεξεργασίας, σε ένα συγκεκριμένο δείγμα.

Διαμόρφωση των βελτιστοποιημένων μοντέλων βάσει των τιμών απορρόφησης που λήφθηκαν από το παραπάνω στάδιο. Εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών που προέκυψαν από το στατιστικό πρόγραμμα και επιβεβαίωση τους σε 20 διαφορετικά φυτικά δείγματα.

Κεφάλαιο 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Υλικά και μέθοδοι

3.1.1. Δείγματα

Για τα τρία συνολικά στάδια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αποξηραμένων στιγμάτων κρόκου ελληνικής προέλευσης από το είδος *Crocus sativus* L. τόσο βιολογικής όσο και συμβατικής καλλιέργειας από εσοδείες των ετών 2018 έως και 2020. 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, ενώ πριν από τη χρήση τους κονιορτοποιήθηκαν σε ιγδίο πορσελάνης. Τα δείγματα αυτά παραχωρήθηκαν για ερευνητικούς σκοπούς στο εργαστήριο από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης.

Το δείγμα **901, Extra BIO EU 1**, της εσοδείας του **2020** ήταν αυτό που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να δημιουργηθούν τα στατιστικά μοντέλα.

Μετά την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών που προέκυψαν από το λογισμικό βάσει των αποτελεσμάτων απορρόφησης, χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα σαφράν (Πίνακας 3.1) από εσοδείες των ετών 2018 έως και 2019 με σκοπό την επαλήθευση των προτεινόμενων συνθηκών SPE.

Πίνακας 3.1. Δείγματα σαφράν που χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευση των προτεινόμενων συνθηκών SPE από τα στατιστικά μοντέλα.

| Αριθμός Δείγματος | Κωδικός Δείγματος |
|-------------------|-------------------|
| Δείγμα 1 | Extra Bio EU 2018 |
| Δείγμα 2 | Extra Bio 2018 |
| Δείγμα 3 | Extra Bio 2018 |
| Δείγμα 4 | Extra Bio 2018 |
| Δείγμα 5 | Bio EU 2018 |
| Δείγμα 6 | Extra Bio 2018 |
| Δείγμα 7 | Extra Bio 2018 |
| Δείγμα 8 | Standard 2018 |
| Δείγμα 9 | Extra Bio 2018 |
| Δείγμα 10 | Standard 2018 |
| Δείγμα 11 | Bio EU 2019 |
| Δείγμα 12 | Bio Suisse 2019 |
| Δείγμα 13 | Extra Bio 2019 |
| Δείγμα 14 | Extra Bio 2019 |
| Δείγμα 15 | Standard 2019 |
| Δείγμα 16 | Extra Bio EU 2019 |
| Δείγμα 17 | Standard 2019 |
| Δείγμα 18 | Standard 2019 |
| Δείγμα 19 | Bio EU 2019 |
| Δείγμα 20 | Bio EU 2019 |

3.1.2. Διαδικασία εκχύλισης των μη πτητικών συστατικών του saffron με υπερήχους

Υλικά και αντιδραστήρια

- Σπάτουλα εργαστηρίου
- Ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 10 mL
- Υδροβολέας
- Απεσταγμένο νερό
- Πλαστικό φιαλίδιο
- Πιπέτα Pasteur
- Γυάλινο φιαλίδιο
- Αλουμινόχαρτο

Συσκευές και Όργανα

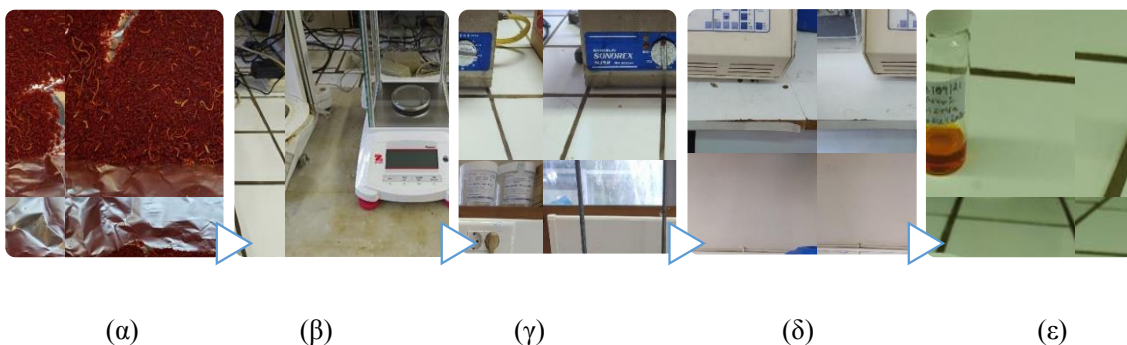
- Εργαστηριακός ζυγός ακριβείας
- Συσκευή υπερήχων Bandelin Electronic, Sonorex Super RK 255H, Berlin, Germany, ισχύος 160/320 W, συχνότητας 35 kHz
- Φυγόκεντρος Sigma 3K-18 refrigerated centrifuge, Germany

Πειραματική πορεία

Η αρχική εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπέρηχους (Ultrasound Assisted Extraction, UAE), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της πειραματικής μελέτης της Καρασταμάτη (2014):

- 20 mg κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού (Εικόνα 3.1. (α)), τα οποία μετρήθηκαν στον εργαστηριακό ζυγό ακριβείας (Εικόνα 3.1. (β)), διαλύθηκαν σε 8 mL απιονισμένου νερού, εντός πλαστικού φιαλιδίου.
- Τα φιαλίδια με το υδατικό διάλυμα τοποθετήθηκαν εντός λουτρού υπερήχων (Εικόνα 3.1. (γ)), για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C).
- Για την παραλαβή του εκχυλίσματος άνευ στερεών υπολειμμάτων φυτικού υλικού, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο (Εικόνα 3.1. (δ)) για 25 min, στις 5.000 στροφές, και σε θερμοκρασία 4 °C ώστε να αποφευχθεί η θερμική υποβάθμιση του εκχυλίσματος.

- Τέλος το καθαρό υδατικό εκχύλισμα λήφθηκε με ακρίβεια, με τη χρήση πιπέτας Pasteur, και μεταφέρθηκε εντός γυάλινων φιαλιδίων (Εικόνα 3.1 (ε)).
- Τα γυάλινα φιαλίδια καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο και ψύχθηκαν στους 4 °C ώστε το περιεχόμενο εκχύλισμα να διατηρηθεί αναλλοίωτο κατά τη διάρκεια των δοκιμών.



Εικόνα 3.1. (α) Αποξηραμένο- κονιορτοποιημένο φυτικό υλικό. (β) Αναλυτικός ζυγός ακριβείας. (γ) Υδατόλουτρο υπέρηχων. (δ) Φυγόκεντρος. (ε) Γυάλινος περιέκτης φυτικού εκχυλίσματος.

3.1.3. Διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)

Υλικά και αντιδραστήρια

- Απεσταγμένο νερό
- Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC και LC-MS της εταιρίας Fisher Scientific Co. (Chicago, IL, USA).
- Υδροβολέας
- Σιφόνια των 1, 5 και 25 mL
- Μηχανική πιπέτα χωρητικότητας 100 – 1000 μ L
- Ποτήρι ζέσεως
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 50, 100 mL
- Ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- Κωνικές φιάλες των 50 και 100 mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Στηλάκια C18 SPE cartridges (Isolute® C18(EC), 2 g/15 ml) της εταιρίας Biotage (Uppsala, Sweden).

Συσκευές και Όργανα

- Συσκευή κενού εκχύλισης στερεάς φάσης
- Αντλία κενού *Rocker 300*
- Φασματοφωτόμετρο *UV-Vis*, διπλής δέσμης, της εταιρίας *Agilent Technologies* (μοντέλο *Cary 60*), με λάμπα *Xenon (80Hz)*, μονοχρωμάτορα *Czerny-Turner* και ανιχνευτή διπλής διόδου πυριτίου.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο *UV-Vis* και το λογισμικό *Cary WinUV*, για την λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων.

Πειραματική πορεία

1^ο στάδιο

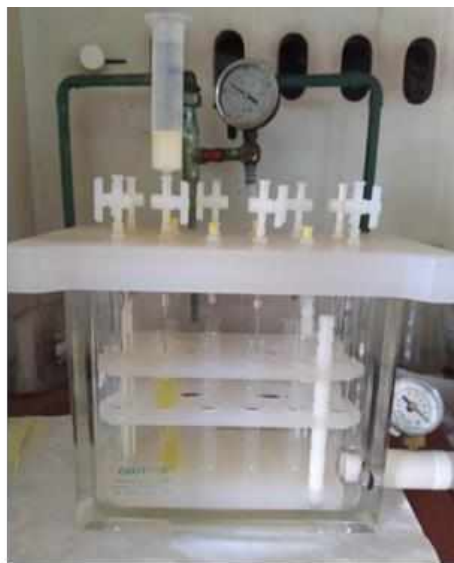
Στο στάδιο αυτό εφαρμόστηκαν πειραματικές συνθήκες βασισμένες στην βιβλιογραφία (Κανάκης, 2007) (A. M. Sánchez et al., 2009), με στόχο τον καθορισμό των διαφορετικών μεταβλητών (factors) οι οποίοι στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του στατιστικού μοντέλου. Έτσι χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ακετονιτριλίου (ACN):νερού σε διαφορετικές αναλογίες, για τον καθορισμό των επιπέδων των μεταβλητών αυτών με στόχο την παραλαβή των επιθυμητών ουσιών.

Για την διαδικασία της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE) χρησιμοποιήθηκαν στηλάκια *ISOLUTE C18 2g / 15mL* και αντλία κενού.

- Στην πρώτη φάση, έγινε ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού της στήλης με 8mL ACN αρχικά, και 15 mL απιονισμένου νερού στη συνέχεια.
- Στην δεύτερη φάση, προστέθηκε 1 mL εκχυλίσματος του δείγματος **901, Extra BIO EU 1**, της εσοδείας **2020** του οποίου οι επιθυμητές ενώσεις κατακρατήθηκαν στη στήλη.
- Τέλος πραγματοποιήθηκε έκλουση του αναλύτη με την συνολική ποσότητα του εκλούσματος να συλλέγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με την χρήση κενού.



(α)



(β)

Εικόνα 3.2. (α) Παραλαβή πικροκροκίνης (άχρωμη), (β) Παραλαβή κροκινών (έγχρωμες)

Σύμφωνα με την εργαστηριακή μελέτη των Sánchez et al. (2009), στην οποία πραγματοποιήθηκε SPE για τον προσδιορισμό της πικροκροκίνης στον ποιοτικό έλεγχο του μπαχαρικού σαφράν (*Crocus sativus* L.), η βελτιστοποιημένη διαδικασία SPE για την παραλαβή της πικροκροκίνης ήταν η εξής: 1 mL εκχυλίσματος σαφράν προστέθηκε στο SPE, στη συνέχεια προστέθηκαν 10 mL νερού για να καθαριστεί το δείγμα και έπειτα η πικροκροκίνη εκλούστηκε με αναλογία ACN/νερό 12% (v/v). Για την διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε στηλάκι SPE C18 Sep-pak plus™, ύψους 8 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2,7 cm, ενώ το βάρος του υλικού προσρόφησης ήταν 360 mg. (A. M. Sánchez et al., 2009)

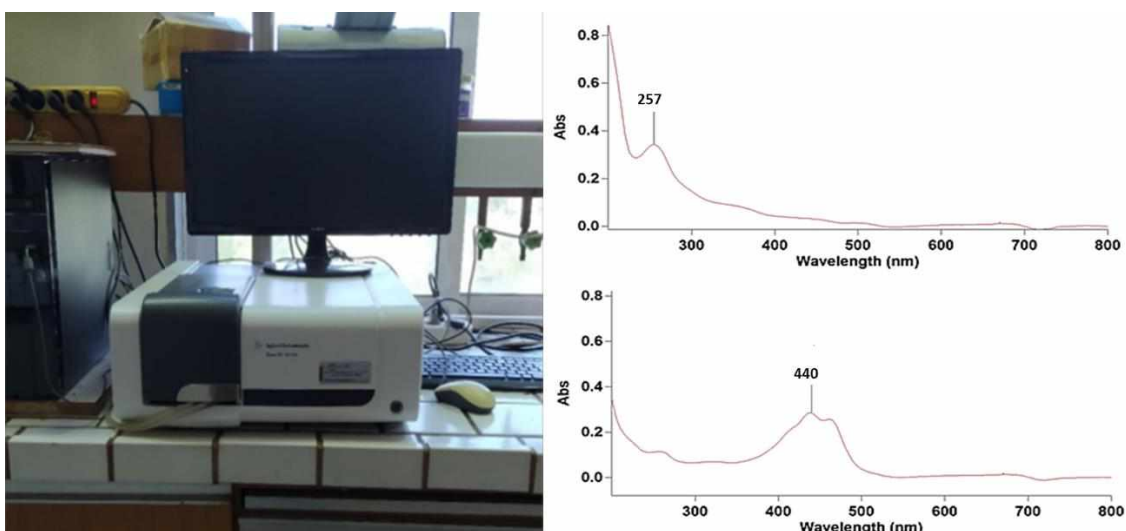
Όσον αφορά την παραλαβή των κροκινών με τη μέθοδο SPE, σύμφωνα με την διδακτορική διατριβή του Κανάκη (2007) όπου δοκιμάστηκαν διάφορες αναλογίες διαλυτών για την παραλαβή τους, σημειώθηκε ότι αυτές εκλούστηκαν με 30 % (v/v) αναλογία ACN/νερού, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 2 mL εκχυλίσματος σαφράν από το οποίο παρελήφθησαν οι κροκίνες με την ανωτέρω μέθοδο. Τα στηλάκια εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου Bakerbond C18 της εταιρείας J.T. Baker.

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία για την παραλαβή της πικροκροκίνης, περάστηκαν από την στήλη 21 mL υδατικού διαλύματος ACN 12% (Εικόνα 3.2. (α)) και το έκλουσμα συλλέχθηκε σε 7 δοκιμαστικά σωληνάκια όγκου 3 mL το καθένα.

Για την παραλαβή των κροκινών, χρησιμοποιήθηκαν 25 mL υδατικού διαλύματος ACN 30%, (Εικόνα 3.2. (β)) και το έκλουσμα συλλέχθηκε σε 8 δοκιμαστικά σωληνάκια όγκου 3 mL το καθένα.

Τα κλάσματα που ελήφθησαν από την εκχύλιση SPE στη συνέχεια φασματοφωτομετρήθηκαν στο υπεριώδες-ορατό φάσμα (UV-Vis) (Εικόνα 3.3. (α)) και οι απορροφήσεις τους λήφθηκαν μέσω του λογισμικού Cary WinUV για να επιβεβαιωθεί η παρουσία των επιθυμητών ουσιών σε αυτά (Εικόνα 3.3. (β)).

- ✓ Πράγματι η πικροκροκίνη εμφάνισε την χαρακτηριστική κορυφή στα 257 nm και αντίστοιχα οι κροκίνες στα 440 nm.



Εικόνα 3.3. (α) Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, διπλής δέσμης, Agilent Technologies **(β)** Φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος 12% v/v ACN (πάνω), Φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος 30% v/v ACN (κάτω).

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκαν επιπλέον αναλύσεις Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) HPLC και Υγρής Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας Μάζας (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) LC-MS στο εκχύλισμα του δείγματός μας για περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας των επιθυμητών ουσιών σε αυτό.

3.1.4. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Υλικά και αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC και LC-MS της εταιρίας Fisher Scientific Co. (Chicago, IL, USA).
- Υπερκάθαρο νερό
- Μυρμηκικό οξύ
- Σύριγγα χωρητικότητας 100 μ L

Συσκευές και Όργανα

- Σύστημα καθαρισμού του νερού “Genie Water System” της εταιρίας RephiLe Bioscience Ltd (Shanghai, China)
- Στήλη αντίστροφης φάσης Nucleosil, L= 250 mm, I.D.= 4.6 mm και P.S.= 5 μ m (Macherey – Nagel, Düren, Germany)
- Σύστημα Agilent Model 1100 HPLC συνδυασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου κύματος UV-Vis DAD (Diode Array Detector)
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής συνδεδεμένος με το σύστημα HPLC και το λογισμικό HP Chemstation για την ανάλυση των αποτελεσμάτων

Μεθοδολογία

Για την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ακολουθήθηκε επίσης το πρωτόκολλο της πειραματικής μελέτης της Καρασταμάτη (2014).



