



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
στις ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
με κατεύθυνση ΦΥΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΟΥ *CROCUS NIVALIS***

**ΣΕΡΓΙΟΣ ΒΑΡΕΜΕΝΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΠΑΤΡΑ 2019

ΣΕΡΓΙΟΣ ΒΑΡΕΜΕΝΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΟΥ *CROCUS NIVALIS*

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φωτεινή Λάμαρη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
Επιβλέπουσα

Βασιλική Μαγκαφά

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μανώλης Φουστέρης

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου Πατρών, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στις Φαρμακευτικές Επιστήμες και την Τεχνολογία στην κατεύθυνση Φαρμακευτικά Φυσικά Προϊόντα.

Με την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Κα Φωτεινή Λάμαρη αρχικά για την ένθερμη αποδοχή στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών όπως επίσης και για την ευχάριστη συνεργασία μας τα τελευταία δυο χρόνια στον ιδιαίτερα απαιτητικό τομέα της έρευνας. Την ευχαριστώ επίσης για την επιστημονική καθοδήγηση της, την προθυμία της, τις συμβουλές της και τον χρόνο που μου αφιέρωνε παρά το διαρκώς φορτωμένο πρόγραμμα της. Η προσπάθειά της για τα μέγιστα της εύρυθμης και αποδοτικής λειτουργίας του εργαστηρίου όπως και η υπομονή και επιμονή της στο δύσκολο επιστημονικό έργο που επιτελεί, αποτελούν πηγή έμπνευσης και θαυμασμού.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Κο Μανώλη Φουστέρη και την Επίκουρη Καθηγήτρια Κα Βασιλική Μαγκαφά που υπήρξαν καθηγητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, για την αποδοχή τους να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής και για το ότι ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν με όποιες απορίες ή προβλήματα αντιμετώπιζα.

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή Βιολογίας Γρηγόρη Ιατρού και την Δρ. Κωνσταντίνα Ζέλιου για την συλλογή και ευγενική παραχώρηση στο εργαστήριο των δειγμάτων *Crocus nivalis* από την περιοχή του Παναχαϊκού όρους, όπως και τον Κο Μάκη Μουρτζή για τα δείγματα *Crocus sativus* από το Ιράν πάνω στα οποία βασίστηκε η μελέτη αυτή.

Ευχαριστώ την Κα Κ. Ανδρεοπούλου του Κέντρου Ενόργανης Ανάλυσης του Πανεπιστημίου Πατρών για την συμβολή της στις αναλύσεις που πραγματοποίησα εκεί, την Δρ. Β. Δημάκη για την όλη προσφορά της στο εργαστήριο και την βοήθεια της και ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στους φίλους και συναδέλφους και σε όλους όσους συνεργάστηκα στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και στα υπόλοιπα εργαστήρια του τμήματος Φαρμακευτικής, οι οποίοι αποφοίτησαν ή θα αποφοιτήσουν μελλοντικά.

Τέλος ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ και εκ βαθέων ευγνωμοσύνη στους φίλους μου, στους γονείς μου και στον αδερφό μου Ιωάννη για την στήριξή τους, την θετική ενέργεια και αισιοδοξία στα όποια επιχειρήματα μου.

τέλος

BIOA

Πίνακας Περιεχομένων

Περιεχόμενα.....	i
1. Εισαγωγικό μέρος.....	1
Το γένος <i>Crocus</i>	2
Ιστορική αναδρομή.....	8
<i>Crocus sativus</i> Linnaeus.....	10
Καλλιέργεια.....	11
Συστατικά.....	13
Δράσεις.....	28
<i>Crocus nivalis</i>	35
2. Σκοπός της εργασίας.....	38
3. Πειραματικό μέρος.....	40
3.1 Το φυτικό υλικό.....	41
3.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	44
3.3 Όργανα και σκεύη	45
3.4 Φυτοχημική ανάλυση στύλων.....	47
3.4.1 Ανάλυση αιθέριων ελαίων <i>C. sativus</i> και <i>C. nivalis</i>.....	47
3.4.1.A Αρχή λειτουργίας : Αέριος Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας.....	47
3.4.1.B Πειραματική πορεία απομόνωσης πτητικών ενώσεων.....	53
3.4.1.Γ Πρωτόκολλο ανάλυσης πτητικών ενώσεων με την τεχνική GC-MS.....	68
3.4.2 Απομόνωση και ανάλυση πολικών συστατικών στύλων	
<i>C. sativus</i> και <i>C. nivalis</i>.....	59
3.4.2.A Αρχή λειτουργίας : Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, HPLC.....	59
3.4.2.B Πρωτόκολλο εκχύλισης στύλων.....	64
3.4.2.Γ Πρωτόκολλο ανάλυσης εκχυλίσματος με την τεχνική HPLC.....	65
3.4.2.Δ Πρωτόκολλο ανάλυσης εκχυλίσματος με την τεχνική MS.....	66
4. Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	67

4Α. Πτητικές ενώσεις :	
4.A.i. <i>Crocus sativus</i> (kozani).....	68
4.A.ii. <i>Crocus sativus</i> (Birgand).....	69
4.A.iii. <i>Crocus sativus</i> (Quaenaet).....	70
4.A.iv. <i>Crocus nivalis</i> (Panahaiko).....	71
4.A.v. Συγκρίσεις πτητικών ενώσεων.....	72
4Β. Χρωματογραφικό προφίλ :	
4.B.i. <i>Crocus sativus</i> (Kozani).....	74
4.B.ii. <i>Crocus sativus</i> (Birgand).....	76
4.B.iii. <i>Crocus sativus</i> (Quaenat).....	77
4.B.iv. <i>Crocus nivalis</i> (Panahaiko).....	78
4.B.v. Συγκρίσεις χρωματογραφικών προφίλ.....	79
4Γ. Ανάλυση απομονωμένων συστατικών <i>Crocus nivalis</i> (Panahaiko) με MS,MS2.....	83
5. Συζήτηση	115
6. Περίληψη- Abstract	123
7. Βιβλιογραφία.....	128

Κεφάλαιο Πρώτο

Εισαγωγικό μέρος

Το γένος *Crocus*

Η βοτανική συστηματική ταξινόμηση κατατάσσει το γένος *Crocus* στην κλάση των Μονοκοτυληδόνων (Monocotyledoneae), στην οικογένεια των Ιριδοειδών (Iridaceae) και την τάξη των Asparagales.



Εικόνα 1 : Γεωγραφική εξάπλωση του γένους *Crocus*
[πηγή Wikipedia]

Η γεωγραφική εξάπλωση αυτοφυών ειδών του γένους *Crocus* εντοπίζεται κυρίως στην Ευρώπη και Ασία (**Εικόνα 1**). Από τα 30 taxa που συναντώνται στην Ελλάδα, τα 12 είναι ενδημικά. Το πιο ευρέως διαδεδομένο είδος κρίκου, εξαιτίας του μεγέθους της καλλιέργειας του ένεκα της εμπορικής του αξίας, είναι το *Crocus sativus* Linnaeus ή αλλιώς ο κρίκος ο ήμερος. Τα αυτοφυή και ενδημικά είδη του γένους *Crocus* που φύονται στην Ελλάδα παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Τα φυτά του γένους *Crocus* είναι πολυετείς βολβώδεις πόες με μεγάλο σφαιρικό υπόγειο βολβό μεγέθους 2-3 cm. Έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε άμυλο και περιβάλλονται από αρκετές στρώσεις ξηρού ινώδους και μεμβρανώδους ιστού, οι οποίες σχηματίζουν ένα χιτώνα-βάση των φύλλων. Τα φύλλα είναι γραμμικά βαθύ πράσινου χρώματος με ευδιάκριτα όρια και φέρουν υπόλευκο κεντρικό αυλάκι. Εμφανίζονται κατά την περίοδο της ανθοφορίας ή αργότερα. Οι ρίζες είναι

κιτρινωπές ινώδεις με κονδυλώδη μορφή και ο βλαστός τους είναι κοντός και μεμβρανώδης και φτάνει σε ύψος τα 30 εκατοστά [1].

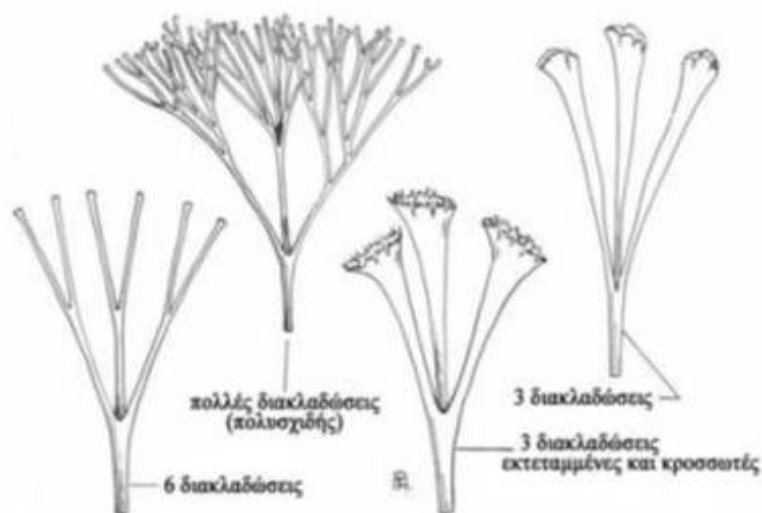
Πίνακας 1 : Γεωγραφική εξάπλωση ενδημικών ειδών του γένους *Crocus* στην Ελλάδα (-με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα ενδημικά είδη της Ελλάδας, NE: βόρεια-ανατολική, WAe: νησιά δυτικού Αιγαίου, SPi: νότια Πίνδος, EC: ανατολική-κεντρική, Ste: Στερεά Ελλάδα, NPi: βόρεια Πίνδος, Iol: Ιόνια νησιά, Pe: Πελοπόννησος, EAe: νησιά ανατολικού Αιγαίου, Kik: Κυκλάδες και KK: Κρήτη-Κάρπαθος) [πηγή : Vascular Plants Checklist of Greece].

Είδη του γένους <i>Crocus</i>	Συνώνυμα	Περιοχή
<i>Crocus athous</i> Bornm		NE
<i>Crocus biflorus</i> Mill.		Pe, StE, NC, NE, KK, EAe
<i>Crocus biflorus</i> subsp. <i>alexandri</i> (Velen.) B. Mathew	<i>Crocus alexandri</i> Velen.	NE
<i>Crocus biflorus</i> subsp. <i>melantherus</i> B. Mathew	• <i>Crocus melantherus</i> (B.Mathew) Peruzzi	Pe, StE
<i>Crocus biflorus</i> subsp. <i>nubigena</i> (Herb.) B. Mathew	• <i>Crocus nubigena</i> Herb., • <i>Crocus rhodensis</i> Rukšāns	KK, EAe
<i>Crocus biflorus</i> subsp. <i>stridii</i> (Papan. & Zacharof) B. Mathew	<i>Crocus stridii</i> Papan. & Zacharof	NE
<i>Crocus boryi</i> J. Gay	• <i>Crocus cretensis</i> Körn. • <i>Crocus ionicus</i> Herb. • <i>Crocus marathonisius</i> Heldr. • <i>Crocus veneris</i>	Iol, NPi, SPi, Pe, StE, EC, KK
<i>Crocus cancellatus</i> Herb.		Iol, NPi, SPi, Pe, StE, EC, NC, NE, NAe, WAe, Kik, EAe
<i>Crocus cancellatus</i> subsp. <i>mazziaricus</i> (Herb.) B. Mathew	• <i>Crocus mazziaricus</i> Herb. • <i>Crocus spruneri</i> Boiss. & Heldr.	Iol, NPi, SPi, Pe, StE, EC, NC, NE, WAe, Kik, EAe
<i>Crocus cartwrightianus</i> Herb.	<i>Crocus sativus</i>	Pe, StE, WAe, Kik, KK, EAe
<i>Crocus chrysanthus</i> (Herb.) Herb.		NPi, SPi, Pe, StE, EC, NC, NE, NAe

<i>Crocus cvijicii</i> Košanin		NPi, EC, NC
<i>Crocus flavus</i> Weston		NPi, SPi, StE, NC, NE
<i>Crocus flavus</i> subsp. <i>atticus</i> Kit Tan, Zograf. & Mermýgkas		StE
<i>Crocus flavus</i> Weston subsp. <i>flavus</i>	<i>Crocus aureus</i> Sm.	NPi, SPi, NC, NE
<i>Crocus fleischeri</i> J. Gay		EAe
<i>Crocus georgei</i> Rukšāns		Pe
<i>Crocus goulimyi</i> Turrill	<i>Crocus goulimyi</i> subsp. <i>leucanthus</i> (B. Mathew) B. Mathew	Pe
<i>Crocus hadriaticus</i> Herb.	• <i>Crocus hadriaticus</i> subsp. <i>parnassicus</i> (B. Mathew) B. Mathew • <i>Crocus hadriaticus</i> subsp. <i>parnonicus</i> B. Mathew • <i>Crocus nivalis</i> Klatt [non • <i>Crocus nivalis</i> Bory & Chaub.] • <i>Crocus peloponnesiacus</i> Orph.	IoI, NPi, SPi, Pe, StE
<i>Crocus harveyi</i> Rukšāns		EAe
<i>Crocus laevigatus</i> Bory & Chaub.	• <i>Crocus laevigatus</i> subsp. <i>pumilus</i> Rukšāns • <i>Crocus pumilus</i> (Rukšāns) Rukšāns	Pe, StE, NAe, WAe, Kik, KK, EAe
<i>Crocus macedonicus</i> Rukšāns		EC, NC, NE
<i>Crocus nivalis</i> Bory & Chaub.	• <i>Crocus atticus</i> subsp. <i>nivalis</i> (Bory & Chaub.) Rukšāns • <i>Crocus sieberi</i> subsp. <i>nivalis</i> (Bory & Chaub.) B. Mathew • <i>Crocus atticus</i> (Boiss. & Orph.) Orph. • <i>Crocus sieberi</i> subsp. <i>atticus</i> (Boiss. & Orph.) B. Mathew • <i>Crocus atticus</i> subsp. <i>sublimis</i> (Herb.) Rukšāns • <i>Crocus sieberi</i> subsp. <i>sublimis</i> (Herb.) B. Mathew	IoI, NPi, SPi, Pe, StE, NC, NE, WAe, Kik, EAe
<i>Crocus niveus</i> Bowles		Pe
<i>Crocus olivieri</i> J. Gay		NPi, Pe, StE, EC, NC, NE, EAe

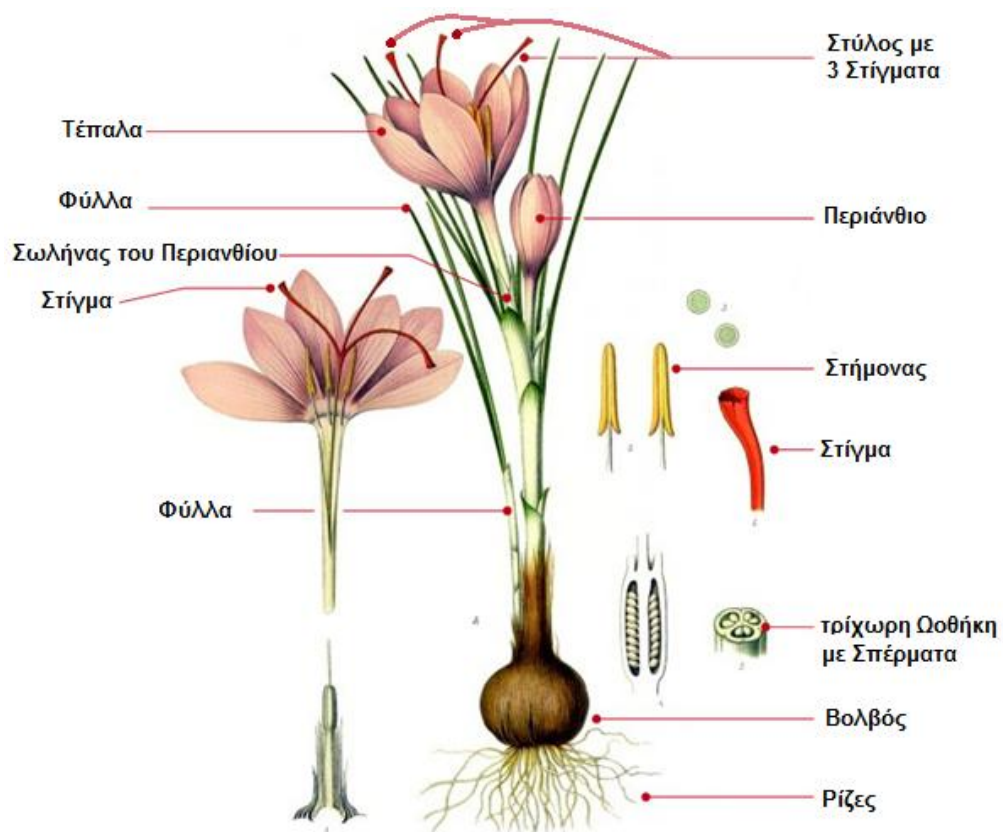
<i>Crocus olivieri</i> subsp. <i>balansae</i> (Baker) B. Mathew	<i>Crocus balansae</i> Maw	E Ae
<i>Crocus olivieri</i> J. Gay subsp. <i>olivieri</i>		Pe, StE, NE, EAe
<i>Crocus oreocreticus</i> B.L. Burt		KK
<i>Crocus orphei</i> Karampl. & Constantin.		NE
<i>Crocus pallasii</i> Goldb.		StE, EC, NC, NE, NAe, EAe
<i>Crocus pelistericus</i> Pulević		NC
<i>Crocus pulchellus</i> Herb.		C, NC, NE, NAe, EAe
<i>Crocus reticulatus</i> Adams		NE
<i>Crocus reticulatus</i> Adams subsp. <i>reticulatus</i>		NE
<i>Crocus robertianus</i> C.D. Brickell		NPi, SPi, StE
<i>Crocus ruksansii</i> Zubov		KK and Karpathos
<i>Crocus seisumsiana</i> Rukšāns		E Ae
<i>Crocus sieberi</i> J. Gay	● <i>Crocus sibthorpianus</i> Herb. ● <i>Crocus sieberianus</i> Herb.	KK
<i>Crocus speciosus</i> M. Bieb.		NPi, StE
<i>Crocus speciosus</i> subsp. <i>hellenicus</i> Rukšāns	● <i>Crocus hellenicus</i> (Rukšāns) Rukšāns ● "<i>Crocus speciosus</i> subsp. <i>speciosus</i>" auct. fl. graec., non M. Bieb.	NPi, StE
<i>Crocus tournefortii</i> J. Gay	● <i>Crocus boryi</i> subsp. <i>tournefortii</i> (J. Gay) Greuter & al. ● <i>Crocus orphanidis</i> Hook. f. ● <i>Crocus pholegandrius</i> Orph. ● <i>Crocus sennii</i> Caval. ● <i>Crocus tournefortianus</i>	Pe, Kik, KK, EAe
<i>Crocus vaclavii</i> Rukšāns		NE
<i>Crocus veluchensis</i> Herb.		NPi, SPi, StE, EC, NC, NE

Η μορφολογική διάκριση μεταξύ των ειδών του κρόκου είναι δύσκολη εξαιτίας της έντονης ομοιότητας που αυτά παρουσιάζουν και εστιάζεται κυρίως στην μορφολογία και τον αριθμό των στύλων του άνθους (**Εικόνα 2, Εικόνα 3**). Ο στύλος αποτελεί προέκταση της ωοθήκης και μπορεί να έχει 2-3 διακλαδώσεις ή να είναι πολυσχιδής. Άλλοτε μπορεί να είναι ακέραιοι ή οδοντωτοί. [2]



Εικόνα 2 : Μορφολογική απεικόνιση διαφόρων τύπων στύλων του γένους *Crocus*.

Η περίοδος ανθοφορίας των φυτών του κρόκου ξεκινάει προς τα τέλη του φθινοπώρου και εκτείνεται προς τις αρχές της άνοιξης [2]. Τα περισσότερα είδη κρόκου αναπαράγονται με σπόρους και είναι πρωτόγυνα. Αναπτύσσουν δηλαδή πρώτα τα γυναικεία μέρη του φυτού και στην συνέχεια τα ανδρικά μέρη. Άλλα είδη κρόκου, όπως ο *Crocus sativus*, ανήκουν στην κατηγορία των τριπλοειδών οργανισμών, γεγονός το οποίο τα καθιστά στείρα. Δεν μπορεί δηλαδή να αναπαραχθεί εγγενώς το φυτό και να δώσει σπόρους. Η διάσπαση και σπορά των βολβών του φυτού είναι ο μοναδικός τρόπος για να πολλαπλασιαστεί.



Εικόνα 3 : Μορφολογική απεικόνιση του φυτού *Crocus sativus* [3].

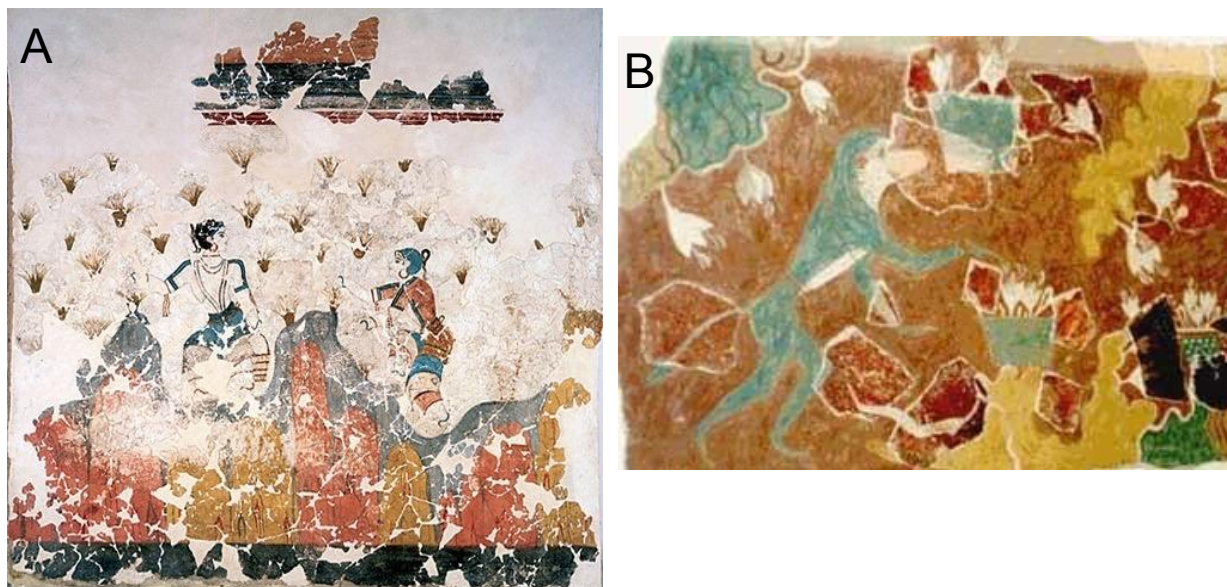
Ιστορική αναδρομή

Οι πιο παλιές αναφορές στο φυτό κρόκος ως χρωστική ουσία, φάρμακο, βότανο ή άρτυμα, είναι από το 2.300 π.Χ και προέρχονται από την ανατολή. Στην αρχαία Περσία ο κρόκος ήταν σημαντικό είδος πολυτέλειας. Επιπροσθέτως, στις χώρες της Ασίας υπήρξε πολύτιμο είδος συναλλαγής, ενώ αφιερωνόταν ως προσφορά στους θεούς. Μικρά δοχεία με σαφράν βρέθηκαν ακόμα και σε μούμιες της Αιγύπτου. Υπάρχουν αναφορές ότι χρησιμοποιούταν στα καλλυντικά της Βασίλισσας Κλεοπάτρας, και ότι στα επίσημα γεύματα των αρχαίων Ρωμαίων, το κρασί ήταν αρωματισμένο με κρόκο.

Στην αρχαία Ελλάδα γραπτές αναφορές υπάρχουν από τον Όμηρο και τον Ιπποκράτη ενώ σημαντικό ρόλο κατείχε στη Μινωική εποχή. Υπάρχουν μαρτυρίες για την ύπαρξη του φυτού σε κείμενα οι οποίες μιλούν για ζαφορόκηπους στα μινωικά ανάκτορα, αλλά και τοιχογραφίες με άνθη κρόκου που έχουν ανευρεθεί το επιβεβαιώνουν. Μια εξ αυτών περιέχει τον "κροκοσυλλέκτη πίθηκο" (**Εικόνα 4B**) [4] ενώ μια άλλη στην Σαντορίνη δείχνει μια "κροκοσυλλέκτρια" γυναίκα η οποία συλλέγει άνθη κρόκου. Αναπαραστάσεις θρησκευτικών σκηνών στις οποίες απεικονίζεται ο κρόκος καταδεικνύουν την σημασία που είχε αποκτήσει ως θρησκευτικό σύμβολο.

Η σημαντικότητα του φυτού στα αρχαία χρόνια προκύπτει και από τις φαρμακευτικές ιδιότητες που έχει, αλλά και από το γεγονός ότι χρησιμοποιούνταν για τις χρωστικές του ιδιότητες αφότου διαδόθηκε από τους Αιγύπτιους στους κατοίκους της Κρήτης [5]. Ο κρόκος ήταν το ιερό φυτό του βασιλιά Μίνωα και τα

ενδύματα βαμμένα με βαφή κρόκου θεωρούνταν τιμητικά. Επίσης, οι αρχαίοι πίστευαν ότι έχει αφροδισιακές ιδιότητες και συχνά δίνονταν ως έδεσμα.



Εικόνα 4 : **A.** "κροκοσυλλέκτριες", τοιχογραφία από τη Σαντορίνη του 16ου π.Χ

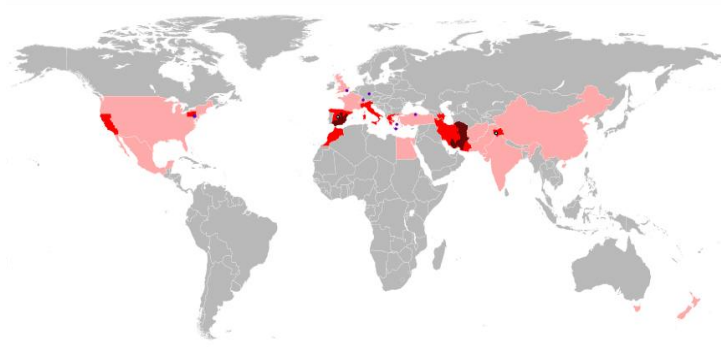
B. Ο "κροκοσυλλέκτης πίθηκος" από το «Σπίτι των τοιχογραφιών» της Κνωσού, 1500 π.Χ.

Στην Κρήτη σήμερα υπάρχουν πέντε συνολικά αυτοφυή είδη κρόκου όμως δεν υπάρχει εντατική καλλιέργειά τους. Ο κρόκος χρησιμοποιούνταν ως φάρμακο, ως καρύκευμα αλλά και για την βαφή υφασμάτων. Γνωστός και ως ζαφορά, αναφέρεται από τους "σημερινούς" Μινωίτες στην έκφραση «Έγινες κίτρινος σαν τη ζαφορά» [6].

Crocus sativus Linnaeus : κρόκος ο ήμερος



Εικόνα 5 : Το φυτό *C. sativus* σε άνθιση [πηγή gartendialog.de]



Εικόνα 6 : Χάρτης παγκόσμιας παραγωγής *C. sativus* [πηγή wikipedia]

Αποτελεί τον πιο γνωστό εκπρόσωπο του γένους *Crocus* (**Εικόνα 5**) με την σημαντικότερη εμπορική αξία. Έχει παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση και καλλιεργείται κυρίως σε χώρες της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Μαρόκο, Αζερμπαϊτζάν) και της κεντρικής Ασίας (Ιράν, Ινδία) (**Εικόνα 6**) [7]. Ειδικά στην Ελλάδα στον Νομό Κοζάνης (Περιφέρεια Μακεδονίας) το χωριό Κρόκος κατατάσσεται στους πρώτους παραγωγούς κρόκου βιολογικής καλλιέργειας στον κόσμο και αποτελεί τοπικό προϊόν με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (ΠΟΠ) (**Εικόνα 7**).

Εικόνα 7 : Συσκευασία πώλησης του Κρόκου Κοζάνης.
(Αναγκαστικός Συνεταιρισμός Κροκοπαραγωγών Κοζάνης)



ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η καλλιέργεια του εδώδιμου κρόκου γίνεται για τα κοκκινο-πορτοκαλί στίγματα του λουλουδιού του φυτού (τα ακραία τμήματα του στύλου του ύπερου, συχνά ταυτίζεται με τον όρο στύλος), τα οποία έχουν μεγάλη φαρμακευτική, χρωστική, αρτυματική και μυρεψική αξία. Μοναδική κροκοκαλλιεργούμενη περιοχή της χώρας μας είναι η περιοχή της Κοζάνης (χωριά Κρόκος, Καρυδίτσα, Αγία Παρασκευή, Άνω Κώμη, Κάτω Κώμη, Λευκοπηγή, Πετρανά κ.λπ).

Για να ευδοκιμήσει το φυτό χρειάζεται ακραίες κλιματικές συνθήκες, συγκεκριμένα, ξηρό και θερμό καλοκαίρι και κρύο χειμώνα. Το έδαφος θα πρέπει να είναι ξηρό, ασβεστώδες, επίπεδο απουσία άλλων φυτών. Επίσης, να είναι καλά στραγγιζόμενο ώστε να αποφεύγονται οι προσβολές των βολβών από μύκητες με επακόλουθο το σάπισμα τους. Η σπορά πραγματοποιείται τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο. Συγκεκριμένα, οι βολβοί φυτεύονται σε γραμμές σε απόσταση 10 εκατοστών μεταξύ τους και σε αυλάκια βάθους 20 εκατοστών [8].

Τα άνθη αναπτύσσονται από τον Οκτώβρη μέχρι τον Νοέμβρη, από ένα έως τρία από κάθε βολβό (**Εικόνα 8**) και σχηματίζουν μικρά ανορθωμένα «χωνάκια» τα οποία ανοίγουν μετά την παρέλευση μερικών ωρών. Τα άνθη αποτελούνται από έξι γαλάζια-μώβ τέπαλα (μήκους 4-5 εκ., πλάτους ενός εκ.), τρεις κίτρινους στήμονες, τον στύλο (χωρίζεται σε τρία τελικά στίγματα) και την ωοθήκη (τρίχωρη, στενή και περιέχει πολλά καστανά στρογγυλά σπέρματα) (**Εικόνα 3**).

Τα στίγματα, έχουν κόκκινο προς το πορτοκαλί χρώμα, μήκους 40-50 χιλιοστών μαζί με το μέρος του στύλου. Είναι οδοντωτά στο ανώτερο άκρο τους και γέρνουν προς τα κάτω, συχνά έξω από το περιάνθιο .

Η συγκομιδή των ανθέων γίνεται προσεκτικά και αποκλειστικά με το χέρι από κάθε φυτό. Η κοπιαστική αυτή εργασία, που χρειάζεται και σχετική δεξιότητα, ξεκινά από την αυγή έως και την δύση σχεδόν του ήλιου. Διαρκεί συνολικά περίπου 20 με 25 ημέρες.

Ιδιαίτερα απαιτητική και λεπτή διαδικασία είναι η ξήρανση των στίγμάτων. Απαιτεί πείρα, μεγάλη προσοχή και τέχνη. Για να διατηρήσει ο κρόκος αναλλοίωτες τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες (χρώμα-άρωμα) πρέπει να ξηρανθεί σωστά χωρίς απώλειες. Ακολουθεί η διαλογή των στίγμάτων ανάμεσα από τους κίτρινους στήμονες, τη γύρη και τις όποιες άλλες τυχόν προσμίξεις

Κατά μέσο όρο ανά στρέμμα παράγονται 0.7-1 kg ξηρά στίγματα. Στον πρώτο χρόνο της φυτείας παρατηρείται η μικρότερη απόδοση του φυτού, ενώ η μεγαλύτερη στο τρίτο και τέταρτο. Υπολογίζεται ότι κατά μέσο όρο χρειάζονται 150.000 λουλούδια για να πάρουμε ένα κιλό αποξηραμένα στίγματα σαφράν.

Τα αποξηραμένα στίγματα πρέπει να αποθηκευτούν και να προστατευθούν από την υγρασία, το ηλιακό φως και τη θερμότητα ώστε να διατηρηθούν τα χαρακτηριστικά τους.

Τα αποξηραμένα στίγματα των λουλουδιών του *Crocus sativus* L., διατίθενται κυρίως στην αγορά με τη μορφή ξηρών. Επίσης, πωλούνται και με τη μορφή σκόνης ύστερα από άλεσμά τους.

Οι κυριότερες καταναλώτριες χώρες θεωρούνται η Ισπανία, η Ιταλία, η Γαλλία, οι Η.Π.Α., η Ελβετία, η Αγγλία, η Γερμανία, οι Σκανδιναβικές και Κάτω Χώρες, τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα και η Ιαπωνία [7].



Εικόνα 8 : Τυπική καλλιέργεια *C. sativus* στην περιοχή της Κοζάνης την εποχή ανθοφορίας του φυτού

Συστατικά των στύλων του *C. sativus*

Εξαιτίας της ιστορίας του αλλά και της εμπορικής αξίας του είναι ο πιο καλά μελετημένος αντιπρόσωπος της οικογένειας *Crocus*. Στους στύλους του φυτού έχουν βρεθεί πάνω από 150 ενώσεις, από αυτές το μεγαλύτερο ενδιαφέρον κατέχουν οι έγχρωμες υδατοδιαλυτές κροκίνες, η σαφρανάλη, υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό άρωμα, αλλά και η πικροκροκίνη, η οποία όπως υποδηλώνει το όνομα της προσδίδει πικρή γεύση όταν καταναλώνεται.

Οι κροκίνες

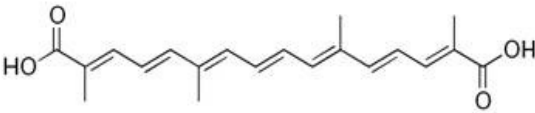
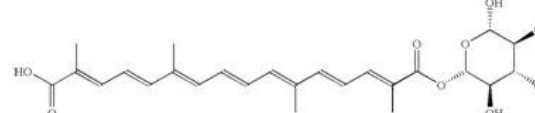
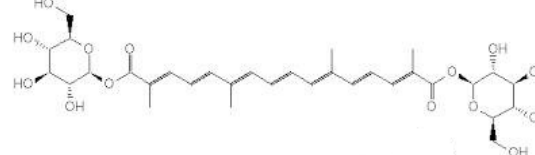
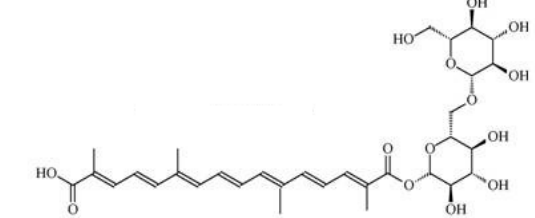
Είναι έγχρωμες υδατοδιαλυτές ενώσεις στις οποίες οι στύλοι οφείλουν το πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα. Είναι αποκαροτενοειδή με 20 άτομα άνθρακα (προϊόντα

του μεταβολισμού των καροτενοειδών) και προέρχονται από την εστεροποίηση της κροκετίνης με μονάδες σακχάρων, D-γλυκόζης, D-γεντιοβιόζης ή και τριμερών γλυκόζης. Τα σάκχαρα στα άκρα του μορίου προσδίδουν μια εξαιρετική υδατοδιαλυτότητα στο νερό και εξαιτίας αυτής της ιδιότητας τους χαρακτηρίζονται ως ασυνήθιστες καροτενοειδείς ουσίες. Στην πραγματικότητα είναι αποκαροτενοειδή μιας και προέρχονται από την αποικοδόμηση των καροτενοειδών. Εκτός από τους στύλους του *C. sativus* απαντώνται και στον καρπό του *Gardenia jasminoides* Ellis (οικογένεια Rubiaceae) Η περιεκτικότητά τους ποικίλλει. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα ευπαθείς, καθώς είναι θερμοευαίσθητες αλλά και φωτοευαίσθητες λόγω του εκτεταμένου συστήματος *trans*- διπλών δεσμών (απαντώνται και σε *cis*- διαμόρφωση).

Η κροκετίνη ($C_{20}H_{24}O_4$ M.W.=328) είναι ένα φυσικό διαποκαροτενοειδές (8,8'- διαπο-8,8'-καροτενοϊκό οξύ) με συμμετρική δομή. Περιέχει συνολικά επτά διπλούς δεσμούς και τέσσερις μεθυλομάδες και στα τελικά τμήματα βρίσκονται δύο καρβοξυλικές ομάδες (από μια εκατέρωθεν). Είναι ελάχιστα διαλυτή σε υδατικά διαλύματα ενώ όταν διαλύεται προκαλεί κίτρινο χρωματισμό.

Ιστορικά, η πρώτη κροκίνη ανακαλύφθηκε το 1915 από τον Γερμανό F. Decker [9]. Ονομάστηκε Κροκίνη 1 και περιείχε 4 μόρια β-D-γλυκόζης (σήμερα ονομάζεται *trans*-κροκίνη-4). Ακολούθησαν και άλλες κροκίνες η ονοματολογία των οποίων αφορά τον αριθμό των σακχάρων που είναι παρόντα στο μόριο αλλά και την σχετική στερεοδιάταξη του μορίου.

Πίνακας 2 : Συγκεντρωτικός πίνακας όπου φαίνεται η ονομασία, η δομή, το μοριακό βάρος, η ονομασία κατά IUPAC και ο μοριακός τύπος των κυριότερων κροκινών

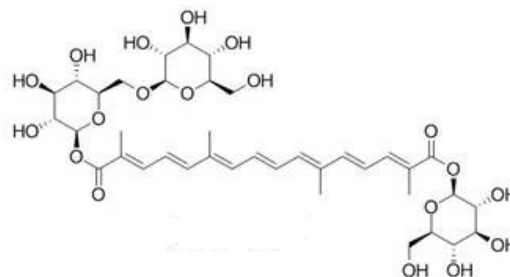
Κροκετίνη	
→ φυσικό αποκαροτενοειδές δικαρβοξυλικό οξύ αποτελούμενο από 20 άτομα άνθρακα. IUPAC: (2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-Tetramethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenedioic acid Μοριακός τύπος C₂₀H₂₄O₄ , Μοριακό βάρος 328.41 g/mol	
<i>trans</i> κροκίνη-1	
→ αποτελείται από μια μονάδα β-D-γλυκόζης ενωμένη στο ένα από τα δύο άκρα της κροκετίνης. IUPAC: 1-O-methyl-16-O-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] (2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenedioate. Μοριακός τύπος C₂₇H₃₆O₉ , Μοριακό βάρος 504.576 g/mol	
<i>trans</i> κροκίνη-2	
→ αποτελείται από δύο μονάδες β-D-γλυκόζης ενωμένες στα δύο άκρα της κροκετίνης. IUPAC: 1-O-methyl-16-O-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] (2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenedioate. Μοριακός τύπος C₂₇H₃₆O₉ , Μοριακό βάρος 504.576 g/mol	
<i>trans</i> κροκίνη-2'	

→ αποτελείται από μια μονάδα δισακχαρίτη β-D-γεντιοβιόζη ενωμένη στο ένα από τα δύο άκρα της κροκετίνης.