Εικόνα 3.4. Σύστημα HPLC-DAD συνδεδεμένο με Η/Υ

Το κάθε δείγμα από τα υδατικά εκχυλίσματα εισάγονταν στο σύστημα HPLC (Εικόνα 3.4.) με την ειδική σύριγγα ενώ ο όγκος εισαγωγής ήταν τα 20 μL , σε βαλβίδα υψηλής πίεσης. Η στήλη ήταν θερμοστατούμενη σε ειδικό φούρνο για το HPLC (Column heater - Model 7971, Jones Chromatography) στους 30 $^{\circ}\text{C}$.

Η κινητή φάση αποτέλεσε συνδυασμό δύο διαλυτών. Ο διαλύτης έκλουσης A ήταν το νερό με προσθήκη 0,25% μυρμηκικού οξέος για την ρύθμιση του pH, και ο διαλύτης έκλουσης B ήταν το ακετονιτρίλιο. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε σε σταθερή τιμή των 0,8 mL/min. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) η οποία ακολούθησε το πρόγραμμα του Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων του σαφράν με HPLC.

| Χρόνος (min) | % A | % B |
|--------------|-----|-----|
| 0 | 80 | 20 |
| 5 | 80 | 20 |
| 15 | 20 | 80 |
| 20 | 80 | 20 |
| 30 | 80 | 20 |

Η καταγραφή των εκλούόμενων συστατικών, ήταν συνεχής με ανίχνευση του φάσματος απορρόφησης μέσω ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) στα 257, 270, 330, 440 nm, ενώ το εύρος λειτουργίας ήταν από 190-950 nm.

3.1.5. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Υλικά και αντιδραστήρια

- *Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC και LC-MS της εταιρίας Fisher Scientific Co. (Chicago, IL, USA).*
- *Υπερκάθαρο νερό*
- *Μυρμηκικό οξύ*

Συσκευές και Όργανα

- *Φασματογράφος μάζας: LC-MS 2010A της εταιρίας Shimadzu*
- *Στήλη αντίστροφης φάσης, Supelco Discovery HS C18, L= 250 mm, I.D.= 4.6 mm και P. S.= 5 μm (Sigma-Aldrich)*
- *Υπολογιστής συνδεδεμένος με τη διάταξη και το λογισμικό LC-MS solution: 3.40.307 για την ανάλυση των αποτελεσμάτων*
- *Αυτόματος δειγματολήπτης*

Μεθοδολογία

Για την ανάλυση LC-MS (Εικόνα 3.5.) χρησιμοποιήθηκαν τα κλάσματα τα οποία έδιναν την μεγαλύτερη απορρόφηση στο UV-Vis και την HPLC, και έτσι περιείχαν σε μεγαλύτερη αφθονία τις ενώσεις.



Εικόνα 3.5. Εργαστηριακή διάταξη του συστήματος LC-DAD/MS της SHIMADZU

Για την στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η ίδια στήλη με αυτήν του συστήματος HPLC-DAD ενώ η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 30 °C.

Την κινητή φάση αποτέλεσαν τα διαλύματα: A= 0,25 % μυρμηκικό οξύ σε νερό B= ακετονιτρίλιο. Η βαθμιδωτή έκλυση ακολούθησε το πρόγραμμα του Πίνακα 3.2.

- Ροή: 0,8 mL/min
- Όγκος ένεσης δείγματος: 20 μ L
- Ανιχνευτής: Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (DAD), Φάσμα UV-Vis: 200-700nm, Μήκος Κύματος Εργασίας: 250, 330, 440 nm

Λειτουργία Φασματογράφου Μάζας Απλού Τετραπόλου:

Λειτουργία λήψης: ESI (+) SCAN

Αρχικό m/z: 100

Τελικό m/z: 1400

Ταχύτητα σκαναρίσματος: 6000 amu/sec

Χρόνος διεξαγωγής: 0,2 sec

Ροή αερίου εκνέφωσης: 1,5 L/min

Θερμοκρασία θερμικού μπλόκ: 300 °C

Θερμοκρασία CDL (καμπύλης απόσβεσης): 250 °C

Τάση διεπαφής: +4,5 kV

Τάση ανιχνευτή: -1,85 kV

Λειτουργία λήψης: ESI (-) SCAN

Αρχικό m/z: 100

Τελικό m/z: 1400

Ταχύτητα σκαναρίσματος: 6000 amu/sec

Χρόνος διεξαγωγής: 0,2 sec

Ροή αερίου εκνέφωσης: 1,5 L/min

Θερμοκρασία θερμικού μπλόκ: 300 °C

Θερμοκρασία CDL (καμπύλης απόσβεσης): 250 °C

Τάση διεπαφής: -3,5 kV

Τάση ανιχνευτή: -1,55 kV

3.1.6. Μεθοδολογία Αποκριτικών Επιφανειών

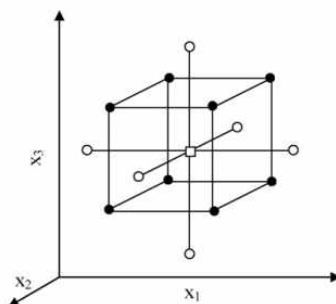
Ο πειραματικός σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Design-Expert 11.0.5.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Χρησιμοποιήθηκε ο περιστρεφόμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός πέντε επιπέδων (Rotatable Central Composite Design, RCCD) σε συνδυασμό με τη μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Methodology, RSM), με τρεις ποσοτικούς παράγοντες (A: ο όγκος του δείγματος, B: η περιεκτικότητα του διαλύτη σε ACN, και ο C: όγκος του διαλύτη) και μία απόκριση για κάθε ένα από τα μοντέλα (πικροκροκίνη και κροκίνες). Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της προσαρμογής των μοντέλων. Η επάρκεια των μοντέλων επιβεβαιώθηκε από τα δεδομένα απόκρισης 20 διαφορετικών δειγμάτων κονιορτοποιημένου σαφράν που αναλύθηκαν υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες SPE που προτάθηκαν από τα μοντέλα.

2^ο στάδιο

Στη φάση αυτή, βασιζόμενοι στην βιβλιογραφία και την παρατήρηση των αποτελεσμάτων από τις παραπάνω αναλύσεις, ορίσαμε τις μεταβλητές με σκοπό να δημιουργήσουμε δυο διαφορετικά μοντέλα. Ένα για την παραλαβή της πικροκροκίνης και ένα για τις κροκίνες.

Οι μεταβλητές που ορίστηκαν ήταν, ο όγκος του δείγματος (sample size) σε mL, η περιεκτικότητα του διαλύτη σε ACN (elution solvent percent) εκφρασμένο σε ποσοστό % v/v, και ο όγκος του διαλύτη (elution volume) σε mL.

Ο σχεδιασμός RSM που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ο περιστρεφόμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός ο οποίος είναι κατάλληλος για τη βελτιστοποίηση διεργασιών όπως η δική μας (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού τριών παραγόντων (•) τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού (points of factorial design), (○) τα αξονικά σημεία (axial points) και (□) το κεντρικό σημείο (central point) (Bezerra et al., 2008).

Επιπλέον, εκτός από τους παράγοντες A, B, C, ορίστηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και τις δικές μας δοκιμές οι ελάχιστες (low) και μέγιστες (high) τιμές των παραγόντων (Εικόνα 3.7).

Numeric factors: (2 to 50) Horizontal Enter factor ranges in terms of ± 1 levels

Categoric factors: (0 to 10) Vertical Enter factor ranges in terms of alphas

| | Name | Units | Low | High | -alpha | +alpha |
|-------------|--------------------|-------|-----|------|----------|---------|
| A [Numeric] | sample volume | mL | 1 | 3 | 0.318207 | 3.68179 |
| B [Numeric] | Aqueous ACN | % | 10 | 15 | 8.29552 | 16.7045 |
| C [Numeric] | Aqueous ACN volume | mL | 10 | 30 | 3.18207 | 36.8179 |

Εικόνα 3.7. Ανάλυση των παραγόντων για την βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής της πικροκροκίνης στο λογισμικό Design Expert.

Η απόκριση για το κάθε μοντέλο αφορά την απορρόφηση της πικροκροκίνης και των κροκινών του εκχυλίσματος σαφράν στο ζητούμενο μήκος κύματος. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής της πικροκροκίνης ο όγκος του δείγματος ορίστηκε από 1 έως 3 mL, η % περιεκτικότητα του υδατικού ακετονιτριλίου από 10 έως 15 % v/v και ο όγκος του υδατικού ακετονιτριλίου από 10 έως 30 mL. Εφόσον ορίσαμε

τις παραπάνω τιμές, οι οποίες αποτελούν το κυβικό τμήμα του CCD, το Design-Expert υπολόγισε την κωδικοποιημένη απόσταση "άλφα" (- alpha, +alpha) για την τοποθέτηση των αξονικών σημείων (ο (axial points) Εικόνα 3.6.) στο CCD. Από το σχεδιασμό προέκυψαν 20 διαφορετικές πειραματικές εκτελέσεις (runs).

Ακολούθως, για τις κροκίνες, οι τιμές για τον όγκο του δείγματος και τον όγκο του διαλύτη παρέμειναν ίδιες, ενώ η περιεκτικότητα του διαλύτη σε ACN αυξήθηκε (25-50 mL) (Εικόνα 3.8).

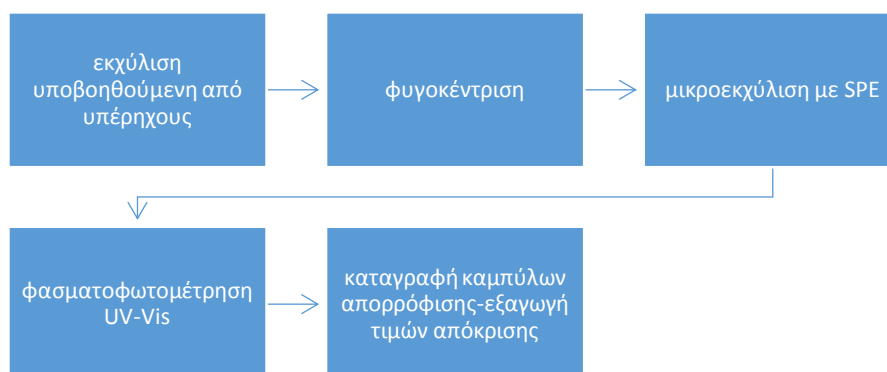
Numeric factors: (2 to 50) Horizontal Enter factor ranges in terms of ± 1 levels

Categoric factors: (0 to 10) Vertical Enter factor ranges in terms of alphas

| | Name | Units | Low | High | -alpha | +alpha |
|-------------|--------------------|-------|-----|------|----------|---------|
| A [Numeric] | sample volume | mL | 1 | 3 | 0.318207 | 3.68179 |
| B [Numeric] | Aqueous ACN | % | 25 | 50 | 16.4776 | 58.5224 |
| C [Numeric] | Aqueous ACN volume | mL | 10 | 30 | 3.18207 | 36.8179 |

Εικόνα 3.8. Ανάλυση των παραγόντων για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής των κροκινών στο λογισμικό Design Expert.

Για την φάση αυτή των δοκιμών, χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό από το δείγμα **901, Extra BIO EU 1**, της εσοδείας **2020**. Η διαδικασία που ακολουθήθηκαν για την παραλαβή των εκχυλισμάτων για τις 20 διαφορετικές εκτελέσεις του πειράματος είναι αυτές που περιγράφονται αναλυτικά στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου (Εικόνα 3.9.). Στη συνέχεια, έγινε εισαγωγή των τιμών των απορροφήσεων στο Design Expert για να πραγματοποιηθεί η εξαγωγή του επιθυμητού μοντέλου.



Εικόνα 3.9. Βήματα πειραματικής επεξεργασίας του φυτικού υλικού για την ανάπτυξη των στατιστικών μοντέλων.

3^ο στάδιο

Ακολούθησε η πειραματική επαλήθευση των τιμών όπως αυτές διαμορφώθηκαν από το λογισμικό (Πίνακας 3.3) σε 20 διαφορετικά δείγματα saffron (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.3. Συνθήκες βελτιστοποίησης παραλαβής των επιθυμητών συστατικών του saffron.

| Συστατικό | Όγκος εκχυλίσματος (mL) | Περιεκτικότητα διαλύτη σε ACN (% v/v) | Όγκος διαλύτη (mL) |
|--------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Πικροκροκίνη | 3 | 15 | 10 |
| Κροκίνες | 3 | 50 | 10 |

3.1.7. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με αναλυτή τετραπόλου-χρόνου πτήσης ιόντων LC-Q-TOF/MS

Υλικά και αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC και LC-MS της εταιρίας Fisher Scientific Co. (Chicago, IL, USA)
- Υπερκάθαρο νερό
- Μυρμηκικό οξύ

Συσκευές και Όργανα

- Υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με αναλυτή τετραπόλου-χρόνου πτήσης ιόντων Q-TOF LC/MS, 6530 Accurate – Mass (Agilent Technologies)
- Στήλη αντίστροφης φάσης Nucleosil, L= 250 mm, I.D.= 4.6 mm και P.S.= 5 μm (Macherey – Nagel, Düren, Germany)
- Υπολογιστής συνδεδεμένος με τη διάταξη και το λογισμικό Agilent MassHunter Data Acquisition (version B.06.00) για την λήψη των δεδομένων και το Agilent MassHunter Qualitative Analysis (version B.07.00) για την επεξεργασία των δεδομένων

Μεθοδολογία

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με αναλυτή τετραπόλου-χρόνου πτήσης ιόντων LC-Q-TOF/MS (Εικόνα 3.10.) στο φυτικό υλικό

901, Extra BIO EU 1, της εσοδείας του έτους 2020. Και συγκεκριμένα στα εκχυλίσματα πικροκροκίνης και κροκινών, τα οποία προέκυψαν από την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών στην SPE.



Εικόνα 3.10. Εργαστηριακή διάταξη αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων συνδυασμένου με τετράπολο.

Για την στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η ίδια στήλη με αυτήν του συστήματος HPLC-DAD ενώ η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 30 °C. Την κινητή φάση αποτέλεσαν τα διαλύματα: A= 0,25 % μυρμηκικό οξύ σε νερό B= ακετονιτρίλιο. Η βαθμιδωτή έκλυση ακολούθησε το πρόγραμμα του Πίνακα 3.2.

Συνθήκες ανάλυσης

- Θερμοκρασία αερίου αποδιαλύτωσης: 300 °C
- Ροή αερίου αποδιαλύτωσης: 10 L/min
- Πίεση αερίου εκνεφωτή: 45 psi
- Δυναμικό τριχοειδούς: 4000 V
- Δυναμικό θραυσματοποίησης: 150 V
- Δυναμικό αποκορυφωτή / διαχωριστή ιόντων: 65 V
- Ταχύτητα σάρωσης: 2.00 scan/sec
- Εύρος ανιχνευόμενων μαζών: 50-1050 m/z

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων υπήρχε συνεχής διόρθωση της βαθμονόμησης του συστήματος με διοχέτευση κατάλληλου διαλύματος που περιείχε γνωστές τιμές ιόντων αναφοράς. Στη λειτουργία του θετικού ιοντισμού τα ιόντα αναφοράς είχαν τιμές m/z 121,0509 και 922,0098, και αντίστοιχα στη λειτουργία του αρνητικού ιοντισμού οι τιμές m/z ήταν 112,9856 και 1033,9881.

3.2. Αποτελέσματα - Συζήτηση

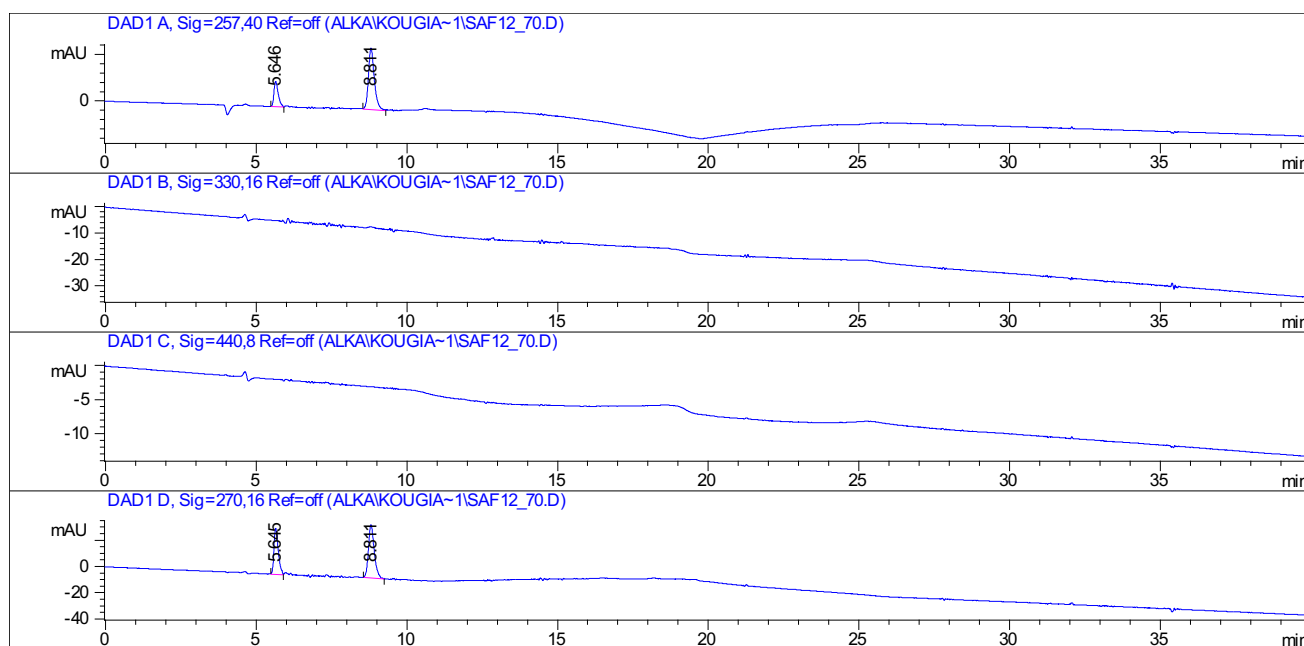
3.2.1. Ανάλυση με HPLC

Τα μήκη κύματος τα οποία επιλέχθηκαν για την ανάλυση HPLC, βασίστηκαν στις αναφορές της βιβλιογραφίας. Ειδικότερα, η πικροκροκίνη παρουσιάζει μια χαρακτηριστική ευρεία ζώνη απορρόφησης στο φάσμα UV στα 250 nm, λόγω της α,β -ακόρεστης κυκλοαλδεΐδης που υπάρχει στο μόριο, ενώ παράλληλα η οξείδωση της αλδεϋδικής ομάδας οδηγεί στην όξινη μορφή της πικροκροκίνης και έτσι εμφανίζεται επιπλέον μια ζώνη απορρόφησης του α,β -ακόρεστου κυκλικού οξέος στα 246 nm (Tarantilis et al., 1995).

Όσον αφορά την παρουσία φαινολικών και ισοφλαβονοειδών ενώσεων αυτές ανιχνεύονται στα 280 nm, ενώ οι φλαβονοειδείς ενώσεις στα 350 nm (Karimi et al., 2010). Επιπλέον τα καροτενοειδή, εμφανίζουν χαρακτηριστικά φάσματα στην ορατή (Vis) περιοχή με διπλές κορυφές μεταξύ των 400 και 500 nm. Στην περιοχή UV μεταξύ 320 και 340 nm, μια κορυφή απορρόφησης που αναφέρεται ως *cis* κορυφή, εμφανίζεται για τα ισομερή *cis*, με την έντασή της να ποικίλλει ανάλογα με τη θέση και τον αριθμό των διπλών *cis* δεσμών.

Τα φάσματα UV-Vis των *all-trans* γλυκοσιδικών καροτενοειδών του σαφράν παρουσιάζουν δύο ζώνες απορρόφησης. Η πρώτη, στα 256 nm, αντιστοιχεί στους δεσμούς γλυκοζυλεστέρα των κροκινών, και η δεύτερη, μεταξύ 400 και 500 nm, με μέγιστο στα 437 nm, είναι χαρακτηριστική των *all-trans* καροτενοειδών. Τα *cis* ισομερή εμφανίζουν τρεις ζώνες απορρόφησης. Η πρώτη, στα 260 nm, αντιστοιχεί σε γλυκοζυλεστερικούς δεσμούς των κροκινών, η δεύτερη, στα 325 nm, αποδίδεται κυρίως στην παρουσία *cis* διπλών δεσμών στο συζευγμένο σύστημα πολυενίων των κροκινών, και η τρίτη ζώνη, μεταξύ 400 και 500 nm αντιστοιχεί στα *all-trans* καροτενοειδή. (Tarantilis et al., 1995)

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων της γρήγης χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, η οποία πραγματοποιήθηκε για τα κλασματοποιημένα εκχυλίσματα της πικροκροκίνης και των κροκινών, την μεγαλύτερη αφθονία στις κορυφές των ουσιών παρατηρήσαμε στο τελευταίο κλάσμα του εκχυλίσματος πικροκροκίνης (Εικόνα 3.11.) και το πρώτο του εκχυλίσματος των κροκινών (Εικόνα 3.12.).

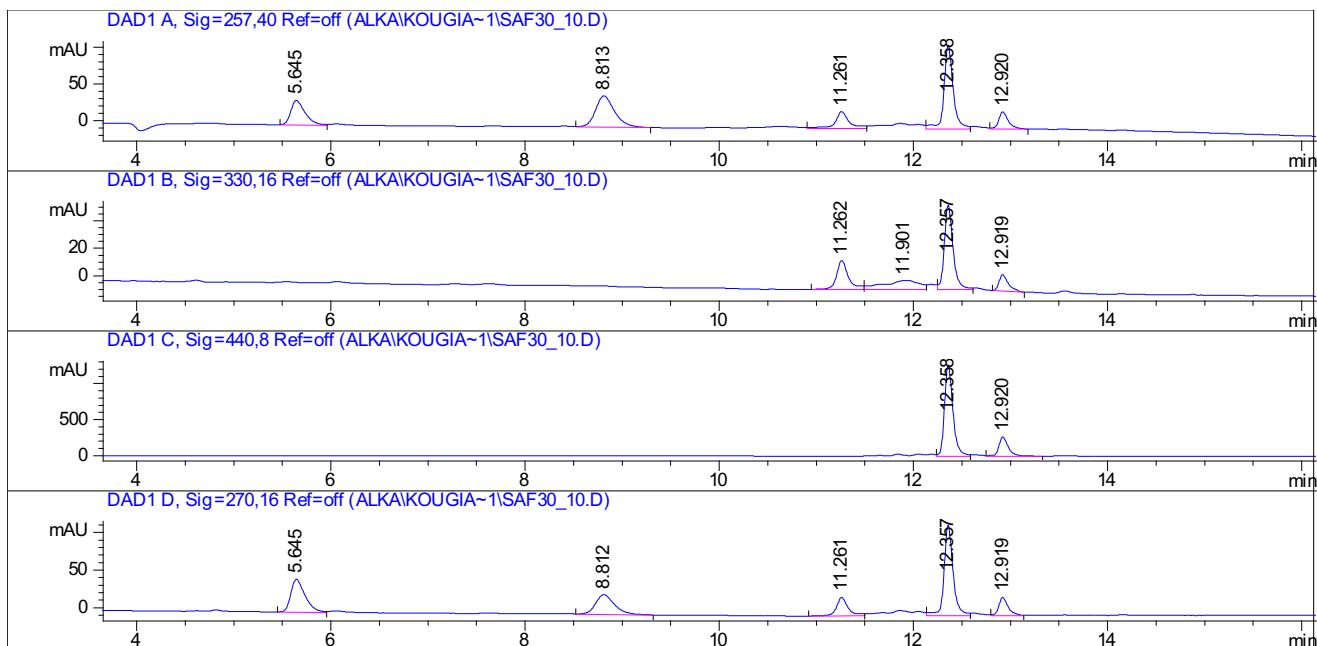


Εικόνα 3.11. Χρωματογραφήματα HPLC σε τέσσερα μήκη κύματος (257, 330, 270, 440 nm) από το εκχύλισμα σαφράν το οποίο λήφθηκε κατά την εφαρμογή της SPE με την χρήση 12% v/v υδατικού ACN.

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε ότι τόσο στα 257 nm όσο και στα 270 nm έχουμε την εμφάνιση δύο συγκεκριμένων κορυφών. Όσον αφορά την κορυφή που διακρίνεται σε χρόνο κατακράτησης (retention time, rt) 5,65 min, παρουσιάζει μεγαλύτερη αφθονία στα 270 nm. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με τις αναφορές της βιβλιογραφίας, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μάλλον πρόκειται για *ισοφλαβονοειδές*. Καθώς σύμφωνα με τους Karimi et al. οι φαινολικές και οι ισοφλαβονοειδείς ενώσεις του σαφράν ανιχνεύονται στα 280 nm. (Karimi et al., 2010)

Σχετικά με την κορυφή στα 8,81 min, πρόκειται για την χαρακτηριστική κορυφή της *πικροκροκίνης*, η οποία απορροφά στα 257 nm. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα επιβεβαιώνεται από τον χρόνο κατακράτησης της συγκεκριμένης ουσίας όπως

παρουσιάστηκε και από την μέθοδο LC-Q-TOF/MS που πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια. Αλλά και την εργαστηριακή μελέτη της Καρασταμάτη (2014), η οποία χρησιμοποίησε τη στήλη αντίστροφης φάσης ιδίων διαστάσεων με την παρούσα μελέτη, εντοπίζοντας την ουσία σε $t_r = 8,19$ min.



Εικόνα 3.12. Χρωματογραφήματα HPLC σε τέσσερα μήκη κύματος (257, 330, 270, 440 nm) από το εκχύλισμα σαφράν το οποίο λήφθηκε κατά την εφαρμογή της SPE με την χρήση 30% v/v υδατικού ACN.

Στο διάγραμμα ανάλυσης του εκχυλίσματος των κροκινών, παρατηρούμε ότι οι κορυφές στα 257 nm και τα 270 nm εξακολουθούν να εμφανίζονται, γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία των παραπάνω ουσιών και σε αυτό το εκχύλισμα.

Σε αυτό το δείγμα έχουμε την εμφάνιση τεσσάρων επιπλέον κορυφών με τις δύο από αυτές (t_r : 12,36 και 12,92) να εμφανίζονται σε όλα τα μήκη κύματος, ωστόσο παρατηρούμε ότι η αφθονία αυτών των δυο κορυφών είναι μεγαλύτερη στα 440 nm. Βασιζόμενοι στους χρόνους κατακράτησης που εμφανίζουν αλλά και τις βιβλιογραφικές αναφορές, συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για εστέρες της κροκετίνης (κροκίνες) καθώς απορροφούν σε μήκος κύματος 440 nm. Θα μπορούσαμε επίσης να συμπεράνουμε ότι οι κορυφές με χρόνους κατακράτησης 12,36 min και 12,92 min, οι οποίες εμφανίζονται τόσο στην ζώνη απορρόφησης των 330 nm όσο και στα 440 nm,

αποτελούν *cis* στερεοϊσομερή, ενώ οι άλλες δύο (rt: 11,26 και 11,09) ανήκουν σε *all-trans* στερεοϊσομερή (Tarantilis et al., 1994), (Tarantilis et al., 1995).

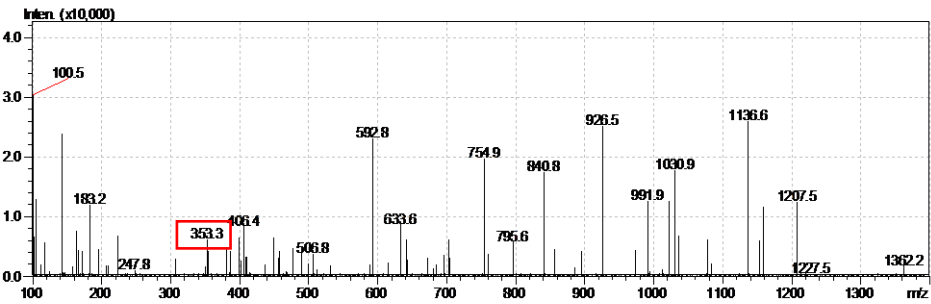
3.2.2 Ανάλυση με LC/MS

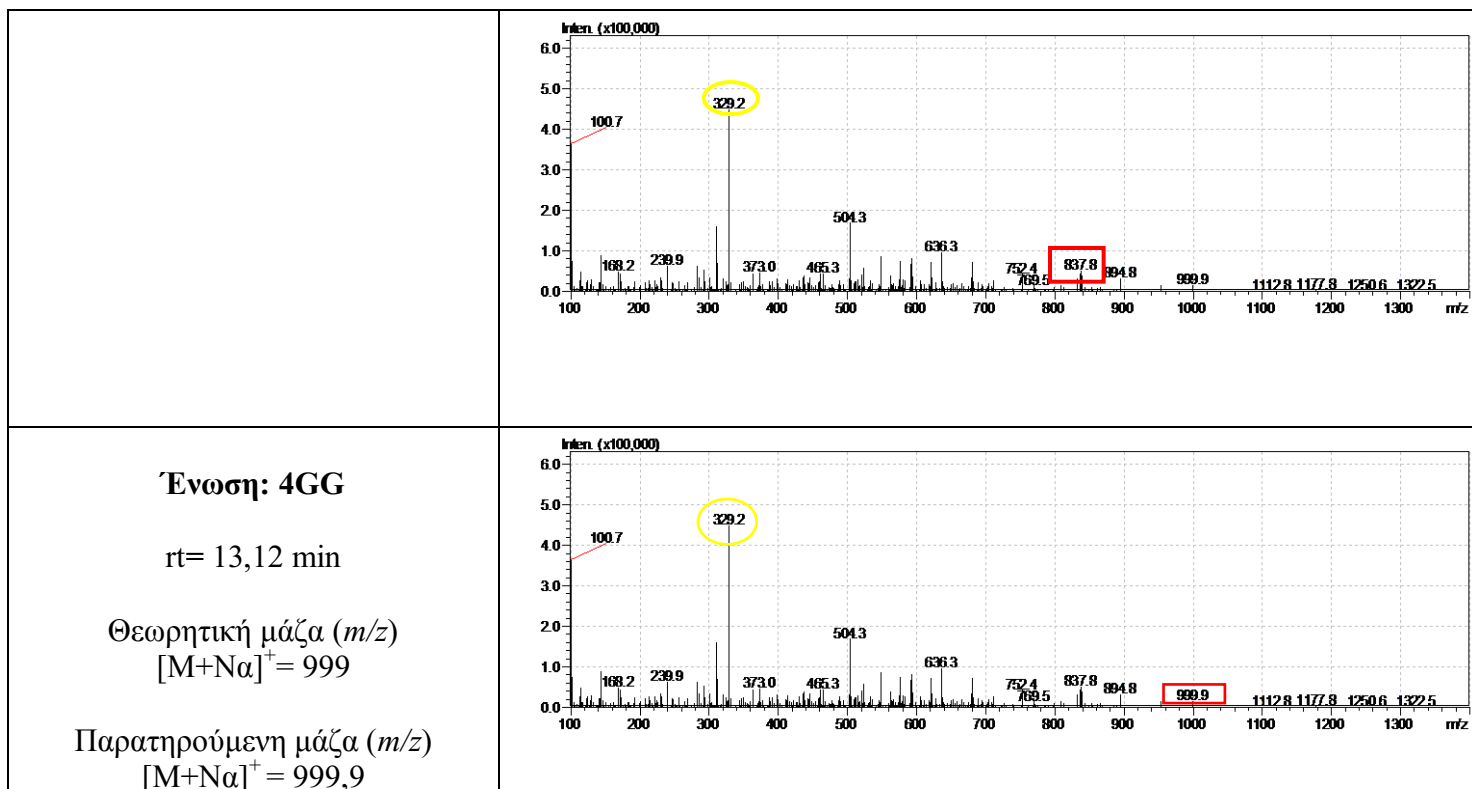
Τα εκχυλίσματα των οποίων η ανάλυση HPLC παρουσιάστηκε παραπάνω, αναλύθηκαν και στο LC/MS ώστε να έχουμε μια επιπλέον εικόνα για την παρουσία των επιθυμητών ενώσεων σε αυτά. Έτσι τα ίδια εκχυλίσματα περάστηκαν στον θετικό και τον αρνητικό ιοντισμό και η ύπαρξη των επιθυμητών ουσιών εντοπίστηκε μέσω της αναζήτησης της εκάστοτε θεωρητικής μάζας.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον θετικό ιοντισμό, εντοπίστηκαν σε αυτόν η ένωση της πικροκροκίνης καθώς και δυο από τις κροκίνες, η 3Gg και η 4Gg.

Όσον αφορά τον αρνητικό ιοντισμό, εντοπίστηκαν περισσότερες ενώσεις σε αυτόν, εκ των οποίων πέντε από αυτές αντιστοιχούν στις κροκίνες 1g, 2G, 3Gg, 4Gg, 5GGg, καθώς και η πικροκροκίνη.