IUPAC: (2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetramethyl-16-oxo-16-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenoic acid

Μοριακός τύπος $C_{32}H_{44}O_{14}$, Μοριακό βάρος 504.576 g/mol

trans κροκίνη-3

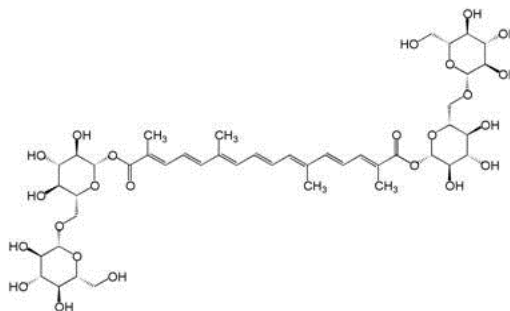


→ αποτελείται από μια μονάδα β-D-γεντιοβιόζης και μια μονάδα β-D-γλυκόζης ενωμένες στα δύο άκρα του σκελετού της κροκετίνης.

IUPAC 3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl (6S)-3,4,5-trihydroxy-6-([3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy)methyl)oxan-2-yl(2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenedioate

Μοριακός τύπος $C_{38}H_{54}O_{19}$, Μοριακό βάρος 814.831 g/mol

trans κροκίνη-4

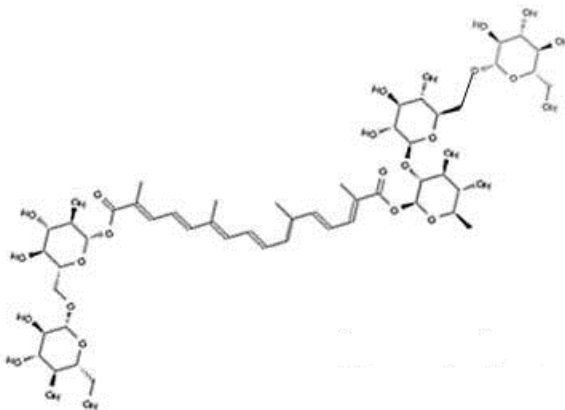


→ αποτελείται από δύο μονάδες β-D-γεντιοβιόζης ενωμένες στα δύο άκρα της κροκετίνης. Είναι η μεγαλύτερη σε αναλογία κροκίνη στους στύλους του *C. sativus*.

IUPAC: [(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl] (2E,4E,6E,8E,10Z,12E,14Z)-2,6,11,15-tetramethyl-16-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxymethyl]heptadeca-2,4,6,8,10,12,14,16-octaenoate

Μοριακός τύπος $C_{46}H_{68}O_{23}$, Μοριακό βάρος 989.027 g/mol

trans κροκίνη-5

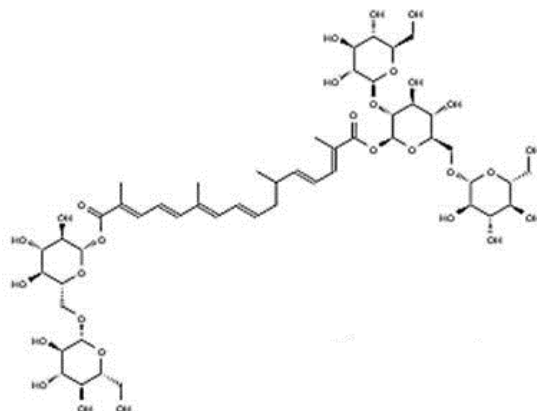


→ αποτελείται από μια μονάδα β-D-γεντιοβιόζης και μια μονάδα τρισακχαρίτη β-D-γεντιοτριόζης ενωμένες στα άκρα της κροκετίνης

IUPAC:1-O-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]16-O-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl](2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenedioate

Μοριακός τύπος $C_{50}H_{74}O_{29}$, Μοριακό βάρος 1139.113 g/mol

trans κροκίνη-5'



→ αποτελείται από μια μονάδα β-D-γεντιοβιόζης και μια μονάδα τρισακχαρίτη β-D-νεαπολιτανόζης ενωμένες στα άκρα της κροκετίνης.

IUPAC:1-O-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]16-O-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl](2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenedioate

Μοριακός τύπος $C_{50}H_{74}O_{29}$, Μοριακό βάρος 1139.113 g/mol

Πίνακας 3 : Συγκεντρωτικός πίνακας όπου φαίνεται η ονομασία, το μοριακό βάρος, και τα επικρατέστερα μοριακά ιόντα, ιόντα προσθήκης (με έντονη γραφή) και θραύσματα τα οποία παράγονται κατά τον αρνητικό και θετικό ιονισμό στην φασματομετρία μάζας όλων των γνωστών κροκίνων καθώς και οι σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές.(t : triglucoside, n : neapolitanoside, G : gentiobioside, g : glucoside)

	Ονομασία	Μοριακό βάρος	Ιόντα (θραυσμάτωση)	Βιβλιογραφία
Αρνητικός ιονισμός	Trans Κροκίνη 6 (trans 6 g)	1300	1323 , 649, 975	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Cis κροκίνη 6 (cis 6 g)	1300	1300, 975	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Cis κροκίνη 6 (cis 6 g)	1300	1300, 975, 324	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Trans κροκίνη 8 (trans 8 g)	1624	1624	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
Θετικός ιονισμός	Cis Κροκίνη 1 (cis -1-g)	490	329, 513	Moras et al., 2018 [70]
	Trans κροκίνη 1 (trans -1-g)	490		Carmona et al., 2006 [62] Ichi et al.,1995 [80]
			329, 491, 513	Moras et al., 2018 [70]
	Cis Κροκίνη 2 (cis -2-g)	652	329, 653, 675	Moras et al., 2018 [70]
	Cis Κροκίνη 2 (cis -2-G)	652	513	Ichi et al., 1995 [80] Straubinger et al., 1997 [81]
	Cis Κροκίνη 2' (cis -2-gg)	652	261, 326, 434, 458	Moras et al., 2018 [70]
			675	Tarantilis et al., 1995 [55]
	Trans κροκίνη 2 (trans -2-G)	652	329, 653, 675	Moras et al., 2018 [70]
			513, 675	Ichi et al.,1995 [80]
	Trans κροκίνη 2' (trans -2-gg)	652	329, 491, 653, 675	Moras et al., 2018 [70]
			675	Ichi et al.,1995 [80]
	Cis Κροκίνη 3 (cis -3-g)	814	329, 837	Moras et al., 2018 [70]
	Cis κροκίνη 3 (cis -3-Gg)		543, 675, 837	Tarantilis et al., 1995 [55] Carmona et al., 2006 [62]
	Trans κροκίνη 3' (trans -3-Gg)	814	329, 491, 653, 675, 837	Moras et al., 2018 [70]
			329, 675, 837	Ichi et al.,1995 [80]
	Cis Κροκίνη 4' (cis -4-GG)	976	329, 511, 635, 653, 675, 797, 999	Moras et al., 2018 [70]

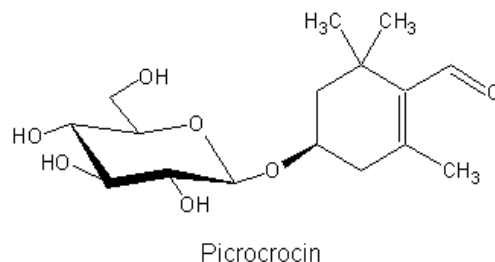
			511, 999	Tarantilis et al., 1995 [55] Carmona et al., 2006 [62]
	Cis Κροκίνη 4 (cis-4-ng)	976	635, 797, 999	Carmona et al., 2006 [62]
	Trans κροκίνη 4 (trans-4 g)	976	329, 999	Moras et al., 2018 [70]
	Trans κροκίνη 4' (trans-4-GG)	976	329, 653, 675, 999	Moras et al., 2018 [70]
			511, 999	Tarantilis et al., 1995 [55] Carmona et al., 2006 [62]
	Trans κροκίνη 4 (trans-4-ng)	976	635, 817, 999	Carmona et al., 2006 [62]
	Trans κροκίνη 5 (trans-5 g)	1138	329, 1161	Moras et al., 2018 [70]
	Trans κροκίνη 5 (trans-5-tG)	1138	329, 635, 675, 837, 1161	Moras et al., 2018 [70]
		1138	592, 675, 837, 1161	Carmona et al., 2006 [62]
	Trans κροκίνη 5 (trans-5-nG)	1138	592, 797, 1161	Carmona et al., 2006 [62]
	Cis κροκίνη 5 (cis-5-tG)	1138	592, 675, 1161	Carmona et al., 2006 [62]
	Cis κροκίνη 5 (cis-5-nG)	1138	592, 635, 1161	Carmona et al., 2006 [62]
	Trans κροκίνη 6 (trans 6 g)	1300	1297, 1135, 811, 487, 325	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Cis κροκίνη 6 (cis 6 g)	1300	1323 , 1134	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Trans κροκίνη 7 (trans 7 g)	1462	1485 , 1462, 1300, 999	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Cis κροκίνη 8 (cis 8 g)	1624	1297, 1135, 973, 811, 649, 487, 325	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Trans κροκίνη 8 (trans 8 gluc)	1624	1647 , 999, 587. 325	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]
	Trans κροκίνη 8 (trans 8 gluc)	1624	1648 , 1145, 827, 651, 489, 325	Rubio-Moraga et al., 2013 [75]

Η πικροκροκίνη

Είναι το δεύτερο σε αφθονία συστατικό των στύλων και αποτελεί το 1-13% του ξηρού βάρους [ονομασία κατά IUPAC: 4-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-1-εν-1-καρβοξαλδεΐδη]. Όπως υποδηλώνει το όνομα της

ευθύνεται για την πικρή γεύση του σαφράν. Αποτελείται από μια μονάδα D-γλυκόζης και το άγλυκο μόριο HTCC (1-κυκλοεξεν-1- καρβοξαλδεΐδη). Οι πρώτοι που μελέτησαν την δομή της (**Εικόνα 9**) ήταν οι Khun και Winterstein (1934) [10] , ενώ οι Buchecker και Eugster [11] καθόρισαν πρώτοι την στεreoχημική της διάταξη.

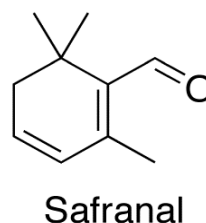
Εικόνα 9 : Η στεreoχημική δομή της Πικροκροκίνης



Η σαφρανάλη

Η σαφρανάλη αποτελεί την κύρια ουσία του αιθέριου ελαίου των στύλων του φυτού [ονομασία κατά IUPAC: 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβοξαλδεΐδη]. Αποτελεί το 30-37%, ενώ αποτελεί μόλις το 0,001-0,006% της ξηρής μάζας του. Η σαφρανάλη είναι η ουσία η οποία ευθύνεται για το χαρακτηριστικό άρωμα του σαφράν. Απομονώθηκε για πρώτη φορά μέσω αλκαλικής ή όξινης υδρόλυσης της πικροκροκίνης από τους Winterstein και Telezcky (1922) [12]. Οι Khun και Winterstein [10] καθόρισαν πρώτοι την δομή (**Εικόνα 10**) και ονομασία της. Επιπλέον, οι Khun και Low (1941) [13] κατάφεραν να την απομονώσουν μέσω ενζυμικής υδρόλυσης της πικροκροκίνης.

Εικόνα 10 : Η χημική δομή της σαφρανάλης



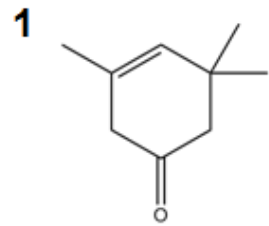
Άλλα συστατικά

Οι στύλοι του *C.sativus* εκτός της σαφρανάλης και της πικροκροκίνης περιέχουν πληθώρα πτητικών συστατικών όπως η ισοφορόνη, η β-ισοφορόνη, η διυδροχυφορόνη, η *trans* β-ινόνη, η HTCC κα. Η αναγνώριση τους γίνεται κυρίως μέσω της τεχνικής της Αερίου Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας. Οι κύριες πτητικές ουσίες των στύλων φαίνονται στην **Εικόνα 11**.

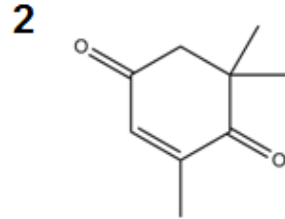
Μεταξύ των διαφόρων ειδών κρόκου υπάρχουν διαφορές ως προς την περιεκτικότητα των συστατικών είτε ποσοτικές, είτε ποιοτικές. Κάτι το οποίο εξαρτάται από παράγοντες όπως η περιοχή στην οποία φύεται το φυτό, η εποχή καλλιέργειας αν αυτό καλλιεργείται, ή γενετικοί παράγοντες.

Σε πρόσφατη μελέτη του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών, πραγματοποιήθηκε φυτοχημικός χαρακτηρισμός μέσω GC-MS και HPLC τεχνικών, όπως επίσης και γενετικός χαρακτηρισμός μέσω ISSR βιοδεικτών, των στύλων των αυτοφυών ειδών *C. cartwrightianus*, *C. oreocreticus* και *C. laevigatus*, από το νησί της Κρήτης. Τα ευρήματα συγκρίθηκαν με αυτά των συστηματικά καλλιεργούμενων στύλων *C. sativus* στην δυτική Μακεδονία. Η μελέτη έδειξε ότι το κύριο πτητικό συστατικό των στύλων ήταν η σαφρανάλη για τον *C. sativus*, η 4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde για τον *C. cartwrightianus* και *C. oreocreticus* και η ισοφορόνη για τον *C. Laevigatus*. Επιπλέον, ο *C. sativus* είχε το πιο πλούσιο περιεχόμενο σε κροκίνες και πικροκροκίνη, ενώ ο *C. laevigatus* το πιο φτωχό. Η γενετική και χημική ανάλυσή τους ανέδειξε επίσης τη συγγένεια μεταξύ των ειδών με τον *C. cartwrightianus* να είναι πιο συγγενικός με τον *C. oreocreticus*, ενώ ο *C. sativus* με τον *C. laevigatus* να είναι οι λιγότερο ομοειδείς [15].

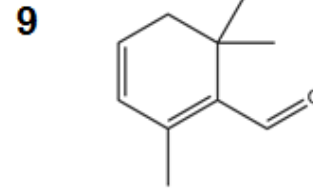
Εικόνα 11 : Πτητικές ενώσεις των στύλων του *C. sativus* [15].



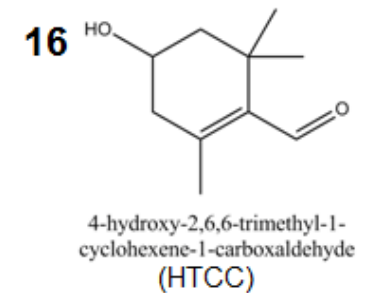
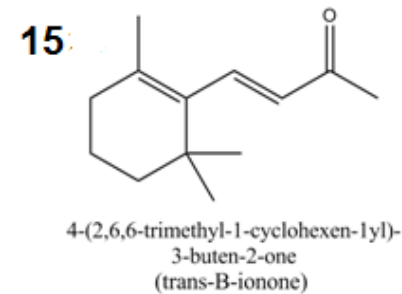
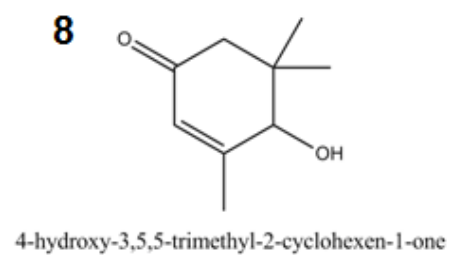
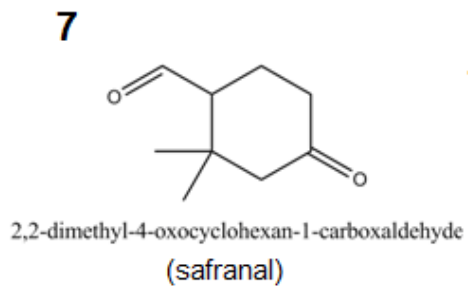
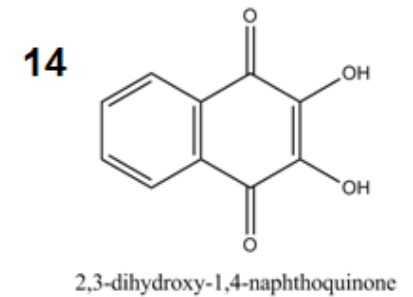
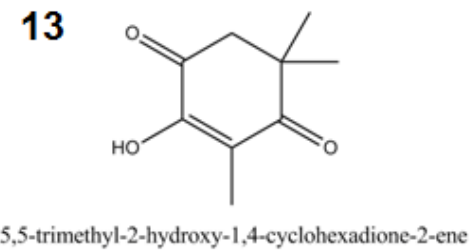
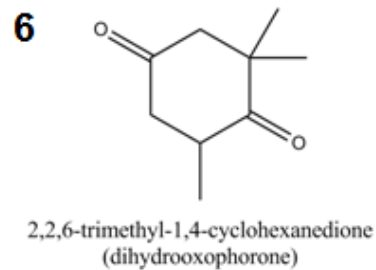
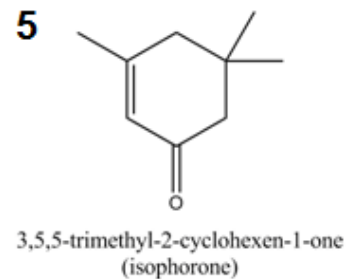
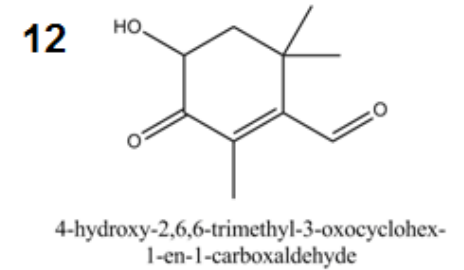
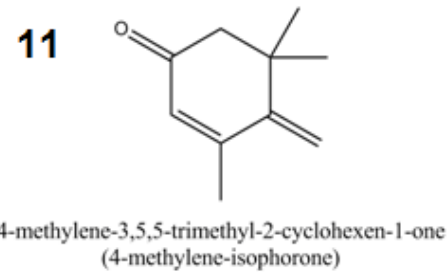
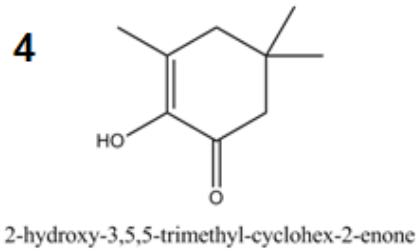
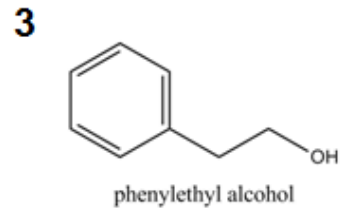
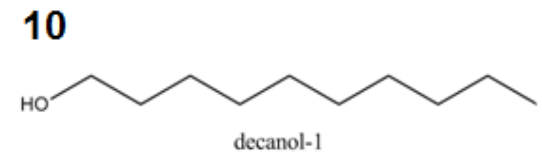
3,5,5-trimethyl-3-cyclohexen-1-one
(B-isophorone)

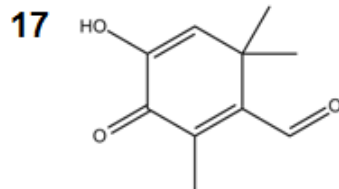


2,6,6-trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione
(4-ketoisophorone)

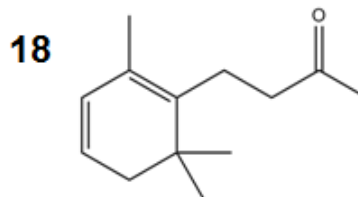


2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene-1-carboxaldehyde

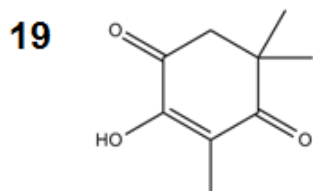




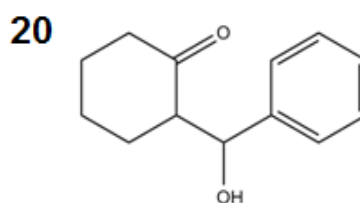
4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-3-oxocyclohexa-1,4-diene-1-carboxaldehyde



4-(2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadien-1-yl)-2-butanone
(dihydrodehydro-a-ionone)



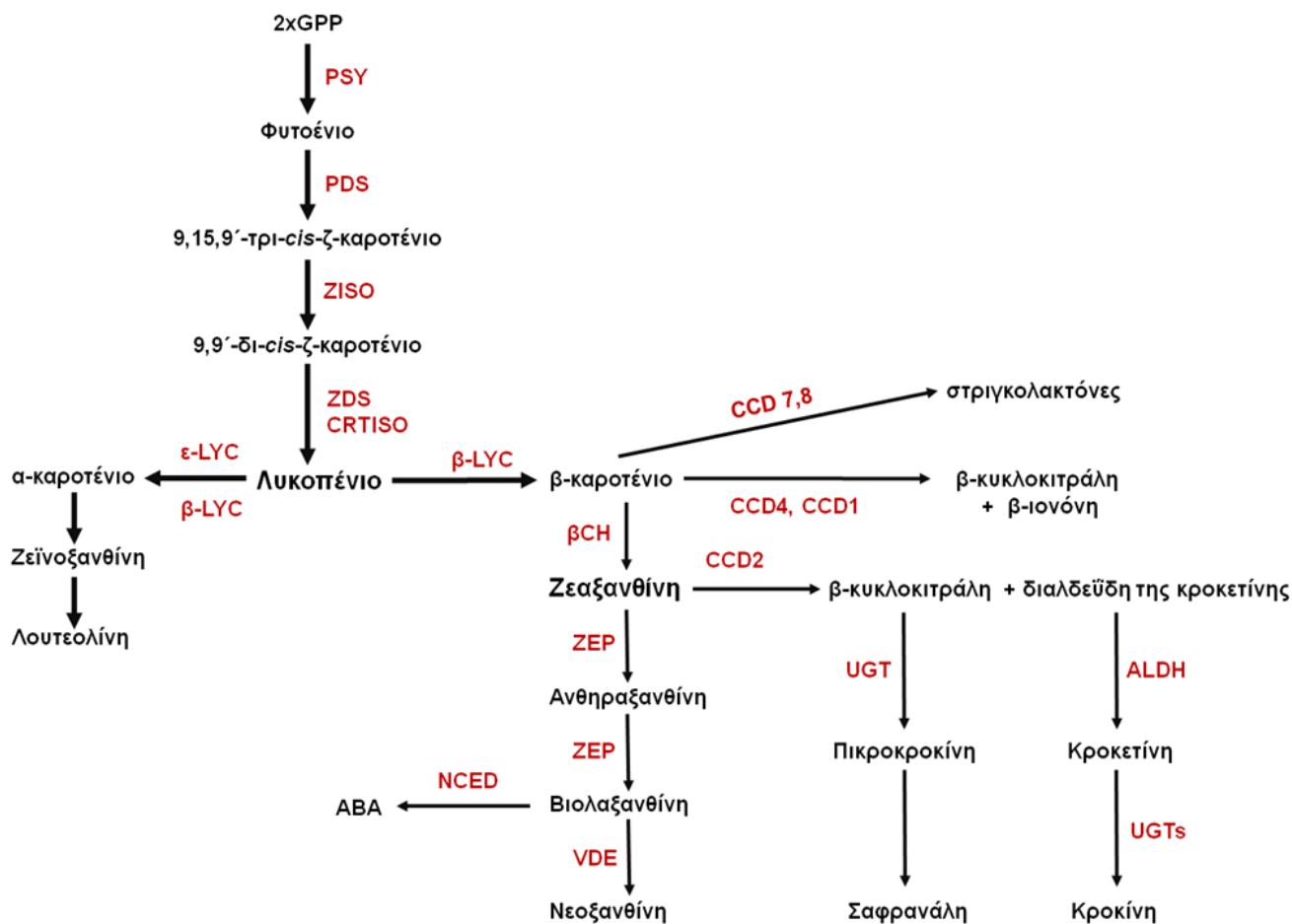
2-hydroxy-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1,4-dione



2-(hydroxyphenylmethyl)-cyclohexanone

Η βιοσυνθετική προέλευση των αποκαροτενοειδών

Τα καροτενοειδή είναι έγχρωμες ενώσεις που απαντώνται στα ζωικό και φυτικό βασίλειο. Μαζί με τις χλωροφύλλες αποτελούν τις επικρατέστερες χρωστικές στα φύλλα, ενώ συναντώνται και στους χρωμοπλάστες. Το κίτρινο-ερυθρό χρώμα των καρπών και των άνθεων οφείλονται σε αυτές. Τα καροτενοειδή είναι βοηθητικές χρωστικές της φωτοσύνθεσης. Όπως προαναφέρθηκε στους στύλους του φυτού υπάρχει έντονη η παρουσία των 3 αποκαροτενοειδών : κροκίνες, πικροκροκίνη και σαφρανάλη. Η ειδική βιοσυνθετική πορεία για το καθένα από αυτά δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (**Εικόνα 12**). Ο κοινός όμως πρόγονος-πρόδρομο μόριο και των τριών είναι η ζεαξανθίνη [16].



Εικόνα 12 : Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των καροτενοειδών στα φυτά [17].

GPP : Geranyl pyrophosphate, PSY : phytoene synthase, PDS : phytoene desaturase synthase, ZISO : 15-*cis*-ζ-carotene isomerase, CRTISO : 7,9,7',9'-*tetrakis*-lycopene *cis-trans*-isomerase, ZDS : ζ-carotene desaturase, β-LYC : lycopene beta-cyclase, ε-LYC : lycopene ε-cyclase, ALDH : aldehyde dehydrogenase, UGTs : UDP-glucuronosyltransferase, NCED : 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, VDE : violaxanthin *de*-epoxidase, CCD : carotenoid cleavage dioxygenase.

Η ζεαξανθίνη συντίθενται στους χλωροπλάστες των στύλων με την χρήση διφωσφορικού ισοπεντανύλιου το οποίο προέρχεται από το μονοπάτι της 4-φωσφορικής μεθυλοερυθρίτης [18]. Το πρώτο στάδιο στο μονοπάτι των καροτενοειδών και καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του φυτοενίου κατά το

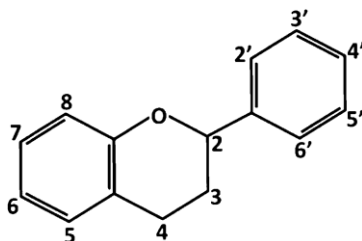
οποίο γίνεται μετατροπή δύο μορίων διφωσφορικού γερανυλογερανυλίου (C20) και σε φυτοένιο (C40). Ακολουθούν διαδοχικοί αποκορεσμοί και ισομερισμοί οι οποίοι οδηγούν στην δημιουργία του *all-trans* λυκοπένιου. Για να πραγματοποιηθεί ο αποκορεσμός και ο ισομερισμός του φυτοενίου σε λυκοπένιο απαιτεί την παρουσία τεσσάρων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα τα : 1) phytoene desaturase synthase, 2) ζ-carotene desaturase και 3) ZISO και 4) CRTISO. Ακολουθούν κυκλοποιήσεις του λυκοπένιου με ακόλουθο τον σχηματισμό δακτύλιων β- ή ε-ιονόνης και την δημιουργία β-καροτένιου και/ή α-καροτένιου τα οποία με αντιδράσεις υδροξυλίωσης και εποξειδίωσης μετατρέπονται σε ζεαξανθίνη [19] [20].

Η διάσπαση της ζεαξανθίνης (**Εικόνα**) σε γίνεται από το ένζυμο carotenoid cleavage dioxygenase 2 (CCD2) στους δεσμούς 7,8 και 7',8' και έχει ως αποτέλεσμα της παραγωγή διαλδεϋδης της κροκετίνης και δυο μόρια 3-υδροξυ-β-κυκλοκιτράλης. Στη συνέχεια με την δράση του ενζύμου αλδεϋδική αφυδρογονάση η διαλδεϋδη της κροκετίνης (ALDH) μετατρέπεται σε κροκετίνη. Το τελικό στάδιο είναι η δημιουργία κροκινών με την βοήθεια των ενζύμων UDPG-γλυκοζυλομεταφορασών, τα οποία προσθέτουν πλευρικές ομάδες στο μόριο της κροκετίνης [20].

Επίσης μέσω της δράσης του ενζύμου UDPG-γλυκοζυλοτρανσφεράση (UGT) η 3-OH-β-κυκλοκιτράλη μετατρέπεται σε πικροκροκίνη και έπειτα στην μονοτερπενική αλδεϋδη σαφρανάλη. Η σαφρανάλη πιθανολογείται ότι σχηματίζεται κατά την ξήρανση των στύλων και προέρχεται από την πικροκροκίνη με ενζυματική ή όξινη υδρόλυση. Ο μηχανισμός εικάζεται ότι συμβαίνει είτε λόγω αύξησης θερμοότητας, είτε λόγω της δράσης ενζύμων όπως οι γλυκοζιδάσες χωρίς να έχει ακόμη εξακριβωθεί [20].

Φλαβονοειδή

Συνιστούν μια από τις μεγαλύτερες χημικές κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών που απαντώνται στο φυτικό βασίλειο. Παρόλο που δεν σχετίζονται με την επιβίωση ενός φυτού, προσδίδουν στα φυτά έντονα χρώματα και εξυπηρετούν κυρίως στην προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς, υπεριώδη ακτινοβολία και φυτοφάγα ζώα. Αποτελούνται από ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6) (**Εικόνα 13**). Διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες : ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή.



Πίνακας 4 : Γλυκοζίτες καμφερόλης του γένους *Crocus*

Πηγή : N. Moratalla- López, C. Lorenzo, G. L. Alonso et al., 2016 [21]

Αριθμός	Συστατικό	MB
1	Kaempferol 3-O-β-D-glucoside	448
2	Kaempferol 7-O-β-glucoside	448
3	Kaempferol 3-O-β-D-(2''-O-α-L-rhamnosyl)-glucoside; Synonym: Kaempferol 3-neohesperidoside	594
4	Kaempferol 3-O-rutinoside	594
5	Kaempferol 3-O-β-D-(2''-O-β-D-glucosyl)-glucoside; Synonym: Kaempferol 3-O-β-sophoroside	610
6	Kaempferol 3-O-α-L-(2''-O-β-D-glucosyl)-rhamnoside	594
7	Kaempferol 7-O-gentiobioside	610
8	Kaempferol 7-O-β-sophoroside	610
9	Kaempferol 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside	594
10	Kaempferol 3,7-di-O-β-D-glucoside	610
11	Kaempferol 3, 4'-di-O-β-D-glucoside	610
12	Kaempferol 3-O-β-rutinoside-7-O-β-glucoside	756
13	Kaempferol 3-O-β-sophoroside-7-O-β-glucoside	772
14	Kaempferol 3-O-sophoroside-7-O-rhamnoside	756
15	Kaempferol 3-O-α-L-(2''-O-β-D-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-D-glucoside	756
16	Kaempferol 3-O-glucoside-7-O-β-sophoroside	772
17	Kaempferol 3,7,4'-tri-O-glucoside	772
18	Kaempferol 3-O-α-L-(2',3''-di-O-β-D-glucosyl)-rhamnoside	756
19	Kaempferol 3-O-β-D-(6-O-acetyl)-glucoside	490
20	Kaempferol 3-O-β-D-(2''-O-β-D-6'''-O acetylglucosyl)-glucoside	652
21	Kaempferol 3-O-β-D-(6-O-acetyl)-glucoside-7-β-D-glucoside	652

22	Kaempferol 3-O-β-D-(2''-O-β-D-6-acetylglucosyl)-glucoside-7-O-β-D-glucoside	814
23	Kaempferol 3-O-α-L-(2''-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-(6'''-O-acetyl)-glucoside	798
24	Kaempferol 3-O-α-L-(2''-O-β-D-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-D-(6'''-O-malonyl)-glucoside	842
25	Kaempferol 6-O-β-glucosyl-8-C-glucoside	626
26	Kaempferol 3,6-di-O-β-glucosyl-8-C-glucoside	788

Βιολογικές δράσεις

Το σαφράν θεωρείται «ελιξίριο μακροζωίας». Χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική ως αντικαρκινικό, ως αντιτοξικό, ως αντιπυρετικό, ως αντιφλεγμονώδες, κατά της αθηροσκλήρωσης, ως αντιδιαβητικό, κατά της αντοχής στην ινσουλίνη, κατά της υπότασης, κατά της υπολιπιδαιμίας, κατά της υπογλυκαιμίας, ως αντικαταθλιπτικό, ως αφροδισιακό, ως βελτιωτικό της διάθεσης και της εγκεφαλικής λειτουργίας [22].

1. Αντιοξειδωτική δράση, νευροπροστασία

- Σε μελέτη του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας Πατρών, μελετήθηκε η ενισχυτική δράση του σαφράν μέσω αντιοξειδωτικής δράσης στην μνήμη ενήλικων ποντικών, έπειτα από επταήμερη διαπεριτοναϊκή χορήγηση σαφράν. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική βελτίωση των μαθησιακών τους ικανοτήτων και της μνήμης (passive avoidance test), ελαττωμένα οξειδωμένα λιπιδικά προϊόντα σε συνδυασμό

με αυξημένη εγκεφαλική αντιοξειδωτική δράση και τέλος μειωμένη δράση της κασπάσης-3 σε εγκεφαλικό ομογενοποίημα (εκτός της παρεγκεφαλίδας). Επίσης, βρέθηκε ότι το σαφράν (1–250 $\mu\text{g/mL}$), και η κροκετίνη (1–125 μM) ήταν ικανά να αυξήσουν την κυτταρική βιωσιμότητα (MTT assay), να καταστείλουν την παραγωγή ROS (DCF assay) και να ελαττώσουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε H_2O_2 -επαγόμενη τοξικότητα SH-SY5Y κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος [23].

- Χορήγηση εκχυλίσματος *C. sativus* (100mg/kg) για 7 μέρες πριν την πρόκληση εγκεφαλικής ισχαιμίας μέσω έμφραξης της εγκεφαλικής αρτηρίας μείωσε σημαντικά την δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης, και των K-ATPασών της καταλάσης και του νατρίου, καθώς και τα επίπεδα του γλουταμινικού και ασπαρτικού οξέος σε ποντίκια [24].

- Χορήγηση εκχυλίσματος σαφράν (5 και 25 mg/ml) και κροκίνης (10 και 50 μM) ήταν ικανή να μειώσει την νευροτοξική δράση της γλυκόζης σε PC12 κύτταρα. Η βιωσιμότητα των PC12 κυττάρων μειώθηκε όταν χορηγήθηκε σε αυτά γλυκόζη (13.5 και 27mg/ml). Η επώαση όμως με εκχύλισμα σαφράν και κροκίνη πριν τη χορήγηση της γλυκόζης ελάττωσε την δράση της γλυκόζης μειώνοντας τον κυτταρικό θάνατο και αυξάνοντας την βιωσιμότητα των κυττάρων [25].

- Σε μελέτη του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών, διερευνήθηκε η νευροπροστατευτική δράση του σαφράν μετά από τοξικότητα προκαλούμενη από αργίλιο στους επίμυες. Η χορήγηση εκχυλίσματος σαφράν (60mg/kg, 6 μέρες), ανέστειλε την δραστηριότητα της μονοαμινοξειδάσης (MAO-A, MAO-B) και τα επίπεδα των υπεροξειδωμένων λιπιδίων σε ολόκληρο τον εγκέφαλο και την παρεγκεφαλίδα. Αποδείχτηκε επίσης ότι η κροκετίνη διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [26].

- Επίσης, η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και η νευρωνική βλάβη που προκλήθηκε σε βιοδείκτες από το diazinon (20mg/kg), ανεστάλθηκε από την χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος σαφράν (50, 100 και 200mg/kg) [27].

2. Αντικαρκινική δράση

- Η αντικαρκινική δράση του κρόκου αναφέρθηκε στην αρχή του 1990 και η έρευνά συνεχίζεται έως και σήμερα. Κυρίως χάρη στην αντιοξειδωτική ουσία κροκετίνη η οποία αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους αρουραίους, η κροκετίνη είχε θεραπευτική δράση τόσο έναντι κυττάρων του γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS), αλλά και καρκινικών κυττάρων του γαστρικού επιθηλίου εξαιτίας της έκθεσής τους σε 1-μεθυλο-3-νιτρο-1-νιτροζογουανιδίνης (MNNG). Η χορήγηση κροκετίνης προκάλεσε αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Αυτό επετεύχθει με την ενεργοποίηση της απόπτωσης τους μέσω ρύθμισης της έκφρασης των παραγόντων της απόπτωσης. Πιο ειδικά καταστολή της έκφρασης του παράγοντα Bcl-2 και αύξηση της έκφρασης του Bax. Αυτή η δράση της κροκετίνης είχε δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη σχέση [28].
- Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι σε πλακώδη κύτταρα καρκινώματος του οισοφάγου (KYSE-150) μετά από επώαση με κροκετίνη για 48 ώρες, παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Και πάλι παρατηρήθηκε μια δοσο-εξαρτώμενη σχέση μεταξύ της αναστολής και της αυξημένης έκφρασης του παράγοντα απόπτωσης BAX και της Κασπάσης 3 [29].
- Μια επιπλέον μελέτη έδειξε για ακόμη μια φορά ότι η χορήγηση κροκετίνης σε διάφορους καρκινικούς τύπους κυττάρων (HeLa καρκινώματος επιθηλίου του

τραχήλου της μήτρας, A549 του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, VA13 από SV-40 τροποποιημένους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα), ανέστειλε την σύνθεση πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA με δόσο-εξαρτώμενη σχέση δράσης [30].

- Επίσης, μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών απέδειξε ότι ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7, NDA-MB-231) αναστάλλει σημαντικά από το εκχύλισμα του σαφράν και τα συστατικά του, *trans*-κροκίνη 4, κροκετίνη και σαφρανάλη. Η αναστολή των καρκινικών κυττάρων έχει δόσο-εξαρτώμενη σχέση μετά την επώαση του με διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων στύλων του γένους *Crocus*. Αυτό βεβαιώθηκε μέσω της μεθόδου MTT. Μάλιστα η κροκετίνη έδειξε ισχυρότερη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 συγκριτικά με την *trans*-κροκίνη 4, κάτι το οποίο πιθανολογείται ότι οφείλεται σε διαφορετικό μηχανισμό οποίος είναι απών από την κυτταρική σειρά MDA-MB-231 [31].

- Σε μεταγενέστερη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, αποδείχτηκε ότι η κροκετίνη αναστέλλει τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων MDA-MB-231, μέσω ρύθμισης της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο[31].

3. Δράση κατά του Parkinson- Alzheimer

- Μελέτη του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών έδειξε ότι ο σχηματισμός τοξικών αμυλοειδών δομών έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως το Alzheimer και η νόσος του Parkinson. Η κροκίνη και η σαφρανάλη παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στην ινιδίωση

(fibrillation) της απο-A-λακταλβουμίνης (α -alpha-LA) σε αμυλοειδογενείς συνθήκες.

Η κροκετίνη επίσης βρέθηκε ότι έχει πιο ισχυρή δράση από την σαφρανάλη. [33]

- Σε ποντικούς τους οποίους είχε προκληθεί νόσος του Parkinson εξαιτίας της 6-υδροξυντοπαμίνη (6-OHDA, 10 μ g στο ραβδωτό σώμα), παρατηρήθηκε νευροπροστατευτική δράση μετά από επταήμερη χορήγηση κροκετίνης (25, 50 και 75 μ g/kg περιτόναιο). Ο πιθανός μηχανισμός δράσης προτάθηκε η ελάττωση της χρήσης ντοπαμίνης από τους ιστούς [34].

- Σε μια άλλη μελέτη εξετάστηκε η προστατευτική δράση του σαφράν σε ντοπαμινεργικά κύτταρα στην φαιά ουσία (substantia nigra pars compacta SNc) και σε κύτταρα του αμφιβληστροειδή χιτώνα μυών, με MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) προκαλούμενη νόσο του Parkinson. Μετά από εξαήμερη χορήγηση σαφράν (0.01%w/v) διαλυμένο στο νερό εξετάστηκε η υδροοξυλάση της τυροσίνης (TH) των εγκεφάλων τους, με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Βρέθηκε ότι και στα κύτταρα της φαιάς ουσίας αλλά και στα κύτταρα του αμφιβληστροειδή χιτώνα, τα επίπεδα της TH ήταν 30-35% μειωμένα. Από την μελέτη αυτή συμπεράστηκε ότι η χορήγηση εκχυλίσματος σαφράν πριν την χορήγηση του MPTP προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες [35].

4. Αντικαταθλιπτική δράση και δράση κατά της σχιζοφρένειας

- Το 2003 μελετήθηκε από τον Hosseinzadeh η αντικαταθλιπτική δράση του σαφράν στους επίμυες. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η χορήγηση κροκίνης (50-60mg/kg) ήταν ικανή να ελαττώσει τον χρόνο ακινησίας αλλά και να αυξήσει τον χρόνο αναρρίχησης στα τεστ κολύμβησης που υπεβλήθησαν οι επίμυες [36].

- Βρέθηκε ότι επακόλουθο της ταυτόχρονης χορήγησης εκχυλίσματος σαφράν *C. sativus* (40 ή 80 mg) μαζί με Fluoxetine (αντικαταθλιπτικό, Prozac 30 mg/ ημέρα) για έξι εβδομάδες, ήταν αποτελεσματικό στην θεραπεία ήπιας κατάθλιψης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όταν η δόση του Fluoxetine παρέμεινε σταθερή, με παράλληλη αύξηση της δόσης του σαφράν, η θεραπεία είχε καλύτερα αποτελέσματα. Υπάρχει δηλαδή δοσοεξαρτώμενη σχέση δράσης για το σαφράν [37].
- Σε παρόμοια μελέτη βρέθηκε ότι η χορήγηση κάψουλων σαφράν (30 mg/ ημέρα) για έξι ημέρες ήταν εξίσου αποτελεσματική με την χορήγηση Fluoxetine (Prozac, 40 mg/ημέρα) στην θεραπεία των συμπτωμάτων της κατάθλιψης σε ασθενείς με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (MDD) [38].

5. Προστασία έναντι της καταρρακτογένεσης

- Μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών έδειξε ότι το εκχύλισμα του σαφράν όταν χορηγείται στους επίμυες, προσφέρει προστασία ενάντια στον οφθαλμικό καταρράκτη προκαλούμενο από σελήνιο. Ως πιθανός μηχανισμός προτάθηκε ότι επιτελείται ενίσχυση της οξειδωτικής άμυνας, με ταυτόχρονη μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης αλλά και προστασίας σουλφυδρυλομάδων και αναστολή της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών των οφθαλμικών φακών [39].
- Σε μεταγενέστερη μελέτη του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών, απεδείχθει ότι η κροκετίνη έχει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου Καλπαΐνη 1 το οποίο εμπλέκεται στη οφθαλμική καταρρακτογένεση. Αυτό επιτυγχάνεται με την θετική επίδραση της κροκετίνης εμποδίζοντας τα σημαντικότερα βήματα της καταρρακτογένεσης. Συγκεκριμένα, την οξειδωση των

πρωτεΐνών από το σελήνιο, την ενεργοποίηση των καλπαϊνών από το ασβέστιο και τη δραστικότητα του μορίου της Καλπαΐνης 1 [40].

- Σε μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών από την Φ. Βούκλιζα (2016), διερευνήθηκε η ανασταλτική δράση της κροκεΐνης στη δράση της καλπαΐνης 2 in vitro με φθορισμομετρικό προσδιορισμό καθώς η απορρύθμιση του πρωτεολυτικού συστήματος των πρωτεασών καλπαΐνη1 και 2 οδηγεί στην εμφάνιση οφθαλμικού καταρράκτη. Αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η κροκεΐνη είναι ικανή να αναστείλει τη δράση της καλπαΐνης 2 μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την κυστεΐνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου, μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικού δεσμού [41].

Crocus nivalis

Το φυτό *Crocus nivalis* Bory & Chaub είναι είδος το οποίο συναντάται στην Ελλάδα, την Αλβανία, τη Βουλγαρία και τη Γιουγκοσλαβία. Ανήκει στην Ομάδα: *Nubiscarpus* και στην Σειρά: *Reticulati* (**Πίνακας 5**). Πρόκειται για ένα μικρό φυτό το οποίο φύεται σε υψόμετρο 400-2800 μέτρα, συνήθως σε περιοχές πετρώδεις ή πετρώδεις θαμνότοπους ή ξέφωτα δασών και σε κορυφές βουνών.

Οικογένεια	<i>Iridaceae</i>
Υποοικογένεια	<i>Crocoideae</i>
Ομοιογένεια	<i>Croceae</i>
Γένος	<i>Crocus</i>
Τομέας	<i>C. sect. Nudiscarpus</i>
Σειρά	<i>C. ser. Reticulati</i>
Είδος	<i>Crocus nivalis</i>

Πίνακας 5 : Συστηματική κατάταξη του φυτού *C. nivalis* [42]

Βασικό χαρακτηριστικό του το οποίο το κάνει εύκολα αναγνωρίσιμο, είναι τα μοβ άνθη με κίτρινη την βάση τους με σύνανθα φύλλα τα οποία έχουν μια μεσαία λευκή γραμμή (**Εικόνα 14**). Ο επίσης κίτρινος-πορτοκαλί στύλος καταλήγει σε τρεις διακλαδώσεις. Το φυτό αναπτύσσεται τον χειμώνα (Ιανουάριος-Φεβρουάριος) και παράγονται συνήθως 1-3 άνθη ανά άτομο, ενώ η άνθιση πραγματοποιείται τους

πρώτους ανοιξιάτικους μήνες. Το *C. nivalis* αναπαράγεται και αγενώς με βολβοκόνδυλους. [43] **(Εικόνα 15)**



Εικόνα 14 : το φυτό *C. nivalis* σε άνθιση



Εικόνα 15 : αποξηραμένο *C. nivalis* μαζί με τον υπόγειο βολβό του

Σε παλιότερες αναφορές μπορεί κάποιος να συναντήσει το *Crocus nivalis* και ως *Crocus atticus* subsp. *nivalis* (Bory & Chaub.) Rukšāns, *Crocus sieberi* subsp. *nivalis* (Bory & Chaub.) B. Mathew, *Crocus atticus* (Boiss. & Orph.) Orph, *Crocus sieberi* subsp. *atticus* (Boiss. & Orph.) B. Mathew, *atticus* subsp. *sublimis* (Herb.) Rukšāns, *Crocus sieberi* subsp. *sublimis* (Herb.) B. Mathew. **(Πίνακας 1)**. Πιο ειδικά στην Ελλάδα (Πελοπόννησος, Νότια Πίνδος, Βόρεια Πίνδος, Βόρεια Ανατολική Ελλάδα, Βόρεια Κεντρική Ελλάδα, Στερεά Ελλάδα, Νησιά Ιονίου, Κυκλάδες, Ανατολικό Αιγαίο, Δυτικό Αιγαίο) θα το συναντήσει κάποιος στις εξής περιοχές : Δίρφη , Άνδρος, Βέρμιο , Εύβοια, Άθως, Γεράνεια , Ερύμανθος , Ζήρεια

(Κυλλήνη), Κατάρα, Ταΰγετος, Κιθαιρών, Κεφαλονιά, Παναχαϊκό Όρος, Παρνασσός, Πάρνηθα, Πατέρας, Πεντέλη, Περιστέρι, Χελμός [44].

Σε προηγούμενη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Πατρών από την Χ. Λυμπεροπούλου [47], μελετήθηκαν οι διαφορές του *C. sativus* και *C. nivalis* ως προς την φυτοχημική σύσταση των στύλων, την περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά, την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, και την αντιοξειδωτική τους δράση. Βρέθηκε ότι το χρωματογραφικό προφίλ του μεθανολικού εκχυλίσματος τους διέφερε σημαντικά. Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει παντελής απουσία πτητικών ουσιών στους στύλους του *C. nivalis* σε σχέση με τον *C. sativus*. Ως προς την περιεκτικότητα των στύλων σε φλαβονοειδή, ο *C. nivalis* είναι πλουσιότερος από τον *C. sativus*. Τέλος, ο *C. nivalis* ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, προκάλεσε λιγότερο αποτελεσματική αναγωγή του σιδηροκατιόντος (μέθοδος FRAP) από τον *C. sativus*, είναι όμως πιο αποτελεσματικός στην αναγωγή της ρίζας του DPPH.

Κεφάλαιο Δεύτερο

Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε λεπτομερώς η φυτοχημική σύσταση των στύλων του *C. nivalis* προερχόμενου από την ευρύτερη γεωγραφική περιοχή του Παναχαϊκού όρους και έπειτα αυτή συγκρίθηκε με την φυτοχημική σύσταση τριών δειγμάτων *C. sativus* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκεκριμένα, το ένα δείγμα προερχόμενο από την περιοχή της Κοζάνης στην Ελλάδα και δυο από τις περιοχές Birgand και Quaenat του Ιράν αντίστοιχα.

1. Ανάλυση αιθέριων ελαίων

Ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο παραλαβής και ανάλυσης του αιθέριου ελαίου για όλα τα δείγματα, μελετήθηκε η σύσταση του αιθέριου ελαίου των στύλων του *Crocus nivalis* και των στύλων του *Crocus sativus* (από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές Ελλάδα – Ιράν). Η μελέτη έγινε με την βοήθεια της συζευγμένης τεχνικής της Αερίου Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (GC-MS).

2. Ανάλυση των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Για όλα τα δείγματα *Crocus nivalis* (Ελλάδα) και *Crocus sativus* (Ελλάδα και Ιράν) ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο παραλαβής και ανάλυσης του μεθανολικού εκχυλίσματος των στύλων. Η ανάλυση του χρωματογραφικού τους προφίλ αλλά και της απομόνωσης συστατικών βασίστηκε στην χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η περαιτέρω ανάλυση-αναγνώριση-ταυτοποίηση των συστατικών έγινε με την βοήθεια της τεχνικής της Φασματομετρίας Μάζας (MS, MS²).

Κεφάλαιο Τρίτο

Πειραματικό μέρος

3.1 Το φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό των στύλων του *Crocus sativus* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα προήλθε από δυο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές :

- *Crocus sativus* από την περιοχή της Κοζάνης στην Βορειοδυτική Ελλάδα.

Χρησιμοποιήθηκε αποξηραμένο εκχύλισμα εμπορικά διαθέσιμων στύλων (έτος κυκλοφορίας 2017, **(Εικόνα 15)**). Πρόκειται για αποξηραμένους στύλους από το εμπόριο οι οποίοι διατίθενται από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης **(Εικόνα 16)**. Η κάθε συσκευασία περιέχει 1 γραμμάριο ξηρών στύλων. Η χρονολογία συγκομιδής τους ήταν το 2014 και της συσκευασίας τους το 2015. Η διατήρηση και φύλαξη του υλικού γίνεται στην κατάψυξη (-25 βαθμούς κελσίου)



Εικόνα 15



Εικόνα 16

Εικόνα 15 : Εμπορική συσκευασία του *Crocus sativus* που διατίθεται από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης

Εικόνα 16 : Η περιοχή της Κοζάνης στην Κεντρική Ελλάδα

- *Crocus sativus* από τις περιοχές Birjand και Quaenat του ανατολικού Ιράν.

Χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένοι στύλοι (**Εικόνες 17, 18**) του φυτού τους έτους 2017 από το Ιράν (**Εικόνα 19**) οι οποίοι παραχωρήθηκαν από τον Κο Μάκη Μουρτζή. Η διατήρηση και φύλαξη του υλικού γίνεται στην κατάψυξη (-25 βαθμούς κελσίου)



Εικόνα 17 : Αποξηραμένοι στύλοι
C. sativus από την περιοχή Birjand



Εικόνα 18 : Αποξηραμένοι στύλοι
C. sativus από την περιοχή Quaenat



Εικόνα 19 : Η περιοχή του Birjand στο κεντρικό-ανατολικό Ιράν

- *Crocus nivalis* από την ευρύτερη περιοχή του Παναχαϊκού όρους (Πελοπόννησος)

Χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένοι στύλοι του φυτού *Crocus nivalis* (**Εικόνα 20**), οι οποίοι συλλέχθηκαν από την περιοχή του Παναχαϊκού όρους (**Εικόνα 21**) στην Πελοπόννησο. Η συλλογή και ταυτοποίηση των στύλων έγινε τον Μάρτιο του 2015 από την Δρ. Κωνσταντίνα Ζέλιου και τον Καθηγητή Γρηγόριο Ιατρού του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών. Η διατήρηση και φύλαξη του υλικού γίνεται στην κατάψυξη (-25 βαθμούς κελσίου)



Εικόνα 20 : Αποξηραμένοι στύλοι
Crocus nivalis



Εικόνα 21 : Η περιοχή του Παναχαϊκού
όρους στην Πελοπόννησο

3.2 Χημικά αντιδραστήρια

Υγροί διαλύτες

Μεθανόλη (CH_3OH) : HPLC gradient , καθαρότητα $\geq 99,9\%$, εταιρεία Fisher Chemical

Μεθανόλη (CH_3OH) : analytical grade, εταιρία Fisher Chemical

Απιονισμένο νερό (ddH_2O) : HPLC gradient, καθαρότητα $\geq 99,9\%$, Fisher Chemical

Ακετονιτρίλιο (AcCN) : HPLC gradient, καθαρότητα $\geq 99,9\%$, Fisher Chemical

Οξικό οξύ (CH_3COOH) : Acetic acid glacial $\geq 99,9\%$, analytical grade , ChemLab

Διαιθυλαιθέρας ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$) : analytical grade καθαρότητα $\geq 99,8\%$, ChemLab

Στερεά αντιδραστήρια

Χλωριούχο νάτριο (NaCl) : analytical reagent

Θειικό Νάτριο (Na_2SO_4) : analytical reagent

3.3 Όργανα και σκεύη

Ανάλυση των αιθέριων ελαίων

Η ανάλυση των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε με σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας Μάζας (Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC-MS) στο Κέντρο Ενόργανης Ανάλυσης του Πανεπιστημίου Πατρών. Το σύστημα αποτελείται από τον Αέριο Χρωματογράφο 6890N GC ο οποίος φέρει Ήλιο (He) υψηλής καθαρότητας και τριχοειδή στήλη HP-5MS capillary column (30m x 0.25mm, 0.25μm). Το συζευγμένο φασματόμετρο είναι το Φασματόμετρο Μάζας 5975B inert MSD της εταιρίας Agilent Technologies (U.S.A.). Το παρόν σύστημα χρησιμοποιεί το λογισμικό Agilent MSDChem.

Η ανάλυση και επεξεργασία των φασμάτων GC-MS πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα AMDIS. Η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε με την χρήση της φασματικής βιβλιοθήκης Nist MS Search v2.0 και την σχετική βιβλιογραφία [14][15]

Ανάλυση των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων του *C. sativus* και *C. nivalis* χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα :

A. όργανο HPLC Ημιπαρασκευαστικής κλίμακας Mod.10 AKTA, Amersham Biosciences, Piscataway (U.S.A.) του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Φέρει αντλία ώσης υδατικών διαλυμάτων P-900, βαλβίδα

έγχυσης INV 907 και ανιχνευτή απορρόφησης PV 908. Για την εισαγωγή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε βρόχος 100μL και υάλινη σύριγγα 100μL. Το λογισμικό του οργάνου είναι το Unicorn v. 4.12. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής χρωματογραφικές στήλες :1. Luna 5u C18 (2) 100A (250x4,6mm) της εταιρείας Phenomenex (U.S.A.). 2. Luna 5u C18 (2) 100A (250x10mm) της εταιρείας Phenomenex (U.S.A.).

B. Φασματόμετρο amaZon SL Ion Trap ESI-MS της εταιρείας Bruker του Κέντρου Ενόργανης Ανάλυσης του Πανεπιστημίου Πατρών με λογισμικό Bruker Compass DataAnalysis 4.2. Η ανάλυση και επεξεργασία των φασμάτων MS και MSMS, πραγματοποιήθηκαν με τα προγράμματα Compass DataAnalysis 4.2 της εταιρείας Bruker και ChemDraw Ultra V12 της εταιρείας PerkinElmer Inc.

Άλλα όργανα και Αναλώσιμα

- Λουτρό υπερήχων B-2200 της εταιρείας Branson (U.S.A.)
- Συσκευή συμπύκνωσης υπό κενό : Rotavapor R-200 με θερμαντικό λουτρό B-490, BUCHI (USA)
- Συσκευή λυοφιλοποίησης (freeze-dry system): Freezone 6, Labconco (USA)
- Vacuum concentrator: αποτελούμενο από το centrivap concentrator και το centrivap cold trap, Labconco (USA)
- Φυγόκεντρος: J.P. Selecta (Spain)
- Αναλυτικοί ζυγοί ακριβείας: Kern (Germany)
- Φίλτρα διήθησης διαλυτών διαφόρων διαμέτρου πόρων

3.4 Φυτοχημική ανάλυση στύλων

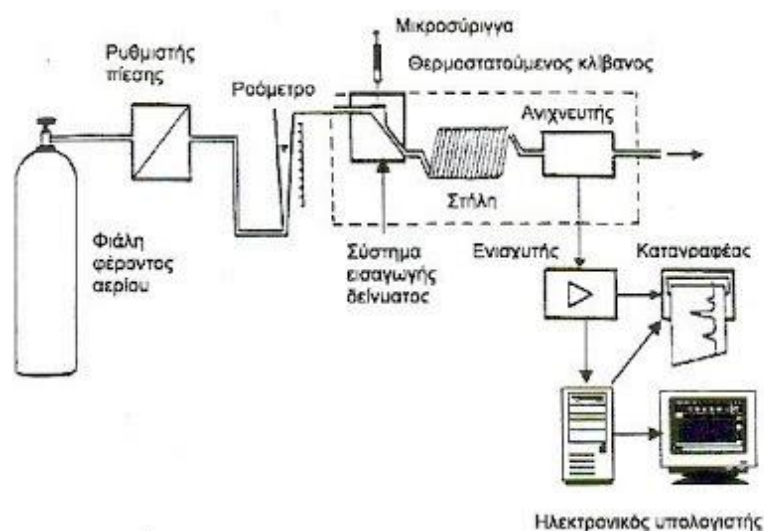
3.4.1 Ανάλυση αιθέριων ελαίων *C. sativus* και *C. nivalis*

3.4.1.A Αρχή λειτουργίας : Αέριος Χρωματογραφία–Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC-MS)

Πρόκειται για μια ιδιαίτερα αποδοτική αναλυτική διαχωριστική τεχνική η οποία συνδυάζει τα οφέλη της Αερίου Χρωματογραφίας σε συνδυασμό με αυτά της Φασματομετρίας Μάζας.

Η Αέριος Χρωματογραφία αναπτύχθηκε τα τελευταία σαράντα χρόνια και έχει μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής στην ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, και πετρελαϊκά προϊόντα βιομηχανίες αρτοποιίας κτλ.[48]. Χαρακτηρίζεται ως απλή σε σχέση με άλλες σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές (**Εικόνα 22**) και η αρχή λειτουργίας ενός αερίου χρωματογράφου βασίζεται στην πτητικότητα ενός δείγματος μέσα σε ένα θερμαινόμενο στόμιο εισαγωγής (injector), τον ακόλουθο διαχωρισμό των περιεχόμενων συστατικών του δείγματος μέσα σε μια ειδική στήλη με βάση τον χρόνο διέλευσης και τέλος την ανίχνευση τους από έναν ανιχνευτή. Ήσσανος σημασίας για την λειτουργία του αερίου χρωματογράφου είναι το φέρον αέριο το οποίο είναι συνήθως υδρογόνο, ήλιο, άζωτο ή αργό. Το φέρον αέριο το οποίο πρέπει να βρίσκεται σε υπερκάθαρη μορφή, επιτελεί την λειτουργία της μεταφοράς του δείγματος διαμέσου των μερών του οργάνου και αποτελεί μαζί με το δείγμα την κινητή φάση. Η στήλη αποτελεί την στατική φάση και είναι είτε πληρωμένη (πεπληρωμένη στήλη-packed), είτε επικαλυμμένη εσωτερικά από ειδικό υλικό (τριχοειδής στήλη-capillary). Το υλικό πλήρωσης τους ποικίλει και μπορεί να είναι πολυ-(διμεθυλο)-σιλοξάνιο, πολυ-(φαινυλομεθυλο)-σιλοξάνιο ή και πολυ-

(δικυανοαλλυλοδιμεθυλο)-σιλοξάνιο. Το μήκος των πληρωμένων στηλών είναι από 1 έως 2 μέτρα, ενώ των τριχοειδών στηλών εκατοντάδων μέτρων. Συνήθως έχουν μορφή σπειράματος (10-100m) για μεγαλύτερη απόδοση και για να καταλαμβάνουν λιγότερο χώρο. Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή και τότε ονομάζεται Gas-Solid Chromatography GSC ή μπορεί να είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού και τότε ονομάζεται Gas-Liquid Chromatography GLC. Το δείγμα για να εισαχθεί στον αναλυτή πρέπει πρώτα να διαλυθεί σε έναν πτητικό διαλύτη (π.χ. εξάνιο, διαιθυλαιθέρας) και έπειτα με την βοήθεια μιας μικροσύριγγας (συνήθως 1μL) εγχύεται διαμέσου ενός διαφράγματος ή μιας ελαστικής πλακέτας στην ειδική οπή έγχυσης, η οποία ονομάζεται και βαλβίδα (septum) εισαγωγής του δείγματος.



Εικόνα 22 : Σχηματική απεικόνιση ενός μηχανήματος Αέριας Χρωματογραφίας [48].

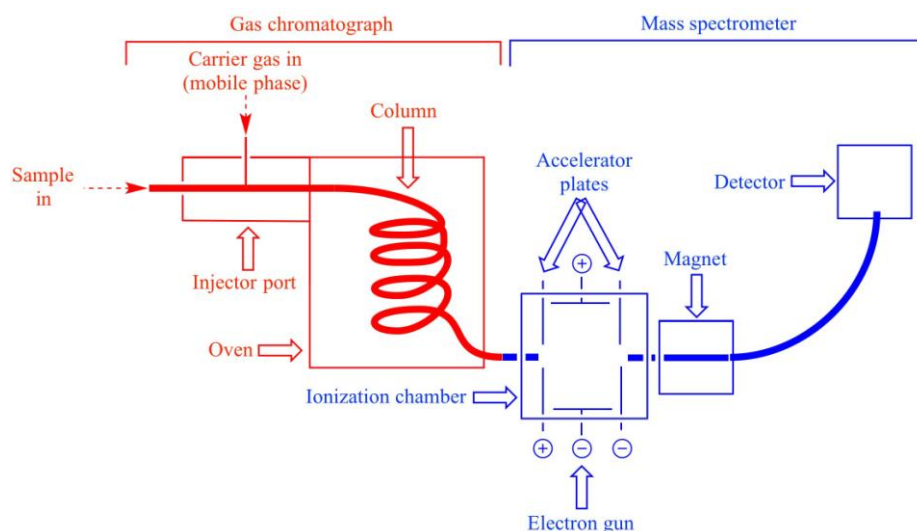
Αφού επιτευχθεί αυτό, τότε το φέρον αέριο από την φιάλη υψηλής πίεσης στην οποία διατηρείται, διαμέσου ρυθμιστών πίεσης και ροής, διοχετεύεται προς την στήλη παρασύροντας μαζί και το δείγμα. Καθώς τα συστατικά διέρχονται από την

στήλη διαχωρίζονται και εξερχόμενα από την στήλη ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή του συστήματος με την βοήθεια ενός ενισχυτή. Τέλος, καταγράφονται από τον υπολογιστή με την μορφή χρωματογραφήματος όπου η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε συστατικό ή συστατικά. Ο χρόνος από την ένεση του δείγματος έως την καταγραφή από τον ανιχνευτή ονομάζεται χρόνος έκλουσης (Retention time, t_R) και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των συστατικών μαζί με το εμβαδό της κορυφής.

Από τους σημαντικότερους παράγοντες διαχωρισμού των συστατικών αποτελεί η θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται εντός θαλάμου-κλίβανου οποίος έχει την δυνατότητα να μεταβάλλει με μεγάλη ακρίβεια την θερμοκρασία της στήλης βάση του επιθυμητού θερμοκρασιακού προγράμματος που έχει επιλεγθεί από τον ερευνητή. Το πρόγραμμα μπορεί να είναι είτε ισοκρατικό (σταθερή θερμοκρασία για όλη την διάρκεια του πειράματος) είτε μεταβλητό-διαβαθμιζόμενο (η θερμοκρασία μεταβάλλεται, δεν μένει σταθερή). Το σύνηθες εύρος θερμοκρασιών είναι 100-400 βαθμούς Κελσίου. Μια άλλη επίσης σημαντική παράμετρος, είναι ότι τα δείγματα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από οποιαδήποτε υγρασία καθώς αυτή είναι ικανή να προκαλέσει οξείδωση της στατικής φάσης και να καταστραφεί έτσι η στήλη.

Η αέριος χρωματογραφία χαρακτηρίζεται από υψηλή διαχωριστική και διακριτική ικανότητα των συστατικών και είναι της τάξης μερικών nanogram (10^{-9} g) ή και picogram (10^{-12} g) σε ορισμένες περιπτώσεις.

Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αναλυτική ικανότητα του αέριου χρωματογράφου, αυτός συνδέεται κατάλληλα με ένα φασματόμετρο μάζας. Τα δυο όργανα συνδέονται σε σειρά με το φασματόμετρο μάζας να βρίσκεται μετά την στήλη (Εικόνα 23).



Εικόνα 23 : Σχηματική απεικόνιση συστήματος αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με φασματόμετρο μάζας (GC-MS) [49].

Με αυτή την διάταξη αφού τα συστατικά διαχωριστούν από την στήλη, στην συνέχεια διέρχονται από το φασματόμετρο. Εκεί θραυσματοποιούνται και στην συνέχεια διέρχονται από ισχυρό μαγνητικό πεδίο προκειμένου να διαχωριστούν με βάση το φορτίο τους. Τελικώς, καταγράφονται από τον ανιχνευτή του φασματόμετρου. Το χρωματογράφημα που προκύπτει δείχνει την θραυσμάτωση κάθε συστατικού, δίνει επίσης και τον λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z) των θραυσμάτων, αλλά και το είδος του ιονισμού κάθε θραύσματος (θετικός, αρνητικός). Ένας τυπικός αναλυτής μαζών αποτελείται από τα εξής μέρη :

1. Ο θάλαμος ιοντισμού (ionization chamber): Με τη βοήθεια της κατάλληλης πηγής ιοντισμού και υπό την επίδραση υψηλού κενού, η ένωση θραυσματοποιείται και μετατρέπεται σε ιόντα. Το υψηλό κενό είναι απαραίτητο ώστε να δημιουργούνται ατμοί των ενώσεων του δείγματος σε χαμηλές θερμοκρασίες χωρίς όμως να προκαλείται διάσπαση-αλλοίωση τους.

Οι δυο κατηγορίες πηγών ιοντισμού είναι οι :

α) Πηγές ιοντισμού Αέριας Φάσης : χρησιμοποιούνται κυρίως σε θερμικά σταθερές ενώσεις. Σε αυτές το δείγμα αρχικώς εξαερώνεται και έπειτα ιονίζεται. Υπάρχουν οι πηγές ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) και οι πηγές χημικού ιοντισμού (CI).

β) Πηγές ιοντισμού εκρόφησης : χρησιμοποιούνται κυρίως σε μη πτητικές ή θερμικώς ασταθείς ενώσεις καθώς δεν απαιτούν εξάτμιση των μορίων του αναλύτη. Το δείγμα είναι σε στερεή ή υγρή μορφή και μετατρέπεται απευθείας σε ιόντα σε αέρια κατάσταση. Υπάρχουν οι πηγές ιοντισμού πεδίου (FI), οι πηγές ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), οι πηγές ιοντισμού εκρόφησης με την βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI), οι πηγές βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB) και οι πηγές ιοντισμού με θερμοψεκασμό (TSI).

Οι πηγές ιοντισμού διαχωρίζονται επίσης ως προς την παραγωγή θραυσμάτων, σε μαλακές και σκληρές. Στις μαλακές, προκαλείται περιορισμένη θραύση στα μόρια του δείγματος, ενώ στις σκληρές , μεταδίδεται στα μόρια του δείγματος αρκετή ενέργεια ώστε να παραμείνουν σε έντονα διεγερμένη κατάσταση.

2. Ο αναλυτής μαζών : είναι σωλήνας με σχήμα τόξου ο οποίος έχει ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο έντασης 3000-4000 gauss και με διεύθυνση κάθετη ως προς τις δυναμικές γραμμές του πεδίου. Στον αναλυτή μαζών γίνεται ο διαχωρισμός

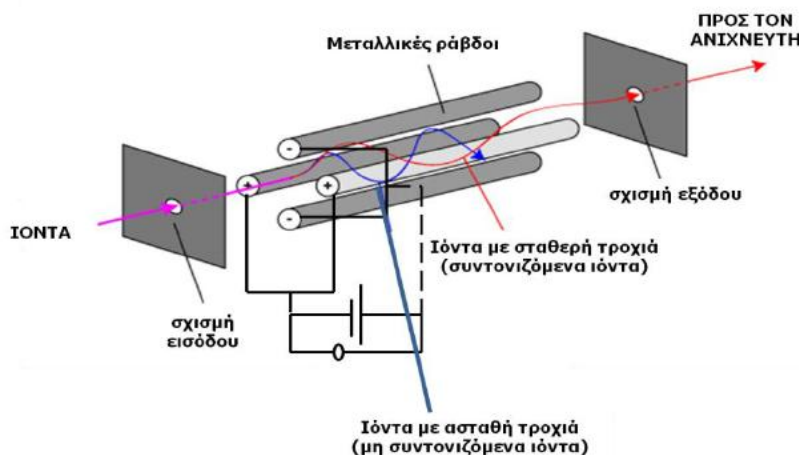
των ιόντων με βάση το λόγο m/z . Υπάρχουν οι συνεχείς αναλυτές μαζών :

α) τετραπολικός αναλυτής ή Q, β) αναλυτής μαγνητικού τομέα και οι παλμικοί αναλυτές μαζών : α) τετραπολική παγίδα ιόντων ή IT, β) αναλυτής μάζας χρόνου πτήσης ή TOF, γ) αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier ή FTICR.

Ο τετραπολικός αναλυτής ή τετράπολο αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τύπο αναλυτή και χαρακτηρίζεται από σχετικά μικρό μέγεθος, υψηλή ταχύτητα σάρωσης και μικρό κόστος λειτουργίας. Περιέχει φίλτρο μαζών το οποίο επιτρέπει σε συγκεκριμένο λόγο δυναμικών, μόνο στα ιόντα με συγκεκριμένο m/z , να φτάσουν στον ανιχνευτή. Όλες οι άλλες τιμές m/z φιλτράρονται εκτός ιοντικής δέσμης. Αποτελείται από τέσσερις μεταλλικές ράβδους (πόλοι) συμμετρικά τοποθετημένες και παράλληλες ως προς τη δέσμη των ιόντων (**Εικόνα 24**). Συνδέονται μεταξύ τους ηλεκτρικά και έχουν διαφοράς φάσης 180 μοιρών. Τα ιόντα αφού επιταχυνθούν σε δυναμικό 5-15V διέρχονται από την διάταξη και σαρώνονται οι τιμές m/z τους. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η υψηλή αξιοπιστία, η καταλληλότητα και για ποσοτική ανάλυση, οι μέτριες απαιτήσεις κενού, και η δυνατότητα για τριπλό τετράπολο (MS/MS). Στα αρνητικά, είναι η χαμηλή διακριτικότητα, $\sim 1\text{Da}$ (u), και το περιορισμένο εύρος m/z με μέγιστο τα 4000u σε σχέση με άλλους αναλυτές.

3. Ο ανιχνευτής (detector) : αποτελεί το τελικό μέρος οργάνου και επιτελεί την αναγνώριση και καταγραφή κάθε αλλαγής που προκαλείται από την διέλευση και θραυσματοποίηση του συστατικού που αναλύεται. Πιο ειδικά, καταγράφει κάθε ελάττωση ή αύξηση του φορτίου που παράγεται ύστερα από την διέλευση ή πρόσκρουση ενός ιόντος σε μια επιφάνεια. Οι συνηθέστερες τεχνικές ανίχνευσης είναι το Κύπελλο Faraday (Faraday cup), ο Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron

Multiplier, EM), ο Ανιχνευτής Daly (Daly detector) και η Πλάκα Μικροδιόδων (Microchannel plate).



Εικόνα 24 : σχηματική απεικόνιση τετραπολικού αναλυτή [50].

3.4.1.B Πειραματική πορεία απομόνωσης πτητικών ενώσεων

Για την παραλαβή και ανάλυση του αιθέριου ελαίου από τους στύλους του *C. sativus* και του *C. nivalis* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης με οργανικό διαλύτη και την χρήση υπερήχων (Ultrasonic Extraction, USE) που προτάθηκε από τους Kanakis et al., [51] . Συγκεκριμένα, σύμφωνα με αυτή την τεχνική το φυτικό υλικό τοποθετείται σε κατάλληλο διαλύτη ή συστήματος διαλυτών σε λουτρό υπερήχων. Ο σκοπός της μεθόδου αυτής είναι να εκχυλιστούν τα συστατικά των στύλων όσο το δυνατόν ταχύτερα χωρίς αυτά να καταστραφούν-αλλοιωθούν. Με την διάδοση των υπερήχων προκαλείται κίνηση των υγρών λόγω συμπίεσης και αρραίωσης κάτι που προκαλεί αύξηση της πίεσης στο διάλυμα και επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς. Επίσης με παράλληλη αύξηση της θερμοκρασίας του συστήματος επιταχύνονται τα φαινόμενα διάχυσης και

διαλυτοποίησης ώστε τα συστατικά να βρεθούν εκτός των φυτικών ιστών λόγω. Επειδή τα συστατικά των αιθέριων ελαίων χαρακτηρίζονται ως θερμοευαίσθητα η διατήρηση της θερμοκρασίας μέσα σε κάποια όρια κρίνεται επιτακτική. Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η χρήση μικρού όγκου διαλυτών. Προκειμένου λοιπόν να γίνει παραλαβή του αιθέριου ελαίου και των υδατοδιαλυτών συστατικών των στύλων των ειδών του γένους *Crocus* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης εκχύλισης το διφασικό σύστημα διαλυτών αποτελούμενο από διαιθυλαιθέρα : νερό σε αναλογία 1:1.

Η ακριβής πειραματική πορεία για τους στύλους *C. sativus* έχει ως εξής :

- εντός σφαιρικής φιάλης 100mL προσθέτουμε 200mg ολόκληρων στύλων και 10mL του συστήματος διαλυτών διαιθυλαιθέρα:νερό 1:1
- εφαρμόζουμε στην φιάλη κάθετο ψυκτήρα και το σύστημα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 10 min απουσία φωτός.
[Ο κάθετος ψυκτήρας διασφαλίζει ότι οι παραγόμενοι κατά την διαδικασία της εκχύλισης ατμοί, οι οποίοι περιέχουν τα πτητικά συστατικά του δείγματος θα υγροποιηθούν και θα επιστρέψουν στην σφαιρική φιάλη. Με αυτό τον τρόπο, δεν υπάρχουν απώλειες στη συλλογή του ολικού εκχυλίσματος και η απουσία φωτός διασφαλίζει ότι τα φωτοευαίσθητα συστατικά του φυτικού υλικού θα παραμείνουν αναλλοίωτα].
- Μετά το πέρας των 10min, το εκχύλισμα συλλέγεται και φυλάσσεται εντός κωνικής φιάλης απουσία φωτός και σε θερμοκρασία δωματίου. Στην σφαιρική φιάλη με το φυτικό υλικό προσθέτουμε 10 mL του συστήματος των διαλυτών και διαδικασία επαναλαμβάνεται όπως προηγουμένως. Συνολικά η περιγραφόμενη

διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιείται 5 φορές και σε όλη την διάρκεια της διατηρούνταν σταθερές οι συνθήκες περιβάλλοντος.

→ Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, το συνολικό εκχύλισμα (50 mL) τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη μαζί με 20 mL κεκορεσμένου διαλύματος NaCl. Έπειτα αναδεύουμε ήπια και συλλέγουμε την υδατική και την οργανική φάση σε διαφορετικά δοχεία.

[Η προσθήκη του κεκορεσμένου διαλύματος NaCl συμβάλλει στον καλύτερο διαχωρισμό της υδατικής φάσης από την οργανική καθώς ο διαιθυλαιθέρας σε θερμοκρασία δωματίου έχει την τάση να διαλύει 1.5% του νερού όταν αυτά συνυπάρχουν σε κοινό διάλυμα. Αντιστοίχως διαλύεται σε ποσοστό 7.5% στο νερό. Με την προσθήκη του κεκορεσμένου διαλύματος NaCl πετυχαίνουμε να μειώνεται η τάση του διαιθυλαιθέρα τόσο να διαλύεται όσο και να διαλύει το νερό και έτσι πραγματοποιείται καλύτερος διαχωρισμός των φάσεων].

→ Πραγματοποιούμε δύο φορές εκχύλιση της υδατικής φάσης με 20mL διαιθυλαιθέρα εκάστη. Το συνολικό οργανικό εκχύλισμα (40mL) συλλέγεται και ενώνεται με το αρχικό οργανικό εκχύλισμα (50mL).

→ Εκπλύουμε το συνολικό οργανικό εκχύλισμα (90mL) με κεκορεσμένο διάλυμα NaCl με αναλογία υδατική φάση : οργανική φάση 3:1

→ Το συνολικό οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με προσθήκη άνυδρου Na_2SO_4 και

→ διηθείται μέσω πτυχωτού ηθμού και

→ συμπυκνώνεται με αέριο άζωτο έως τελικού όγκου περίπου 5mL.