Πίνακας 3.4. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με LC/MS στον θετικό ιοντισμό ESI (+).

| | |
|---|--|
| <p>Ένωση: Πικροκροκίνη</p> <p>rt= 7,39 min</p> <p>Θεωρητική μάζα (<i>m/z</i>) [M+Nα]⁺ = 353</p> <p>Παρατηρούμενη μάζα (<i>m/z</i>) [M+Nα]⁺ = 353,3</p> |  |
| <p>Ένωση: 3Gg</p> <p>rt= 13,12 min</p> <p>Θεωρητική μάζα (<i>m/z</i>) [M+Nα]⁺ = 837</p> <p>Παρατηρούμενη μάζα (<i>m/z</i>) [M+Nα]⁺ = 837,8</p> | |



Η ονοματολογία των κροκινών βασίζεται σε αυτή που πρότειναν οι Tarantilis et al (1995) και Carmona et al (2006), σύμφωνα με την οποία, το πρώτο τμήμα του ονόματος περιγράφει την ισομερική μορφή του άγλυκου τμήματος, ακολουθεί ο συνολικός αριθμός των τμημάτων σακχάρων του μορίου και τέλος αναφέρεται ο τύπος του σακχάρου σε κάθε άκρο της κροκίνης: (n) νεαπολιτανοζίτης, (G) γεντοβιοζίτης, (g) γλυκοζίτης.

- ✓ Η μάζα με μάζα (m/z) [M+Na]⁺ = 329,2 αντιστοιχεί στην αγλυκόνη της κροκετίνης.

Πίνακας 3.5. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με LC/MS στον αρνητικό ιοντισμό ESI (-)

| | |
|--|--|
| <p>Ένωση: Πικροκροκίνη</p> <p>rt= 7,39 min</p> <p>Θεωρητική μάζα (m/z)</p> <p>M+FA-H = 375</p> <p>Παρατηρούμενη μάζα (m/z)</p> <p>M+FA-H = 375,1</p> | |
| <p>Ένωση: 1g</p> <p>rt= 13,10 min</p> <p>Θεωρητική μάζα (m/z)</p> <p>[M-H]⁻ = 489</p> <p>Παρατηρούμενη μάζα (m/z)</p> <p>[M-H]⁻ = 489,3</p> | |
| <p>Ένωση: 2G</p> <p>rt= 12,58, 12,91, 13,10, 13,65 και 14,33 min</p> <p>Θεωρητική μάζα (m/z)</p> <p>[M-H]⁻ = 651</p> <p>Παρατηρούμενη μάζα (m/z) [M-H]⁻</p> <p>= 651,1, 651, 651,2, 651,8 και 651,1</p> | |

3Gg

rt= 13,10 min

Θεωρητική μάζα (m/z)

$[M-H]^- = 813$

Παρατηρούμενη μάζα (m/z)

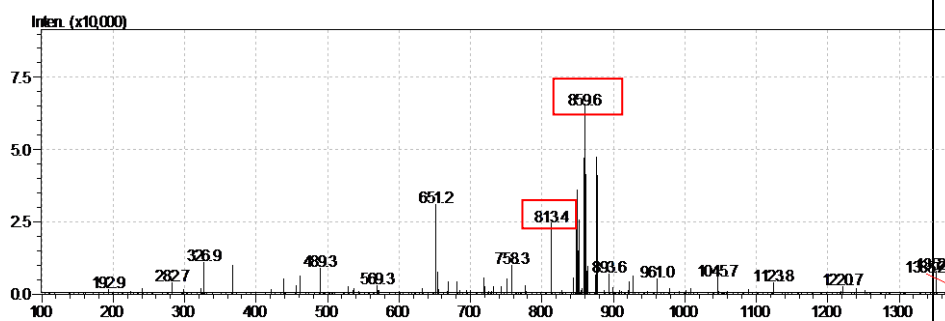
$[M-H]^- = 813,4$

Θεωρητική μάζα (m/z)

$M+FA-H = 859$

Παρατηρούμενη μάζα (m/z)

$M+FA-H = 859,6$



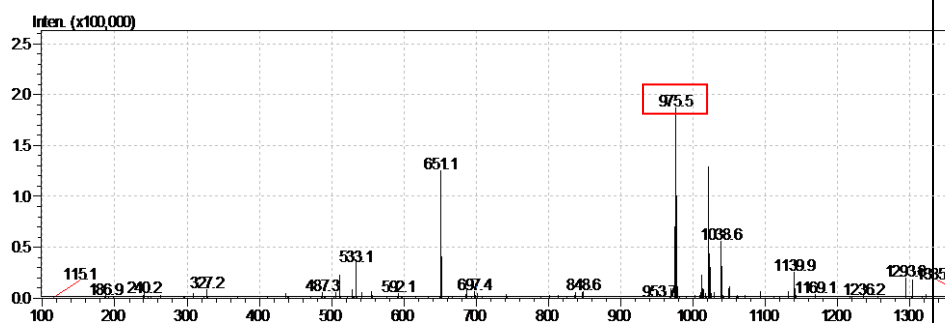
4GG

rt= 12,58, 13,65 και 14,33 min

Θεωρητική μάζα $[M-H]^- = 975$

Παρατηρούμενη μάζα $[M-H]^- =$

975,5, 975,9 και 975,6



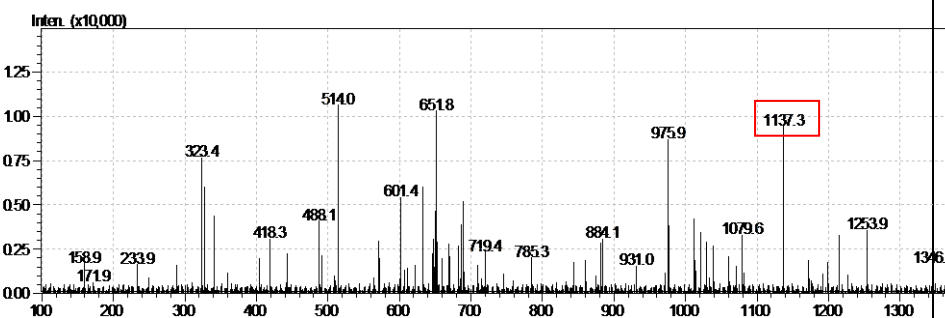
5GGG

rt= 13,65 min

Θεωρητική μάζα $[M-H]^- = 1.137$

Παρατηρούμενη μάζα $[M-H]^- =$

1.137,3



Για να επιβεβαιώσουμε την παρουσία των ενώσεων σύμφωνα με τη θεωρητική τους μάζα παρατηρήσαμε επιπλέον τον χρόνο κατακράτησης τους, ώστε αυτός να συνάδει με τον χρόνο που εμφάνισαν στις υπόλοιπες αναλυτικές μεθόδους.

Καθώς η ανάλυση LC/MS μπορεί να μας δώσει ακρίβεια μόνο ενός δεκαδικού ψηφίου είναι δυσκολότερο να συμπεράνουμε με σιγουριά αν πρόκειται για την *cis* ή την *trans* μορφή όσον αφορά τις κροκίνες εφόσον δεν έχουμε παράλληλη εικόνα για

την απορρόφηση στο UV-Vis.

Μελετώντας τις ερευνητικές μελέτες οι οποίες αφορούν την ανάλυση των στιγμάτων του *C. sativus* με την μέθοδο LC/MS, έχουμε την δυνατότητα να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της παρούσας. Έτσι, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι ένα μέρος των μελετών εντοπίζει επίσης το μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων στον αρνητικό ιοντισμό, ενώ ένα άλλο τις εντοπίζει στον θετικό.

Σύμφωνα με τους Guijarro-Díez et al. προκειμένου να ληφθεί ο μεγαλύτερος αριθμός ενώσεων από τα δείγματα του κρόκου τα οποία μελέτησαν για το μεταβολομικό τους προφίλ, λήφθηκαν υπόψη η φύση του διαλύτη εκχύλισης αλλά και το pH του διαλύματος, καθώς οι ενώσεις του κρόκου μπορεί να παρουσιάζουν ποικίλες πολικότητες. Επιπλέον, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων διερευνήθηκε με τη χρήση διαφορετικών σταθερών φάσεων για να μελετηθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός μιας σειράς ενώσεων διαφορετικής πολικότητας και ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες. Η ανάλυση MS πραγματοποιήθηκε σε ESI+ και ESI- για την παρατήρηση όσο το δυνατόν περισσότερων ιόντων. Επιπλέον, διερευνήθηκε και η επίδραση του χρόνου εκχύλισης σε λουτρό υπέρηχων, όπου τα 15 λεπτά επιλέχθηκαν ως ο βέλτιστος χρόνος. Τέλος, μελετήθηκαν και οι παράμετροι λειτουργίας του μηχανήματος για την επίδρασή τους στον εντοπισμό των ενώσεων. Όσον αφορά την συγκεκριμένη μελέτη, παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα στον θετικό ιοντισμό. (Guijarro-Díez et al., 2015)

Αντίστοιχα στην μελέτη των Suchareau et al. οι περισσότερες από τις κροκίνες ταυτοποιήθηκαν στον θετικό ιοντισμό με βάση το $[M + Na]^+$, και για όλες τις κροκίνες, τα m/z 329 και m/z 311 αντιστοιχούσαν στην αγλυκόνη της κροκετίνης και στην αφυδατωμένη αγλυκόνη της κροκετίνης αντίστοιχα (Suchareau et al., 2021).

Αντίθετα, οι Verma και Middha αναλύοντας τις ενώσεις του σαφράν μέσω LC-MS-MS επισήμαναν ότι επέλεξαν τον αρνητικό ιοντισμό για την επιθυμητή ταυτοποίηση καθώς παρουσίασε λιγότερα προβλήματα δίνοντας αποτελέσματα μεγαλύτερης αξιοπιστίας. Έτσι ταυτοποιήθηκαν δέκα διαφορετικές ενώσεις εκ των οποίων οι πέντε αντιστοιχούσαν σε κροκίνες στον αρνητικό ιοντισμό. (Verma & Middha, 2010)

Επιπλέον οι Muzaffar et al. μελετώντας την μη πτητική χημική σύνθεση του σαφράν, ταυτοποίησαν 30 συνολικά ουσίες στο υπό μελέτη μεθανολικό εκχύλισμα, οι περισσότερες εκ των οποίων εντοπίστηκαν στον αρνητικό ιοντισμό. (Muzaffar et al. 2018)

3.2.3. Επαλήθευση μοντέλου πικροκροκίνης

Στον Πίνακα 3.6, ο οποίος προέκυψε από το design expert αφού εισήγαμε τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα, εμφανίζονται οι 20 συνολικά πειραματικές δοκιμές, ο τύπος του σημείου που αποτελούν αυτές στον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό τριών παραγόντων, καθώς και οι τιμές των τριών παραγόντων όπως αυτές διαμορφώθηκαν από το πρόγραμμα για κάθε δοκιμή. Τέλος, η στήλη της απόκρισης αναγράφει την απορρόφηση του εκχυλίσματος που προέκυψε από κάθε δοκιμή στα 257 nm.

Πίνακας 3.6. Δοκιμές για την πειραματική μελέτη της απορρόφησης της πικροκροκίνης στα 257 nm.

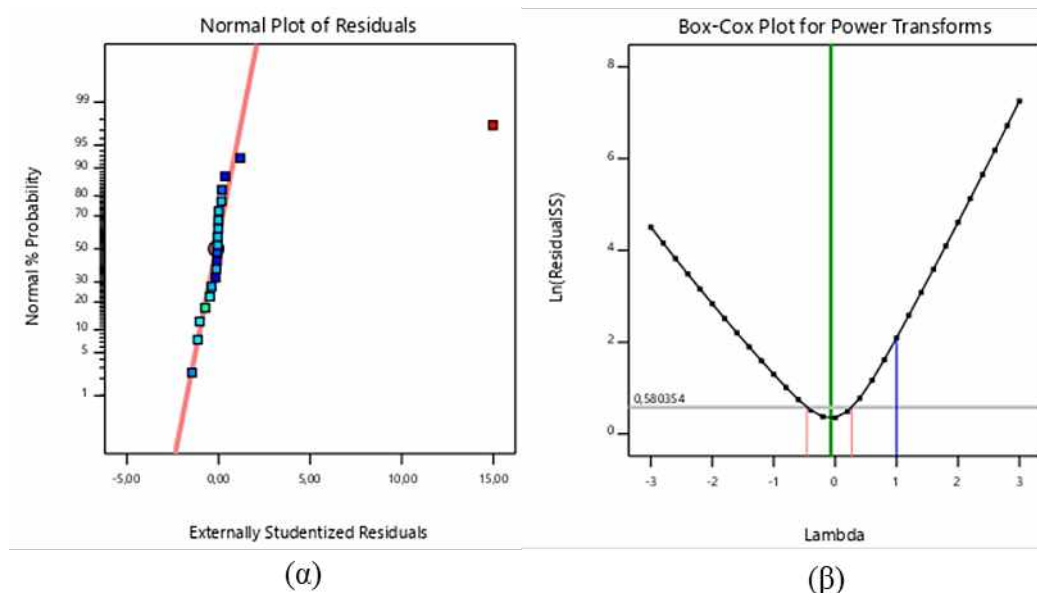
| Δοκιμή | Τύπος σημείου | Παράγοντας 1 | Παράγοντας 2 | Παράγοντας 3 | Απόκριση 1 |
|--------|---------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------|
| | | A: όγκος δείγματος (mL) | B: περιεκτικότητα δ/τη σε ACN (% v/v) | C: όγκος διαλύτη(mL) | Απορρόφηση 257 nm |
| 1 | Παραγοντικό | 1,000 | 10,000 | 10,000 | 0,295 |
| 2 | Αξονικό | 0,318 | 12,500 | 20,000 | 0,321 |
| 3 | Αξονικό | 2,000 | 8,296 | 20,000 | 0,344 |
| 4 | Παραγοντικό | 3,000 | 15,000 | 30,000 | 1,314 |
| 5 | Κεντρικό | 2,000 | 12,500 | 20,000 | 1,205 |
| 6 | Παραγοντικό | 1,000 | 15,000 | 30,000 | 0,639 |
| 7 | Αξονικό | 3,682 | 12,500 | 20,000 | 1,851 |
| 8 | Παραγοντικό | 1,000 | 10,000 | 30,000 | 0,442 |
| 9 | Κεντρικό | 2,000 | 12,500 | 20,000 | 1,164 |
| 10 | Παραγοντικό | 1,000 | 15,000 | 10,000 | 1,108 |
| 11 | Παραγοντικό | 3,000 | 10,000 | 10,000 | 1,420 |
| 12 | Παραγοντικό | 3,000 | 10,000 | 30,000 | 1,148 |
| 13 | Αξονικό | 2,000 | 12,500 | 36,818 | 0,752 |
| 14 | Κεντρικό | 2,000 | 12,500 | 20,000 | 1,187 |
| 15 | Κεντρικό | 2,000 | 12,500 | 20,000 | 1,109 |
| 16 | Κεντρικό | 2,000 | 12,500 | 20,000 | 1,184 |
| 17 | Κεντρικό | 2,000 | 12,500 | 20,000 | 1,166 |
| 18 | Παραγοντικό | 3,000 | 15,000 | 10,000 | 5,020 |
| 19 | Αξονικό | 2,000 | 12,500 | 3,182 | 0,897 |
| 20 | Αξονικό | 2,000 | 16,704 | 20,000 | 1,366 |

Μετά την καταγραφή του συνόλου των τιμών απόκρισης, ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ωστόσο τα μοντέλα που προτάθηκαν από το λογισμικό είχαν αρκετά χαμηλό συντελεστή προσδιορισμού (R^2) (Πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.7. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για την πικροκροκίνη.

| Μοντέλο | Προσαρμοσμένο R^2 | Προβλεπόμενο R^2 | |
|------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------|
| Γραμμικό | 0,4829 | 0,1888 | Προτεινόμενο |
| Αλληλεπίδραση δυο παραγόντων (2FI) | 0,7299 | 0,0025 | Προτεινόμενο |
| Τετραγωνικό | 0,6590 | -0,4432 | |
| Κυβικό | 0,8543 | -9,0765 | Αλλοιωμένο |

Επιπλέον, από την ανάλυση των υπολοίπων (residuals) (Εικόνα 3.13. (α)), παρατηρούμε ότι υπάρχει ένα σημείο που παρεκκλίνει από την ευθεία. Από το τεστ Box-Cox (Εικόνα 3.13. (β)), είναι φανερό ότι τα δεδομένα απαιτούν μετασχηματισμό καθώς το διάστημα εμπιστοσύνης για το βέλτιστο λ δεν περιλαμβάνει την τιμή 1, η οποία είναι ισοδύναμη με τη χρήση των αρχικών δεδομένων.