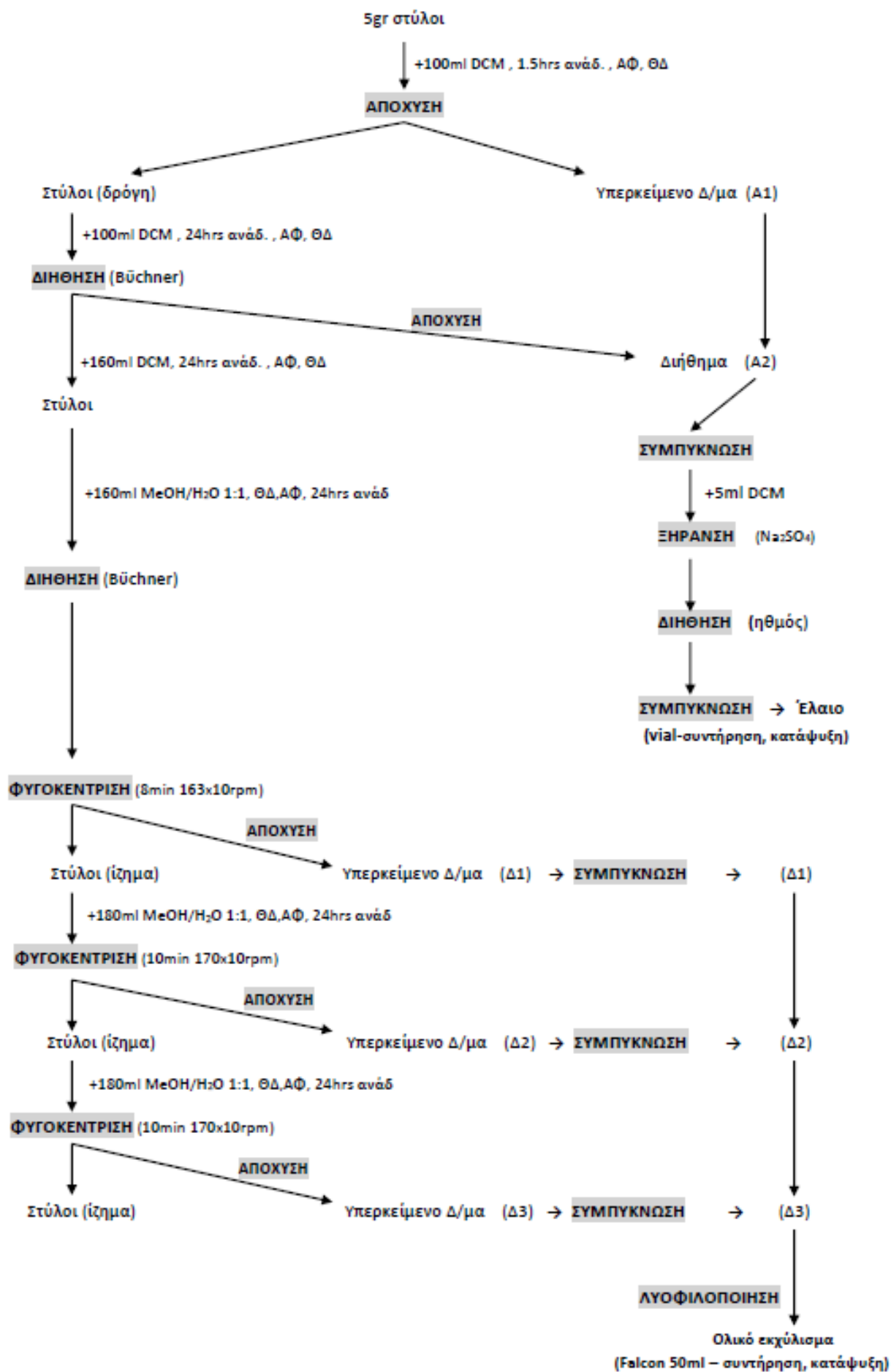
Η συνολική υδατική και η οργανική φάση (5mL) αποθηκεύονται στην κατάψυξη και υποχρεωτικά σε γυάλινα φιαλίδια (vials).

Η ακριβής πειραματική πορεία για τους στύλους *C. nivalis* έχει ως εξής :

(Εικόνα 25)

- Προσθέτουμε 5 g ολόκληρων στύλων σε 100 mL διχλωρομεθάνιο (DCM) και αφήνουμε να αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 ώρες απουσία φωτός.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα (A1) σε κωνική φιάλη , προσθέτουμε 100 mL DCM στους στύλους και αφήνουμε σε ανάδευση για επιπλέον 24 ώρες απουσία φωτός
- Διηθούμε σε δοχείο Buchner και ενώνουμε το διάλυμα (A2) με το προηγούμενο διάλυμα (A1)
- το ολικό διάλυμα συμπυκνώνεται υπό κενό (έως 20ml μέγιστος όγκος)
- Ξηραίνουμε το διάλυμα με προσθήκη Na_2SO_4
- διηθούμε σε ηθμό
- συμπυκνώνουμε το έλαιο σε rotavapor και τοποθετούμε σε vial
- αποθηκεύουμε στην κατάψυξη

Εικόνα 25 : συνολική πειραματική πορεία για τους στύλους *C. nivalis*



3.4.1.Γ Πρωτόκολλο ανάλυσης πτητικών ενώσεων με την τεχνική GC-MS

Η ανάλυση των αιθέριων ελαίων *C. sativus* και του *C. nivalis* πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Kanakis et al., [51] για την ανάλυση του αιθέριου ελαίου του *C. sativus*.

Η ακριβής πειραματική πορεία έχει ως εξής (πρόγραμμα GC-MS):

- Με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας πραγματοποιείται ένεση 1μL του δείγματος στην ειδική στήλη του μηχανήματος (χώρος ταχείας εξάτμισης του δείγματος). Η θερμοκρασία εκεί έχει ρυθμισθεί στους 200°C.
 - Ως αρχική θερμοκρασία του προγράμματος ανάλυσης ορίζονται οι 50°C. Εκεί διατηρείται σταθερή για τα πρώτα 3min.
 - Στην συνέχεια, η θερμοκρασία αυξάνεται με ρυθμό 3°C/min έως τους 180°C.
 - Έπειτα με ρυθμό 15°C/min αυξάνεται έως ότου φτάσει τους 250°C και παραμένει για 5min.
 - Στο τελικό στάδιο της διαδικασίας η θερμοκρασία μειώνεται έως ότου φτάσει τους 60°C, όπου και ολοκληρώνεται το πρόγραμμα ανάλυσης.
- Ο συνολικός χρόνος του πειράματος είναι 57min και καθ' όλη την διάρκεια του προγράμματος ο ρυθμός ροής είναι σταθερός 1mL/min. Η μέθοδος είναι splitless (το δείγμα εισάγεται στη στήλη προς ανάλυση εξ ολοκλήρου από την αρχή).

3.4.2 Απομόνωση και ανάλυση πολικών συστατικών στύλων *C. sativus* και *C. nivalis*

3.4.2.A Αρχή λειτουργίας : Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης έχει εδραιωθεί τα τελευταία χρόνια στον χώρο της ενόργανης ανάλυσης και αποτελεί παραλλαγή-εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης . Χαρακτηρίζεται ως κατάλληλη τεχνική με ακρίβεια και επαναληψιμότητα για τον προσδιορισμό μεγάλου εύρους οργανικών και ανόργανων χημικών ενώσεων [52]. Το κύριο πεδίο εφαρμογών της είναι η ανάλυση φαρμάκων, τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Κατά αυτή, τα συστατικά διαχωρίζονται μέσω συνδυαστικής δράσης μιας κινητής και μιας στατικής φάσης. Συγκεκριμένα, η κινητή φάση η οποία είναι ένας διαλύτης ή ένα σύστημα διαλυτών στο οποίο εμπεριέχεται το προς ανάλυση δείγμα, διαβιβάζεται με την εφαρμογή υψηλής πίεσης στην στατική φάση. Η στατική φάση βρίσκεται στο εσωτερικό μιας χρωματογραφικής στήλης και έχει εδραιωθεί με χημικό τρόπο πάνω σε αδρανή υποστρώματα. Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καθώς μετακινούνται μέσα από την στήλη έχοντας διαφορετικές ταχύτητες το καθένα. Κατά την έκλουσής τους από την στήλη υπάρχει ανιχνευτής UV-ορατού ο οποίος καταγράφει την απορρόφηση τους στο κατάλληλα επιλεγμένο μήκος κύματος ως προς τον χρόνο εμφάνισής τους. Προκύπτει λοιπόν χρωματογράφημα στο οποίο εμφανίζεται το σύνολο των εκλουόμενων συστατικών με την μορφή κορυφών. Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε συστατικό ή ομάδα συστατικών και χρησιμοποιείται για την ποιοτική

ανάλυση-ταυτοποίηση τους, ενώ το εμβαδόν κάθε κορυφής για την ποσοτική ανάλυση τους.

Υπάρχουν δύο κυρίως είδη χρωματογραφίας και η διάκριση τους γίνεται με βάση την πολικότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση :

α) Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase, NP) : η στατική φάση είναι πολική (π.χ. silica gel –συνήθως SiO_2 ή AlO_3) και η κινητή φάση σχετικά μη πολική (π.χ. n-εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, ισοπροπανόλη , μεθανόλη). Αυτό το είδος χρωματογραφίας βρίσκει εφαρμογή στον διαχωρισμό πολικών ενώσεων.

β) Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης (Reversed Phase, RP) : η στατική φάση είναι μη πολική (υδρόφοβη, SiO_2 συζευγμένο με διάφορα αλκύλια) και η κινητή φάση πολική (π.χ. σύστημα διαλυτών μεθανόλης ή ακετονιτριλίου ή THF με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό). Αυτό το είδος χρωματογραφίας βρίσκει εφαρμογή στον διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων και η ισχύς έκλουσης αυξάνει με την μείωση της πολικότητας του διαλύτη. Αυτό συμβαίνει διότι ελαττώνεται ο βαθμός συγκράτησης μιας ένωσης επάνω στη στατική φάση.

Περιγραφή αναλυτή HPLC

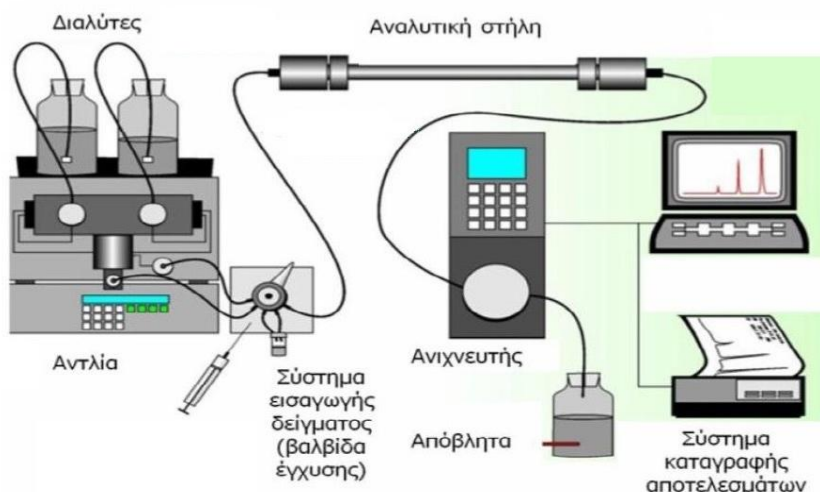
Ένας σύγχρονος αναλυτής HPLC (**Εικόνα 26**) αποτελείται τα εξής μέρη :

1) το σύστημα εισαγωγής δείγματος, 2) την αντλία, 3) την αναλυτική στήλη, 4) τον ανιχνευτή και 5) τον συλλογέα καταγραφής αποτελεσμάτων.

Πιο αναλυτικά :

1) το σύστημα εισαγωγής δείγματος : ονομάζεται και βαλβίδα έγχυσης και είναι υπεύθυνο για την εισαγωγή του δείγματος στην ροή της κινητής φάσης των

διαλυτών. Η εισαγωγή γίνεται συνήθως χειροκίνητα ενίοντας το δείγμα με την χρήση σύριγγας ή αυτόματα από αυτόματο δειγματολήπτη ο οποίος διαθέτει ειδικά διαμορφωμένο δισκίο δειγμάτων χωρητικότητας έως και 100 φυαλιδίων επιτρέποντας έτσι προγραμματισμένες εγχύσεις σε διάφορους όγκους. Βρίσκεται πάντα πριν από την αναλυτική στήλη και από την ειδική σπή-βαλβίδα το δείγμα περνάει στον βρόχο του δείγματος (loop)-θέση προετοιμασίας. Εκεί με την βοήθεια της ροής των διαλυτών θα παρασυρθεί προς την στήλη. Ο βρόγχος έχει συγκεκριμένη χωρητικότητα (π.χ. 100μL έως 2mL) και επιλέγεται ο κατάλληλος ανάλογα την ποσότητα του δείγματος που θα ενεθεί αλλά και την χωρητικότητα της αναλυτικής στήλης. Σε όλη την διάρκεια της ανάλυσης η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος παραμένει κλειστή και ανοίγει μόνο όταν γίνεται η έγχυση του δείγματος, περιορίζοντας έτσι την εισαγωγή αέρα.



Εικόνα 26 : Τα μέρη ενός αναλυτή HPLC [53].

2) η αντλία : αποτελεί την κινητήρια δύναμη του συστήματος καθώς είναι επιφορτισμένη με την δημιουργία υψηλής ροής για την κινητή φάση. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές συσκευές και λειτουργούν συνήθως σε 14-6000psi. Ο σκοπός της αντλίας είναι η συνεχής μεταφορά των υπερκάθαρων διαλυτών (HPLC grade), μέσω κατάλληλων σωληνώσεων, από τα δοχεία στα οποία βρίσκονται προς το υπόλοιπο σύστημα (loop, στήλη). Για να μην υπάρχουν αυξομειώσεις στην πίεση, αλλά και για την μεγιστοποίηση της απόδοσης του πειράματος, πρέπει οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται να μην περιέχουν αέρα, γι' αυτό πρέπει να απαερώνονται πριν από κάθε χρήση. Επίσης οι αντλίες διαθέτουν και αυτές σύστημα απαέρωσης τους για τον ίδιο λόγο. Χρίζουν τακτικής συντήρησης όπως και το σύνολο του αναλυτή.

3) η αναλυτική στήλη : Αποτελεί τον πυρήνα κάθε χρωματογραφικού συστήματος και ανάλογα το είδος του δείγματος που αναλύεται, επιλέγεται η κατάλληλη στήλη ανάλογα το υλικό πλήρωσης. Είναι ανοξειδωτοι μεταλλικοί σωλήνες, συνήθως 25cm, των οποίων το μήκος ποικίλλει, με τις μεγαλύτερες σε διάμετρο να προσφέρουν ικανότητα ανάλυσης περισσότερης ποσότητας δείγματος ενώ οι στενότερες σε διάμετρο να μπορούν να διαχωρίσουν πιο αποτελεσματικά τα συστατικά του δείγματος. Το σύνηθες υλικό πλήρωσης τους έχει σωματίδια μεγέθους 5 μm . Είναι ανθεκτικές και με μεγάλο χρόνο ζωής όταν χρησιμοποιούνται εντός των προδιαγραφών τους (οξύτητα-βασικότητα ουσιών, μέγιστη ανεκτή πίεση, μοριακά βάρη ουσιών, κατάλληλοι διαλύτες) οι οποίες καθορίζονται από την εταιρία παραγωγής τους. Πολλές φορές χρησιμοποιείται μια μικρή προστατευτική στήλη

(ονομάζεται προστήλη ή προστατευτική στήλη), πριν από την αναλυτική στήλη και ο σκοπός της είναι η προστασία της από ακαθαρσίες ή μικροσωματίδια.

4) ο ανιχνευτής : Υπάρχουν οι εξής ανιχνευτές: α) δείκτη διαθλάσεως (Refractive Index Detector), β) υπεριώδους – ορατού (UV/Vis Detector) , γ) φθορισμού (Fluorescence Detector), δ) υπερύθρου (IR Detector), ε) ηλεκτροχημικοί (Electrochemical), στ) φασματομετρίας μάζας (Mass Spectroscopy, MS), ζ) αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector) και η) ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD). Οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους και οι ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων αποτελούν τους συνηθέστερους και αποδοτικότερους ανιχνευτές. Επίσης συχνόι, είναι και οι φασματογράφοι μάζας.. Έπειτα, ο ανιχνευτής μεταφέρει τα δεδομένα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή για την καταγραφή και επεξεργασία τους.

5) ο συλλογέας καταγραφής αποτελεσμάτων : πρόκειται για ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος είναι διασυνδεδεμένος με όλα τα μέρη του αναλυτή. Έχει κατάλληλο λογισμικό το οποίο παρέχεται από την κατασκευάστρια εταιρία και δίνει την δυνατότητα στον αναλυτή να έχει τον πλήρη έλεγχο και εποπτεία των παραμέτρων του συστήματος όπως η θερμοκρασία, ή πίεση, οι απορροφήσεις, η οξύτητα αλλά και η σύσταση και η ροή της κινητής φάσης. Επίσης, επιτρέπει την καταγραφή, προβολή και επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων με την μορφή χρωματογραφήματος. Έπειτα ο αναλυτής μπορεί να χρησιμοποιήσει τα πειραματικά δεδομένα για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών.

3.4.2.B Πρωτόκολλο εκχύλισης στύλων

Το φυτικό υλικό από τους πληθυσμούς *C. sativus* και *C. nivalis* εκχυλίσθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί και περιγράφει στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων (Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών) από τους Koulakiotis et al., [54].

Η ακριβής πειραματική πορεία εκχύλισης των στύλων *C. sativus* έχει ως εξής :

- τοποθετούμε σε κωνική φιάλη 50mg ολόκληρων στύλων μαζί με 10mL συστήματος διαλυτών MeOH-ddH₂O 1:1, v/v.
- αφήνουμε υπό ήπια ανάδευση, απουσία φωτός και σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες.
- συλλέγουμε το ολικό εκχύλισμα και συμπυκνώνουμε υπό κενό για την απομάκρυνση της μεθανόλης με εφαρμογή ήπιας θέρμανσης (40-45°C) στο υδατόλουτρο του συμπυκνωτή.
- απομακρύνουμε τον εναπομείναντα διαλύτη με λυοφιλοποίηση (freeze drying)
- το λαμβανόμενο ξηρό υπόλειμμα διατηρείται στην κατάψυξη.

Το συνολικό εκχύλισμα θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των συστατικών του με την τεχνική της HPLC του MS .

Η ακριβής πειραματική πορεία εκχύλισης των στύλων *C. nivalis* έχει ως εξής :

Βλέπε Εικόνα 25

→ μετά την πρώτη διήθηση από την εκχύλιση του ελαίου, προσθέτουμε στους στύλους 160ml DCM και αφήνουμε για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός για 24 ώρες.

→ προσθέτουμε 160ml Μεθανόλης : ddH₂O 1:1 v:v και αφήνουμε για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός για 24 ώρες.

→ φυγοκεντρούμε για 5min 163x10 rpm, συλλέγουμε το υπερκείμενο (Δ1) και το συμπυκνώνουμε

→ επαναλαμβάνουμε άλλες 2 φορές προσθέτοντας κάθε φορά 180ml Μεθανόλης : ddH₂O 1:1 και συλλέγοντας το υπερκείμενα (Δ2) και (Δ3) μετά από φυγοκέντριση

→ ενώνουμε τα (Δ1), (Δ2) και (Δ3) , λυοφιλοποιούμε έως ξηρού και τα τοποθετούμε σε κατάλληλο δοχείο

→ αποθηκεύουμε στην κατάψυξη για συντήρηση

3.4.2.Γ Πρωτόκολλο ανάλυσης εκχυλίσματος με την τεχνική HPLC

Για την ανάλυση του ξηρού εκχυλίσματος του *C. sativus* και του *C. nivalis* με την τεχνική του HPLC παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1mg/mL, με προσθήκη διαλύτη MeOH-ddH₂O 1:1, v:v.

Το πρωτόκολλο ανάλυσης που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη βασίστηκε στο πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από τους Tarantilis et al., [55] για τον *C. sativus*. Λόγω όμως της διαφορετικότητας στην περιεκτικότητα σε συστατικά του *C. nivalis*,

αυτό τροποποιήθηκε (**Πίνακας 6**) ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος διαχωρισμός των συστατικών του.

Πίνακας 6 : Πειραματική πορεία - πρόγραμμα HPLC για τον *C. nivalis*

Στήλη	Luna 5u C18 (2) 100A (250 x 10mm)		
Απορρόφηση (nm)	250	308	440
Ροή	1,7 mL / min		
Διαλύτες	Α. Οξικό οξύ 1% , Β. Μεθανόλη		
ΣΤΑΔΙΟ	ΧΡΟΝΟΣ (min)	% B	
1	5	35	
2	60	35→70	
3	5	70	
4	10	70→35	
5	5	35	
	Συνολικός χρόνος 85 min		

3.4.2.Δ Πρωτόκολλο ανάλυσης εκχυλίσματος με την τεχνική MS

Οι απομονωμένες κορυφές του *Crocus nivalis* από την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ξηράθηκαν με την χρήση αρχικά συμπυκνωτή για την απομάκρυνση της μεθανόλης και στην συνέχεια με λυοφιλοποίηση (freeze dry) για απομάκρυνση της εναπομείνουσας υγρασίας.

Οι ξηρές κορυφές διαλύθηκαν σε κατάλληλο διαλύτη η καθεμία (νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) και σε τελικό όγκο 200-400μL. Η ανάλυση των απομονωμένων συστατικών του *Crocus nivalis* πραγματοποιήθηκε με Φασματόμετρο ESI-MS και τεχνικές MS,MS2 στον θετικό ή στον αρνητικό ιονισμό.

Κεφάλαιο Τέταρτο

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

4. Ανάλυση Αποτελεσμάτων

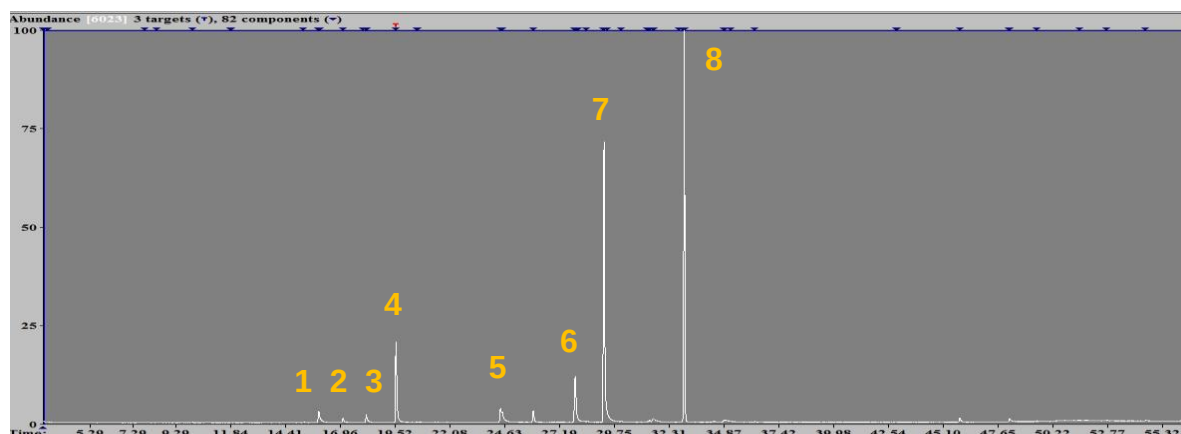
4Α. Πτητικές ενώσεις

Για τα τέσσερα δείγματα στύλων του γένους *Crocus* πραγματοποιήθηκε ανάλυση με την συζευγμένη τεχνική GC-MS σύμφωνα με το πρωτόκολλο (σελίδα 58) που αναπτύχθηκε από τους Kanakis et al., [51].

Η ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου βασίζεται στον δείκτη κατακράτησης (RI) και τα φάσματα μάζας που παρελήφθησαν καθώς αυτά συσχετίστηκαν με κατάλληλες βιβλιοθήκες όπως η βιβλιοθήκη NIST και η βιβλιοθήκη πτητικών ουσιών του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας. Επίσης έγινε σύγκριση τους με την γενικότερη σχετική βιβλιογραφία.

4.A.i. Πτητικές ενώσεις στύλων *Crocus sativus* από την περιοχή της Κοζάνης

Για το αιθέριο έλαιο του είδους *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης από το Χρωματογράφημα (**Εικόνα 27**) αναλύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 9 συστατικά τα οποία παρατίθενται στον **Πίνακα 7** μαζί με τα μοριακά τους βάρη, τον χρόνο έκλουσής τους, τον μοριακό τους τύπο και τα θραύσματα τους.



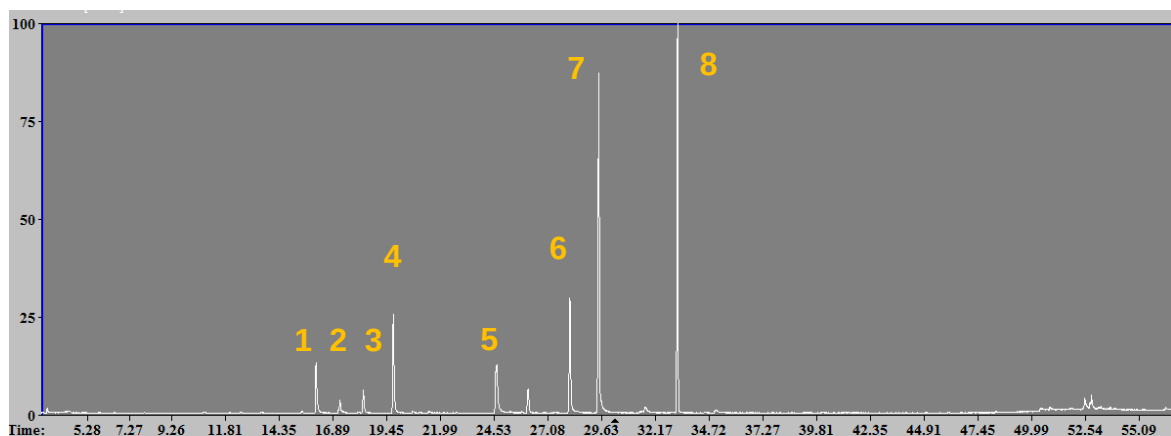
Εικόνα 27 : Χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου του είδους *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης

Πίνακας 7 : Συστατικά του αιθέριου ελαίου των στύλων του είδους *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης

Κορυφή	Συστατικό	MW	Μοριακός τύπος	t _R (min)	Ιόντα	RI
1	Ισοφορόνη	138	C ₉ H ₁₄ O	15,93	138, 95, 82, 54	1091
2	4-κετο-ισοφορόνη	152	C ₉ H ₁₂ O ₂	17,06	152, 137, 109, 96, 68	1118
3	2,6,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιόνη	154	C ₉ H ₁₄ O ₂	18,16	154, 139, 95, 83, 70, 69, 56	1145
4	σαφρανάλη	150	C ₁₀ H ₁₄ O	19,58	150, 135, 121, 107, 91, 79, 65	1179
5	4-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-ενόνη	154	C ₉ H ₁₄ O ₂	24,54	154, 112, 98, 70, 69, 55	1297
6	4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-3-οξο-κυκλοεξαν-1,4-διεν-1-καρβοξαλδεΐδη	180	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	27,93	180, 165, 152, 137, 123, 109, 83, 79, 53	1378
7	HTCC	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	29,32	168, 150, 135, 121, 107, 91, 79, 55	1413
8	BHT (εσωτερικό πρότυπο)	220	C ₁₅ H ₂₄ O	33,04	220, 205, 177, 145, 105, 81, 57	1051

4.A.ii. Πτητικές ενώσεις στύλων *Crocus sativus* από την περιοχή Birgand

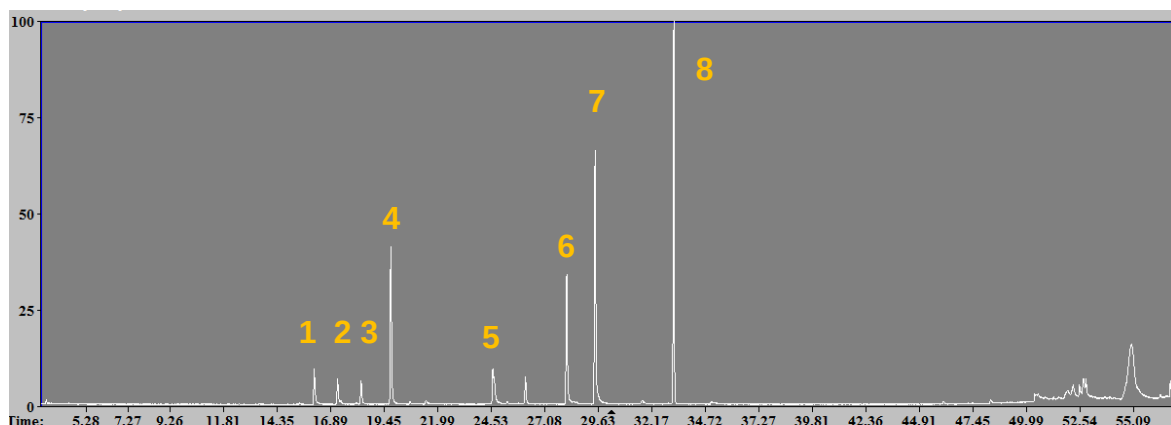
Σχετικά με το αιθέριο έλαιο του είδους *C. sativus* από την περιοχή του Birgand του Ιράν η εικόνα του χρωματογραφήματος (**Εικόνα 28**) δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα σε σχέση με αυτή του *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης ως προς την παρουσία των συστατικών. Παρατηρούνται όμως διαφορές σε σχέση με την επιφάνεια-εμβαδό των κορυφών. Υπάρχουν δηλαδή ποσοτικές διαφορές. Τα ευρήματα της ανάλυσης και ταυτοποίησης των συστατικών από το χρωματογράφημα της **Εικόνα 28** είναι παρόμοια με αυτά του **Πίνακα 7**.



Εικόνα 28 : Χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου του είδους *C. sativus* από την περιοχή Birgand του Ιράν

4.A.iii. Πτητικές ενώσεις στύλων *Crocus sativus* από την περιοχή Quaenat

Σχετικά με το αιθέριο έλαιο του είδους *C. sativus* από την περιοχή του Quaenat του Ιράν η εικόνα του χρωματογραφήματος (**Εικόνα 29**) και πάλι δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα σε σχέση με αυτή των δυο προηγούμενων ως προς την παρουσία των συστατικών. Παρατηρούνται όμως και πάλι διαφορές σε σχέση με την επιφάνεια-εμβαδό των κορυφών κάτι που μαρτυρά ποσοτικές διαφορές. Οι κορυφές που παρατηρούνται στο τέλος του χρωματογραφήματος αποδίδονται σε ακαθαρσίες της στήλης του αναλυτή. Τα ευρήματα της ανάλυσης και ταυτοποίησης των συστατικών από το χρωματογράφημα της **Εικόνα 29** είναι παρόμοια με αυτά του **Πίνακα 7**.

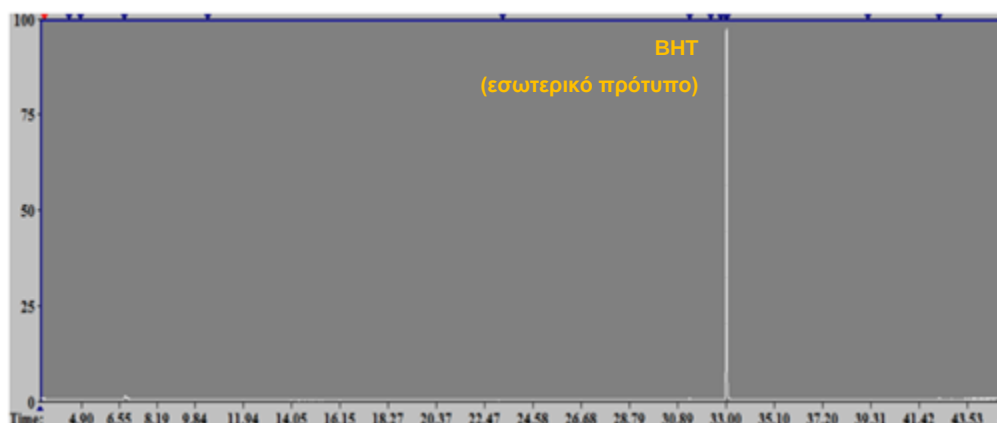


Εικόνα 29 : Χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου του είδους *C. sativus* από την περιοχή Quaenat του Ιράν

4.Α.ιγ. Πτητικές ενώσεις στύλων *Crocus nivalis* από την περιοχή του Παναχαϊκού Όρους

Σε αντίθεση με τα τρία προηγούμενα δείγματα *C. sativus*, το Χρωματογράφημα του *C. nivalis* (**Εικόνα 30**) από την περιοχή του Παναχαϊκού όρους δεν παρουσιάζει κανένα από τα συστατικά των προηγούμενων χρωματογραφημάτων. Επιπροσθέτως υπάρχει παντελής έλλειψη πτητικών συστατικών στο αιθέριο έλαιο των στύλων του *C. nivalis*.

Μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου βασίζεται στο ότι το *C. nivalis* είναι ένα φυτό το οποίο αναπτύσσεται στο τέλος του χειμώνα. Λόγω των κλιματολογικών συνθηκών προκειμένου ο βλαστός να αναπτυχθεί και να καταφέρει να διαπεράσει το χιόνι-πάγο του εδάφους πραγματοποιεί αλλαγές στην φυσιολογία των κυττάρων του και συγκεκριμένα στην ενεργειακή απόδοση της κυτταρικής αναπνοής. Αυξάνει έτσι την εκπεμπόμενη θερμότητα από τα κύτταρα του προκειμένου να λιώσει τοπικά τον πάγο και να αναπτυχθεί περαιτέρω το φυτό. Η αύξηση της θερμοκρασίας όμως που προκαλείται στο φυτό έχει ως αποτέλεσμα των απώλεια των θερμοευαίσθητων και πτητικών συστατικών των στύλων.



Εικόνα 30 : Χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου του είδους *C. nivalis* από την περιοχή του Παναχαϊκού όρους, παρατηρείται η παντελής απουσία συστατικών.

4.Α.ν. Συγκρίσεις πτητικών ενώσεων

Για τα συστατικά των τριών δειγμάτων *C. sativus* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές που αναγνωρίστηκαν παρατηρούμε ότι και τα 7 συστατικά είναι παρόντα μεταξύ των οποίων και τα βασικά συστατικά (σαφρανάλη, ισοφορόνη, HTCC). Διαφέρουν όμως προς τις ποσότητες τους και τις σχετικές τους αναλογίες (**Πίνακας 8**). Συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο του *C.sativus* από την περιοχή Quaenat είναι πιο πλούσιο σε σαφρανάλη και μάλιστα βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά σε σχέση με τα άλλα δυο δείγματα. Το ίδιο ισχύει και για την 4-κετο-ισοφορόνη. Το αιθέριο έλαιο του *C.sativus* από την περιοχή Birgand είναι πιο πλούσιο σε ισοφορόνη και 4-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξεν-2-ενόνη και επίσης έχει την μεγαλύτερη αναλογία ως προς τα άλλα συστατικά. Το δείγμα της περιοχής Birgand είναι πιο πλούσιο σε 2,6,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιόνη και 4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-3-οξο-κυκλοεξαν-1,4-διεν-1-καρβοξαλδεΰδη, με παρόμοια αναλογία συστατικών με αυτό της περιοχής Quaenat. Το αιθέριο έλαιο του *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης είναι πιο πλούσιο σε HTCC από τα άλλα δυο δείγματα, όπως επίσης έχει την μεγαλύτερη αναλογία.

Πίνακας 8 : Συγκεντρωτικός πίνακας για την επιφάνεια επί τις εκατό των πτητικών συστατικών για τα τρία είδη *C.sativus* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

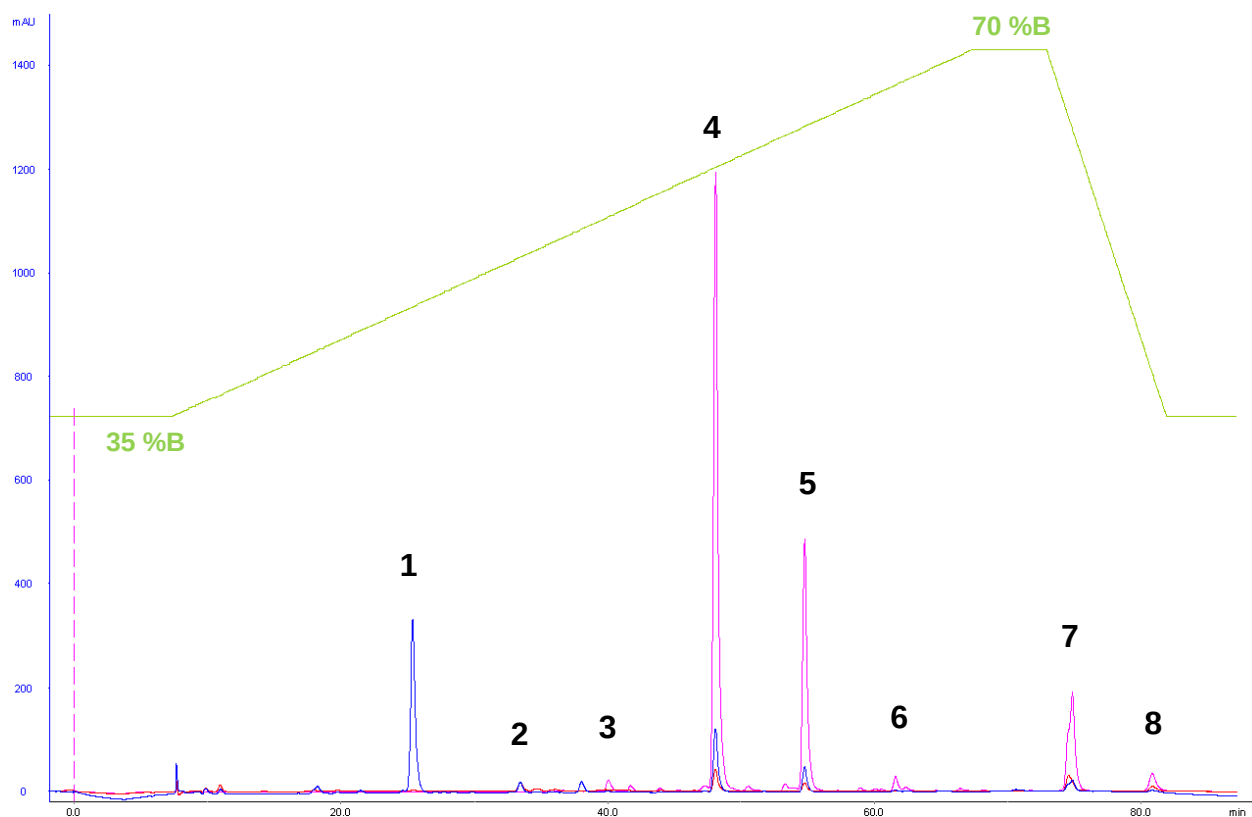
		Κοζάνη (Greece)		Birgand (Iran)		Quaenat (Iran)	
Κορυφή	Συστατικό	Εμβαδό επιφάνειας	% περιεκτικ ότητα	Εμβαδό επιφάνειας	% περιεκτικ ότητα	Εμβαδό επιφάνειας	% περιεκτι κότητα
1	Ισοφορόνη	128029	2,737	350132	7,263	183259	5,164
2	4-ΚΕΤΟ-ΙΣΟΦΟΡΟΝΗ	49179	1,051	93294	1,935	133007	3,748
3	2,6,6-ΤΡΙΜΕΘΥΛΟ- 1,4- ΚΥΚΛΟΕΞΑΔΙΟΝΗ	90531	1,935	165265	3,428	129074	3,637
4	σαφρανάλη	814848	17,421	657354	13,636	796317	22,441
5	4-ΥΔΡΟΞΥ-3,5,5- ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΚΥΚΛΟΕΞ -2-ΕΝΟΝΗ	167408	3,579	430232	8,924	204674	5,768
6	4-ΥΔΡΟΞΥ-2,6,6- ΤΡΙΜΕΘΥΛΟ-3-ΟΞΟ- ΚΥΚΛΟΕΞΑΝ-1,4- ΔΙΕΝ-1- ΚΑΡΒΟΞΑΛΔΕΪΔΗ	611628	13,076	837717	17,377	696472	19,627
7	HTCC	2815874	60,200	2286873	47,437	1405730	39,614
		4677497		4820867		3548533	

4B Χρωματογραφικά Προφίλ

Για τα τέσσερα δείγματα στύλων του γένους *Crocus* πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην σελίδα 67. Στον κάθετο άξονα των χρωματογραφημάτων φαίνεται η απορρόφηση σε mAU και στον οριζόντιο ο χρόνος σε min.

Για όλα τα χρωματογραφήματα ισχύουν τα εξής : -με χρώμα μπλε είναι η απορρόφηση στα **250 nm** και αφορά τα φλαβονοειδή και την πικροκροκίνη. -Με χρώμα κόκκινο είναι η απορρόφηση στα **308 nm** και αφορά τις *cis*-ισομορφές των αποκαροτενοειδών και τις μορφές με περισσότερους συζυγικούς δεσμούς. -Με χρώμα φούξια είναι η απορρόφηση στα **440 nm** και αφορά τις κροκίνες. -Με χρώμα **πράσινο** είναι το ποσοστό του διαλύτη B (MeOH)

4.B.i. Χρωματογραφικό προφίλ *Crocus sativus* (Κοζάνη)



Εικόνα 31 : HPLC Χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος του *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης

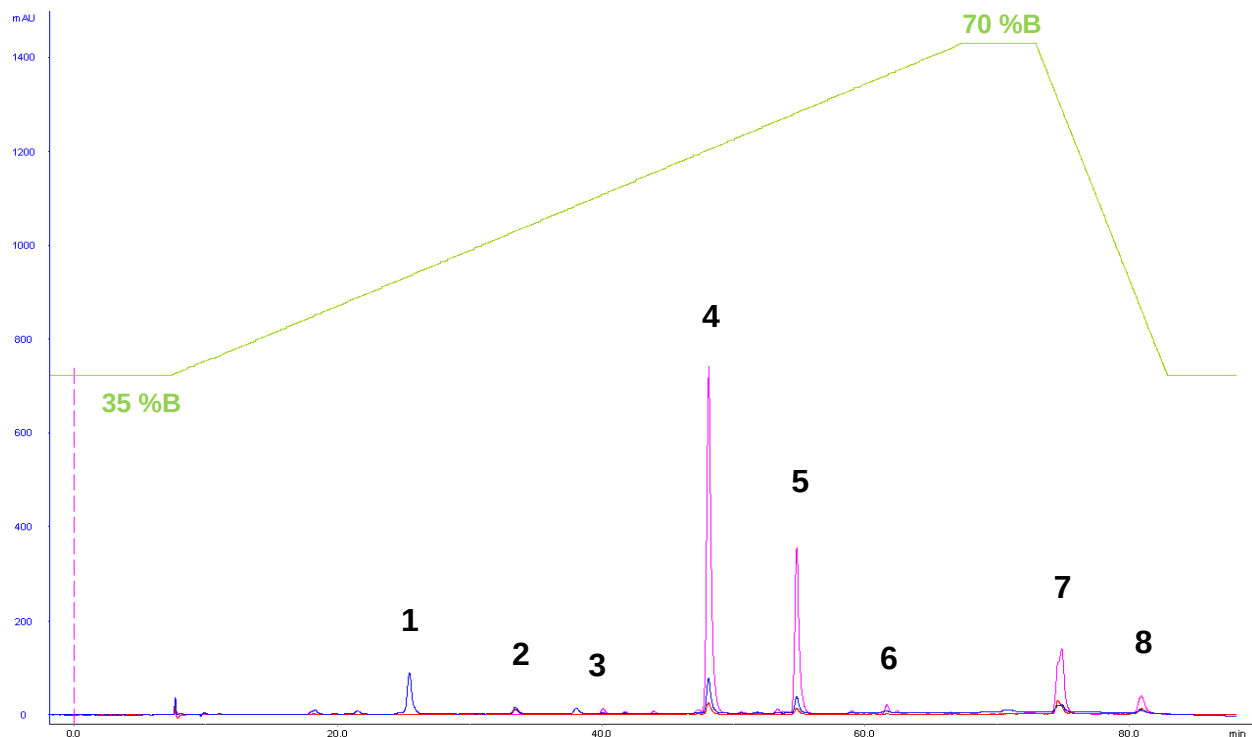
Στο Χρωματογράφημα της **Εικόνας 31** βλέπουμε την σειρά έκλουσης των συστατικών μεθανολικού εκχυλίσματος των στύλων του *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης. Η αναγνώριση των συστατικών διακρίνεται στον **Πίνακα 8** και έγινε με βάση την σχετική βιβλιογραφία και τα ευρήματα της εργασίας της Χ. Λυμπεροπούλου [47] σχετικά με την αναγνώριση των συστατικών του *C. sativus*. Προκύπτει λοιπόν ότι οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στα εξής συστατικά :

- | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------|
| 1. πικροκροκίνη | 2. HTCC | 3. <i>trans</i> -κροκίνη 5 |
| 4. <i>trans</i>-κροκίνη 4 | 5. <i>trans</i>-κροκίνη 3 | 6. <i>cis</i> -κροκίνη 5 |
| 7. <i>trans</i> -κροκίνη 2 + <i>cis</i> -κροκίνη 4 | 8. <i>cis</i> -κροκίνη 3 | |

Κυρίαρχο συστατικό είναι η *trans*-κροκίνη 4 με σχεδόν διπλάσιο μέγιστο ύψος απορρόφησης από την *trans*-κροκίνη 3 σε μήκος κύματος 440nm και τριπλάσιο από την πικροκροκίνη η οποία απορροφά σε μέγιστο μήκος κύματος στα 250nm. Ακολουθούν τα συστατικά *trans*-κροκίνη 2 και *cis*-κροκίνη 4 τα οποία εκλούθησαν μαζί και παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση επίσης στα 440nm. Σε αρκετά μικρότερα επίπεδα βρίσκονται τα συστατικά HTCC, *trans*-κροκίνη 5, *cis*-κροκίνη 5 και *cis*-κροκίνη 3.

4.B.ii. Χρωματογραφικό προφίλ *Crocus sativus* (Birgand)

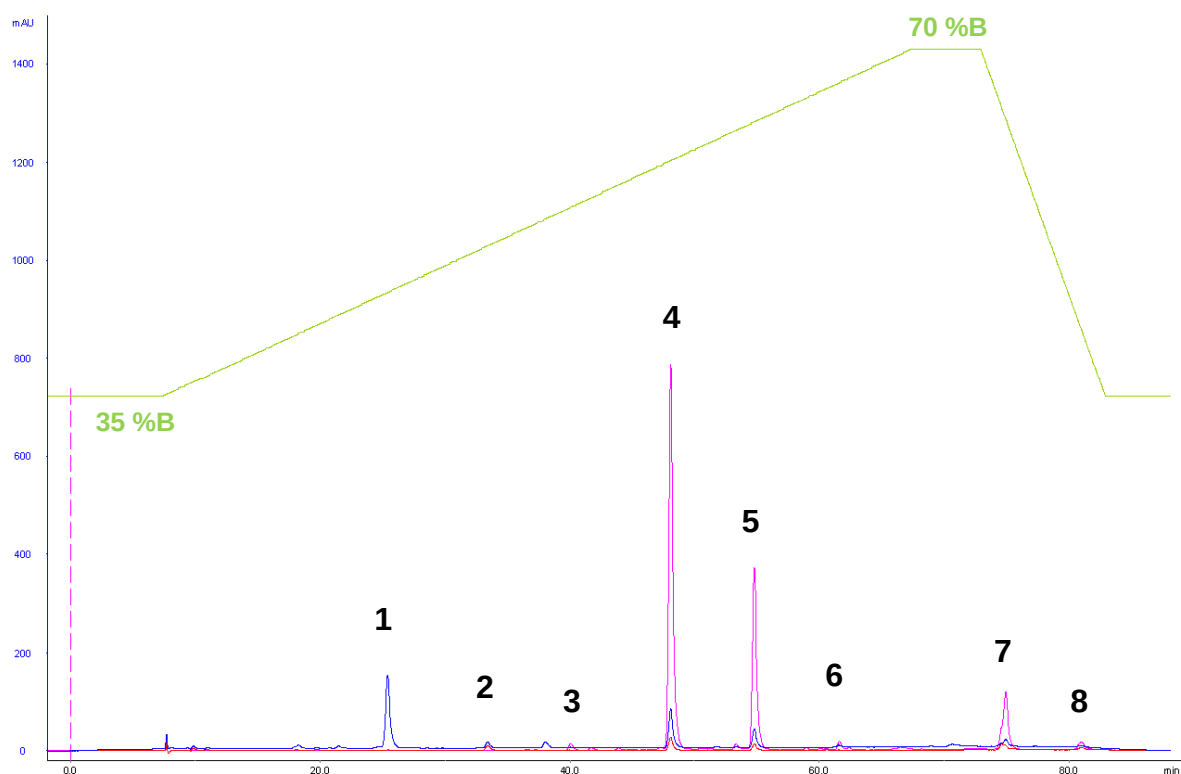
Στην **Εικόνα 32** βλέπουμε το Χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος των στύλων του *C. sativus* από την περιοχή της Birgand του Ιράν . Η αρίθμηση των κορυφών έγινε με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές ως προς το πλήθος των συστατικών που εκλούθησαν. Υπάρχουν όμως ποσοτικές διαφορές και θα παρατεθούν στη συνέχεια.



Εικόνα 32 : HPLC Χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος του *C. sativus* από την περιοχή του Birgand στο Ιράν.

4.B.iii. Χρωματογραφικό προφίλ *Crocus sativus* (Quaenat)

Στην **Εικόνα 33** βλέπουμε το Χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος των στύλων του *C. sativus* από την περιοχή της Quaenat του Ιράν . Η αρίθμηση των κορυφών έγινε και πάλι με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο **4.B.i.** Παρατηρούμε ότι και πάλι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές ως προς την σειρά έκλουσης των συστατικών. Υπάρχουν όμως διαφορές ως προς τα μέγιστα των απορροφήσεων. Πιο αναλυτικά οι διαφορές θα παρατεθούν στη συνέχεια.

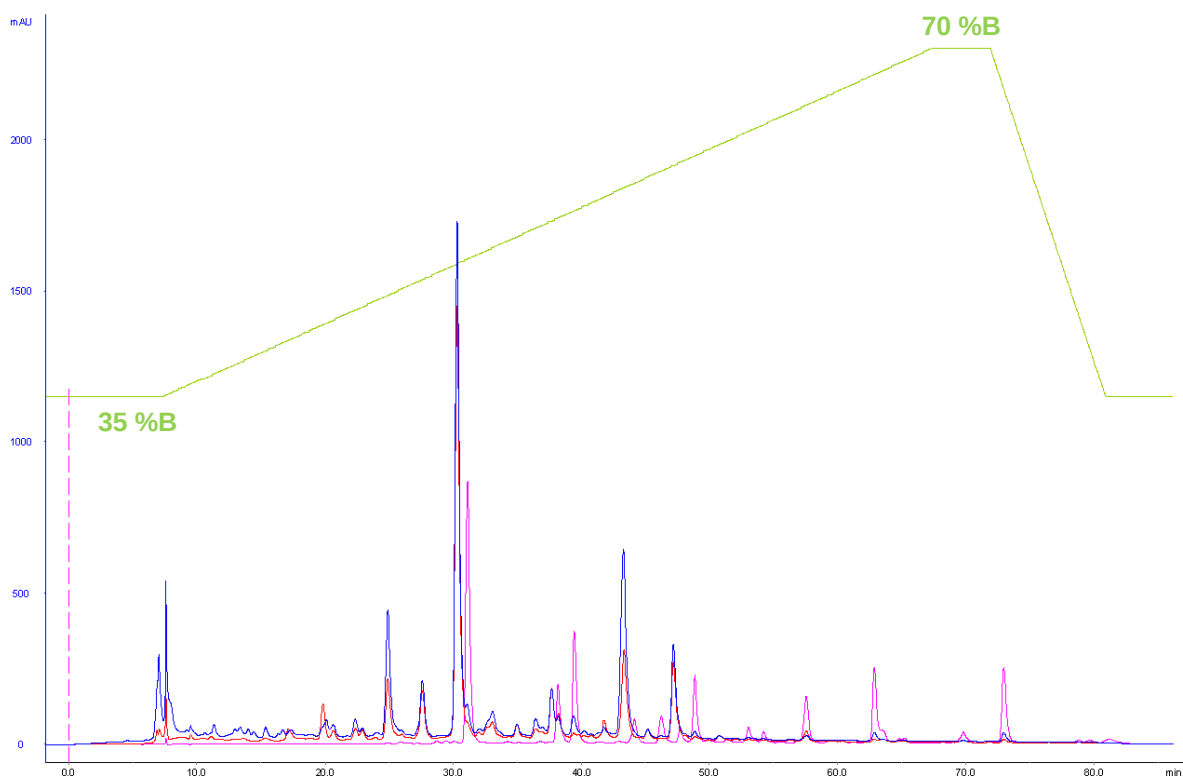


Εικόνα 33 : HPLC Χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος του *C. sativus* από την περιοχή του Quaenat στο Ιράν.

4.B.iv. Χρωματογραφικό προφίλ *Crocus nivalis* (Panahaiko)

Στην **Εικόνα 34** βλέπουμε το Χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος των στύλων του *C. nivalis* από την ευρύτερη περιοχή του Παναχαϊκού όρους. Άμεσα παρατηρήσιμο είναι ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές σχετικά με το πλήθος των εκλουόμενων συστατικών αλλά και τα μέγιστα των απορροφήσεων τους. Δηλαδή, το χρωματογραφικό προφίλ του *C. nivalis* διαφοροποιείται σημαντικά από αυτά των τριών δειγμάτων *C. sativus* που παρατέθηκαν προηγουμένως.

Η λεπτομερής αναγνώριση και ταυτοποίηση των κορυφών έγινε με MS και περιγράφεται στην παράγραφο 4Γ.



Εικόνα 34 : HPLC Χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος του *C. nivalis* από την ευρύτερη περιοχή του Παναχαϊκού όρους.

4.B.v. Συγκρίσεις χρωματογραφικών προφίλ

C. sativus

→ Για τα συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος των τριών δειγμάτων *C. sativus* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές παρατηρούμε ότι έχουν παρόμοιο Χρωματογραφικό προφίλ (**Εικόνες 32, 33, 34**) και διαφέρει κυρίως όχι ως προς τον αριθμό των κορυφών αλλά ως προς το σχετικό ύψος τους. Προκύπτει δηλαδή ότι υπάρχουν σημαντικές ποσοτικές διαφορές και όχι ποιοτικές. Πιο αναλυτικά, από τον **Πίνακα 9** βλέπουμε ότι :

- ο *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης έχει σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **πικροκροκίνη** από τον *C. sativus* της περιοχής Birgand ενώ διπλάσια από τον *C. sativus* της περιοχής Quaenat. Επίσης αποτελεί το τρίτο σε αφθονία συστατικό των στύλων (~10% του συνόλου των συστατικών).
- Η περιεκτικότητα σε **HTCC** κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα και για τα τρία δείγματα *C. sativus* και δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές.
- Η περιεκτικότητα σε **trans-κροκίνη 5** επίσης βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα και για τα τρία δείγματα *C. sativus*.
- Η **trans-κροκίνη 4** είναι το κυρίαρχο συστατικό των στύλων του *C. sativus* (~50% του συνόλου των συστατικών). Επίσης είναι το συστατικό με την μεγαλύτερη παρατηρηθείσα διαφορά σε περιεκτικότητα μεταξύ των τριών δειγμάτων *C. sativus*. Συγκεκριμένα ο *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης έχει σχεδόν διπλάσια περιεκτικότητα σε *trans*-κροκίνη 4 από τους δυο Ιρανικούς *C. sativus* οι οποίοι έχουν παρόμοια επίπεδα σε *trans*-κροκίνη 4.
- Η περιεκτικότητα σε **trans-κροκίνη 3** επίσης βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα και για τα τρία δείγματα *C. sativus*. Επίσης αποτελεί το δεύτερο σε αφθονία συστατικό των στύλων (~20% του συνόλου των συστατικών).
- Για την **cis-κροκίνη 5** παρατηρούμε ότι υπάρχει ελάχιστα μεγαλύτερη περιεκτικότητα στον *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης από τους δυο Ιρανικούς *C. sativus*.
- Για την κορυφή 7 η οποία περιέχει τα συστατικά **trans-κροκίνη 2** και **cis-κροκίνη 4** τα οποία εκλούθησαν μαζί, παρατηρείται ότι αυτά βρίσκονται σε παρόμοια

επίπεδα για τα δείγματα *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης και του Birgand ενώ ελαττώνεται στο μισό για το δείγμα της περιοχής Quaenat.

- Η περιεκτικότητα σε **cis-κροκίνη 3** βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα για τα δυο δείγματα *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης και του Birgand. Αντίθετα το δείγμα της περιοχής Quaenat έχει την μισή περιεκτικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα *C. sativus*

- Τέλος, από το σύνολο της περιεκτικότητας σε ολικά συστατικά προκύπτει ότι ο *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης είναι πιο πλούσιος σε συστατικά από τους δυο Ιρανικούς *C. sativus* οι οποίοι έχουν μεταξύ παρόμοια περιεκτικότητα σε συστατικά.

C. nivalis

→ Μετά από σύγκριση όμως των χρωματογραφημάτων του *C. nivalis* με αυτά του *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης επιβεβαιώνεται ότι δεν έχουν μεταξύ τους παρόμοιο χρωματογραφικό προφίλ. Για την ακρίβεια υπάρχει σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός συστατικών στους στύλους του *C. nivalis*, περίπου 30, αποτελούμενος από Κροκίνες αλλά και Φλαβονοειδή (Κεφάλαιο 4Γ).

→ Οι ουσίες **Πικροκροκίνη** και **HTCC** δεν ανιχνεύτηκαν στους στύλους τους *C. nivalis* σε αντίθεση με όλα τα δείγματα των στύλων του *C. sativus*.

→ ανιχνεύτηκαν νέες κροκίνες, όπως η **trans-κροκίνη 6** της Κορυφής 8 η οποία είναι η κύρια κροκίνη των στύλων του *C. nivalis* με ποσοστό **31%**, η **cis-κροκίνη 6** της Κορυφής 24 και η **trans-κροκίνη 3'** της Κορυφής 25.

→ Η % περιεκτικότητα των στύλων σε κροκίνες φαίνεται στον **Πίνακα 10**.

→ Το κύριο φλαβονοειδές είναι η **Καμφερόλη-3-σοφοροζίτης** της κορυφής 7 με ποσοστό **43%**.

→ Ανιχνεύτηκαν νέα φλαβονοειδή κυρίως γλυκοζίτες καμφερόλης με διάφορους συνδυασμούς μορίων γλυκόζης και ραμνόζης (Κορυφές 12, 14 και 15).

→ Η % περιεκτικότητα των στύλων σε φλαβονοειδή φαίνεται στον **Πίνακα 11**.

→ Ως προς το συνολικό περιεχόμενο των στύλων *C. nivalis* να αναφερθεί ότι είναι σημαντικά μικρότερο (περίπου 17 φορές) από αυτό των *C. sativus* όπως είχε τονισθεί στην εργασία της Χ. Λυμπεροπούλου [47].

- Η λεπτομερής ανάλυση των διαφορών των συστατικών του *C. nivalis* και του *C. sativus* αναφέρονται στο Κεφάλαιο 5.

Πίνακας 9 : Συγκεντρωτικός πίνακας για το εμβαδό κάθε κορυφής και την επί τις εκατό περιεκτικότητα των μη πτητικών συστατικών για τους στύλους των τριών ειδών *C.sativus*. Οι μετρήσεις για τις πικροκροκίνη και HTCC έγιναν στα 250 nm, ενώ για τις κροκίνες στα 440 nm.

		<i>C. sativus</i> Κοζάνη (Greece)		<i>C. sativus</i> Birgand (Iran)		<i>C. sativus</i> Quaenat (Iran)	
Κορυφή	Συστατικό	Εμβαδό επιφάνειας	% περιεκτι κότητα	Εμβαδό επιφάνειας	% περιεκτι κότητα	Εμβαδό επιφάνειας	% περιεκτι κότητα
1	πικροκροκίνη (250nm)	135,747	13,995	37,426	6,195	61,798	10,095
2	HTCC (250nm)	8,081	0,833	6,257	1,036	5,288	0,864
3	trans-κροκίνη 5	9,779	1,008	5,091	0,843	5,622	0,918
4	trans-κροκίνη 4	476,493	49,124	294,663	48,774	312,698	51,082
5	trans-κροκίνη 3	194,745	20,077	139,047	23,016	146,456	23,925
6	cis-κροκίνη 5	10,989	1,133	7,774	1,287	6,937	1,133
7	trans-κροκίνη 2 + cis-κροκίνη 4	112,947	11,644	89,755	14,857	62,806	10,260
8	cis-κροκίνη 3	21,199	2,186	24,124	3,993	10,543	1,722
		969,980		604,137		612,147	

Πίνακας 10 : Συγκεντρωτικός πίνακας για το εμβαδό κάθε κορυφής και την επί τις εκατό περιεκτικότητα των κροκίνων για τους στύλους του *C. nivalis* από την ευρύτερη περιοχή του Παναχαϊκού Όρους. Οι μετρήσεις έγιναν στα 440 nm.

Κροκίνες			
Κορυφή	Συστατικό	Επιφάνεια	% περιεκτικότητα
8	<i>trans</i> -κροκίνη 6	318,7349	30,85608
13	<i>trans</i> -κροκίνη 5	72,4550	7,014223
14	Άγνωστο καροτενοειδές	134,3445	13,00562
17	Κανένα αποτέλεσμα	33,6895	3,261413
18	<i>trans</i> -crocin 4	37,0662	3,588304
20	κροκίνη 2	17,0662	1,652145
21	<i>cis</i> -κροκίνη 4	80,0699	7,751406
22	<i>trans</i> -κροκίνη 3	21,7832	2,108788
23	Κανένα αποτέλεσμα	13,4004	1,297266
24	<i>cis</i> -κροκίνη 6	66,1445	6,403316
25	<i>trans</i> -κροκίνη 3'	115,2935	11,16133
26	<i>cis</i> -κροκίνη 4	21,1241	2,044982
27	<i>trans</i> -κροκίνη 2	101,8007	9,855121
		1032,9726	

Πίνακας 11 : Συγκεντρωτικός πίνακας για το εμβαδό κάθε κορυφής και την επί τις εκατό περιεκτικότητα των φλαβονοειδών για τους στύλους του *C. nivalis* από την ευρύτερη περιοχή του Παναχαϊκού Όρους. Οι μετρήσεις έγιναν στα 250 nm. (Glc: glucose, Rha: rhamnose)

Φλαβονοειδή			
Κορυφή	Συστατικό	Επιφάνεια	% περιεκτικότητα
5	Κερσετίνη-3,7-Ο-διεξοζίτης ή Κερσετίνη-3-Ο-διεξοζίτης	178,7674	11,4271
6	Καμφερόλη 3-ρουτινοζίτης-7-γλυκοζίτης	78,6837	5,0296
7	Καμφερόλη-3-σοφοροζίτης	677,2241	43,2892
9	Ραμνετίνη 3-ρουτινοζίτης	51,1679	3,2707
10	Άγνωστη ουσία	23,0800	1,4753
12	Kaempferol + 2Glc + 2Rha	60,6777	3,8786
14	1. Άγνωστη ουσία (γλυκοζίτης καμφερόλης) 2. Κερσετίνη 3-Ο-γλυκοζίτης 7-Ο ραμνοζίτης	27,0959	1,7320
15	1. Kaempferol+1Glc+3Rha, 2. Kaempferol+2Glc+4Rha	14,9980	0,9587
16	A. Καμφερόλη 3-σοφοροζίτης-7-ραμνοζίτης B. Καμφερόλη-3-Ο-γλυκοζίτης	318,8704	20,3827
19	Καμφερόλη 3-Ο-α-L(2-Ο-β-D-γλυκοκυρανόσυλ-ραμνοκυρανοζίτης ή Καμφερόλη 3-Ο-ρουτινοζίτης	133,8521	8,5560
		1564,4172	

4Γ. Ανάλυση απομονωμένων κορυφών μεθανολικού εκχυλίσματος στύλων *Crocus nivalis* (Παναχαϊκό Όρος)

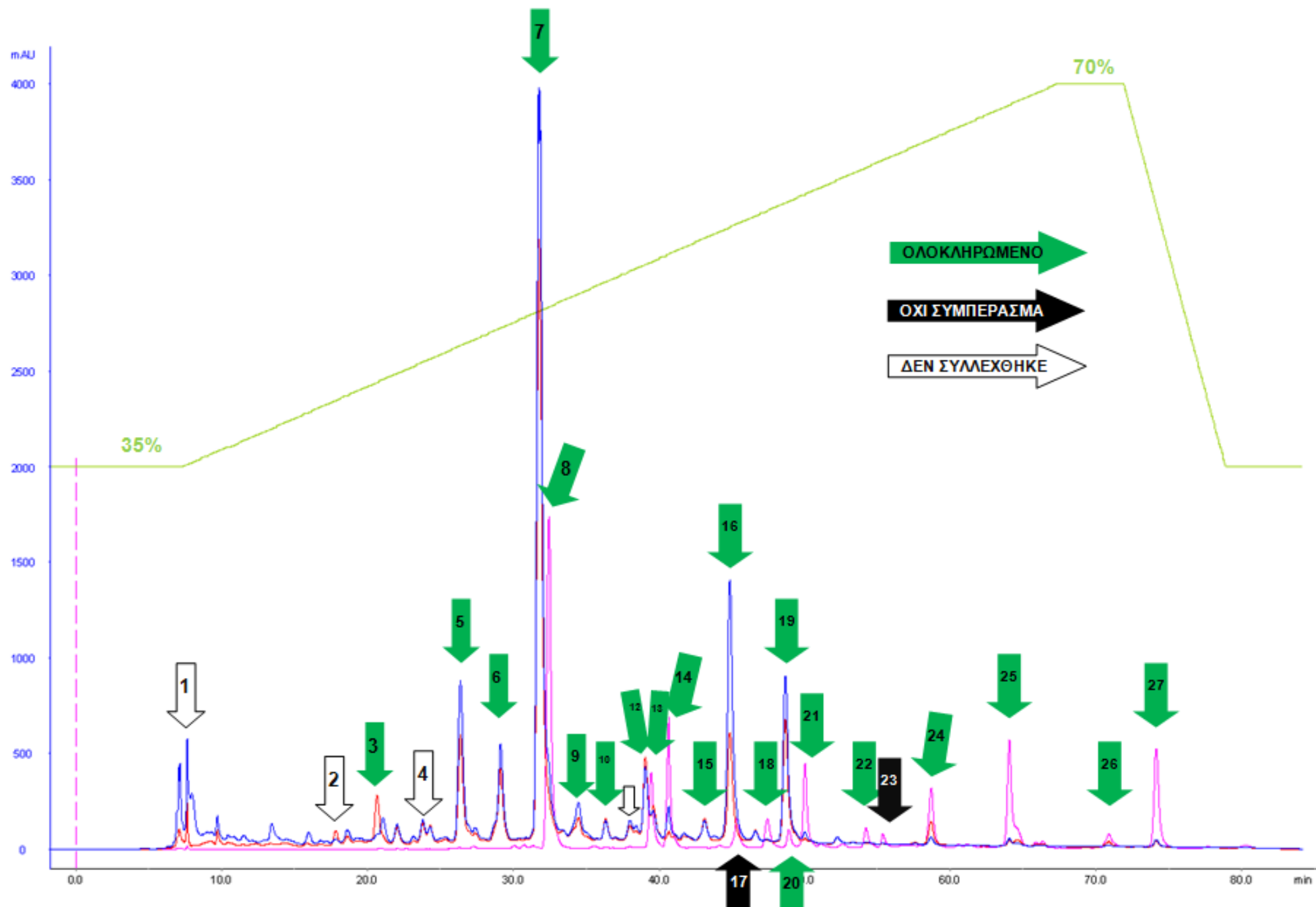
Έπειτα από συλλογή αρκετής ποσότητας για την κάθε κορυφή, απομονωμένης με ημιπαρασκευαστικό HPLC **(Εικόνα 35)** ακολούθησε ξήρανση και επαναδιαλυτοποίηση της σε κατάλληλο διαλύτη όπως φαίνεται στο συγκεντρωτικό **Πίνακα 12**.

Ακολούθησαν πειράματα MS και MS2 για την κάθε κορυφή ξεχωριστά προκειμένου να γίνει η αναγνώριση και ταυτοποίηση των συστατικών του *Crocus nivalis* από την ευρύτερη περιοχή του Παναχαϊκού όρους. Ως κατάλληλος διαλύτης επιλέχθηκε ο διαλύτης στον οποίο το προς ανάλυση συστατικό είχε την μέγιστη διαλυτότητα αλλά και τον μικρότερο θόρυβο (background). Για την πλειοψηφία των συστατικών-κορυφών επιλέχτηκε ως διαλύτης το νερό πλην εξαιρέσεων για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε 100% μεθανόλη ή συνδυασμός διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο/νερό 4:1, v/v. Η διαλυτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε 200 μ L έως 400 μ L μέγιστο όγκο και η συγκέντρωση κυμαινόταν από 0.5 mg έως 2.5 mg.

Η θραυσμάτωση πραγματοποιήθηκε στον αρνητικό ιονισμό για το σύνολο των κορυφών. Τα αποτελέσματα από τα πειραματικά δεδομένα μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιοθήκης του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και με την σχετική επιστημονική βιβλιογραφία η οποία παρατίθενται.

Για τις κορυφές 1, 2, 4, και 11 δεν πραγματοποιήθηκε συλλογή υλικού λόγω της περιορισμένης ποσότητας τους ή της παρουσίας πολλών συστατικών σε αυτές κάτι το οποίο καθιστά δύσκολη την επεξεργασία και μελέτη τους.

Για τις υπόλοιπες κορυφές τα αποτελέσματα είναι τα εξής :



Εικόνα 35 : Τελική κατάσταση αναγνώρισης συστατικών *C. nivalis*

Πίνακας 12 : Συγκεντρωτικός πίνακας της ανάλυσης των απομονωμένων κορυφών με HPLC του *C. nivalis* όπου φαίνεται η σειρά έκλουσης τους, η ονομασία του κάθε συστατικού, το μοριακό βάρος, ο ιονισμός, η θραυσμάτωση και ο διαλύτης στον οποίο διαλύθηκε.

* τα θραύσματα έχουν παρατεθεί κατά σειρά ελαττούμενης έντασης, ** Hac : acetic acid

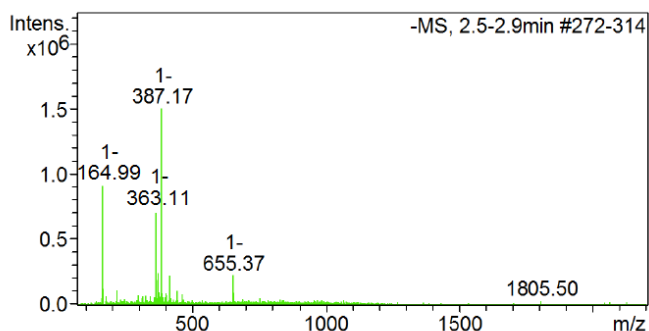
Κορυφή	RT (min)	Ονομασία συστατικού	Μοριακό βάρος	MS m/z	MS2 * m/z	ION POLARITY	Solvent
1	09.02	Δεν συλλέχθηκε	-	-	-	-	-
2	19.60	Δεν συλλέχθηκε	-	-	-	-	-
3	20.82	Άγνωστη ουσία	328	387(M+Hac), 165, 363, 655	165, 327	-ESI	ddH ₂ O
4	25.40	Δεν συλλέχθηκε	-	-	-	-	-
5	25.14	Κερσετίνη-3,7-Ο-διεξοζίτης ή Κερσετίνη-3-Ο-διεξοζίτης	626	625	300 , 445, 285, 463	-ESI	ddH ₂ O
6	27.87	Καμφερόλη 3-ρουτινοζίτης-7-γλυκοζίτης	756	755	576, 285	-ESI	ddH ₂ O
7	30.47	Καμφερόλη-3-σοφοροζίτης	610	609, 645 (M+Cl)	285, 429	-ESI	ACN/ddH ₂ O 4:1
8	31.50	trans-κροκίνη 6	1300	1299	813, 531, 795, 327	-ESI	ACN/ddH ₂ O 4:1
9	33.24	Ραμνετίνη 3-ρουτινοζίτης	624	623	314, 315, 299, 459	-ESI	ddH ₂ O
10	35.28	Άγνωστη ουσία	1064	1063, 531	917, 918, 755	-ESI	ddH ₂ O
11	40.00	Δεν συλλέχθηκε	-	-	-	-	-
12	37.92	Kaempferol + 2Glc + 2Rha	902	450, 901, 739	755, 593, 285	-ESI	ddH ₂ O
13	38.48	trans-κροκίνη 5	1138	813, 1137	813, 651, 531, 327	-ESI	ddH ₂ O

14	39.78	1. Άγνωστη ουσία (γλυκοζίτης καμφερόλης) 2. Κερσεΐνη 3-O-γλυκοζίτης 7-O ραμνοζίτης 3. Άγνωστη ουσία (καροτενοειδές)	564 610 -	563 609 -	431, 285 300, 447, 271, 429, 563 -	-ESI -ESI -	ddH ₂ O ddH ₂ O
15	42.06	1. Kaempferol+1Glc+3Rha, 2. Kaempferol+2Glc+4Rha	886 1193	885, 442 596, 1193	739, 593 1047, 901, 739	-ESI	ddH ₂ O
16	43.56	A. Καμφερόλη 3-σοροροζίτης-7-ραμνοζίτης B. Καμφερόλη-3-O-γλυκοζίτης Γ. Κανένα αποτέλεσμα	756 448 -	755, 377 447, 895 -	593, 285, 575 286, 447 -	-ESI -ESI -ESI	ddH ₂ O
17	44.52	Κανένα αποτέλεσμα	-	-	-	-ESI	ddH ₂ O
18	46.65	<i>trans-crocin 4</i>	976	975	652, 327, 813, 489	-ESI	ddH ₂ O
19	47.32	Καμφερόλη 3-O-α-L(2-O-β-D- γλυκοπυρανόσυλ-ραμνοπυρανοζίτης ή Καμφερόλη 3-O-ρουτινοζίτης	594	593, 1187, 296	285, 413, 255, 431,	-ESI	ddH ₂ O
20	48.03	Κροκίνη 2	652	675 (M+Na)	-	-ESI	ddH ₂ O
21	51.50	<i>cis</i> -κροκίνη 4	976	975	651, 931, 633, 327, 531, 783	-ESI	ddH ₂ O
22	53.52	<i>trans</i> -κροκίνη 3	814	873 (M+HAc)	651, 813, 327, 489	-ESI	ddH ₂ O
23	54.60	Κανένα αποτέλεσμα	-	-	-	-ESI	ddH ₂ O
24	57.83	<i>cis</i> -κροκίνη 6	1300	1299	813, 1017, 1137, 531	-ESI	ddH ₂ O
25	63.19	<i>trans</i> -κροκίνη 3'	814	813	327, 531, 795	-ESI	MeOH
26	70.07	<i>cis</i> -κροκίνη 4	976	975	651, 813, 327	-ESI	ddH ₂ O
27	73.21	<i>trans</i> -κροκίνη 2	652	651	327, 283, 447, 239, 531, 490	-ESI	MeOH

ΚΟΡΥΦΗ 3

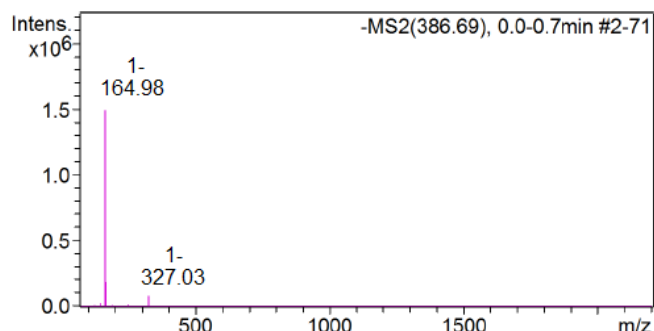
Για τη κορυφή 3 η οποία εκλούεται στα 20.82 min το MS (**Εικόνα 36**) φανερώνει μοριακά ιόντα με m/z 655 το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν $[2M-H]^-$, με m/z 363 το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M+Cl]^-$ και ιόν με m/z 387 το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν προσθήκης $[M+HAc-H]^-$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 387 (**Εικόνα 37**) δίνει το μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με 327 amu και το θραύσμα με $m/z=165$ το οποίο προκύπτει μετά από απώλεια μορίου εξόζης με amu 162. Ο χρόνος έκλουσής της δείχνει ότι προηγείται των υπολοίπων συστατικών και σε συνδυασμό με το προφίλ θραυσμάτωσης, της απορρόφηση στα 308nm αλλά και λαμβάνοντας υπόψη την σχετική βιβλιογραφία για τον *C. sativus*, πιθανολογείται ότι πρόκειται για γλυκοζιτικό παράγωγο μονοτερπενίου και MB 328, αντίστοιχο της πικροκροκίνης. Η πιθανή δομή ενός τέτοιου συστατικού φαίνεται στην **Εικόνα 38**, αλλά χρειάζονται περαιτέρω πειράματα για την ταυτοποίηση της δομής.