Εικόνα 3.13. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και (β) Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το γραμμικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης της πικροκροκίνης.

Μετά την εφαρμογή διάφορων μετασχηματισμών των δεδομένων της μεταβλητής απόκρισης, ο μετασχηματισμός με αντίστροφη τετραγωνική ρίζα κρίθηκε καταλληλότερος καθώς το τετραγωνικό (quadratic) μοντέλο που προτάθηκε από το λογισμικό (Πίνακας 3.8) είχε συντελεστές προσδιορισμού $R^2 = 0,9616$ και προσαρμοσμένο $R^2 = 0,9270$. Οι τιμές αυτές βρίσκονται κοντά στο 1 και σε σχετική συμφωνία με την προβλεπόμενη τιμή $R^2 = 0,7046$, υποδεικνύοντας την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών.

Πίνακας 3.8. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για την πικροκροκίνη μετά το μετασχηματισμό των δεδομένων της μεταβλητής απόκρισης με αντίστροφη τετραγωνική ρίζα.

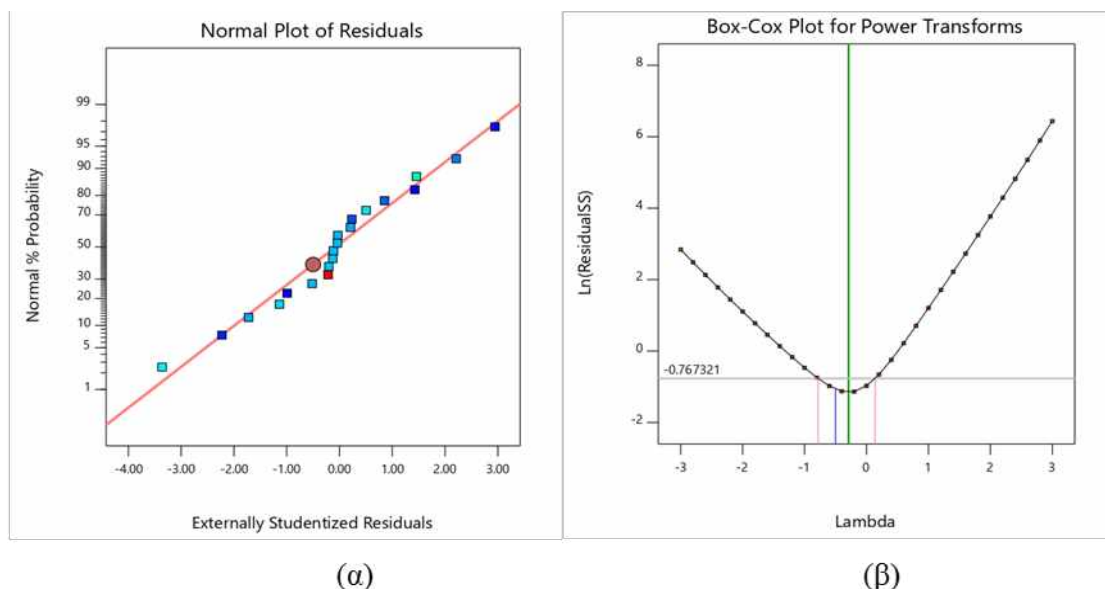
| Μοντέλο | Προσαρμοσμένο R^2 | Προβλεπόμενο R^2 | |
|------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------|
| Γραμμικό | 0,7523 | 0,6532 | |
| Αλληλεπίδραση δυο παραγόντων (2FI) | 0,8209 | 0,7730 | |
| Τετραγωνικό | 0,9270 | 0,7046 | Προτεινόμενο |
| Κυβικό | 0,9090 | -5,2564 | Αλλοιωμένο |

Το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης εκφράζεται από την κωδικοποιημένη εξίσωση (1):

$$Y = 0,9299 - 0,3066 A - 0,2216 B + 0,0474 C + 0,0863 AB + 0,0695 AC + 0,1212 BC + 0,0834 A^2 + 0,0941 B^2 + 0,0319 C^2 \quad (1)$$

Όπου Y: η αντίστροφη τετραγωνική ρίζα της απορρόφηση του εκχυλίσματος στα 257 nm ($1/\sqrt{\text{Abs}257}$), και A, B, C οι κωδικοποιημένες τιμές του όγκου του δείγματος, της % v/v περιεκτικότητας του διαλύτη σε ACN και του όγκου του διαλύτη αντίστοιχα.

Η ανάλυση των υπολοίπων δεν παρουσιάζει αποκλίσεις από τους ισχυρισμούς του τετραγωνικού μοντέλου (Εικόνα 3.14. (α)), καθώς όπως παρατηρούμε η κατανομή των σημείων είναι ομοιόμορφη γύρω από τον άξονα της ευθείας χωρίς να υπάρχουν σημεία που παρεκκλίνουν ιδιαίτερα. Αντίστοιχα η τιμή $\lambda = -0,5$ που προέκυψε από το τεστ Box-Cox (Εικόνα 3.14. (β)), βρίσκεται κοντά στο $\lambda = -0,29$ και εντός των ορίων (κόκκινα ευθύγραμμα τμήματα) γεγονός που υποδηλώνει ότι ο συγκεκριμένος μετασχηματισμός είναι κατάλληλος.



Εικόνα 3.14. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και (β) Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης της μικροκροκίνης με μετασχηματισμό αντίστροφης τετραγωνικής ρίζας.

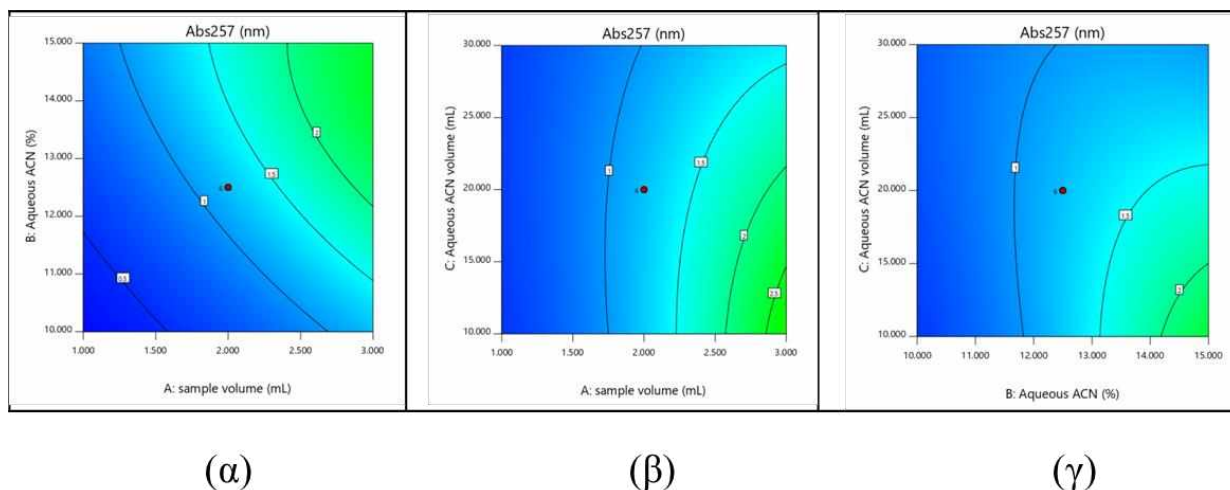
Πίνακας 3.9. Ανάλυση ANOVA τετραγωνικού μοντέλου μικροκροκίνης [¹DF= βαθμοί ελευθερίας (degree of freedom)]

| Πηγή | Άθροισμα τετραγώνων | DF ¹ | Μέσο τετράγωνο | F-value | p-value |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------|----------------|---------|----------|
| Μοντέλο | 2,410 | 9 | 0,268 | 27,830 | < 0,0001 |
| A-όγκος δείγματος | 1,280 | 1 | 1,280 | 133,280 | < 0,0001 |
| B-%v/v περιεκτικότητα δ/τη σε ACN | 0,671 | 1 | 0,671 | 69,630 | < 0,0001 |
| C-όγκος διαλύτη | 0,031 | 1 | 0,031 | 3,190 | 0,1044 |
| AB | 0,060 | 1 | 0,060 | 6,190 | 0,0321 |
| AC | 0,039 | 1 | 0,039 | 4,010 | 0,0729 |
| BC | 0,118 | 1 | 0,118 | 12,210 | 0,0058 |
| A ² | 0,100 | 1 | 0,100 | 10,400 | 0,0091 |
| B ² | 0,128 | 1 | 0,128 | 13,240 | 0,0045 |
| C ² | 0,015 | 1 | 0,015 | 1,530 | 0,2450 |
| Υπόλοιπο | 0,096 | 10 | 0,0096 | | |
| Έλλειψη προσαρμογής | 0,095 | 5 | 0,0191 | 106,910 | < 0,0001 |
| Καθαρό σφάλμα | 0,0009 | 5 | 0,0002 | | |

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της προσαρμογής του μοντέλου (Πίνακας 3.9).

Εξετάζοντας τον παραπάνω πίνακα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το τετραγωνικό μοντέλο που επιλέχθηκε είναι στατιστικά σημαντικό με τιμή p-value < 0,0001, ενώ παράλληλα και οι όροι A και B του μοντέλου είναι στατιστικά σημαντικοί (p-value < 0,05). Από την άλλη ο όρος C, με p-value>0,05 δεν είναι στατιστικά σημαντικός.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα περιγράμματος της αλληλεπίδρασης (contour plots) μεταξύ των τριών πειραματικών παραγόντων (Εικόνα 3.15).

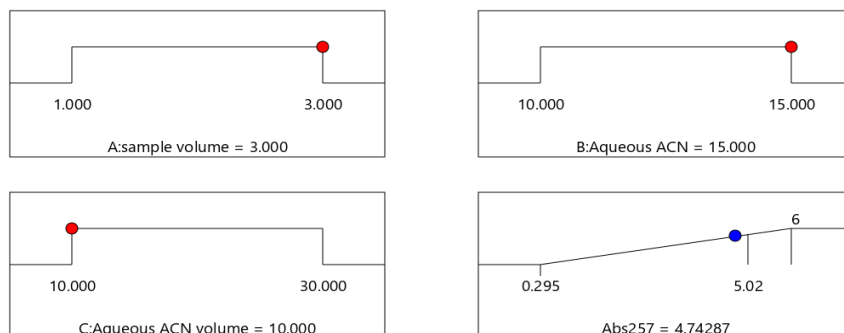


Εικόνα 3.15. Διαγράμματα περιγράμματος της αλληλεπίδρασης (contour plots) μεταξύ: **(α)** % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη H_2O και όγκου δείγματος, **(β)** όγκου διαλύτη και όγκου δείγματος και **(γ)** όγκου διαλύτη και % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη H_2O .

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την παρατήρηση των παραπάνω διαγραμμάτων είναι πως η τιμή της απόκρισης (απορρόφηση στα 257 nm) μεγιστοποιείται αυξανόμενου του όγκου του δείγματος με ταυτόχρονη αύξηση της περιεκτικότητας του ACN στον διαλύτη (Εικόνα 3.15.(α)). Αντίστοιχα στο επόμενο σχήμα βλέπουμε ότι η απόκριση αυξάνεται με αύξηση του όγκου του δείγματος και ταυτόχρονη μείωση του όγκου του διαλύτη (Εικόνα 3.15.(β)), ενώ στο τελευταίο σχήμα η απόκριση αυξάνεται με αύξηση της περιεκτικότητας του ACN στον διαλύτη και ταυτόχρονη μείωση του όγκου του διαλύτη (Εικόνα 3.15.(γ)).

Αφού λοιπόν επιβεβαιώσαμε πως το τετραγωνικό μοντέλο είναι το ιδανικό για το πείραμά μας, προχωρήσαμε στην καταγραφή των ιδανικών τιμών για τους παράγοντες

(Εικόνα 3.16.). Το λογισμικό πρότεινε ως βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή της πικροκροκίνης τις παρακάτω A= 3 mL, B= 15% v/v και C= 10 mL.



Εικόνα 3.16. Ιδανικές τιμές παραγόντων για το μοντέλο της πικροκροκίνης.

Στο τρίτο στάδιο του πειράματος, όπου εξετάστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή της ουσίας στη μέγιστη ποσότητα, εκχυλίστηκαν 20 διαφορετικά φυτικά δείγματα, οι κωδικοί των οποίων αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα.

Οι μετρήσεις των εκχυλισμάτων στο ορατό-υπεριώδες φάσμα, ήταν αυτές που μας επιβεβαίωσαν την πρακτική εφαρμογή των συνθηκών (Πίνακας 3.10). Οι τιμές αυτές, προήλθαν μετά από αραιώση των υπό φωτομέτρηση δειγμάτων, καθώς οι μετρήσεις αυτών εμφάνιζαν απορροφήσεις άνω του 1. Έτσι πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:5 με τον διαλύτη της εκχύλισης, δηλαδή υδατικού διαλύματος 15% v/v ACN.

Πίνακας 3.10. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων στα 20 διαφορετικά δείγματα για την επιβεβαίωση του μοντέλου.

| Δείγμα | Απορρόφηση στα 257 nm | Δείγμα | Απορρόφηση στα 257 nm |
|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| Std 10 | 5,235 | Std 7 | 4,280 |
| Std 24 | 5,425 | Extra Bio 13 | 4,820 |
| Bio EU 11 | 3,840 | Extra 20 | 3,270 |
| Std 14 | 4,080 | Extra 21 | 7,475 |
| Std 20 | 5,155 | Extra 22 | 7,245 |
| Extra Bio EU 9 | 3,985 | Extra 23 | 3,175 |
| Bio EU 10 | 3,775 | Bio EU 4 | 9,185 |
| Extra Bio EU 6 | 3,070 | Extra Bio EU 7 | 3,200 |
| Extra 25 | 5,905 | Extra Bio EU 17 | 6,395 |
| Bio Suisse 11 | 6,420 | Extra 12 | 2,890 |

Για να επαληθεύσουμε αν οι απορροφήσεις αυτές ανταποκρίνονται στα όρια τα οποία έθεσε το λογισμικό, ελέγχουμε αν βρίσκονται εντός των τιμών που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.17., και όπου δίνεται ως ελάχιστη απορρόφηση η τιμή 2,406 και ως μέγιστη τα 13,354.

| Response | Predicted Mean | Predicted Median* | Observed | Std Dev | n | SE Pred | 95% PI low | Data Mean† | 95% PI high |
|----------|----------------|-------------------|----------|---------|----|---------|------------|------------|-------------|
| Abs257# | 5.39292 | 4.74287 | | 2.22619 | 20 | N/A | 2.40591 | 4.55814 | 13.3541 |

Εικόνα 3.17. Επιβεβαίωση του μοντέλου της πικροκροκίνης.

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι όλες οι τιμές του Πίνακα 3.10. βρίσκονται εντός των ορίων επιβεβαίωσης (Εικόνα 3.17.), γεγονός που υποδεικνύει την πρακτική λειτουργικότητα του μοντέλου.

3.2.4. Επαλήθευση μοντέλου κροκινών

Όμοια με την προηγούμενη υποενότητα, στον Πίνακα 3.11, εμφανίζονται οι 20 συνολικά πειραματικές δοκιμές για το μοντέλο των κροκινών, ο τύπος του σημείου που αποτελούν αυτές στον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό τριών παραγόντων, καθώς και οι τιμές των τριών παραγόντων όπως αυτές διαμορφώθηκαν από το πρόγραμμα για κάθε δοκιμή. Τέλος, η στήλη της απόκρισης αναγράφει την απορρόφηση του εκχυλίσματος που προέκυψε από κάθε δοκιμή στα 440 nm.

Πίνακας 3.11. Δοκιμές για την πειραματική μελέτη της απορρόφησης των κροκινών στα 440 nm.

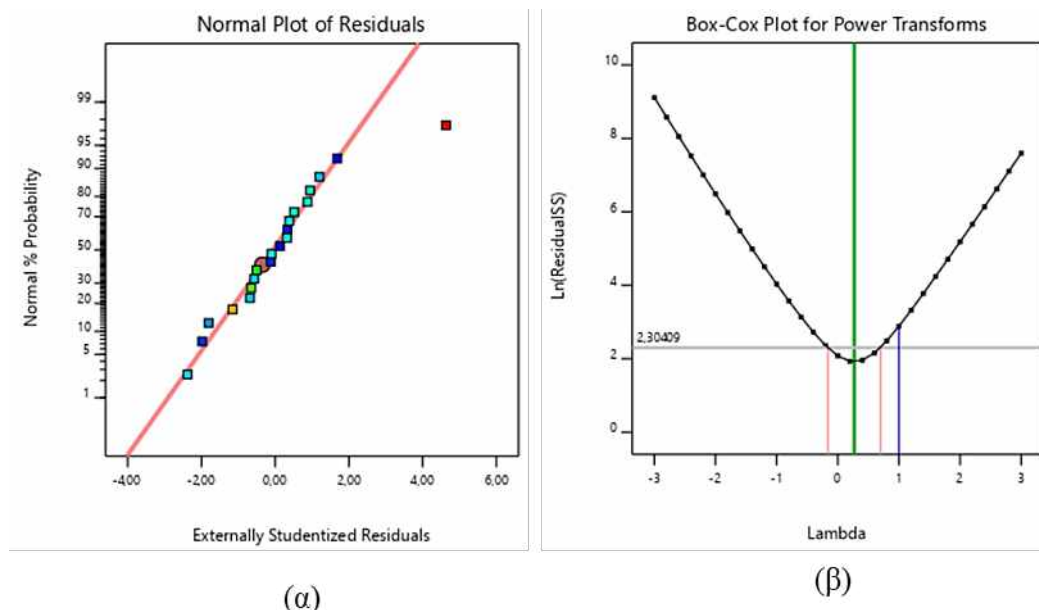
| Δοκιμή | Τύπος σημείου | Παράγοντας 1 | Παράγοντας 2 | Παράγοντας 3 | Απόκριση 1 |
|--------|---------------|-------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| | | A: όγκος δείγματος (mL) | B: περιεκτικότητα δ/τη σε ACN (% v/v) | C: όγκος διαλύτη (mL) | Απορρόφηση 440 nm |
| 1 | Παραγοντικό | 1,000 | 25,000 | 10,000 | 1,707 |
| 2 | Παραγοντικό | 3,000 | 25,000 | 10,000 | 10,56 |
| 3 | Κεντρικό | 2,000 | 37,500 | 20,000 | 5,400 |
| 4 | Παραγοντικό | 1,000 | 50,000 | 10,000 | 4,370 |
| 5 | Παραγοντικό | 3,000 | 50,000 | 10,000 | 14,240 |
| 6 | Κεντρικό | 2,000 | 37,500 | 20,000 | 5,640 |
| 7 | Κεντρικό | 2,000 | 37,500 | 20,000 | 5,480 |

| | | | | | |
|----|-------------|-------|--------|--------|--------|
| 8 | Αξονικό | 2,000 | 37,500 | 36,818 | 3,390 |
| 9 | Αξονικό | 3,682 | 37,500 | 20,000 | 8,720 |
| 10 | Αξονικό | 2,000 | 58,522 | 20,000 | 5,540 |
| 11 | Παραγοντικό | 3,000 | 50,000 | 30,000 | 5,720 |
| 12 | Αξονικό | 2,000 | 37,500 | 3,182 | 17,220 |
| 13 | Αξονικό | 2,000 | 16,478 | 20,000 | 1,027 |
| 14 | Παραγοντικό | 3,000 | 25,000 | 30,000 | 4,110 |
| 15 | Παραγοντικό | 1,000 | 50,000 | 30,000 | 1,480 |
| 16 | Κεντρικό | 2,000 | 37,500 | 20,000 | 4,270 |
| 17 | Παραγοντικό | 1,000 | 25,000 | 30,000 | 1,264 |
| 18 | Κεντρικό | 2,000 | 37,500 | 20,000 | 4,130 |
| 19 | Αξονικό | 0,318 | 37,500 | 20,000 | 0,836 |
| 20 | Κεντρικό | 2,000 | 37,500 | 20,000 | 4,860 |

Συνεκτιμώντας τους συντελεστές προσδιορισμού (R^2) (Πίνακας 3.12), την ανάλυση των υπολοίπων (residuals) (Εικόνα 3.18. (α)), και το τεστ Box-Cox (Εικόνα 3.18. (β)), συμπεραίνουμε ότι τα δεδομένα της μεταβλητής απόκρισης απαιτούν μετασχηματισμό.

Πίνακας 3.12. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για τις κροκίνες.

| Μοντέλο | Προσαρμοσμένο R^2 | Προβλεπόμενο R^2 | |
|------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------|
| Γραμμικό | 0,6788 | 0,5129 | Προτεινόμενο |
| Αλληλεπίδραση δυο παραγόντων (2FI) | 0,6887 | 0,5204 | Προτεινόμενο |
| Τετραγωνικό | 0,9032 | 0,6499 | |
| Κυβικό | 0,9644 | -0.1687 | Αλλοιωμένο |



Εικόνα 3.18. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και **(β)** Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης των κροκινών.

Έπειτα από δοκιμές με διάφορους μετασχηματισμούς των δεδομένων της μεταβλητής απόκρισης, επιλέχθηκε ο μετασχηματισμός με τετραγωνική ρίζα. Οι τιμές του R^2 και του προσαρμοσμένου R^2 μετά το μετασχηματισμό είναι 0,9671 και 0,9374, αντίστοιχα για το τετραγωνικό μοντέλο που προτάθηκε από το λογισμικό (Πίνακας 3.13). Οι τιμές βρίσκονται κοντά στο 1 και σε σχετική συμφωνία με την προβλεπόμενη τιμή $R^2 = 0,7928$, υποδεικνύοντας την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών.

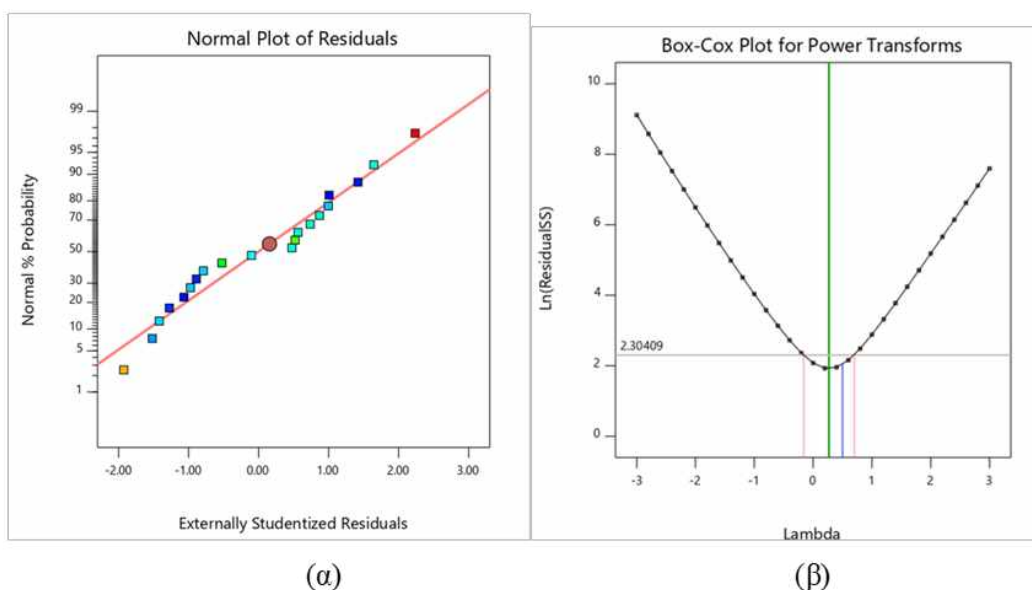
Πίνακας 3.13. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για τις κροκίνες μετά το μετασχηματισμό των δεδομένων της μεταβλητής απόκρισης με τετραγωνική ρίζα.

| Μοντέλο | Προσαρμοσμένο R^2 | Προβλεπόμενο R^2 | |
|------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------|
| Γραμμικό | 0,7659 | 0,6460 | |
| Αλληλεπίδραση δυο παραγόντων (2FI) | 0,7518 | 0,6214 | |
| Τετραγωνικό | 0,9374 | 0,7928 | Προτεινόμενο |
| Κυβικό | 0,9738 | 0,8369 | Αλλοιωμένο |

Το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης που εκφράζεται από την κωδικοποιημένη εξίσωση (2):

$$Y = 2,23 + 0,6687 A + 0,2943 B - 0,5523 C + 0,0015 AB - 0,1935 AC - 0,1064 BC - 0,1143 A^2 - 0,2027 B^2 + 0,2611 C^2 \quad (2)$$

Όπου Y: η τετραγωνική ρίζα της απορρόφησης του εκχυλίσματος στα 440 nm (sqrt(Abs 440 (nm))), και A, B, C οι κωδικοποιημένες τιμές του όγκου του δείγματος, της % v/v περιεκτικότητας του διαλύτη σε ACN και του όγκου του διαλύτη αντίστοιχα.



Εικόνα 3.19. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και **(β)** Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης των κροκινών με μετασχηματισμό τετραγωνικής ρίζας.

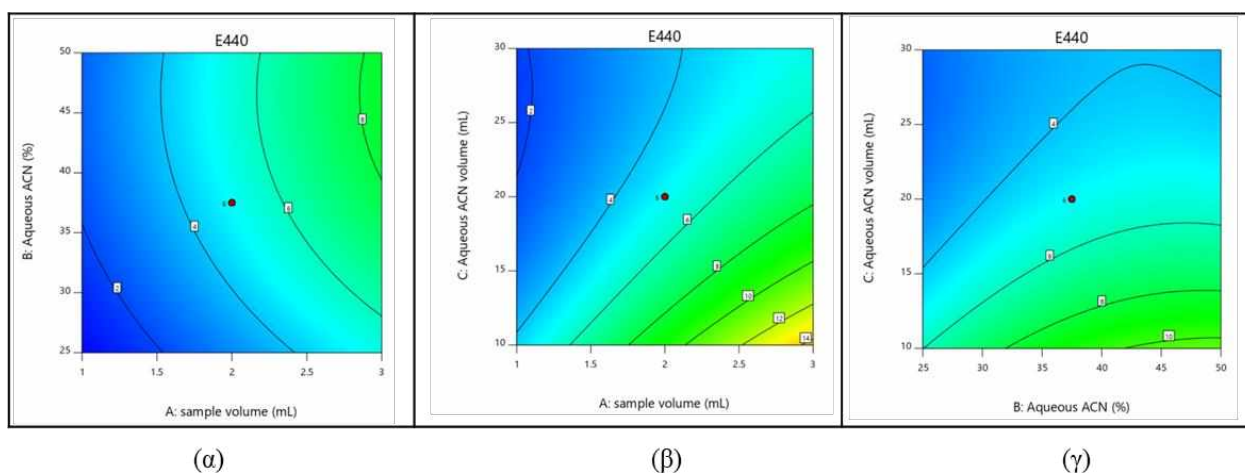
Η ανάλυση των υπολοίπων (residuals) δεν παρουσιάζει αποκλίσεις από τους ισχυρισμούς του τετραγωνικού μοντέλου (Εικόνα 3.19. (α)), καθώς όπως παρατηρούμε η κατανομή των σημείων είναι ομοιόμορφη γύρω από τον άξονα της ευθείας χωρίς να υπάρχουν σημεία που παρεκκλίνουν ιδιαίτερα. Αντίστοιχα η τιμή $\lambda = 0,5$ που προέκυψε από το τεστ Box-Cox (Εικόνα 3.19. (β)), βρίσκεται κοντά στο **ιδανικό $\lambda = 0,27$** και εντός των ορίων (κόκκινα ευθύγραμμα τμήματα).

Εξετάζοντας τον Πίνακα 3.14, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το τετραγωνικό μοντέλο που επιλέχθηκε είναι στατιστικά σημαντικό με τιμή p-value < 0,0001, ενώ παράλληλα και οι όροι A, B και C του μοντέλου είναι στατιστικά σημαντικοί (p-value < 0,05).

Πίνακας 3.14. Ανάλυση ANOVA τετραγωνικού μοντέλου κροκινών [¹DF= βαθμοί ελευθερίας (degree of freedom)]

| Πηγή | Άθροισμα τετραγώνων | DF | Μέσο τετράγωνο | F-value | p-value |
|------------------------------------|---------------------|----|----------------|---------|----------|
| Μοντέλο | 13,800 | 9 | 1,530 | 32,630 | < 0,0001 |
| A-όγκος δείγματος | 6,110 | 1 | 6,110 | 129,990 | < 0,0001 |
| B-% v/v περιεκτικότητα δ/τη σε ACN | 1,180 | 1 | 1,180 | 25,170 | 0,0005 |
| C-όγκος διαλύτη | 4,170 | 1 | 4,170 | 88,670 | < 0,0001 |
| AB | 0.000 | 1 | 0.000 | 0.0004 | 0.9846 |
| AC | 0.300 | 1 | 0.300 | 6.380 | 0.0301 |
| BC | 0.091 | 1 | 0.091 | 1.930 | 0.1951 |
| A ² | 0.188 | 1 | 0.188 | 4.010 | 0.0732 |
| B ² | 0.592 | 1 | 0.592 | 12.610 | 0.0053 |
| C ² | 0.982 | 1 | 0.982 | 20.910 | 0.0010 |
| Υπόλοιπο | 0,470 | 10 | 0,047 | | |
| Έλλειψη προσαρμογής | 0,362 | 5 | 0,072 | 3,330 | 0,1061 |
| Καθαρό σφάλμα | 0,108 | 5 | 0,022 | | |

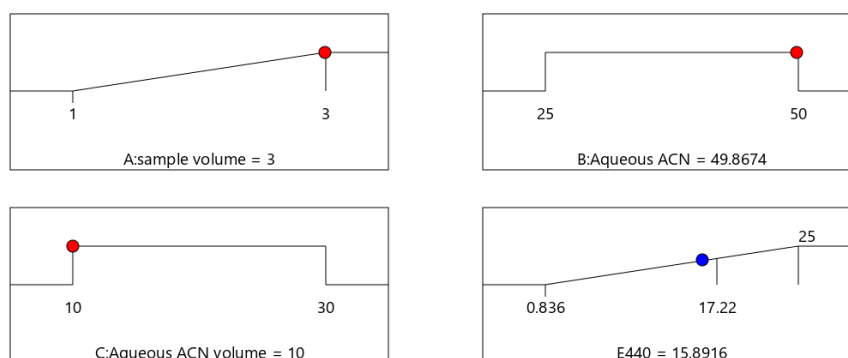
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα περιγράμματος της αλληλεπίδρασης (contour plots) μεταξύ των τριών πειραματικών παραγόντων για την απόκριση της απορρόφησης στα 440 nm (Εικόνα 3.20).



Εικόνα 3.20. Διαγράμματα περιγράμματος της αλληλεπίδρασης (contour plots) μεταξύ: **(α)** % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη και όγκου δείγματος, **(β)** όγκου διαλύτη και όγκου δείγματος και **(γ)** όγκου διαλύτη και % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη H₂O.

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την παρατήρηση των παραπάνω διαγραμμάτων είναι πως η τιμή της απόκρισης μεγιστοποιείται αυξανόμενου του όγκου του δείγματος με ταυτόχρονη αύξηση της περιεκτικότητας του ACN στον διαλύτη (Εικόνα 3.20.(α)). Αντίστοιχα στη συνέχεια παρατηρούμε ότι η απόκριση αυξάνεται με αύξηση του όγκου του δείγματος και ταυτόχρονη μείωση του όγκου του διαλύτη (Εικόνα 3.20.(β)), ενώ επιπλέον η απόκριση αυξάνεται με αύξηση της περιεκτικότητας του ACN στον διαλύτη και ταυτόχρονη μείωση του όγκου του διαλύτη (Εικόνα 3.20.(γ)).

Όμοια με το μοντέλο της πικροκροκίνης, το λογισμικό πρότεινε ως βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή των κροκινών τις παρακάτω A= 3mL, B= 50% v/v και C= 10 mL (Εικόνα 3.21.).



Εικόνα 3.21. Ιδανικές τιμές παραγόντων για το μοντέλο των κροκινών.

Αντίστοιχα για την παραλαβή των κροκινών εξετάστηκαν οι απορροφήσεις στο αντίστοιχο φάσμα, και ελέγχθηκε αν οι τιμές βρίσκονται εντός των ορίων (Πίνακας 3.15).