-MS, 2.5-2.9min #272-314

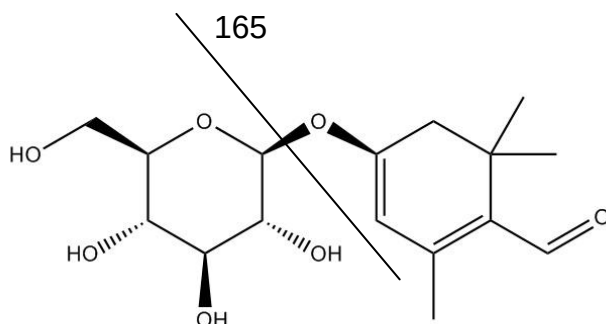


Εικόνα 36 : MS κορυφής 3

-MS2(386.69), 0.0-0.7min #2-71



Εικόνα 37 : MS2 κορυφής 3 στα 386 m/z



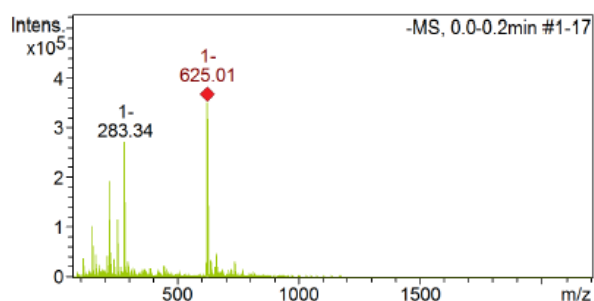
Εικόνα 38 : Πιθανή μοριακή δομή της ένωσης 3 όπου φαίνεται η θέση θραυσμάτωσης της.

ΚΟΡΥΦΗ 5

Για τη κορυφή 5, η οποία εκλούεται στα 25.14 min, το MS φανερώνει μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=625$ (**Εικόνα 39**). Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 625 (**Εικόνα 40**) δίνει τα εξής θραύσματα: 1) $m/z=300$ το οποίο αντιστοιχεί στην Κερσετίνη μετά από απώλεια ολόκληρου του δισακχαρίτη $[M-Glc-Glc]^-$. Πρόκειται για θυγατρικό ιόν το οποίο εμφανίζεται συχνά σε γλυκοζίτες κερσετίνης ύστερα από MS2 του μοριακού ιόντος αποπρωτονιωμένων γλυκοζιτών κερκετίνης, Το συγκεκριμένο φαινόμενο αποδόθηκε στον πιθανό σχηματισμό ανιόντος κινόνης (Luo et al., 2013 [78] , Μερμίγκη Π. 2014 [67]).

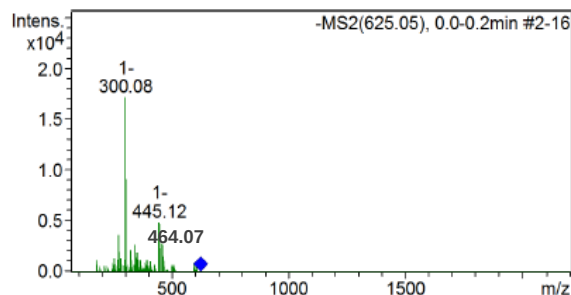
2) θραύσμα $m/z=464$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc]^-$, ενώ 3) θραύσμα με $m/z=445$ αντιστοιχεί σε δύο πιθανές δομές (**Εικόνα 41**) σύμφωνα με την βάση δεδομένων CFM-ID Spectra. Το σύνολο των φασματομετρικών στοιχείων, η σύγκριση αυτών και του χρόνου έκλουσης με προηγούμενες εργασίες (Termetzi & Kokkalou 2008 [68], Goupy et al. 2013 [74]) δείχνουν ότι η ένωση 5 αντιστοιχεί σε διεξοζίτη της κερσετίνης και πιθανώς στην ένωση **Κερσετίνη-3,7-O-διεξοζίτης** ή **Κερσετίνη-3-O-διεξοζίτης** με MB 626.

-MS, 0.0-0.2min #1-17

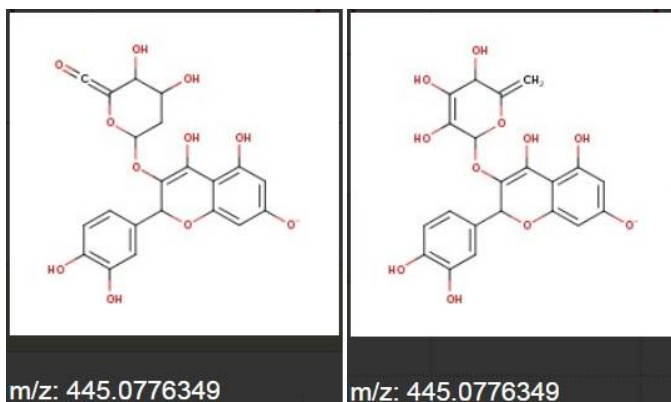


Εικόνα 39 : MS κορυφής 5

-MS2(625.05), 0.0-0.2min #2-16



Εικόνα 40 : MS2 κορυφής 5 στα 625 m/z

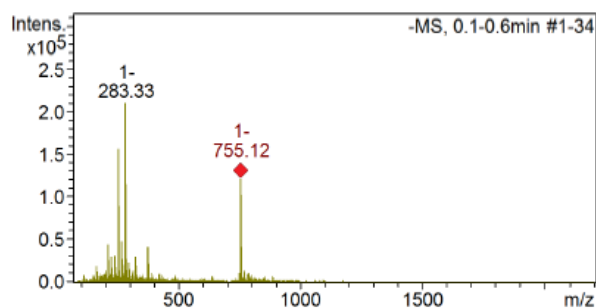


Εικόνα 41: πιθανές δομές του θραύσματος με m/z 445

ΚΟΡΥΦΗ 6

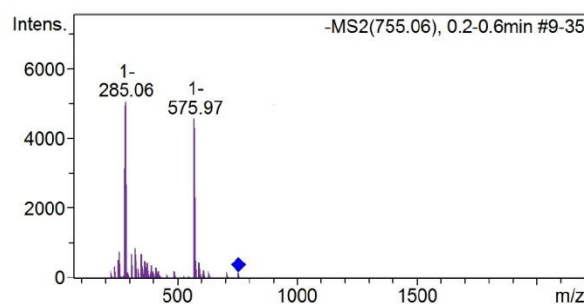
Για τη κορυφή 6 η οποία εκλούεται στα 27.87 min το MS φανερώνει μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=755$ (**Εικόνα 42**). Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 755 (**Εικόνα 43**) δίνει τα εξής θραύσματα : 1) $m/z=576$ το οποίο αντιστοιχεί στην απώλεια 179 amu ενός μορίου γλυκόζης μαζί με μία ρίζα υδροξυλίου $[M-Glc-OH]^-$. 2) θραύσμα $m/z=285$ αντιστοιχεί στην ουσία Καμφερόλη με MB 286 μετά από απώλεια και του δισακχαρίτη ρουτινόζη της θέσης 3' αλλά και της γλυκόζης της θέσης 7'. Το σύνολο των φασματομετρικών δεδομένων, η σύγκριση αυτών και του χρόνου έκλουσης με προηγούμενες εργασίες (Termetzi & Kokkalou 2008 [68], Goupy et al. 2013 [74]) δείχνουν ότι η ένωση 6 αντιστοιχεί στην ουσία **Καμφερόλη 3-ρουτινοζίτης-7-γλυκοζίτης με MB 756 (Εικόνα 44)**.

-MS, 0.1-0.6min #1-34

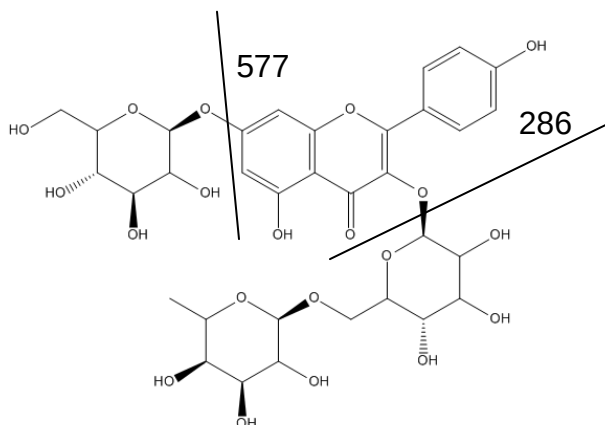


Εικόνα 42 : MS κορυφής 6

-MS2(755.06), 0.2-0.6min #9-35



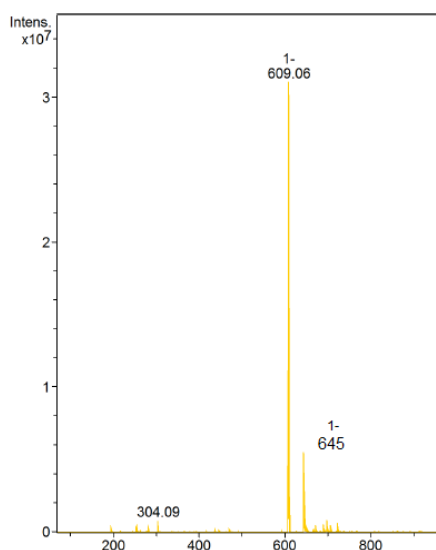
Εικόνα 43 : MS2 κορυφής 6 στα 755 m/z



Εικόνα 44 : Μοριακή δομή της Καμφερόλη 3-ρουτινοζίτης-7-γλυκοζίτης όπου φαίνονται οι θέσεις θραυσμάτωσης της και η μάζα κάθε θραύσματος

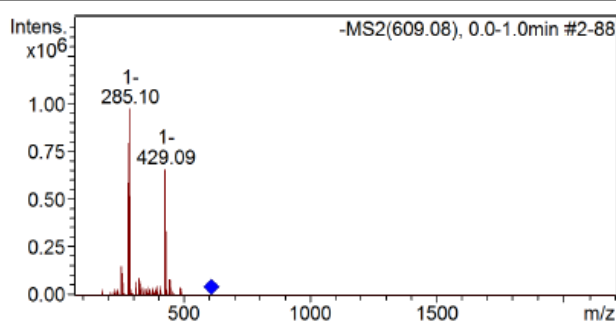
ΚΟΡΥΦΗ 7

Για τη κορυφή 7 η οποία εκλούεται στα 30.47 min, το MS (**Εικόνα 45**) φανερώνει μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=609$ και μοριακό ιόν προσθήκης $[M+Cl]^-$ με $m/z=645$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 609 (**Εικόνα 46**) δίνει τα εξής θραύσματα: 1) ιόν m/z 285 το οποίο αντιστοιχεί στην ουσία Καμφερόλη με MB 286 μετά από απώλεια ολόκληρου του δισακχαρίτη σοφοροζή $[M-Glc-Glc]$. 2) Θραύσμα με $m/z=429$ αντιστοιχεί στη πιθανή δομή η οποία απεικονίζεται στην (**Εικόνα 48**) σύμφωνα με την βάση δεδομένων CFM-ID Spectra. Από το σύνολο των φασματομετρικών δεδομένων και του χρόνου έκλουσης προκύπτει ότι η ένωση 7 αντιστοιχεί στην ουσία **Καμφερόλη 3-σοφοροζίτης** με MB 610 το οποίο είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Goupy et al 2013 [74] (**Εικόνα 47**).

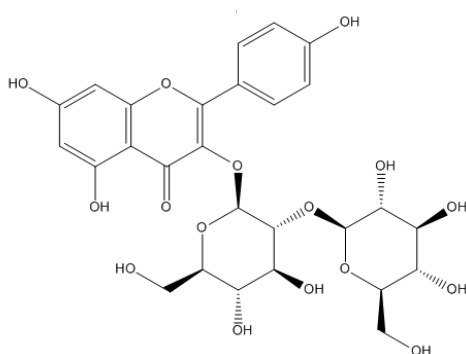


Εικόνα 45 : -MS κορυφής 7

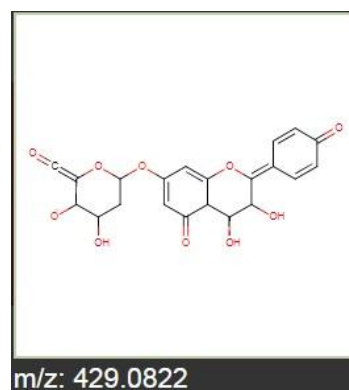
-MS2(609.08), 0.0-1.0min #2-88



Εικόνα 46: -MS2 κορυφής 7 στα 609 m/z

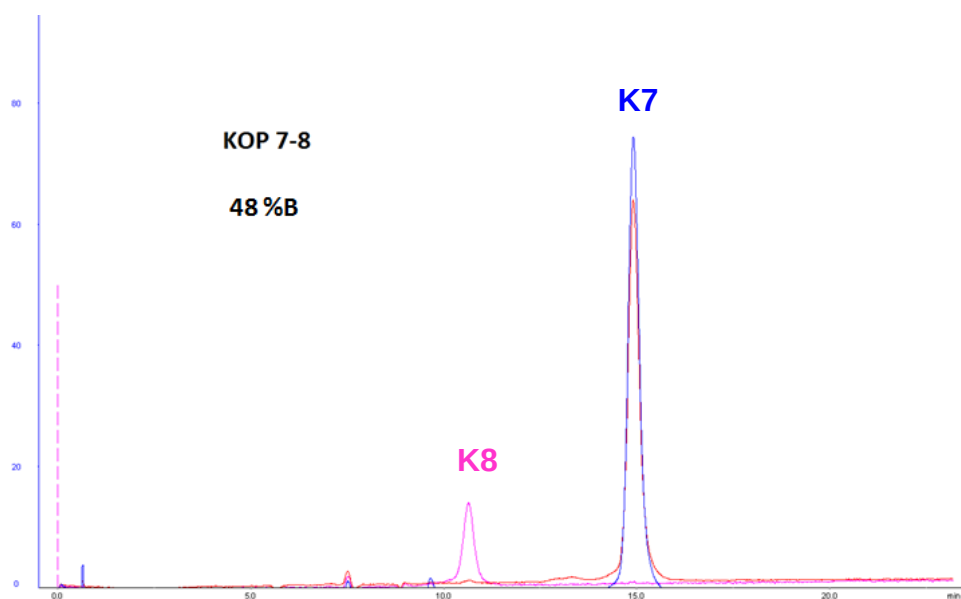


Εικόνα 47 : Μοριακή δομή της Καμφερόλη 3-σοφοροζίτης



Εικόνα 48: πιθανή δομή του θραύσματος με m/z 429

Επειδή για τις κορυφές 7 και 8 οι χρόνοι έκλουσης επικαλύπτονται, προκειμένου να υπάρξει μεγαλύτερη καθαρότητα μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε επιπλέον HPLC με ισοκρατικό σύστημα έκλουσης και συγκριμένα, σε 48% μεθανόλη για διάστημα 20 λεπτών. Τα αποτελέσματα του διαχωρισμού παρατίθενται στην **Εικόνα 49**.



Εικόνα 49: Ισοκρατικός διαχωρισμός των κορυφών 7 και 8

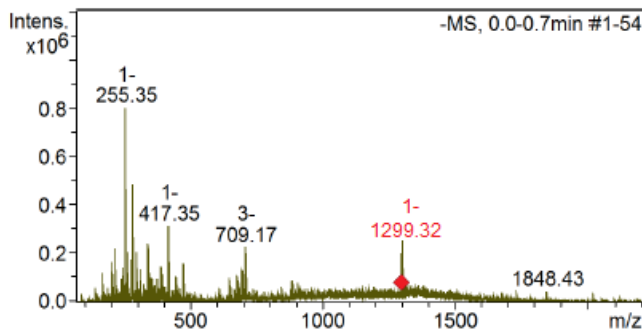
ΚΟΡΥΦΗ 8

Για τη κορυφή 8 η οποία εκλούεται στα 31.50 min, το MS (**Εικόνα 50**) φανερώνει μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=1299$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 1299 (**Εικόνα 51**) δίνει θραύσματα: 1) Θραύσμα $m/z=813$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Glc-Glc]^-$. 2) Θραύσμα $m/z=531$ αντιστοιχεί στην δομή $[Glc-Glc-Glc-COO]^-$. 3) Θραύσμα με $m/z=327$ αντιστοιχεί στην Κροκετίνη με MB 328 μετά από απώλεια όλων των μορίων γλυκόζης. Μοριακό ιόν με $m/z=1017$ αντιστοιχεί δομή $2[Glc-Glc-Glc-COO]^-$.

Το σύνολο των φασματομετρικών δεδομένων δείχνει ότι πρόκειται για μια κροκίνη με 6 μόρια γλυκόζης και MB 1300 (**Εικόνα 52**) η οποία δεν έχει αναφερθεί σε άλλη προηγούμενη μελέτη σχετική με τους στύλους του *C. sativus* ή τους στύλους κάποιου άλλου αντιπρόσωπου του γένους *Crocus*. Ο αυξημένος αριθμός σακχάρων που περιέχει δικαιολογεί το γεγονός ότι αυτή εκλούεται νωρίτερα από όλες τις υπόλοιπες. Επίσης, ο συνδυασμός της υψηλής απορρόφησης στα 440 και της χαμηλής στα 308 nm υποδηλώνει ότι έχει *trans* διάταξη η κροκετίνη. Προκύπτει ότι η ένωση 8 αντιστοιχεί στην ουσία **trans-κροκίνη 6** με MB 1300.

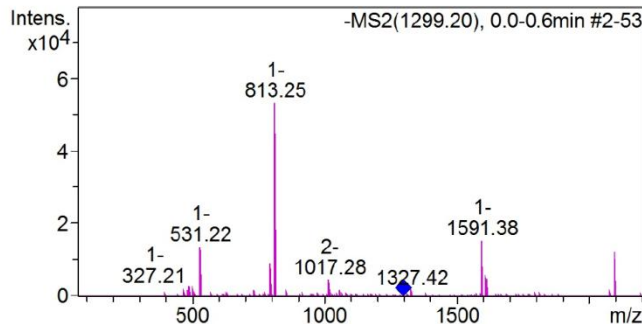
Η παρουσία μιας κροκίνης με ταυτόσημο MB αλλά και θραυσμάτωση έχει αναφερθεί από τους Moraga et al. 2013 [75] στα τέπαλα του *C. sativus*.

-MS, 0.0-0.7min #1-54

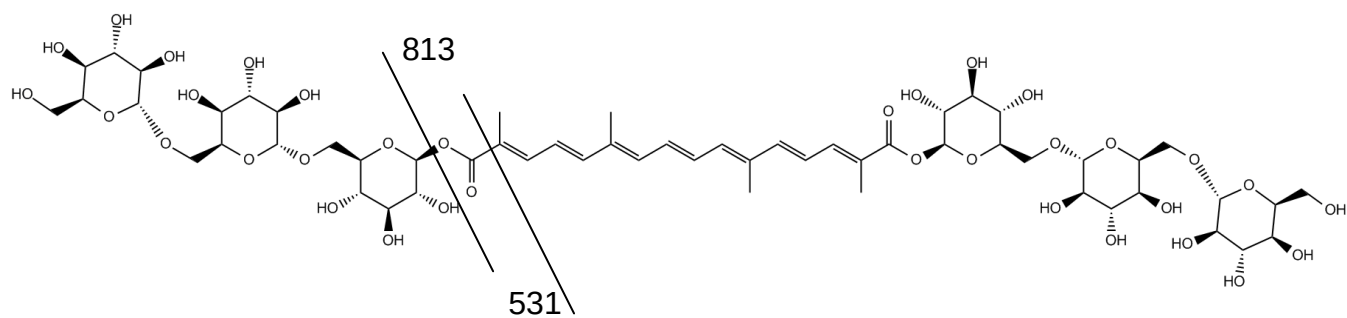


Εικόνα 50 : MS κορυφής 8

-MS2(1299.20), 0.0-0.6min #2-53



Εικόνα 51 : MS2 κορυφής 8 στα 1299 m/z

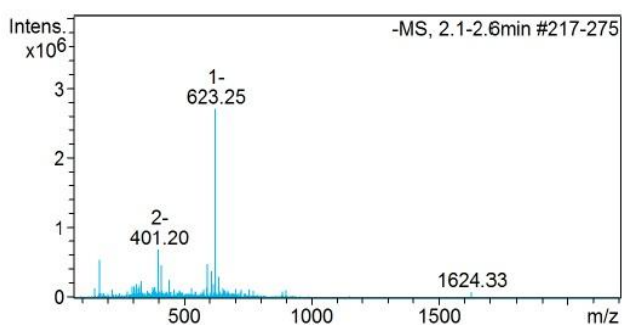


Εικόνα 52 : Μοριακή δομή της *trans*-κροκίνης 6 όπου φαίνονται οι θέσεις θραυσμάτωσης της και η μάζα των θραυσμάτων

ΚΟΡΥΦΗ 9

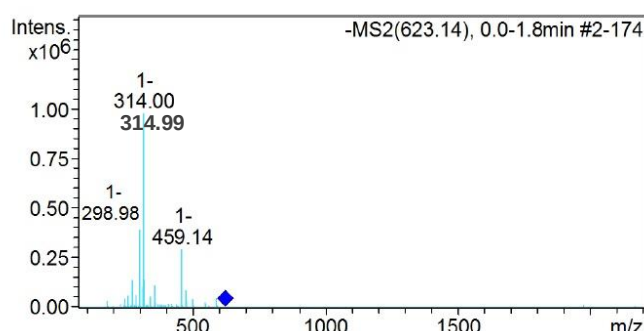
Για τη κορυφή 9 το MS (**Εικόνα 53**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=623$. Επιπλέον θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 623 (**Εικόνα 54**) δίνει : 1) θραύσματα $m/z=314.00$ και 315 τα οποία αντιστοιχούν στην Ραμνετίνη (Rha) με MB 316 ως προϊόν της απώλειας ολόκληρου του δισακχαρίτη ρουτινόζη της 3' θέσης, δομή $[M-Glc-Rha]^-$. 2) θραύσμα $m/z=299$ το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν $[M-Glc-Rha-O]^-$. 3) θραύσμα με $m/z=459$ το οποίο αντιστοιχεί στη πιθανή δομή η οποία απεικονίζεται στην **Εικόνα 56** σύμφωνα με την βάση δεδομένων CFM-ID Spectra. Από τα ευρήματα της παρούσας ανάλυσης σε συνδυασμό με τα σχετικά ευρήματα των Termetzi & Kokkalou et al. 2008 [68] και Goupy et al. 2013 [74] οι οποίες αφορούσαν παρόμοιες δομές Ραμνετίνης ενωμένες με τον δισακχαρίτη ρουτινόζη, του σχετικού χρόνου έκλουσης τους, αλλά και την απουσία κυρίου θραύσματος με m/z 477 [74], προκύπτει ότι η ένωση 9 είναι πιθανόν η **Ραμνετίνη 3-ρουτινοζίτης** με MB 624 (**Εικόνα 55**).

-MS, 2.1-2.6min #217-275

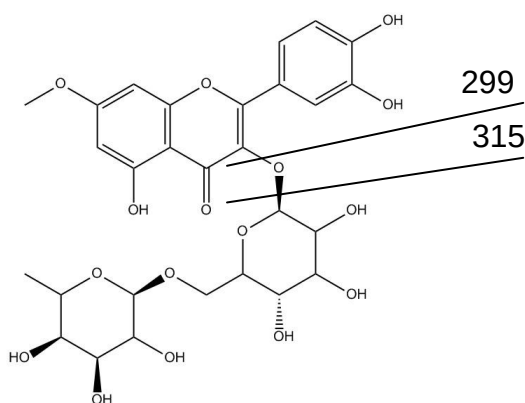


Εικόνα 53 : MS κορυφής 9

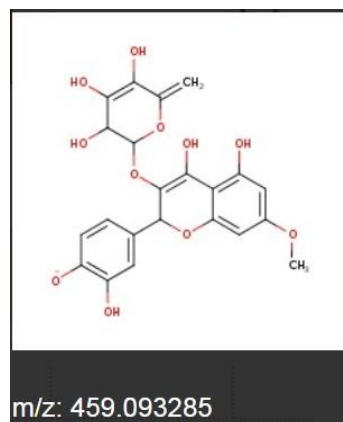
-MS2(623.14), 0.0-1.8min #2-174



Εικόνα 54: MS2 κορυφής 9 στα 624 m/z



Εικόνα 55 : Μοριακή δομή της Ραμνετίνη 3-ρουτινοζίτης και οι θέσεις θραυσμάτωσης της

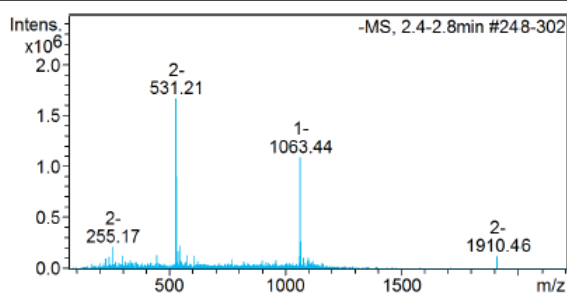


Εικόνα 56 : πιθανή δομή του θραύσματος με m/z 459

ΚΟΡΥΦΗ 10

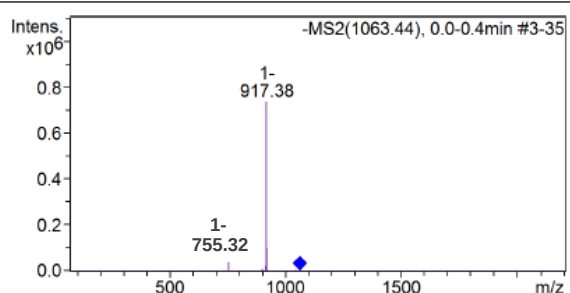
Για τη κορυφή 10 η οποία εκλύεται στα 35,28 min δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση του συστατικού-συστατικών. Από το MS (**Εικόνα 57**) προκύπτει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=1063$ και ιόν με $m/z=531$ το οποίο αντιστοιχεί στη δομή $[M-2H]^{2-}$. Επιπλέον θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 1063 (**Εικόνα 58**) δίνει θραύσματα : 1) θραύσμα με $m/z=917$ το οποίο προκύπτει μετά από απώλεια μιας ραμνόζης και αντιστοιχεί στη δομή $[M-Rha]^-$ (1063-146) 2) θραύσμα με $m/z=755$ αντιστοιχεί στη δομή $[M-Rha-Glc]^-$ (1063-146-162) και προκύπτει μετά από απώλεια μιας ραμνόζης και μιας γλυκόζης. Από το σύνολο των φασματομετρικών δεδομένων προκύπτει ότι για την κορυφή 10 περιέχεται άγνωστη ένωση με MB 1064 και παρουσία τουλάχιστον ενός μορίου ραμνόζης και ενός μορίου γλυκόζης. Επίσης, δεν είναι αποκαρτενοειδές διότι δεν απορροφά στα 440 nm. Παρόμοια ένωση με MB και χρόνο έκλυσης δεν έχει αναφερθεί σε προηγούμενη εργαστηριακή μελέτη.

-MS, 2.4-2.8min #248-302



Εικόνα 57 : MS κορυφής 10

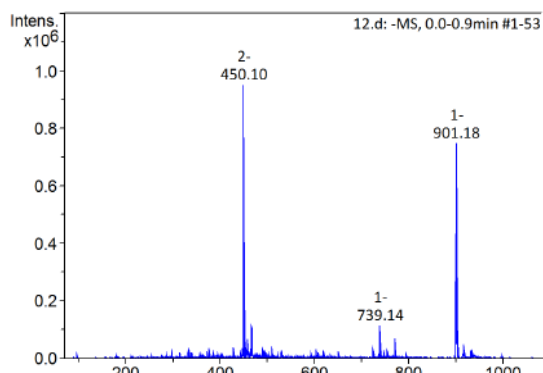
-MS2(1063.44), 0.0-0.4min #3-35



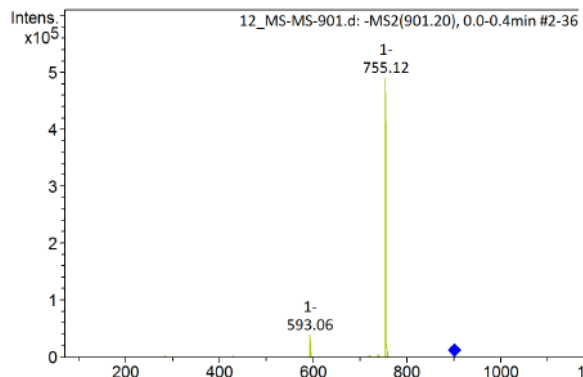
Εικόνα 58 : MS2 κορυφής 10 στα 1063 m/z

ΚΟΡΥΦΗ 12

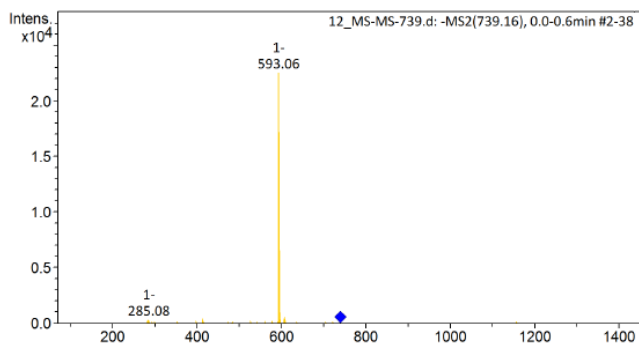
Για τη κορυφή 12 η οποία εκλούεται στα 37.92 min το MS (**Εικόνα 59**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=901$ και μοριακό ιόν με $m/z=450$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M-2H]^{2-}$. Το ιόν με $m/z=739$ αποτελεί θραύσμα της μάζας 901 και αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc]^-$ (902-162). **A.** Επιπλέον θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 901 (**Εικόνα 60**) δίνει θραύσματα : 1) θραύσμα $m/z=755$ το οποίο προκύπτει μετά από απώλεια μίας ραμνόζης, δομή $[M-Rha]^-$, 2) θραύσμα $m/z=593$ προκύπτει από απώλεια μίας επιπλέον γλυκόζης, δομή $[M-Rha-Glc]^-$. **B.** Επιπλέον θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 739 (**Εικόνα 61**) δίνει: 1) θραύσμα $m/z=285$ αντιστοιχεί στην ένωση Καμφερόλη με MB 286 μετά από απώλεια όλων των σακχάρων, 2) θραύσμα $m/z=593$ μετά από απώλεια μίας ραμνόζης $[M-Glc-Rha]^-$. Το σύνολο των φασματομετρικών δεδομένων δείχνει ότι η ένωση 12 είναι ένας γλυκοζίτης Καμφερόλης ο οποίος περιέχει 2 μόρια γλυκόζης και 2 μόρια ραμνόζης με MB 902. Ουσία με παρόμοια δεδομένα (**Kaempferol+2Glc+2Rha**) δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν σε παρόμοιες μελέτες.



Εικόνα 59 : MS κορυφής 12



Εικόνα 60 : MS2 κορυφής 12 στα 901 m/z



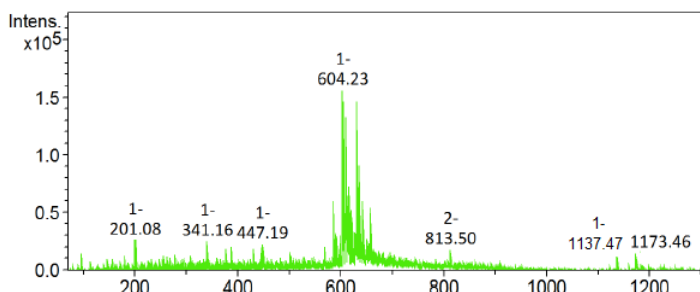
Εικόνα 61 : MS2 κορυφής 12 στα 739 m/z

ΚΟΡΥΦΗ 13

Για τη κορυφή 13 η οποία εκλούεται στα 38.48 min το MS (**Εικόνα 62**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=1137$ και μοριακό ιόν προσθήκης $[M+Cl]^-$ με $m/z=1173$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 1137 (**Εικόνα 63**) δίνει :

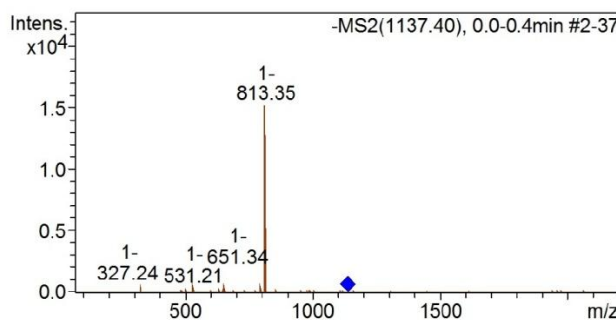
1) θραύσμα $m/z=813$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Glc]$ και φανερώνει την απώλεια 2 μορίων γλυκόζης (324 amu), 2) θραύσμα $m/z=651$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M-3Glc]^-$ και φανερώνει την απώλεια 3 μορίων γλυκόζης (486 amu), 3) θραύσμα $m/z=531$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[3Glc+COO]^-$, 4) θραύσμα $m/z=327$ αντιστοιχεί στην ουσία Κροκετίνη με MB 328, δομή $[M-5Glc]$.

Το σύνολο των φασματομετρικών στοιχείων, η σύγκριση αυτών και του χρόνου έκλουσης με προηγούμενες εργασίες (Moras et al., 2018 [70]) αλλά και η υψηλή απορρόφηση στα 440 σε συνδυασμό με χαμηλή στα 308 nm (*trans* δομή κροκετίνης), δείχνουν ότι η ένωση 5 αντιστοιχεί στην ένωση ***trans*-κροκίνη 5** με MB 1138 (**Εικόνα 64**).

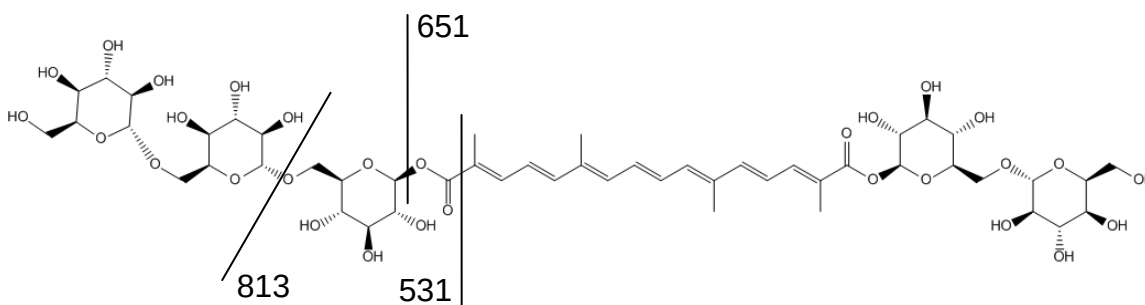


Εικόνα 62 : -MS κορυφής13

-MS2(1137.40), 0.0-0.4min #2-37



Εικόνα 63 : -MS2 κορυφής13 στα1137 m/z

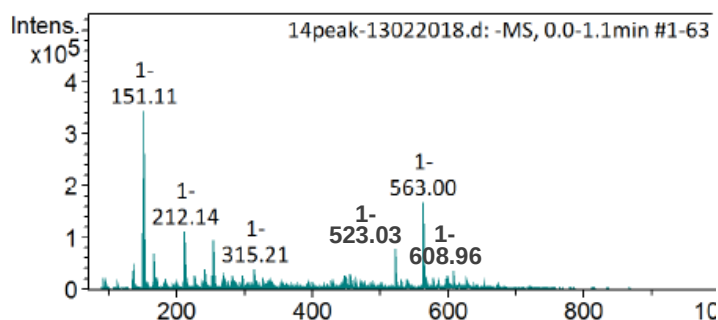


Εικόνα 64 : Μοριακές δομές της *trans*-κροκίνης 5 όπου φαίνονται οι θέσεις θραυσμάτωσης της και η μάζα κάθε θραύσματος

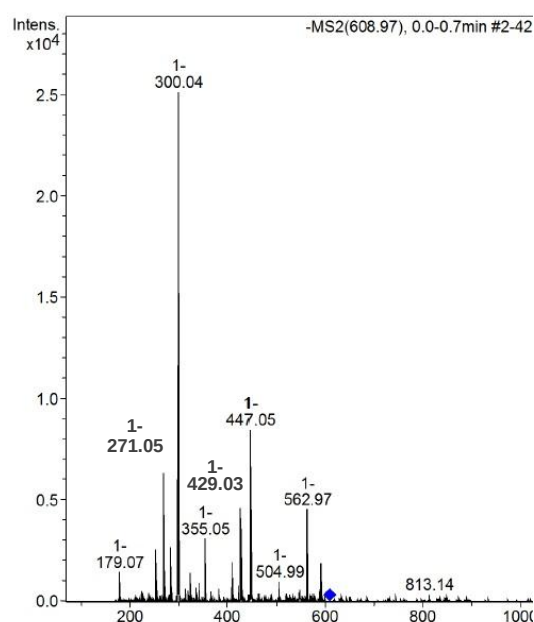
ΚΟΡΥΦΗ 14

Για τη κορυφή 14 η οποία εκλύεται στα 39.78 min το MS (**Εικόνα 65**) φανερώνει ότι πρόκειται για μίγμα ενώσεων. Η μία ουσία έχει μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=609$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 609 (**Εικόνα 66**) δίνει: 1) θραύσμα με $m/z=300$ που αντιστοιχεί στην ουσία Κερσετίνη (αντί του 301). Όπως και στην κορυφή 5, πρόκειται για θυγατρικό ιόν το οποίο εμφανίζεται συχνά σε γλυκοζίτες κερσετίνης (Luo et al., 2013, Μερμίκη Π. 2014 [67]). 2) θραύσμα με $m/z=447$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc]^-$, η οποία προκύπτει από απώλεια μιας γλυκόζης. Τα αποτελέσματα για την ένωση με μοριακό ιόν με m/z 610 συμφωνούν με τα ευρήματα του Zengin et al 2019 [76] ως προς τον χρόνο έκλουσης και την θραυσμάτωση και η ένωση ταυτοποιείται ως **Κερσετίνη 3-O-γλυκοζίτης 7-O-ραμνοζίτης** με MB 610 (**Εικόνα 68**).

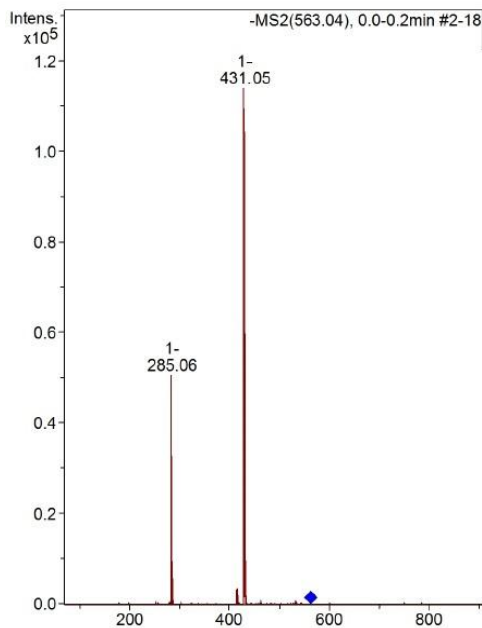
Επίσης μετά από περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) του μοριακού ιόντος $[M-H]^-$ με $m/z=563$ προκύπτουν θραύσμα με $m/z=285$ (**Εικόνα 67**), το οποίο αντιστοιχεί στην Καμφερόλη με MB 286 και μοναδικό θραύσμα με $m/z=431$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[Kaempferol+Rha]$ (MB 432). Το εύρημα υποδηλώνει και την ύπαρξη άγνωστου γλυκοζίτη Καμφερόλης με MB 564, ο οποίος περιέχει μια ραμνόζη και μια άγνωστη επιπλέον ομάδα με MB 132. Για την ταυτοποίηση της ουσίας χρειάζονται περαιτέρω αναλύσεις.



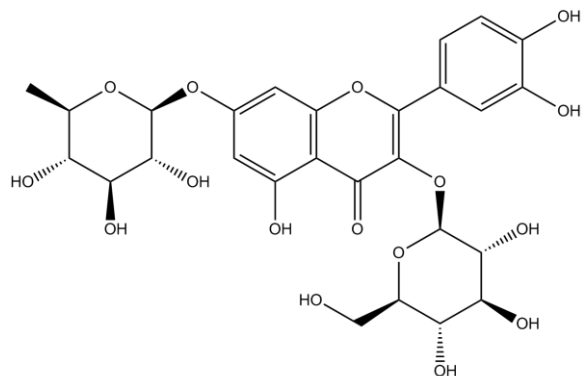
Εικόνα 65 : -MS κορυφής 14



Εικόνα 66 : -MS2 κορυφής 14 στα 609 m/z



Εικόνα 67 : -MS2 κορυφής 14 στα 563 m/z



Εικόνα 68 : μοριακή δομή της
Κερσετίνη 3-Ο-γλυκοζίδης 7-Ο-ραμνοζίδης

Σημείωση

Σε προκαταρκτικά MS για την Κορυφή 14 παρουσιάστηκε μοριακό ιόν με $m/z=1137$. Είναι πιθανόν ότι αυτή ίσως περιέχει αποκαροτενοειδές με δομή Κροκίνης 5 και MB 1138 (βλέπε Κορυφή 13). Επίσης παρουσιάζει έντονη απορρόφηση στα 440nm και η απομονωμένη κορυφή έχει έντονο κίτρινο χρώμα. Όλα αυτά παραπέμπουν σε χαρακτηριστικά κροκίνης. Δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση της όμως λόγω μη ιονισμού της ή λόγω καταστροφής της.

ΚΟΡΥΦΗ 15

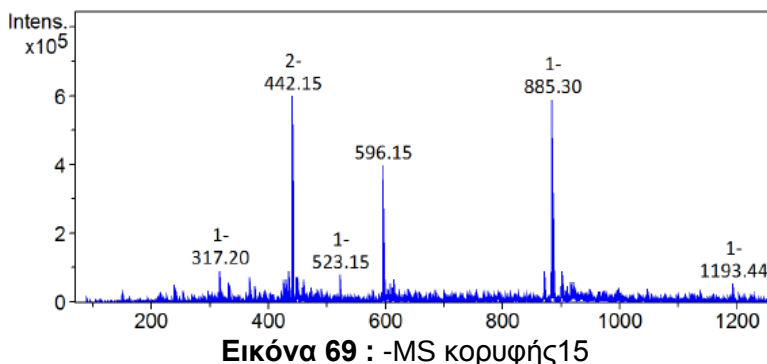
Για τη κορυφή 15 η οποία εκλούεται στα 42.06 min το MS (**Εικόνα 69**) φανερώνει τα εξής:

1. μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=885$ και μοριακό ιόν με $[M-2H]^{2-}$ με $m/z=442$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 885 (**Εικόνα 70**), δίνει θραύσμα με $m/z=739$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M-Rha]$ και θραύσμα με $m/z=593$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M-Rha-Rha]^-$.

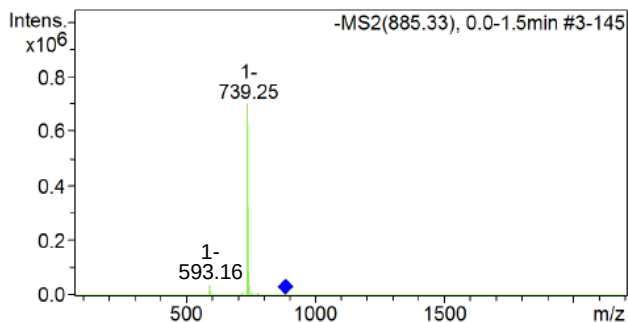
2. μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=1193$ και μοριακό ιόν με $[M-2H]^{2-}$ με $m/z=596$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS) της μάζας 1193 (**Εικόνα 71**), δίνει θραύσμα με $m/z=1047$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Rha]$, θραύσμα με $m/z=901$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Rha-Rha]$ και θραύσμα με $m/z=739$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Rha-Rha-Glc]^-$.

Το σύνολο των φασματομετρικών δεδομένων δείχνει ότι η κορυφή 15 πιθανόν περιέχει :

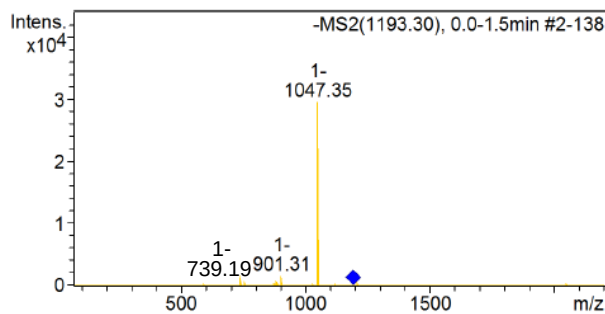
1. γλυκοζίτη καμφερόλης ο οποίος περιέχει 3 μόρια ραμνόζης και μια 1 μόριο γλυκόζης (**Kaempferol+3Rha+1Glc**) με MB 886 και 2. γλυκοζίτη καμφερόλης ο οποίος περιέχει 4 μόρια ραμνόζης και 2 μόρια γλυκόζης (**Kempferol+2Glc+4Rha**) με MB 1194. Ουσίες με παρόμοια δομή δεν έχουν αναφερθεί στο παρελθόν σε μελέτες του γένους *Crocus*.



-MS2(885.33), 0.0-1.5min #3-145



-MS2(1193.30), 0.0-1.5min #2-138



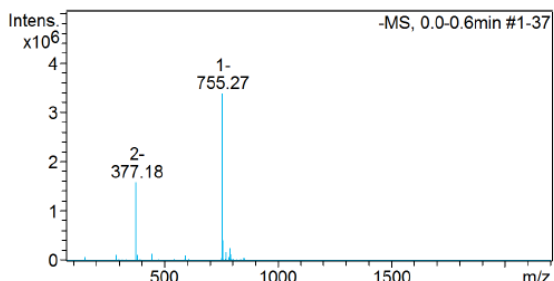
ΚΟΡΥΦΗ 16

Για τη κορυφή 16 η οποία εκλούεται στα 43,56 min πραγματοποιήθηκε επιπλέον HPLC διαχωρισμός (**Εικόνα 77**) σε ισοκρατικό σύστημα έκλουσης (55.7% μεθανόλη) για διάστημα 20 λεπτών. Προέκυψαν 3 συστατικά σε 3 νέες κορυφές :

1. **K16A** με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=755$ (**Εικόνα 72**) αντιστοιχεί στην ουσία **Καμφερόλη 3-σοφοροζίτης-7-ραμνοζίτης** με MB 756. Μοριακό ιόν με $m/z=377$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-2H]^{2-}$. Από το MS2 (**Εικόνα 73**) προκύπτουν θραύσματα $[M-Glc]=593$, $[M-Glc-CO]=575$ και Kaempferol=286. Τα ευρήματα είναι σύμφωνα με αυτά των Goupy et al., 2013 [74]

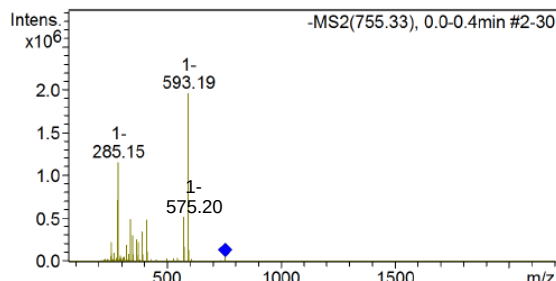
2. **K16B** με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=447$ (**Εικόνα 74**), το οποίο αντιστοιχεί στην ουσία **Καμφερόλη-3-Ο-γλυκοζίτης**. Μοριακό ιόν με $m/z=895$ αντιστοιχεί στην δομή $[2M-H]^-$. Από το MS2 (**Εικόνα 75**), προκύπτει θραύσμα Καμφερόλης με $m/z=285$. Τα ευρήματα συμφωνούν με τα ευρήματα των Zengin et al., 2019 [76] και Tuberoso et al., 2016 [77] ως προς τον χρόνο έκλουσης και την θραυσμάτωση.

-MS, 0.0-0.6min #1-37



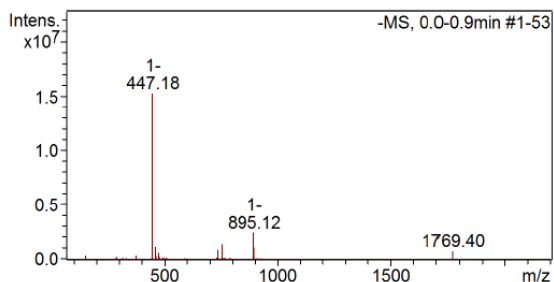
Εικόνα 72 : -MS κορυφής K16A

-MS2(755.33), 0.0-0.4min #2-30



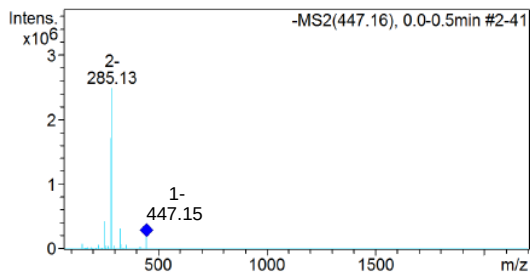
Εικόνα 73 : -MS2 κορυφής K16A

-MS, 0.0-0.9min #1-53



Εικόνα 74 : -MS κορυφής K16B

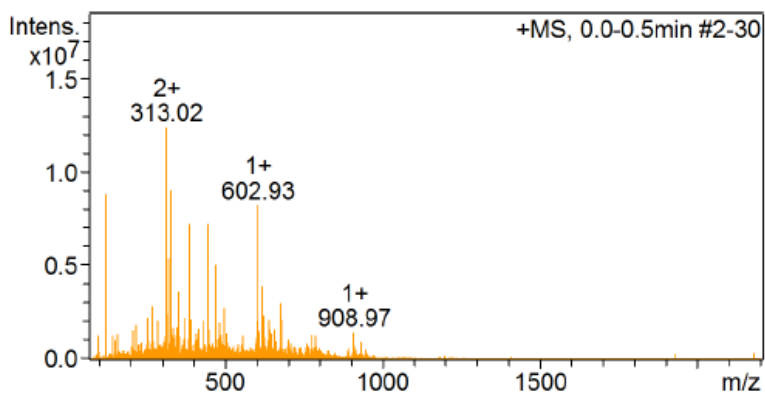
-MS2(447.16), 0.0-0.5min #2-41



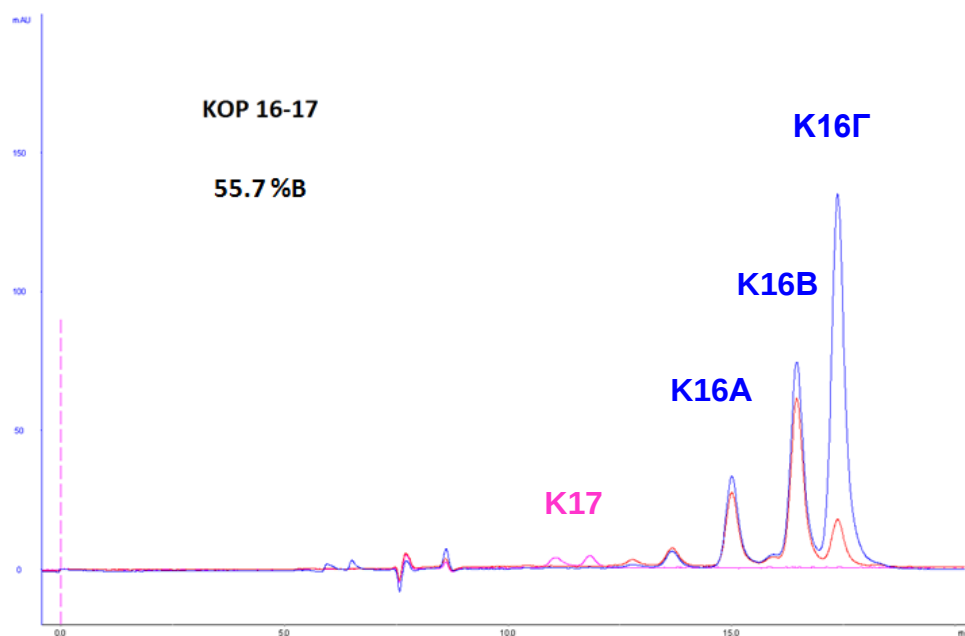
Εικόνα 75: -MS κορυφής K16B

3. **K16Γ** δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση του περιεχομένου συστατικού –συστατικών.
(Εικόνα 76)

+MS, 0.0-0.5min #2-30



Εικόνα 76 : -MS κορυφής K16 Γ



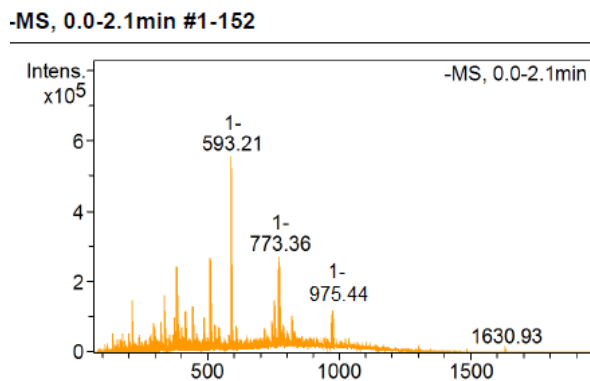
Εικόνα 77: Ισοκρατικός διαχωρισμός των συστατικών στην κορυφή 16

ΚΟΡΥΦΗ 17

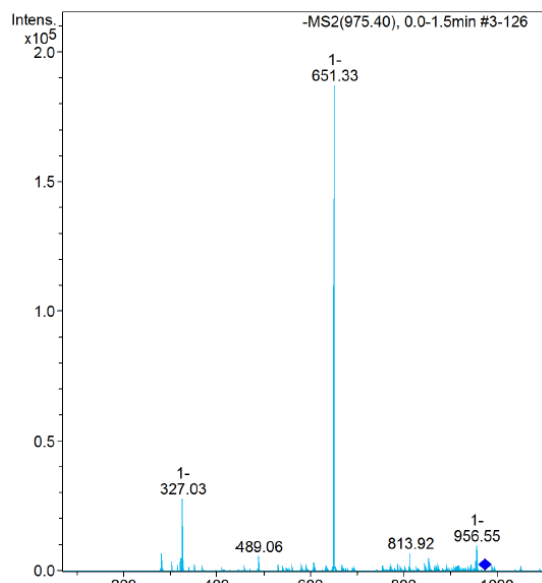
Για τη κορυφή 17 η οποία εκλούεται στα 44,52 min δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση του περιεχομένου συστατικού–συστατικών λόγω περιορισμένης ποσότητας του δείγματος και της μη επαρκούς καθαρότητας του. Αξίζει να αναφερθεί όμως ότι απορροφά στα 440 nm κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι έχει αποκαροτενοειδή φύση.

ΚΟΡΥΦΗ 18

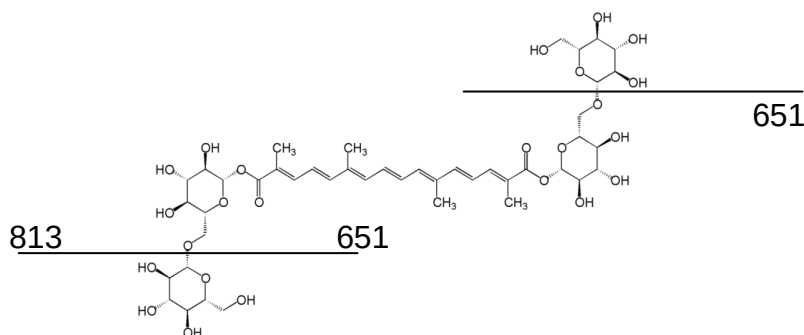
Για τη κορυφή 18 η οποία εκλούεται στα 46,65 min το MS (**Εικόνα 78**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=975$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 975 δίνει (**Εικόνα 79**) : 1) θραύσμα $m/z=813$ που αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc]^-$ (MB κροκίνης 3), 2) θραύσμα $m/z=651$ το οποίο αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glu-Glc]^-$ (MB κροκίνης 2), 3) θραύσμα $m/z=489$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Glc-Glc]^-$ (MB κροκίνης 1) και 4) θραύσμα $m/z=327$ αντιστοιχεί στην κροκετίνη με MB 328. Τα αποτελέσματα για την ένωση της κορυφής 18 με μοριακό ιόν με m/z 975 συμφωνούν με τα ευρήματα του Moras et al., 2018 [70] ως προς τον χρόνο έκλουσης και την θραυσμάτωση και η ένωση ταυτοποιείται ως **trans-κροκίνη 4** με MB 976 (**Εικόνα 80**). Αυτό επιβεβαιώθηκε και με ανάλυση του εκχυλίσματος των στύλων του *C. sativus* με την ίδια χρωματογραφική μέθοδο.



Εικόνα 78 : -MS κορυφής18



Εικόνα 79 : -MS2 κορυφής18 στα 975 m/z



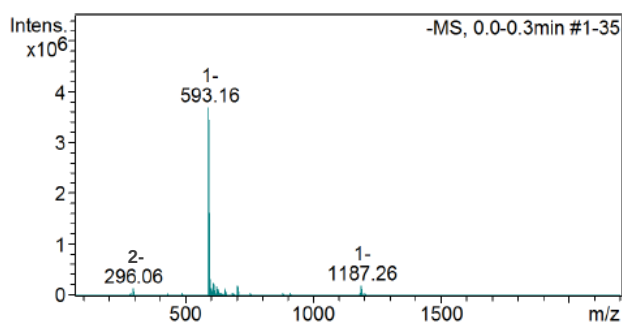
Εικόνα 80 : Μοριακή δομή της *trans*-κροκίνης 4 όπου φαίνονται οι θέσεις θραυσμάτωσης της και η μάζα του κάθε θραύσματος

ΚΟΡΥΦΗ 19

Για τη κορυφή 19 η οποία εκλύεται στα 47,32 min το MS (**Εικόνα 81**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=593$. Επίσης μοριακό ιόν με $m/z=1187$ αντιστοιχεί στην δομή $[2M-H]^-$ και μοριακό ιόν με $m/z=296$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-2H]^{2-}$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 593 δίνει (**Εικόνα 82**) : 1) θραύσμα $m/z=413$ που αντιστοιχεί στην δομή $[M-Rha-CH_2]^-$, 2) θραύσμα $m/z=285$ που αντιστοιχεί στην ουσία Καμφερόλη με MB 286.

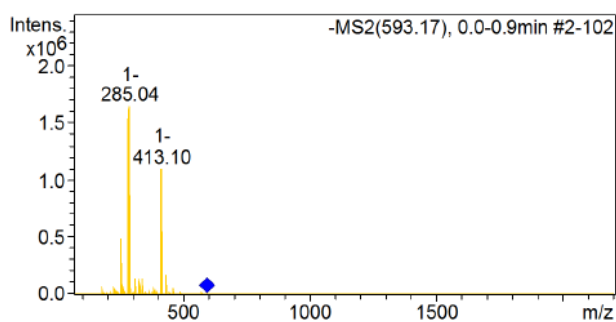
Το σύνολο των φασματομετρικών στοιχείων, η σύγκριση αυτών και του χρόνου έκλουσης με προηγούμενες εργασίες ταιριάζουν με τα ευρήματα των Norbaek & Kondo 1999 [71], Termetzi & Kokkalou 2008 [68], Goupy et al., 2013 [74] δείχνουν ότι η ένωση 19 αντιστοιχεί στην ουσία **Καμφερόλη 3-O-α-L(2-O-β-D- γλυκοκυρανόσυλ-ραμνοκυρανοζίτης ή Καμφερόλη 3-O-ρουτινοζίτης με MB 594 (Εικόνα 83).**

-MS, 0.0-0.3min #1-35

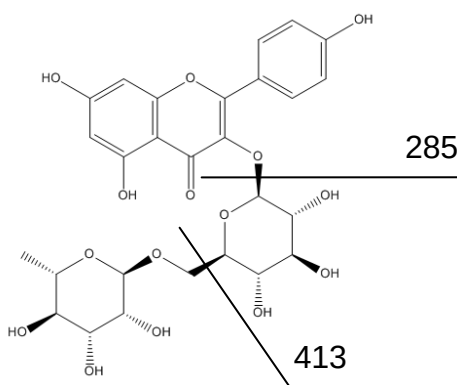


Εικόνα 81 : -MS κορυφής19

-MS2(593.17), 0.0-0.9min #2-102

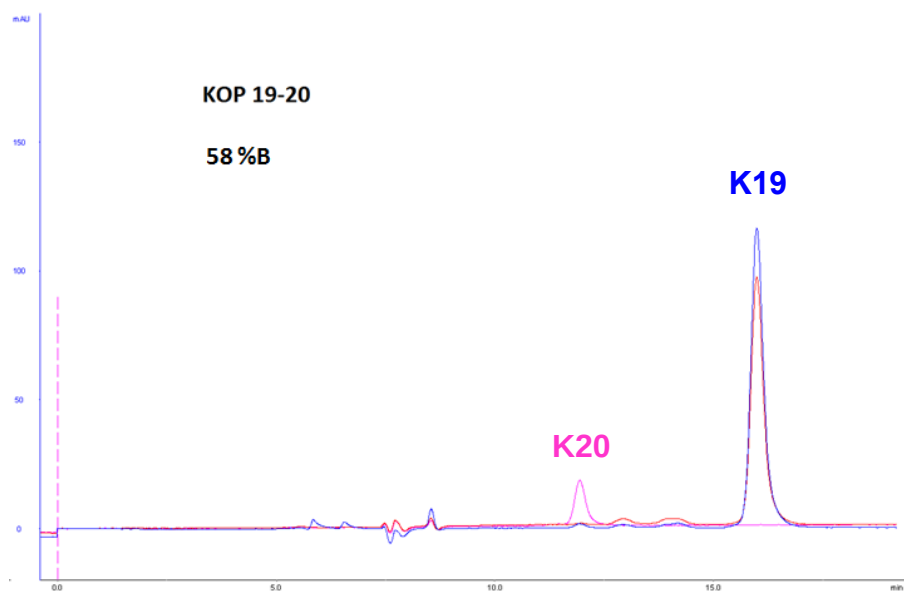


Εικόνα 82: -MS2 κορυφής19 στα 594 m/z



Εικόνα 83 : Μοριακή δομή της Καμφερόλη 3-O-ρουτινοζίτης όπου φαίνονται οι θέσεις θραυσμάτωσης της και η μάζα κάθε θραύσματος

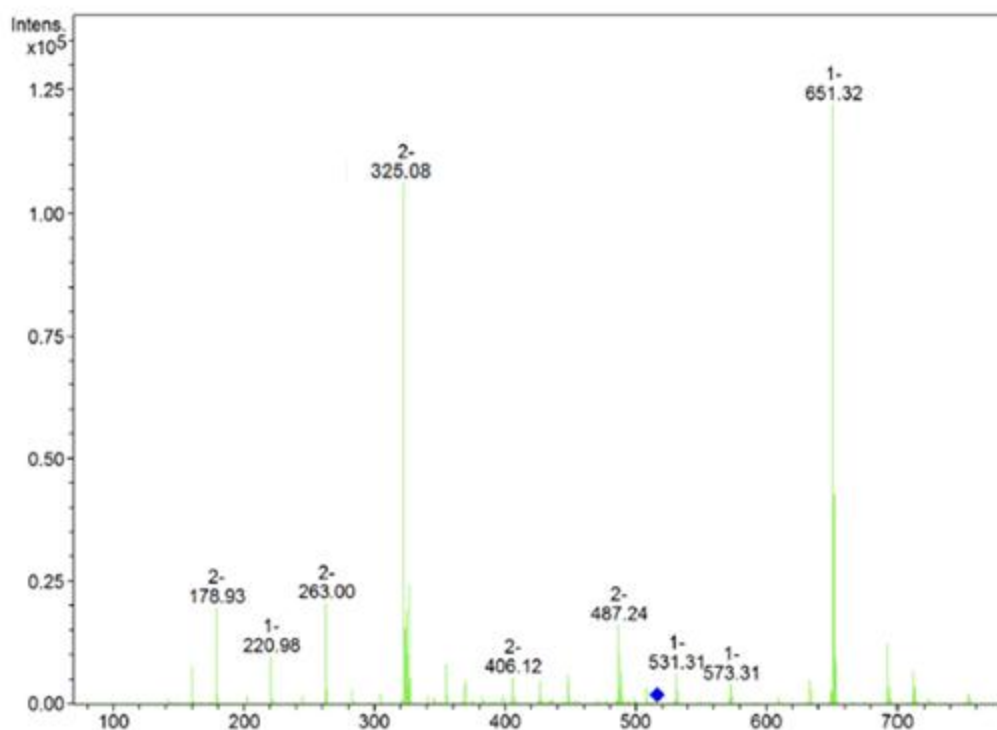
Για την μέγιστη δυνατή καθαρότητα μεταξύ των κορυφών 19 και 20 εξαιτίας του επικαλυπτόμενου χρόνου έκλουσης τους, πραγματοποιήθηκε επιπλέον HPLC με ισοκρατικό σύστημα έκλουσης, 58% μεθανόλη για διάστημα 20 λεπτών. Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού τους παρατίθενται στην **Εικόνα 84**.



Εικόνα 84: ισοκρατικός διαχωρισμός για τις κορυφές 19 και 20

ΚΟΡΥΦΗ 20

Για τη κορυφή 20 η οποία εκλούεται στα 48,03 min το MS (**Εικόνα 85**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=651$ και μοριακό ιόν $[M-2H]^{2-}$ με $m/z=325$ και αντιστοιχεί πιθανόν στην ουσία **κροκίνη 2** με MB 652. Δεν κατέστη δυνατή η περαιτέρω θραυσμάτωση της με MS2 λόγω περιορισμένης ποσότητας της ουσίας.

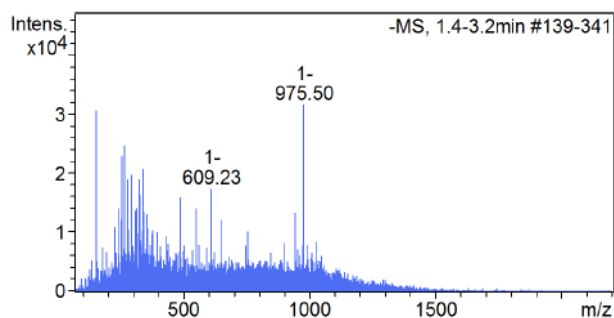


Εικόνα 85 : -MS κορυφής 20

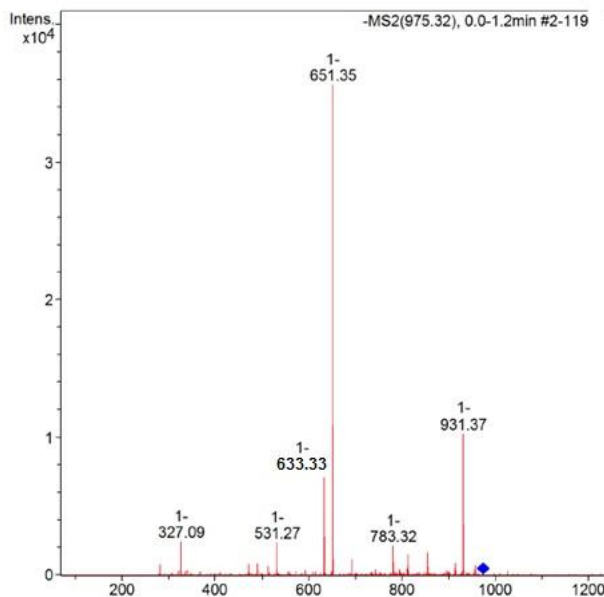
ΚΟΡΥΦΗ 21

Για τη κορυφή 21 η οποία εκλούεται στα 51,50 min το MS (**Εικόνα 86**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=975$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) της μάζας 975 δίνει τα εξής (**Εικόνα 87**) : 1) Θραύσμα $m/z=651$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Glc]^-$ μετά από απώλεια δυο μορίων γλυκόζης. 2) Θραύσμα $m/z=531$ αντιστοιχεί στην δομή $[3Glc+COO]^-$. 3) Θραύσμα $m/z=327$ αντιστοιχεί στην ουσία Κροκετίνη με MB 328. 4) Θραύσμα $m/z=783$ προκύπτει μετά από απώλεια ενός μορίου σακχάρου, δομή $[M-Glc-CH_2]^-$. Επίσης, 5) Θραύσμα $m/z=931$ προκύπτει μετά από απώλεια του καρβοξυτελικού άκρου, δομή $[M-COOH]^-$ (976-45) και 6) Θραύσμα $m/z=633$ προκύπτει από μετά από απώλεια ενός μορίου νερού από το $m/z=651$. Το σύνολο των φασματομετρικών στοιχείων, η σύγκριση αυτών και του χρόνου έκλουσης με αυτό του *C. sativus* ταιριάζουν με τα ευρήματα των (Moras et al., 2018 [70]) για την ουσία **cis-κροκίνη 4** με MB 976 (**Εικόνα 88**).

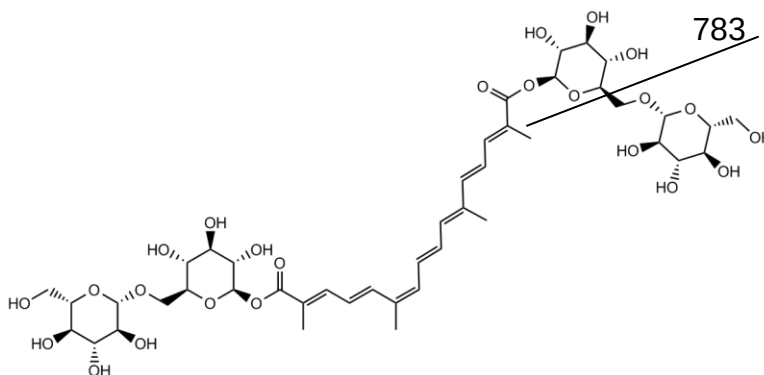
-MS, 1.4-3.2min #139-341



Εικόνα 86 : -MS κορυφής21



Εικόνα 87 : -MS2 κορυφής21 στα 594 m/z



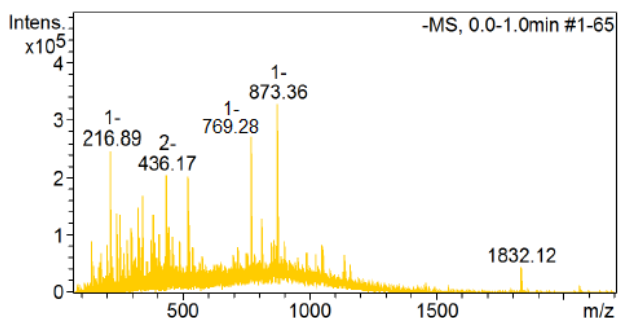
Εικόνα 88 : Μοριακή δομή της *cis*-κροκίνης 4

ΚΟΡΥΦΗ 22

Για τη κορυφή 22 η οποία εκλύεται στα 53,52 min το MS (**Εικόνα 89**) φανερώνει ουσία με $m/z=873$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) δίνει τα εξής (**Εικόνα 90**) : 1) Θραύσμα $m/z=651$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Hac]^-$ μετά από απώλεια ενός μορίου γλυκόζης και ενός μορίου οξικού οξέος (Hac), 2) Θραύσμα $m/z=489$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Glc-Hac]^-$ μετά από απώλεια δυο μορίων γλυκόζης. 3) Θραύσμα $m/z=327$ αντιστοιχεί στην Κροκετίνη με MB 328.

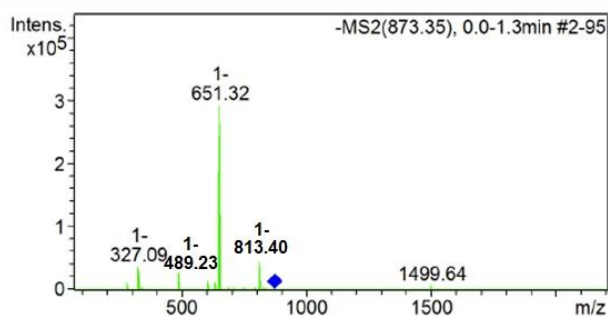
Τα αποτελέσματα της ένωσης της κορυφής 22 με μοριακό ιόν με m/z 873 συμφωνούν με τα ευρήματα του Moras et al., 2018 [70] και της δικής μας μελέτης για τον *C. sativus*, ως προς τον χρόνο έκλυσης και την θραυσμάτωση και αντιστοιχούν στην ουσία **trans-κροκίνη 3** (**Εικόνα 91**) με MB 814 παρουσία Οξικού Οξέος ($[M+Acetic\ Acid-H]^-$, $m/z=873$). Η παρουσία οξικού οξέος δικαιολογείται πιθανόν ως κατάλοιπο της υδατικής φάσης του διαχωρισμού με HPLC.

-MS, 0.0-1.0min #1-65

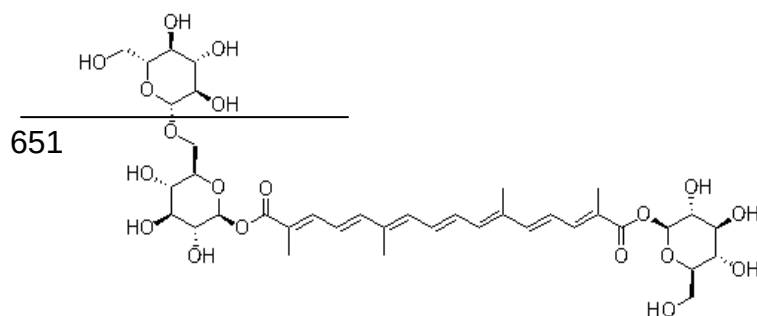


Εικόνα 89 : -MS κορυφής 22

-MS2(873.35), 0.0-1.3min #2-95



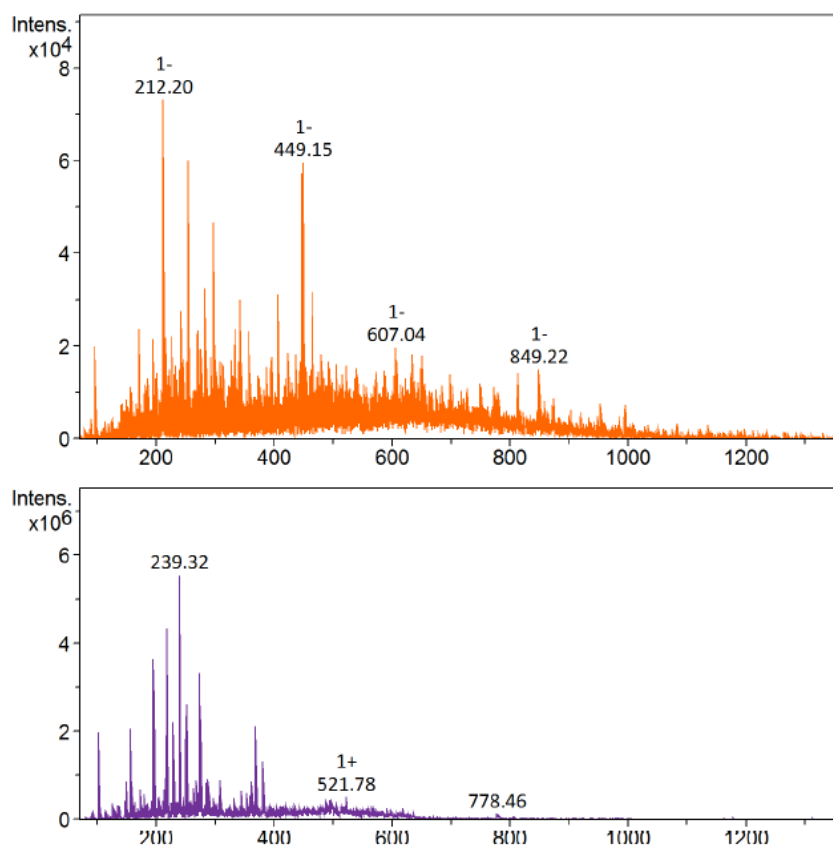
Εικόνα 90 : -MS2 κορυφής 22 στα 873 m/z



Εικόνα 91 : Μοριακή δομή της *trans*-κροκίνης 3

ΚΟΡΥΦΗ 23

Για τη κορυφή 23 η οποία εκλούεται στα 54,60 min δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση του περιεχομένου συστατικού-συστατικών λόγω περιορισμένης ποσότητας του δείγματος και αδυναμίας συσχέτισης με την γενικότερη βιβλιογραφία. **(Εικόνα 92)** . Υπάρχει όμως η πιθανότητα να είναι κάποιο αποκαροτενοειδές λόγω του ότι απορροφά στα 440 nm.



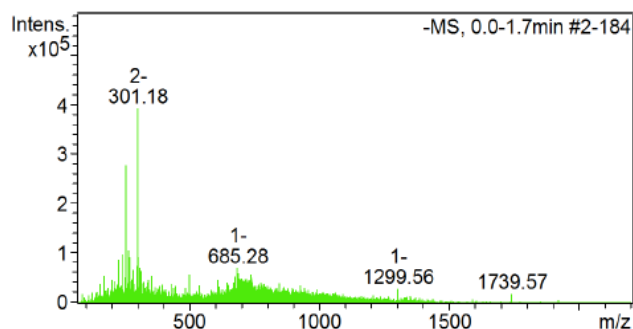
Εικόνα 92 : -MS και +MS κορυφής 23

ΚΟΡΥΦΗ 24

Για τη κορυφή 24 η οποία εκλούεται στα 57,83 min το MS (**Εικόνα 93**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=1299$. Περαιτέρω θραυσμάτωση με MS2 δίνει τα εξής (**Εικόνα 94**): 1) θραύσμα $m/z=813$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Glc]^-$ μετά από απώλεια δυο μορίων γλυκόζης, 2) θραύσμα $m/z=531$ προκύπτει από την δομή $[Glc-Glc-Glc-COO]^-$. 3) θραύσμα $m/z=1137$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc]$, δηλαδή απώλεια ενός μορίου γλυκόζης, 4) θραύσμα $m/z=1017$ αντιστοιχεί δομή $2[Glc-Glc-Glc-COO]^-$.