Πίνακας 3.15. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων στα 20 διαφορετικά δείγματα για την επιβεβαίωση του μοντέλου.

| Δείγμα | Απορρόφηση στα 440 nm | Δείγμα | Απορρόφηση στα 440 nm |
|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| Std 10 | 16,680 | Std 7 | 13,200 |
| Std 24 | 15,420 | Extra Bio 13 | 15,900 |
| Bio EU 11 | 17,400 | Extra 20 | 14,960 |
| Std 14 | 11,500 | Extra 21 | 14,260 |
| Std 20 | 13,160 | Extra 22 | 12,360 |
| Extra Bio EU 9 | 17,060 | Extra 23 | 14,400 |
| Bio EU 10 | 17,440 | Bio EU 4 | 10,760 |
| Extra Bio EU 6 | 13,340 | Extra Bio EU 7 | 12,360 |

| | | | |
|---------------|--------|-----------------|--------|
| Extra 25 | 15,180 | Extra Bio EU 17 | 13,420 |
| Bio Suisse 11 | 15,120 | Extra 12 | 14,960 |

Οι τιμές αυτές, προήλθαν επίσης μετά από αραίωση των υπό φωτομέτρηση δειγμάτων, καθώς οι μετρήσεις αυτών εμφάνιζαν απορροφήσεις άνω του 1. Έτσι πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:20 με τον διαλύτη της εκχύλισης, δηλαδή υδατικού διαλύματος 50% v/v ACN.

Για να επαληθεύσουμε αν οι απορροφήσεις αυτές ανταποκρίνονται στα όρια τα οποία έθεσε το λογισμικό, ελέγχουμε αν βρίσκονται εντός των τιμών που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.22., και όπου δίνεται ως ελάχιστη απορρόφηση η τιμή 12,79 και ως μέγιστη τα 19,33.

| | Response | Predicted Mean | Predicted Median* | Observed | Std Dev | n | SE Pred | 95% PI low | Data Mean† | 95% PI high |
|--|----------|----------------|-------------------|----------|---------|----|---------|------------|------------|-------------|
| | E440† | 15.9385 | 15.8915 | | 1.72945 | 20 | N/A | 12.7926 | 14.3818 | 19.3262 |

Εικόνα 3.22. Επιβεβαίωση του μοντέλου των κροκινών.

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η πλειοψηφία των τιμών του Πίνακα 3.15 βρίσκονται εντός των ορίων επιβεβαίωσης (Εικόνα 3.22.), γεγονός που υποδεικνύει την πρακτική λειτουργικότητα του μοντέλου.

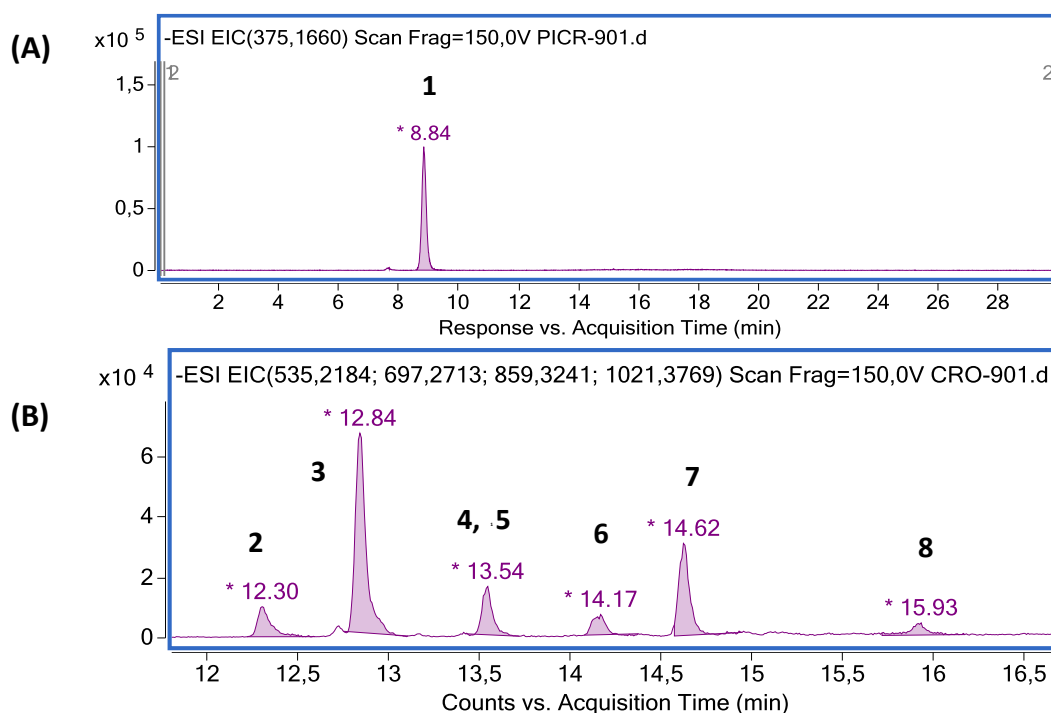
Σχετικά με τις τιμές των απορροφήσεων οι οποίες προέκυψαν από τις επιβεβαιωτικές δοκιμές των στατιστικών μας μοντέλων, συγκρινόμενες με την βιβλιογραφία, αυτές εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλές τιμές στο σύνολό τους. Στην μελέτη των Sánchez et al. (2009) η απορρόφηση της πικροκροκίνης στο UV-Vis μετά από προσθήκη 4mL εκχυλίσματος σαφράν πυκνότητας 2,5 g/L, στην στήλη SPE και την επιπλέον προσθήκη 10 mL από τον διαλύτη εκχύλισης, δηλαδή υδατικού διαλύματος 5% v/v ACN, δεν ξεπέρασε την τιμή $A = 2,5$. Επιπλέον στην μελέτη του Alsudairy Z. (2019) σχετικά με την ταυτοποίηση των κυριότερων οργανικών ενώσεων του σαφράν, όπου χρησιμοποιήθηκε και πάλι η μέθοδος SPE για την παραλαβή των επιθυμητών ενώσεων, μετά από προσθήκη 3 mL εκχυλίσματος πυκνότητας 4 g/L, στην στήλη, και στη συνέχεια την χρήση οργανικών διαλυτών για την παραλαβή των ουσιών, η τιμή της απορρόφησης δεν ξεπέρασε το 1,8.

Αντίστοιχα, σχετικά με τις τιμές των απορροφήσεων για τις κροκίνες, εξετάζοντας επίσης τη μελέτη των Sánchez et al., η τιμή αυτή έφτασε το 1,2 με την προσθήκη

υδατικού διαλύματος 15% v/v ACN στη στήλη SPE. Επιπλέον οι Tabtabaei et al. (2019) πραγματοποίησαν τη γεωγραφική ταξινόμηση των ιρανικών και ιταλικών κρόκων με βάση την ανάλυση HPLC και τα φάσματα UV-Vis των υδατικών εκχυλισμάτων τους, αναλύοντας 29 διαφορετικά φυτικά δείγματα. Τα δείγματα αυτά προέκυψαν από υδατική εκχύλιση με φυγοκέντριση και στη συνέχεια φιλτραρίστηκαν με τη χρήση υδρόφιλου πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE). Η απορρόφηση στα 440 nm στο φάσμα UV-Vis όπου αφορά τις κροκίνες, για το σύνολο των δειγμάτων, δεν ξεπέρασε το 1,8.

3.2.5. Ανάλυση με LC-Q-TOF/MS

Τα αποτελέσματα της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με αναλυτή τετραπόλου-χρόνου πτήσης ιόντων, επεξεργάστηκαν μέσω του προγράμματος Agilent MassHunter Qualitative Analysis. Κατά την επεξεργασία αυτή αναζητήθηκαν οι μάζες των επιθυμητών ουσιών στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών.



Εικόνα 3.23. Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων της πικροκροκίνης (A) και των κροκινών (B) στον αρνητικό ιοντισμό (-ESI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ενώσεις του Πίνακα 3.16.

Η απόδοση των ουσιών με τον χαρακτηρισμό τους ως *cis* ή *trans*, βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης. Τα δύο στερεοϊσομερή εμφανίζουν κοινή θεωρητική μάζα αλλά έχουν διαφορετικό χρόνο κατακράτησης με την *trans* μορφή να προηγείται της *cis*.

Καθώς η συγκεκριμένη ανάλυση μας δίνει μεγάλη ακρίβεια αποτελεσμάτων, αυτή των τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τον χαρακτηρισμό των ενώσεων. Επιπλέον μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το σφάλμα μάζας δεν είναι σημαντικό στις ταυτοποιημένες ενώσεις, καθώς οι τιμές του είναι < 5 ppm (Πίνακας 3.16).

Πίνακας 3.16. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC-Q-TOF/MS με παρατηρούμενη μάζα M+FA-H με τη σειρά εμφάνισής τους στην **Εικόνα 3.23**.

| Ένωση | Χρόνος κατακράτησης (min) | Θεωρητική μάζα (m/z) M+FA-H | Παρατηρούμενη μάζα (m/z) M+FA-H | Σφάλμα μάζας (ppm) |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| 1 Πικροκροκίνη | 8,84 | 375,1660 | 375,1653 | 1,9 |
| 2 <i>trans</i> 4GG | 12,30 | 1021,3769 | 1021,3754 | 1,5 |
| 3 <i>trans</i> 3Gg | 12,84 | 859,3241 | 859,3230 | 1,3 |
| 4 <i>trans</i> 2G | 13,54 | 697,2713 | 697,2708 | 0,7 |
| 5 <i>cis</i> 4GG | 13,55 | 1021,3769 | 1021,3805 | 3,5 |
| 6 <i>cis</i> 3Gg | 14,17 | 859,3241 | 859,3214 | 3,1 |
| 7 <i>cis</i> 2G | 14,62 | 697,2713 | 697,2702 | 1,6 |
| 8 <i>cis</i> 1g | 15,93 | 535,2184 | 535,2193 | 1,7 |

Οι ίδιες ενώσεις και μια επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν επίσης και στον θετικό ιοντισμό (+ESI) (Πίνακας 3.17.), παρ' όλα αυτά επιλέχθηκαν να παρουσιαστούν τα χρωματογραφήματα των πρώτων καθώς αυτά είχαν τη μεγαλύτερη αφθονία συγκριτικά με τα δεύτερα.

Πίνακας 3.17. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC-Q-TOF/MS με παρατηρούμενη μάζα $M+Na^+$ κατά σειρά εμφάνισης.

| Ένωση | Χρόνος κατακράτησης (min) | Θεωρητική μάζα (m/z) $M+Na^+$ | Παρατηρούμενη μάζα (m/z) $M+Na^+$ | Σφάλμα μάζας (ppm) |
|------------------|---------------------------------|---|--|-----------------------|
| Πικροκροκίνη | 7,91 | 353,1570 | 353,1568 | 0,6 |
| <i>trans</i> 4GG | 12,11 | 999,3679 | 999,3659 | 2,0 |
| <i>trans</i> 3Gg | 12,67 | 837,3151 | 837,3148 | 0,4 |
| <i>trans</i> 1g | 12,67 | 513,2094 | 513,2094 | 0,0 |
| <i>trans</i> 2G | 13,38 | 675,2623 | 675,2623 | 0,0 |
| <i>cis</i> 4GG | 13,40 | 999,3679 | 999,3692 | 1,3 |
| <i>cis</i> 3Gg | 14,01 | 837,3151 | 837,3146 | 0,6 |
| <i>cis</i> 2G | 14,47 | 675,2623 | 675,2633 | 1,5 |
| <i>cis</i> 1g | 15,78 | 513,2094 | 513,2092 | 0,4 |

Κεφάλαιο 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σύνοψη των παρατηρήσεων και των αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν στην παραπάνω μελέτη, οδηγεί στα ακόλουθα συμπεράσματα.

- Καθώς το σαφράν αποτελεί ένα ιδιαίτερα ακριβό καρύκευμα, είναι σημαντικό να ερευνηθούν οι τρόποι με τους οποίους θα μπορέσουν να ληφθούν οι κυρίαρχες βιοδραστικές ενώσεις του στην μέγιστη ποσότητα από την ελάχιστη πρώτη ύλη. Επιπλέον έχει σημασία ο διαλύτης που θα επιλέξουμε να είναι αποτελεσματικός για τον σκοπό του, αλλά εφόσον αποτελεί μια τοξική ένωση να βρίσκεται στην μικρότερη δυνατή συγκέντρωση, ώστε να μειωθεί το οικολογικό αντίκτυπο της χρήσης του. Παράλληλα, με στόχο την μείωση των αναλώσιμων υλικών για την διαδικασία της παραλαβής των επιθυμητών ουσιών, έγινε χρήση κοινής στήλης μικροεκχύλισης για το σύνολο των μη πτητικών ενώσεων που απομονώθηκαν.
- Πραγματοποιήσαμε μια έρευνα η οποία δεν έχει αναφερθεί στην έως τώρα βιβλιογραφία με σκοπό την μέγιστη παραλαβή των συγκεκριμένων ουσιών. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν δεν καταφέραμε να διαχωρίσουμε εντελώς τις ενώσεις, καθώς παρατηρήσαμε ότι ένα μικρό μέρος της μιας ουσίας εντοπίζεται και στο εκχύλισμα της άλλης. Παρ' όλα αυτά φαίνεται ότι ο στόχος μας να λάβουμε την μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα των μη πτητικών ενώσεων μέσω της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης επετεύχθη ως αποτέλεσμα των επιβεβαιωτικών αναλύσεων που πραγματοποιήσαμε καθώς και των ιδιαίτερα υψηλών τιμών απορρόφησης που προέκυψαν μέσω της ανάλυσης στο φάσμα UV-Vis.
- Τα δύο στατιστικά μοντέλα που δημιουργήθηκαν τόσο για την πικροκροκίνη όσο και για τις κροκίνες, υπήρξαν στατιστικά σημαντικά με επιπλέον επαλήθευσή τους να αποτελεί την διενέργεια του ίδιου πειράματος για 20 διαφορετικά φυτικά δείγματα του σαφράν.
- Μέσα από τις αναλυτικές μεθόδους HPLC, LC/MS και LC-Q-TOF/MS, καταφέραμε να εντοπίσουμε την παρουσία των επιθυμητών ενώσεων στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη χρήση των βέλτιστων συνθηκών, γεγονός που επιβεβαιώνει την πρακτική λειτουργικότητα της ανωτέρω μελέτης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agha-Hosseini, M., Kashani, L., Aleyaseen, A., Ghoreishi, A., Rahmanpour, H., Zarrinara, A. R., & Akhondzadeh, S. (2008). Crocus sativus L. (saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: A double-blind, randomised and placebo-controlled trial. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *115*(4), 515–519. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01652.x>
- Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., Noorbala, A.-A., Amini, H., Fallah-Pour, H., Jamshidi, A.-H., & Khani, M. (2005). Crocus sativus L. in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytotherapy Research: PTR*, *19*(2), 148–151. <https://doi.org/10.1002/ptr.1647>
- Alonso, G. L., Zalacain, A., & Carmona, M. (2012). Saffron. In *Handbook of Herbs and Spices* (pp. 469–498). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.469>
- Alsudairy, Z., (2019). Identification of Major Organic Constituents of Saffron Isolated by Solid Phase Extraction and Column Chromatography. Thesis. Department of Chemistry, Atlanta, Georgia. (pp. 22-23, 53-54)
- Bazoobandi, M., Rahimi, H., & Karimi-Shahri, M.-R. (2020). Chapter 10—Saffron crop protection. In A. Koocheki & M. Khajeh-Hosseini (Eds.), *Saffron* (pp. 169–185). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00010-1>
- 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*(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bian, Y., Zhao, C., & Lee, S. M.-Y. (2020). Neuroprotective Potency of Saffron Against Neuropsychiatric Diseases, Neurodegenerative Diseases, and Other

- Brain Disorders: From Bench to Bedside. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.579052>
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 973–979. <https://doi.org/10.1021/jf052297w>
- 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(1), 95–112. <https://doi.org/10.1051/agro:2007030>
- Guijarro-Díez, M., Nozal, L., Marina, M. L., & Crego, A. L. (2015). Metabolomic fingerprinting of saffron by LC/MS: Novel authenticity markers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(23), 7197–7213. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8882-0>
- Hatziagapiou, K., Kakouri, E., Lambrou, G. I., Bethanis, K., & Tarantilis, P. A. (2019). Antioxidant Properties of *Crocus sativus* L. and Its Constituents and Relevance to Neurodegenerative Diseases; Focus on Alzheimer’s and Parkinson’s Disease. *Current Neuropharmacology*, 17(4), 377–402.
<https://doi.org/10.2174/1570159X16666180321095705>
- Jafari, S.-M., Tsimidou, M. Z., Rajabi, H., & Kyriakoudi, A. (2020). Bioactive ingredients of saffron: Extraction, analysis, applications. In *Saffron* (pp. 261–290). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00016-2>
- Kakouri, E., Agalou, A., Kanakis, C., Beis, D., & Tarantilis, P. A. (2020). Crocins from *Crocus sativus* L. in the Management of Hyperglycemia. In Vivo Evidence from

- Zebrafish. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), E5223.
<https://doi.org/10.3390/molecules25225223>
- Kakouri, E., Hatziagapiou, K., Bethanis, K., Nikola, O. A., Lambrou, G. I., & Tarantilis, P. A. (2017). Tumor-Suppressing Properties of *Crocus sativus* L.: Nature as an Anti-Cancer Agent. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 22(3–4), 263–273.
<https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2017024841>
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H. Z. E. (2010). Evaluation of *Crocus sativus* L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Molecules*, 15(9), 6244–6256.
<https://doi.org/10.3390/molecules15096244>
- Kianbakht, S., & Mozaffari, K. (2009). *Effects of Saffron and its Active Constituents, Crocin and Safranal, on Prevention of Indomethacin Induced Gastric Ulcers in Diabetic and Nondiabetic Rats*. 5, 9.
- Maggi, L., Carmona, M., Sánchez, A., & Alonso, G. (2010). *Saffron Flavor: Compounds Involved, Biogenesis and Human Perception*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Saffron-Flavor%3A-Compounds-Involved%2C-Biogenesis-and-Maggi-Carmona/4049eb9d23de46a1bf4e6a835c4f034819cc3d54>
- Moratalla-López, N., Bagur, M. J., Lorenzo, C., Martínez-Navarro, M. E., Salinas, M. R., & Alonso, G. L. (2019). Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of *Crocus sativus* L. Flower. *Molecules*, 24(15), 2827.
<https://doi.org/10.3390/molecules24152827>
- Muzaffar, S., Mir, M. A., & Khan, K. Z. (2018). *NON-VOLATILE CHEMICAL COMPOSITION OF SAFFRON NATIVE TO JAMMU AND KASHMIR*. 7.

- Mzabri, B., Addi, M., & Berrichi. (2019). Traditional and Modern Uses of Saffron (Crocus Sativus). *Cosmetics*, 6, 63. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040063>
- Pitsikas, N. (2016). Constituents of Saffron (Crocus sativus L.) as Potential Candidates for the Treatment of Anxiety Disorders and Schizophrenia. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(3), 303. <https://doi.org/10.3390/molecules21030303>
- Pitsikas, N., & Tarantilis, P. A. (2020). The GABAA-Benzodiazepine Receptor Antagonist Flumazenil Abolishes the Anxiolytic Effects of the Active Constituents of Crocus sativus L. Crocins in Rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), E5647. <https://doi.org/10.3390/molecules25235647>
- Sánchez, A., Delgado, M., Jarén-Galán, M., Mosquera, M., & Alonso, G. (2011). Picrocrocin Kinetics in Aqueous Saffron Spice Extracts (Crocus sativus L.) upon Thermal Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 249–255. <https://doi.org/10.1021/jf102828v>
- Sánchez, A. M., Carmona, M., Campo, C. P. del, & Alonso, G. L. (2009). Solid-phase extraction for picrocrocin determination in the quality control of saffron spice (Crocus sativus L.). *Food Chemistry*, 116(3), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.039>
- Sánchez, A. M., & Winterhalter, P. (2013). Carotenoid Cleavage Products in Saffron (Crocus sativus L.). In P. Winterhalter & S. E. Ebeler (Eds.), *ACS Symposium Series* (Vol. 1134, pp. 45–63). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1134.ch005>
- Srivastava, R., Ahmed, H., Dixit, R. K., Dharamveer, & Saraf, S. A. (2010). Crocus sativus L.: A comprehensive review. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 200–208. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70919>

- Suchareau, M., Bordes, A., & Lemée, L. (2021). Improved quantification method of crocins in saffron extract using HPLC-DAD after qualification by HPLC-DAD-MS. *Food Chemistry*, 362, 130199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130199>
- Tabtabaei, S., D'Archivio, A., Maggi, M., Brutus, M., Bajracharya, D., Konakbayeva, D., Soleimani, A., Brim, H., & Ashktorab, H. (2019). Geographical classification of Iranian and Italian saffron sources based on HPLC analysis and UV–Vis spectra of aqueous extracts. *European Food Research and Technology*, 245. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03352-7>
- Tarantilis, P. A., Polissiou, M., & Manfait, M. (1994). Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 664(1), 55–61. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80628-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80628-4)
- Tarantilis, P. A., Tsoupras, G., & Polissiou, M. (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 699(1), 107–118. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00044-N](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00044-N)
- Verma, R., & Middha, D. (2010). Analysis of saffron (*Crocus sativus* L. Stigma) components by LC-MS-MS. *Chromatographia*, 71, 117–123. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1398-z>
- Κανάκης, Χ. (2007). Παραλαβή δευτερογενών μεταβολιτών από το άνθος του φυτού *Crocus sativus* L. και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης και των συμπλοκών αυτών με DNA, tRNA και Human Serum Albumin (HSA).

- Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Γενικό τμήμα.
Εργαστήριο Χημείας. (σελ. 135-136)
- Καρασταμάτη, Π.Δ. (2014). Επίδραση μεθόδων τεχνητής γήρανσης στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του saffron. Μεταπτυχιακή διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου. Εργαστήριο Γενικής Χημείας. (σελ. 19-23)
- Νικητίδης Ν. (2019). Οι κρόκοι της Ελλάδας. Έκδοση ebook: Ιδιωτική έκδοση. Α' Μέρος. (σελ. 8-15)
- Ορφανίδου, Μ. (2014). Μελέτη Σχεδιασμών Αποκριτικών Επιφανειών. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών. (σελ. 6)
- Παπανικολάου, Κ. (2005). Συμβατική και βιολογική καλλιέργεια του κρόκου στην περιοχή Κοζάνης. Πτυχιακή διατριβή. Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. (σελ.17-20)
- Πετρίδης, Ν.Π. (2016). Ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση υγρής-υγρής μικροεκχύλισης και μεθοδολογίας αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων με τη χρήση χημειομετρικών μεθόδων σε υδατικά δείγματα. Εκτίμηση οικοτοξικολογικού κινδύνου για την λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Τμήμα Χημείας, Τομέας Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. (σελ. 61,74)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

| Συντομογραφία | Αγγλική ονομασία | Ελληνική ονομασία |
|---------------|--|--|
| ACN | <i>Acetonitrile</i> | <i>Ακετονιτρίλιο</i> |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> | <i>Ανάλυση διακύμανσης</i> |
| DAD | <i>Diode Array Detector</i> | <i>Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων</i> |
| DOE | <i>Design of Experiment</i> | <i>Πειραματικός σχεδιασμός</i> |
| ESI | <i>Electrospray Ionization</i> | <i>Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό</i> |
| HPLC | <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> | <i>Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης</i> |
| LC-MS | <i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> | <i>Υγρή χρωματογραφίας-φασματομετρία μαζών</i> |
| PTFE | <i>Polytetrafluoroethylene</i> | <i>Πολυτετραφθοροαιθυλένιο</i> |
| Q-TOF-LC/MS | <i>Quadrupole Time of Flight Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> | <i>Υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με αναλυτή τετραπόλου-χρόνου πτήσης ιόντων</i> |
| RCCD | <i>Rotatable Central Composite Design</i> | <i>Περιστρεφόμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός</i> |
| RSM | <i>Response Surface Methodology</i> | <i>Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης</i> |
| SPE | <i>Solid Phase Extraction</i> | <i>Εκχύλιση στερεάς φάσης</i> |
| UV-Vis | <i>Ultraviolet-Visible</i> | <i>Υπεριώδες – ορατό</i> |

II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1.1. <i>Crocus sativus L.</i> , Κρόκος ο ήμερος..... | 2 |
| Εικόνα 1.2. Οι κροκοσυλλέκτριες..... | 3 |
| Εικόνα 1.3. Τα μέρη του φυτού..... | 4 |
| Εικόνα 1.4. Στάδια ανάπτυξης του κρόκου (Bazoobandi et al., 2020)..... | 4 |
| Εικόνα 1.5. Όργωμα της γης και φύτευση των κόρων..... | 6 |
| Εικόνα 1.6. Χειρωνακτική συλλογή των ανθέων του κρόκου..... | 6 |
| Εικόνα 1.7. Το λίχνισμα..... | 7 |
| Εικόνα 1.8. Το πουράτισμα..... | 7 |
| Εικόνα 1.9. Ξήρανση του κρόκου σε ελεγχόμενες συνθήκες..... | 8 |
| Εικόνα 1.10. Χημική δομή της κροκετίνης και των εστέρων της κροκετίνης (*ανταλλάξιμα) (A. M. Sánchez & Winterhalter, 2013..... | 10 |
| Εικόνα 1.11. Χημική δομή της πικροκροκίνης..... | 11 |
| Εικόνα 1.12. Δημιουργία της σαφρανάλης από την πικροκροκίνη (Sánchez & Winterhalter, 2013)..... | 12 |
| Εικόνα 1.13. Διατροφικά συμπληρώματα με βάση το σαφράν σε μορφή εκχυλίσματος σε κάψουλα, σκόνης των στιγμάτων σε κάψουλα, σε τσίγλα και σε ζελεδάκια..... | 14 |
| Εικόνα 3.1. (α) Αποξηραμένο- κονιορτοποιημένο φυτικό υλικό. (β) Αναλυτικός ζυγός ακριβείας. (γ) Υδατόλουτρο υπέρηχων. (δ) Φυγόκεντρος. (ε) Γυάλινος περιέκτης φυτικού εκχυλίσματος..... | 19 |
| Εικόνα 3.2. (α) Παραλαβή πικροκροκίνης (άχρωμη), (β) Παραλαβή κροκινών (έγχρωμες)..... | 21 |
| Εικόνα 3.3. (α) Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, διπλής δέσμης, Agilent Technologies (β) Φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος 12% v/v ACN (πάνω), Φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος 30% v/v ACN (κάτω)..... | 22 |

| | |
|--|----|
| Εικόνα 3.4. Σύστημα HPLC-DAD συνδεδεμένο με H/Y..... | 24 |
| Εικόνα 3.5. Εργαστηριακή διάταξη του συστήματος LC-DAD/MS της SHIMADZU..... | 25 |
| Εικόνα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού τριών παραγόντων (•) τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού (points of factorial design), (ο) τα αξονικά σημεία (axial points) και (□) το κεντρικό σημείο (central point) (Bezerra et al., 2008)..... | 28 |
| Εικόνα 3.7. Ανάλυση των παραγόντων για την βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής της μικροκροκίνης στο λογισμικό Design Expert..... | 28 |
| Εικόνα 3.8. Ανάλυση των παραγόντων για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής των κροκινών στο λογισμικό Design Expert..... | 29 |
| Εικόνα 3.9. Βήματα πειραματικής επεξεργασίας του φυτικού υλικού για την ανάπτυξη των στατιστικών μοντέλων..... | 29 |
| Εικόνα 3.10. Εργαστηριακή διάταξη αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων συνδυασμένου με τετράπολο..... | 31 |
| Εικόνα 3.11. Χρωματογραφήματα HPLC σε τέσσερα μήκη κύματος (257, 330, 270, 440 nm) από το εκχύλισμα σαφράν το οποίο λήφθηκε κατά την εφαρμογή της SPE με την χρήση 12% v/v υδατικού ACN..... | 33 |
| Εικόνα 3.12. Χρωματογραφήματα HPLC σε τέσσερα μήκη κύματος (257, 330, 270, 440 nm) από το εκχύλισμα σαφράν το οποίο λήφθηκε κατά την εφαρμογή της SPE με την χρήση 30% v/v υδατικού ACN..... | 34 |
| Εικόνα 3.13. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και (β) Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το γραμμικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης της μικροκροκίνης..... | 43 |

| | |
|--|----|
| Εικόνα 3.14. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και (β) Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης πικροκροκίνης με μετασχηματισμό αντίστροφης τετραγωνικής ρίζας | 45 |
| Εικόνα 3.15. Διαγράμματα περιγράμματος της αλληλεπίδρασης (contour plots) μεταξύ: (α) % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη H ₂ O και όγκου δείγματος, (β) όγκου διαλύτη και όγκου δείγματος (γ) όγκου διαλύτη και % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη H ₂ O | 46 |
| Εικόνα 3.16. Ιδανικές τιμές παραγόντων για το μοντέλο της πικροκροκίνης..... | 47 |
| Εικόνα 3.17. Επιβεβαίωση του μοντέλου της πικροκροκίνης..... | 48 |
| Εικόνα 3.18. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και (β) Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης των κροκινών..... | 50 |
| Εικόνα 3.19. (α) Γραφική απεικόνιση των υπολοίπων (residuals) και (β) Γραφική απεικόνιση του διαγράμματος Box-Cox, για το τετραγωνικό μοντέλο συνάρτησης απόκρισης των κροκινών με μετασχηματισμό τετραγωνικής ρίζας..... | 51 |
| Εικόνα 3.20. Διαγράμματα περιγράμματος αλληλεπίδρασης (contour plots) μεταξύ: (α) % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη και όγκου δείγματος, (β) όγκου διαλύτη και όγκου δείγματος και (γ) όγκου διαλύτη και % v/v ποσοστού ACN σε διαλύτη H ₂ O | 52 |
| Εικόνα 3.21. Ιδανικές τιμές παραγόντων για το μοντέλο των κροκινών..... | 53 |
| Εικόνα 3.22. Επιβεβαίωση του μοντέλου των κροκινών..... | 54 |
| Εικόνα 3.23. Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων της πικροκροκίνης (Α) και των κροκινών (Β) στον αρνητικό ιοντισμό (-ESI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ενώσεις του Πίνακα 3.16..... | 56 |

III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|--|-------|
| Πίνακας 1.1. Προσεγγιστική ανάλυση του σαφράν (Srivastava et al., 2010)..... | 8 |
| Πίνακας 1.2. Ποσοστιαία χημική σύσταση του σαφράν (Srivastava et al., 2010)..... | 9 |
| Πίνακας 3.1. Δείγματα σαφράν που χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευση των προτεινόμενων συνθηκών SPE από τα στατιστικά μοντέλα..... | 17 |
| Πίνακας 3.2. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων του σαφράν με HPLC | 24 |
| Πίνακας 3.3. Συνθήκες βελτιστοποίησης παραλαβής των επιθυμητών συστατικών του saffron..... | 30 |
| Πίνακας 3.4. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με LC/MS στον θετικό ιοντισμό ESI (+). | 36 |
| Πίνακας 3.5. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με LC/MS στον αρνητικό ιοντισμό ESI (-) | 38,39 |
| Πίνακας 3.6. Δοκιμές για την πειραματική μελέτη της απορρόφησης της πικροκροκίνης στα 257 nm | 42 |
| Πίνακας 3.7. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για την πικροκροκίνη | 43 |
| Πίνακας 3.8. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για την πικροκροκίνη μετά το μετασχηματισμό των δεδομένων της μεταβλητής απόκρισης με αντίστροφη τετραγωνική ρίζα | 44 |
| Πίνακας 3.9. Ανάλυση ANOVA τετραγωνικού μοντέλου πικροκροκίνης [1DF = βαθμοί ελευθερίας (degree of freedom)]..... | 45 |
| Πίνακας 3.10. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων στα 20 διαφορετικά δείγματα για την επιβεβαίωση του μοντέλου..... | 47 |
| Πίνακας 3.11. Δοκιμές για την πειραματική μελέτη της απορρόφησης των κροκινών στα 440 nm | 49 |

| | |
|--|----|
| Πίνακας 3.12. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για τις κροκίνες..... | 49 |
| Πίνακας 3.13. Συντελεστές προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων που προτάθηκαν από το λογισμικό για τις κροκίνες μετά το μετασχηματισμό των δεδομένων της μεταβλητής απόκρισης με τετραγωνική ρίζα | 50 |
| Πίνακας 3.14. Ανάλυση ANOVA τετραγωνικού μοντέλου κροκινών [^{1}DF = βαθμοί ελευθερίας (degree of freedom)] | 52 |
| Πίνακας 3.15. Απορροφήσεις εκχυλισμάτων στα 20 διαφορετικά δείγματα για την επιβεβαίωση του μοντέλου..... | 53 |
| Πίνακας 3.16. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC-Q-TOF/MS με παρατηρούμενη μάζα $M+FA-H$ με τη σειρά εμφάνισής τους στην Εικόνα 3.23 | 56 |
| Πίνακας 3.17. Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC-Q-TOF/MS με παρατηρούμενη μάζα $M+Na^+$ κατά σειρά εμφάνισης..... | 57 |