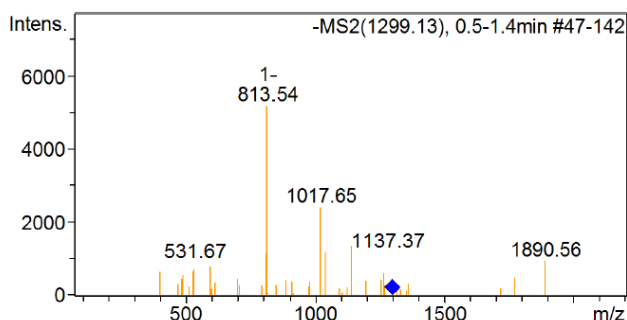
Και πάλι όπως και για την κορυφή 8 προκύπτει κροκίνη με 6 μόρια γλυκόζης και MB 1300. Η θραυσμάτωση είναι επίσης παρόμοια με τους Moraga et al.2013 [75]. Όμως ο συνδυασμός της υψηλής απορρόφηση στα 440 και επίσης υψηλής στα 308 nm υποδηλώνει ότι έχει η Κροκετίνη έχει *cis* διάταξη σε αντίθεση με την κορυφή 8. Από το σύνολο των φασματομετρικών δεδομένων πρόκειται για την επίσης νέα ουσία *cis*-κροκίνη 6 με MB 1300 (**Εικόνα 95**).

-MS, 0.0-1.7min #2-184

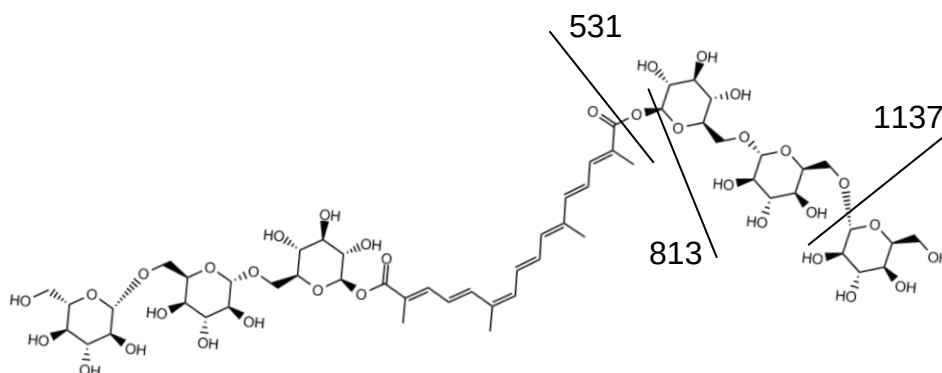


Εικόνα 93 : -MS κορυφής 24

-MS2(1299.13), 0.5-1.4min #47-142



Εικόνα 94: -MS2 κορυφής 24 στα 1299 m/z

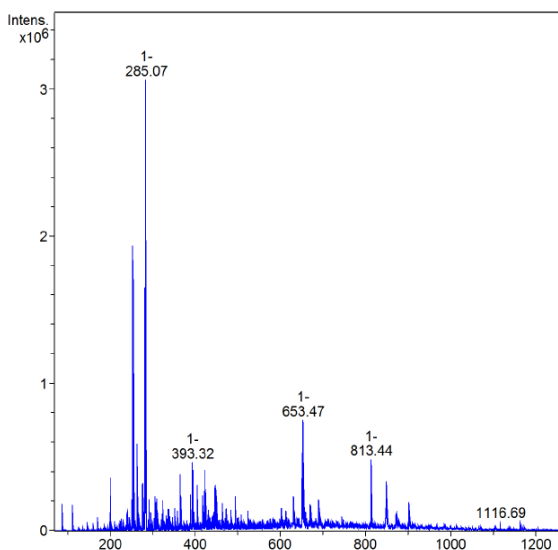


Εικόνα 95 : Μοριακή δομή της *cis*-κροκίνης 6

ΚΟΡΥΦΗ 25

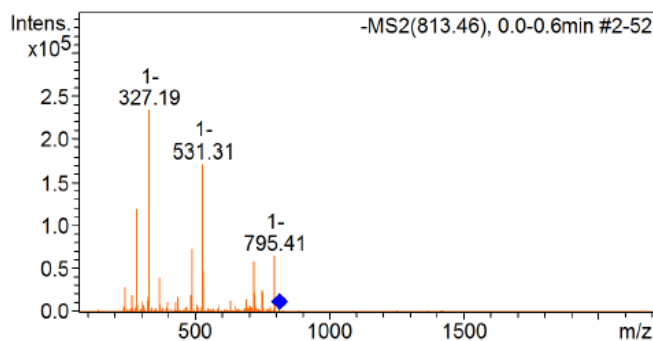
Για τη κορυφή 25 η οποία εκλούεται στα 63,19 min το MS (**Εικόνα 96**) φανερώνει ουσία με $[M-H]^-$ με $m/z=813$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) φαίνεται στην (**Εικόνα 97**) και δίνει τα εξής : 1) Θραύσμα $m/z=531$ αντιστοιχεί δομή $[M-crocetin]^-$ (Glc+Glc+Glc+COO⁻), 2) Θραύσμα $m/z=327$ αντιστοιχεί στην ουσία κροκετίνη με MB 328.

Η μοναδικότητα του θραύσματος 531 σε συνδυασμό με την απουσία των γνωστών θραυσμάτων της *cis*-κροκίνη 3 και *trans*-κροκίνη 3 (MB 489, MB 652), μαρτυρά την ύπαρξη όλων των οντοτήτων σακχάρων στο ένα καρβόξυ άκρο της Κροκετίνης. Προκύπτει λοιπόν μια νέα κροκίνη, η ***trans*-κροκίνη 3'** με MB 814, η οποία δεν έχει περιγραφεί προηγουμένως σε άλλη εργαστηριακή μελέτη (**Εικόνα 98**).

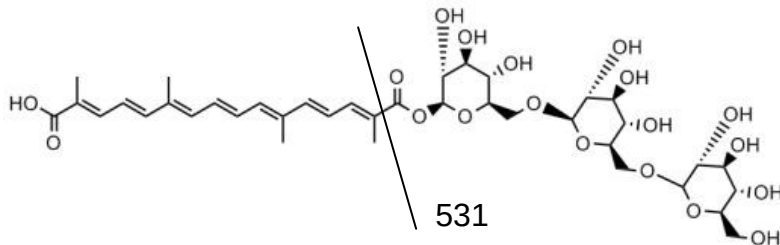


Εικόνα 96 : -MS κορυφής25

-MS2(813.46), 0.0-0.6min #2-52



Εικόνα 97 : -MS2 κορυφής25 στα 813 m/z



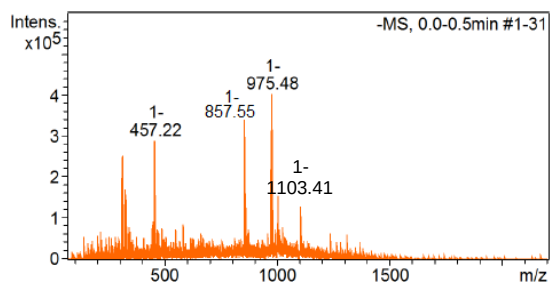
Εικόνα 98 : Μοριακή δομή της *trans*-κροκίνης 3' όπου φαίνεται η θέση θραυσμάτωσης της η μάζα του κάθε θραύσματος

ΚΟΡΥΦΗ 26

Για τη κορυφή 26 η οποία εκλούεται στα 70,07 min το MS (**Εικόνα 99**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=975$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) φαίνεται στην (**Εικόνα 100**) και δίνει τα εξής θραύσματα: 1) Θραύσμα $m/z=651$, αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-Glc]^-$ μετά από απώλεια δυο μορίων γλυκόζης (Κροκίνη 2). 2) Θραύσμα $m/z=813$, αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc]^-$ μετά από απώλεια ενός μορίου γλυκόζης (Κροκίνη 3). 3) Θραύσμα $m/z=327$ αντιστοιχεί στην ουσία Κροκετίνη με MB 328 .

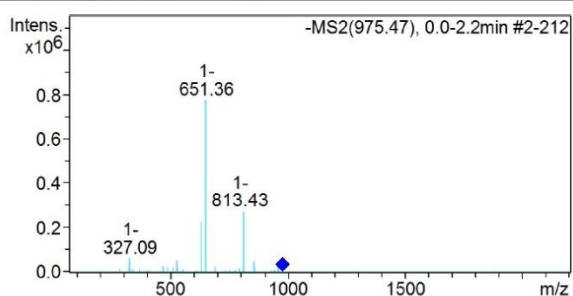
Το σύνολο των φασματομετρικών στοιχείων, η σύγκριση αυτών και του χρόνου έκλουσης με αυτού του *C. sativus* ταιριάζουν με τα ευρήματα των Moras et al., 2018 [70] και δείχνουν ότι η ένωση 26 αντιστοιχεί στην ουσία αντιστοιχεί στην **cis-κροκίνη 4** με MB 976 (**Εικόνα 101**).

-MS, 0.0-0.5min #1-31

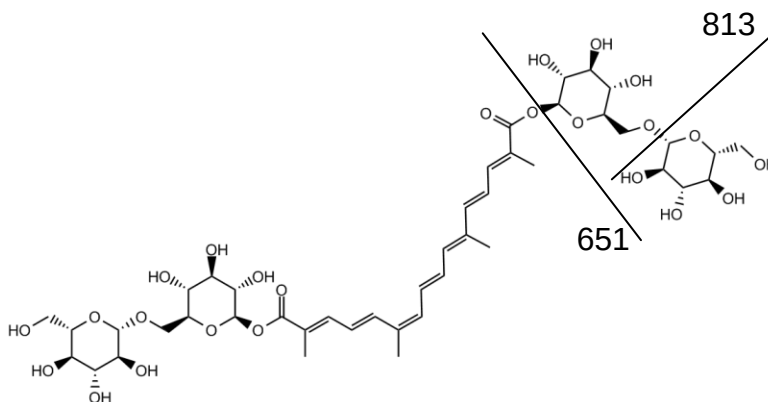


Εικόνα 99 : -MS κορυφής 26

-MS2(975.47), 0.0-2.2min #2-212



Εικόνα 100 : -MS2 κορυφής 26 στα 813 m/z

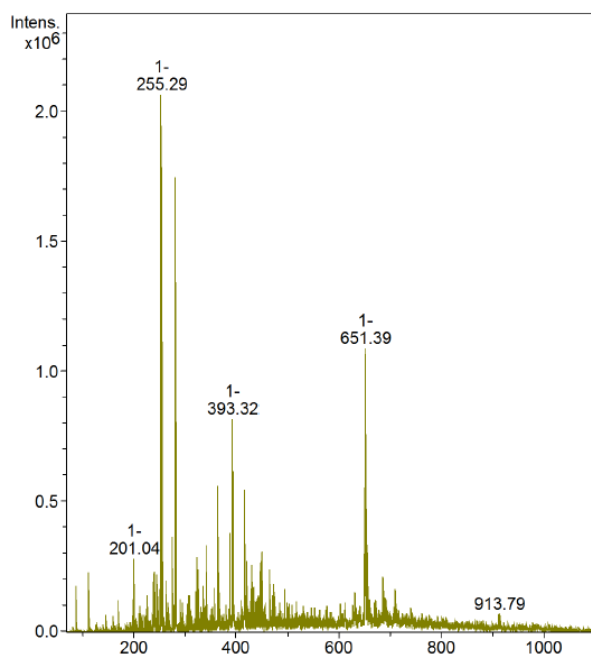


Εικόνα 101 : Μοριακή δομή της *cis*-κροκίνης 4 όπου φαίνονται οι θέσεις θραυσμάτωσης της και η μάζα του κάθε θραύσματος

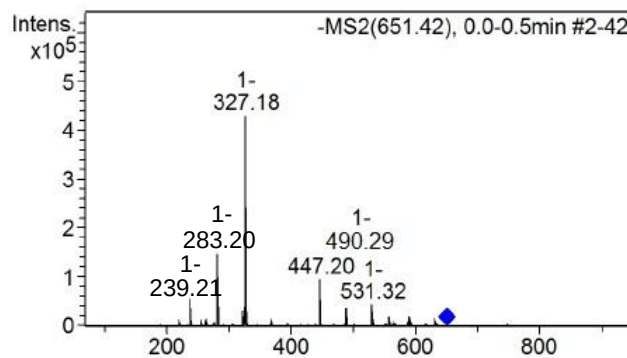
ΚΟΡΥΦΗ 27

Για τη κορυφή 27 η οποία εκλούεται στα 73,21 min το MS (**Εικόνα 101**) φανερώνει ουσία με μοριακό ιόν $[M-H]^-$ με $m/z=651$. Περαιτέρω θραυσμάτωση (MS2) δίνει τα εξής (**Εικόνα 102**) : 1) θραύσμα $m/z=447$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc-COO]^-$ μετά από απώλεια ενός μορίου γλυκόζης μαζί με το καρβοξυ άκρο. 2) θραύσμα $m/z=490$ αντιστοιχεί στην δομή $[M-Glc]^-$ (κροκίνη1), 3) θραύσμα $m/z=327$ αντιστοιχεί στην ουσία Κροκετίνη με MB 328. 4) θραύσμα με $m/z=283$ αντιστοιχεί δομή $[Crocetin-CO_2]$. 5) θραύσμα με $m/z=239$ αντιστοιχεί δομή $[Crocetin-2CO_2]$.

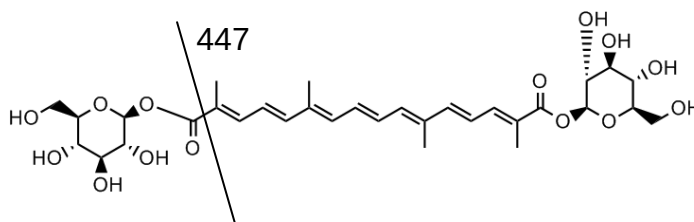
Το σύνολο των φασματομετρικών στοιχείων, η σύγκριση αυτών και του χρόνου έκλουσης με προηγούμενες εργασίες ταιριάζουν με τα ευρήματα των Moras et al., 2018 [70] και δείχνουν ότι η ένωση 27 αντιστοιχεί στην ουσία **trans-κροκίνη 2** με MB 652 (**Εικόνα 103**).



Εικόνα 101 : -MS κορυφής 27



Εικόνα 102 : -MS2 κορυφής 27 στα 651 m/z



Εικόνα 103 : Μοριακή δομή της *trans*-κροκίνης 2 όπου φαίνονται οι θέσεις θραυσμάτωσης της και η μάζα του κάθε θραύσματος

Κεφάλαιο Πέμπτο

Συζήτηση

Συζήτηση

Εξαιτίας της υψηλής εμπορικής του αξίας ακόμα και από την αρχαιότητα, ο *Crocus sativus* αποτελεί δικαιολογημένα τον πιο διεξοδικά μελετημένο αντιπρόσωπο της οικογένειας Iridaceae. Η μελέτη εστιάστηκε κυρίως στους στύλους του φυτού οι οποίοι αξιοποιούνται ως καρύκευμα ή ως αφέψημα και αφορά κυρίως το περιεχόμενο τους σε συστατικά. Έχουν ανευρεθεί πάνω από 150 συστατικά τα οποία μπορεί να είναι πτητικά συστατικά όπως η Σαφρανάλη υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό άρωμα του φυτού ή η Πικροκροκίνη υπεύθυνη για την πικρή γεύση. Επίσης, έχουν υψηλό περιεχόμενο σε Φλαβονοειδή και μια ιδιαίτερη κατηγορία αποκαροτενοειδών τις Κροκίνες. Οι Κροκίνες είναι υπεύθυνες για το πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα των στύλων και κατέχουν ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον εξαιτίας της ασυνήθιστης υδατοδιαλυτότητάς τους αλλά και τις μαρτυρίες από εργαστηριακές μελέτες στην συμβολή τους στην προστασία του οργανισμού από νευροεκφυλιστικές ασθένειες και έναντι του καταρράκτη των οφθαλμών.

Το πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης, αφορά τον ποιοτικό έλεγχο των στύλων *Crocus sativus* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές καλλιέργειας. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα πτητικά συστατικά με την συζευγμένη μέθοδο της Αέριου Χρωματογραφίας–Φασματομετρίας Μάζας ενός εμπορικού δείγματος *C. sativus* από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαγωγών Κοζάνης στην Ελλάδα, και δυο δείγματα στύλων *C. sativus* από τις περιοχές Birgand και Quaenat αντίστοιχα του ανατολικού Ιράν. Επίσης, τα τρία δείγματα *C. sativus* συγκρίθηκαν με ένα δείγμα του αυτοφυούς *Crocus nivalis* από την ευρύτερη περιοχή του Παναχαϊκού όρους στην Πελοπόννησο. Η μελέτη έδειξε ότι οι τα τρία δείγματα *C. sativus* δεν

εμφάνισαν ποιοτικές διαφορές ως προς τον αριθμό των συστατικών. Αναγνωρίστηκαν όλα τα βασικά συστατικά των στύλων όπως η σαφρανάλη, η ισοφορόνη και η HTCC. Υπάρχουν διαφορές όμως ως προς τις ποσότητες τους και τις σχετικές τους αναλογίες. Συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο του *C.sativus* από την περιοχή Quaenat είναι πιο πλούσιο σε σαφρανάλη και βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία ως προς τα υπόλοιπα συστατικά σε σχέση με τα άλλα δυο δείγματα. Επίσης είναι πιο πλούσιο σε 4-κετοισοφορόνη σε περίπου διπλάσια ποσότητα από το δείγμα της περιοχής Birgand και περίπου τετραπλάσια ποσότητα από αυτό της περιοχής της Κοζάνης. Επιπροσθέτως, το αιθέριο έλαιο του *C.sativus* από την περιοχή Birgand είναι πιο πλούσιο σε ισοφορόνη και βρίσκεται σε τριπλάσια αναλογία από το δείγμα της Κοζάνης και σε διπλάσια από το δείγμα του Quaenat. Επίσης είναι πιο πλούσιο σε 2,2,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξαδιενόνη και έχει παρόμοια περιεκτικότητα με αυτό του Birgand. Το δείγμα του Birgand είναι τρεις φορές πιο πλούσιο σε 4-υδροξυ-3,5,5-τριμέθυλοκυκλοεξ-2-ενόνη από την περιοχή της Κοζάνης και 2 φορές από αυτό του Quaenat. Έχει επίσης την μεγαλύτερη αναλογία ως προς τα υπόλοιπα συστατικά. Για το συστατικό 4-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλο-3-οξο-κυκλοεξαν-1,4-διεν-1-καρβοξαλδεϋδη, το δείγμα του Birgand είναι πιο πλούσιο από τις άλλες δυο περιοχές, όμως στο δείγμα του Quaenat είναι σε μεγαλύτερη αναλογία. Τέλος, το αιθέριο έλαιο του *C.sativus* από την περιοχή της Κοζάνης είναι πιο πλούσιο σε HTCC και σε μεγαλύτερη αναλογία, ενώ ακολουθεί αυτό της περιοχής Birgand σε ποσότητα και σε περιεκτικότητα.

Τα ευρήματα αυτά είναι σε αντίθεση με αυτά των πτητικών συστατικών του *C. nivalis* καθώς σε αυτό υπάρχει παντελής έλλειψη τους. Η αντίθεση αυτή εικάζεται ότι σχετίζεται με την περίοδο ανάπτυξης του *C. nivalis* στο τέλος του χειμώνα και

στην προσπάθεια του να αναπτυχθεί και να καταφέρει να διαπεράσει το χιόνι-πάγο του εδάφους πραγματοποιεί αλλαγές στην φυσιολογία των κυττάρων του και συγκεκριμένα στην ενεργειακή απόδοση της κυτταρικής αναπνοής. Αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την εκπεμπόμενη θερμότητα από τα κύτταρα του ώστε να καταφέρει να λιώσει τοπικά τον πάγο και να αναπτυχθεί περαιτέρω. Αυτή η αύξηση όμως έχει ως αποτέλεσμα των απώλεια των θερμοευαίσθητων και πτητικών συστατικών των στύλων.

Στην συνέχεια μελετήθηκε το χρωματογραφικό προφίλ που προκύπτει από το μεθανολικό εκχύλισμα των στύλων *C.sativus* και *C. nivalis* σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης που προτάθηκε από τους Koulakiotis et al., σε αναλογία Μεθανόλη-νερό 1:1. Αυτό έγινε με την βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Προκαταρκτικά πειράματα στους ελάχιστους μελετημένους στύλους του *C. nivalis* έδειξαν ότι υπάρχει πληθώρα συστατικών και εξαιτίας της ελάχιστης σχετικής βιβλιογραφίας σχετική με το φυτό κρίθηκε επιτακτική η διερεύνηση της βέλτιστης μεθόδου HPLC ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός των συστατικών ο οποίος θα επιτρέψει πιο αξιόπιστα συμπεράσματα. Αυτός βρέθηκε ότι πραγματοποιείται με μεταβολή της αναλογίας των διαλυτών από 35% έως 70% για την Μεθανόλη σε διάστημα 90 λεπτών σε σύστημα διαλυτών Μεθανόλη:οξικό οξύ 1%. Βρέθηκε ότι υπάρχουν λιγότερο σημαντικές διαφορές για τα χρωματογραφικά προφίλ των τριών δειγμάτων *C.sativus* και αφορούν κυρίως της % περιεκτικότητα των συστατικών. Οι διαφορές είναι κυρίως ποσοτικές και δεν υπάρχουν ποιοτικές. Η *trans*-κροκίνη 4 η οποία είναι το κυρίαρχο συστατικό των στύλων του *C. sativus* (~50% του συνόλου των συστατικών) στο δείγμα από την περιοχή της Κοζάνης έχει σχεδόν διπλάσια συγκέντρωση από τους δυο Ιρανικούς *C. sativus* οι οποίοι έχουν

παρόμοια επίπεδα. Επιπλέον, ο *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης έχει σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πικροκροκίνη από αυτόν της περιοχής Birgand ενώ διπλάσια από τον *C. sativus* της περιοχής Quaenat. Αντίθετα για της HTCC, *trans*-κροκίνη 5 και *trans*-κροκίνη 3, η περιεκτικότητα βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα και για τα τρία δείγματα *C. sativus* ενώ την *cis*-crocin 5 υπάρχει ελάχιστα μεγαλύτερη περιεκτικότητα στον *C. sativus* από την περιοχή της Κοζάνης από τους από τους δυο Ιρανικούς *C. sativus*.

Η σύγκριση όμως των χρωματογραφικών προφίλ των δειγμάτων *C. sativus* με αυτό του *C. nivalis* έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ τους. Ο *C. sativus* έχει σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε κροκίνες (17 φορές, Χ. Λυμπεροπούλου [47]), κάτι το οποίο δικαιολογεί την σημαντική εμπορική του αξία ως επιλεγμένο είδος.

Το δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης εστίασε στην Φυτοχημική Μελέτη Στύλων *Crocus nivalis*. Για να επιτευχθεί αυτό συλλέχθηκε αρκετή ποσότητα από κάθε κορυφή του μεθανολικού εκχυλίσματος των στύλων του *Crocus nivalis* και με την χρήση της τεχνικής της Φασματομετρίας Μάζας (MS, MS2) κατέστη δυνατή η αναγνώριση 20 εκ των 30 συστατικών.

Πιο αναλυτικά, βρέθηκε ότι στους στύλους του *C. nivalis* υπάρχει άφθονη παρουσία Φλαβονοειδών τα οποία δεν συναντώνται στους στύλους τους *C. sativus*. Αυτά είναι γλυκοζίτες καμφερόλης με ποικίλο αριθμό σακχάρων κυρίως γλυκόζης ή ραμνόζης ή συνδυασμού τους, όπως η καμφερόλη-3-σοφοροζίτης με δύο μόρια γλυκόζης και MB 610 το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό σε περιεκτικότητα των στύλων με χρόνο έκλουσης τα 28 λεπτά, ή γλυκοζίτες κερσετίνης όπως η κερσετίνη-3,7-O-διεξοζίτης (ή κερσετίνη-3-O-διεξοζίτης) με MB 626 και χρόνο έκλουσης τα 25 λεπτά

το οποίο αποτελεί το τέταρτο σε αφθονία συστατικό. Παρόμοιας φύσης είναι πιθανόν και τα δυο συστατικά της κορυφής 15. Με χρόνο έκλουσης τα 42 λεπτά πιθανολογείται ότι πρόκειται για 2 γλυκοζίτες καμφερόλης, έναν με 3 μόρια ραμνόζης και 1 γλυκόζης με MB 886 και έναν με 2 μόρια γλυκόζης και 2 δύο μόρια ραμνόζης και MB 1094 κάτι το οποίο μαρτυρά η θραυσμάτωση τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατέχει επίσης η ουσία της κορυφής 3 με χρόνο έκλουσης τα 21 λεπτά, MB 328 και πιθανή μοριακή δομή ανάλογης της πικροκροκίνης.

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζουν τα ευρήματα σχετικά με τις Κροκίνες. Ανιχνεύτηκαν 10 διαφορετικές κροκίνες από τις οποίες οι 3 αποτελούν νέα επιστημονικά ευρήματα. Οι υπόλοιπες 7, έχουν παρατηρηθεί σε άλλες εργαστηριακές μελέτες και τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τα φασματομετρικά στοιχεία της υπάρχουσας βιβλιογραφίας και αφορούν τους στύλους κυρίως του γένους *Crocus*. Το σύνολο των επιστημονικών δεδομένων έχουν συγκεντρωθεί και παρατίθενται στον Πίνακα 3, σελ 23. Η αναγνώριση και ταυτοποίηση τους βασίστηκε στις εργασίες των Moras et al., 2018 [70], Rubio-Moraga et al., 2013 [75], Carmona et al., 2006 [62] και Tarantilis et al., 1995 [55] και συσχετίστηκαν οι χρόνοι έκλουσης των συστατικών αλλά και η θραυσμάτωση τους (MS, MS2) .

Ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε μια κροκίνη με 2 μόρια γλυκόζης και MB 652 (κροκίνη 2) με χρόνο έκλουσης τα 48 λεπτά. Ανιχνεύτηκε αλλά δεν ταυτοποιήθηκε μια κροκίνη επίσης με 2 μόρια γλυκόζης και MB 652 (κροκίνη 2) με χρόνο έκλουσης τα 48 λεπτά λόγω περιορισμένης ποσότητας της. Ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν τρεις κροκίνες με 4 συνολικά μόρια γλυκόζης με MB 976 (δύο *cis*-κροκίνη 4 και μια *trans*-κροκίνη 4) και χρόνους έκλουσης τα 70 και 51 λεπτά για τις *cis* δομές και τα

47 λεπτά για την *trans*. Ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε μια κροκίνη με 5 μόρια γλυκόζης και MB 1138 (*trans*-κροκίνη 5) με χρόνο έκλουσης τα 38 λεπτά. Ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν δύο κροκίνες με 3 μόρια γλυκόζης και MB 814 (*trans*-κροκίνη 3' και *trans*-κροκίνη 3) με χρόνο έκλουσης τα 63 και 53λεπτά αντίστοιχα. Από την θραυσμάτωση της *trans*-κροκίνη 3' προκύπτει μοναδικό θραύσμα με m/z 531 το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη όλων των μορίων γλυκόζης στο ένα καρβόξυ άκρο της κροκετίνης. Εύρημα πολύ σημαντικό καθώς δεν υπάρχει παρόμοια εργαστηριακή αναφορά η οποία να κάνει λόγω για τέτοιου είδους δομής κροκίνης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν δύο κροκίνες με 6 μόρια γλυκόζης και MB 1300 (*trans*-κροκίνη 6 και *cis*-κροκίνη 6) με χρόνο έκλουσης τα 31 και 58 λεπτά αντίστοιχα. Ο συγκεκριμένος τύπος κροκινών δεν έχει αναφερθεί σε άλλη προηγούμενη μελέτη σχετική με τους στύλους του *C. sativus* ή τους στύλους κάποιου άλλου αντιπρόσωπου του γένους *Crocus*. Παρόμοιος τύπος όμως κροκίνης με MB 1300 αλλά και Θραυσμάτωση έχει αναφερθεί από τους Moraga et al., 2013 [75] στα τέπαλα του *C. sativus*. Η μια από τις εν λόγω κροκίνες με χρόνο έκλουσης τα 32 λεπτά αποτελεί μάλιστα την κύρια κροκίνη των στύλων του *C. nivalis* σε ποσοστό 31% επί του συνόλου τους .

Τέλος, να αναφερθεί ότι για τις Κορυφές 1, 2, 4, και 11 δεν πραγματοποιήθηκε συλλογή υλικού λόγω της περιορισμένης ποσότητας τους ή της παρουσίας πολλών συστατικών σε αυτές κάτι το οποίο καθιστά δύσκολη την επεξεργασία και μελέτη τους. Για τις Κορυφές 16Γ, 17 και 23 η αναγνώριση και ταυτοποίηση τους ήταν ανεπιτυχής είτε λόγω αδυναμίας συσχέτισης των ευρημάτων με την υπάρχουσα βιβλιογραφία είτε λόγω της περιορισμένης ποσότητάς τους. Επιπλέον, για την

Κορυφή 14 εκτός της κερσετίνη 3-O-γλυκοσίδιο 7-O-ραμνοσίδιο είναι πιθανόν ότι αυτή ίσως περιέχει αποκαροτενοειδές με δομή κροκίνης 5 και MB 1138. Δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση της όμως λόγω μη ιονισμού της ή λόγω καταστροφής της. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στο ότι παρουσιάστηκε μοριακό ιόν με $m/z=1337$ (βλέπε Κορυφή 13), η έντονη απορρόφηση στα 440nm, αλλά και το χρώμα της συλλεχθείσας κορυφής (έντονο κίτρινο) παραπέμπει σε χαρακτηριστικά κροκίνης.

Όλα τα προηγούμενα ευρήματα σχετικά με την φυτοχημική σύσταση των στύλων του *C. nivalis* προκύπτει ότι ο *C. sativus* έχει μεγαλύτερη συνολική περιεκτικότητα σε κροκίνες όπως επίσης περιέχει και ουσίες οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν στον *C. nivalis* όπως οι ουσίες πικροκροκίνη και HTCC οι οποίες αποτελούν βασικές ουσίες των στύλων του *C. sativus*. Από την άλλη όμως, ο *C. nivalis* περιέχει πληθώρα συστατικών τα οποία δεν περιέχονται με την σειρά τους στον *C. sativus* και αφορούν είτε ήδη μελετημένα φλαβονοειδή και κροκίνες είτε μη μελετημένα-νέα συστατικά τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω από την επιστημονική κοινότητα με έντονο ενδιαφέρον για τις κροκίνες *trans*-κροκίνη 6, *cis*-κροκίνη 6, *trans*-κροκίνη 3'.

Κεφάλαιο Έκτο

Περίληψη-Abstract

Περίληψη

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ *CROCUS NIVALIS*

Το γένος *Crocus* αποτελείται από 160 είδη παγκοσμίως, με 12 από τα 31 taxa που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα να είναι ενδημικά. Ο *Crocus sativus* είναι ο μόνος ο οποίος καλλιεργείται συστηματικά για τους στύλους του, οι οποίοι αποτελούν το ευρέως γνωστό σαφράν. Το σαφράν περιέχει πληθώρα συστατικών όπως φλαβονοειδή και κροκίνες, τα οποία θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμα στην θεραπεία της γνωστικής επιδείνωσης και άλλων παθήσεων που σχετίζονται με το γήρας. Παρόλο που πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί για τον *C. sativus*, ελάχιστα είναι γνωστά για τη φυτοχημική σύσταση άλλων αυτοφυών κρόκων και τις βιολογικές τους ιδιότητες. Στην παρούσα μελέτη, αντικείμενο ήταν ο *Crocus nivalis* από το Παναχαϊκό όρος (Αχαΐα Πελοποννήσου) επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη. Ο οποίος αποτελεί ενδημικό είδος της Βαλκανικής περιοχής, και ανθίζει την άνοιξη. Στο εργαστήριο μας, μελετήθηκε η ταυτότητα των πτητικών ενώσεων, οι οποίες εκχυλίστηκαν με διαιθυλαιθέρα μέσω GC-MS και των πολικών μεταβολιτών οι οποίες εκχυλίστηκαν με μεθανόλη/νερό, 1/1 v/v, μέσω HPLC. Αναλύθηκαν συνολικά τρία δείγματα *C. sativus*, ένα από την περιοχή της Κοζάνης στην Ελλάδα και δύο από τις περιοχές Birgand και Quaenat του Ιράν. Αυτά συγκρίθηκαν με αυτό του *C. nivalis*. Κανένα από τα γνωστά πτητικά συστατικά τα οποία ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα *C. sativus*, δεν ανιχνεύτηκε στον *C. nivalis*. Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι διαφορές του ελληνικού και των ιρανικών *C. sativus* είναι κυρίως ποσοτικές και όχι ποιοτικές. Αντίθετα, η χρωματογραφική ανάλυση αποκάλυψε όχι μόνο ποσοτικές

διαφορές στην συγκέντρωση γνωστών κροκίνων των στύλων, αλλά και σημαντικές ποιοτικές διαφορές εξαιτίας της παρουσίας πολλών κορυφών οι οποίες απουσιάζουν από τον *C. sativus*. Προκειμένου να χαρακτηριστούν τα συστατικά, αυτά απομονώθηκαν με ημιπαρασκευαστικό HPLC και οι καθαρές ενώσεις μελετήθηκαν μέσω Φασματομετρία Μάζας. Ως αποτέλεσμα αυτών, ταυτοποιήθηκαν 10 γλυκοζίτες φλαβονοειδών (κυρίως καμφερόλης) και 10 κροκίνες. Δείξαμε για πρώτη φορά ότι η κύρια κροκίνη των στύλων του *C. nivalis* είναι η *trans*-κροκίνη 6, η οποία δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως στους στύλους άλλου *Crocus* taxon. Επίσης ανιχνεύσαμε την παρουσία μιας νέας κροκίνης 3 με μοναδική μοριακή δομή. Τα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σε μια ευρύτερη κατανόηση της χημειοποικιλότητας του γένους *Crocus* και πιθανές θεραπευτικές του χρήσεις.

Abstract

The genus of *Crocus* consists of 160 species worldwide, while in Greece the existence of 31 taxa, 12 of which are endemic, has been recorded. *Crocus sativus* is the only one cultivated for its styles, which constitute the well known saffron. Saffron contains a plethora of components like flavonoids and crocins, which could be of value to the treatment of cognitive impairment and other age related disorders. Although many studies have been conducted on *C. sativus*, little is known about the phytochemical composition of the other indigenous crocuses and their biological properties. In this study, we focused on *Crocus nivalis* from Panahaiko mountain (Achaia, Peloponnesus) which is an endemic species of the Balkan area and blooms in spring. In our lab, we studied the profile of volatiles extracted with diethylether by GC-MS, and the identity of polar metabolites extracted with methanol/water, 1/1 v/v, by HPLC. We analyzed in total three samples of *C. sativus*, one from the area of Kozani in Greece and two from the areas of Birgand and Quaenat respectively, that are located in Iran. None of the main known volatile components which were identified in *C. sativus*, was detected in *C. nivalis*. In addition, we founded that that the differences between the Greek samples and the Iranian ones of *C. sativus* are predominantly quantitative but not qualitative. The chromatographic analysis revealed not only quantitative differences in style concentration of known crocins, but also important qualitative differences due to the appearance of many peaks not present in *C. sativus*. In order to characterize the components, those were isolated by semi-preparative HPLC and the pure compounds were studied by Mass Spectrometry. As a result, 10 flavonol

glycosides (mostly of kaempferol) and 10 crocins were identified. We show for the first time that the main crocin in *C. nivalis* styles is *trans*-crocine 6, which has not been previously reported in styles of other *Crocus* taxon. We also show the presence of a new crocin 3 with unique chemical structure. The results of our lab could contribute to a wider understanding of the chemodiversity of the *Crocus* genus and potential therapeutic uses.

Κεφάλαιο Έβδομο

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

1. Χρυσάνθη Δ., «Συμβολή στον χαρακτηρισμό και στη διερεύνηση βιολογικών ιδιοτήτων των στύλων ειδών γένους *Crocus*». Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, (2010).
2. Πυλαρά Α., «Συμβολή στην κυτταρολογία, μορφομετρία και χημική ανάλυση των στύλων ενδημικών ειδών του γένους *Crocus* L. από την Πελοπόννησο». Μεταπτυχιακή Εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, (2007).
- 3 https://www.espaceagro.com/horticulture-plante-biocarburant/recherche-colchique-dautomne-_i281273.html
4. «ΚΡΟΚΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΑ». <http://www.bioathens.com/krokos-ke-istoria/>
5. «Κρόκος η αρχαία βαφή». <http://elhalfashbacks.blogspot.com/2018/04/krokos-archaia-vafi.html>
6. «Κρόκος (Ζαφορά, σαφράν, *Crocus sativus*)» .
<http://3lyk-n-filad.att.sch.gr/secret/botana/3Fyta/Krokos/Crokus.htm>
7. «Trade and use of saffron». https://en.wikipedia.org/wiki/Trade_and_use_of_saffron
8. «Κρόκος». <https://el.wikipedia.org/wiki/Κρόκος>
9. Decker F., «Beiträge zur Kenntnis des Crocetins». Arch. Pharm., 252, 139–160, (1914).
10. Kuhn R, Winterstein A., «Über die Konstituten des Pikrocrocins und seine Beziehung zu den Carotin-Farbstoffen des Safrans». Chem Ber 67:344-357, (1934).
11. Buchecker R., Eugster CH., «Absolute configuration of picrocrocine». Helv Chim Acta 56:1121-1124, (1973).
12. Winterstein E., Telezcky I. «Constituents of saffron». Helv. Chim. Acta 5, 376 (1922).
13. Kuhn R, Low I. «Synthesis of Safranal». Ber., 74, 219 (1941).
14. Tarantilis P., Tsoupras G., Polissiou M., «Isolation and Identification of the Aroma Components from Saffron (*Crocus sativus*)». J. Agric. Food Chem. 45, 459-462 (1997).
15. Lamari FN., Papasotiropoulos V., Tsis D., Bariamis SE., Sotirakis K., Pitsi E., Vogiatzoglou AP., Iatrou G., «Phytochemical and genetic characterization of styles of wild *Crocus* species from the island of Crete, Greece and comparison to those of cultivated *C.sativus*». Fitoterapia 130, 225–233, (2018)
16. Ahmad S., Ashraf BN., «Apocarotenoids of *Crocus sativus* L: From biosynthesis to pharmacology». Medicine Srinagar India 978-981-10-1899-2 , (2016)

- 17.. Baba SA., Mohiuddin T., Basu S., Swarnkar MK., Malik A.H., Wani Z.A., Abbas N., Singh AK., Ashraf N., «Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis». BMC Genomics, 16:698, (2015).
18. Demurtas O., «Candidate Enzymes for Saffron Crocin Biosynthesis Are Localized in Multiple Cellular Compartments». DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.0181>, (2018).
19. Ahrazem O., Rubio-Moraga A., Jimeno ML., Gómez-Gómez L., «Structural characterization of highly glucosylated crocins and regulation of their biosynthesis during flower development in *Crocus*». Front Plant Sci, (2015).
20. Raimund N., «Subcellular Spice Trade Routes: Crocin Biosynthesis in the Saffron *Crocus (Crocus sativus)*». Plant physiology 177(3):869-870 · (2018).
21. Moratalla-López N., Lorenzo C., Alonso G., and Sánchez A., «Kaempferol Glycosides in *Crocus*: Sources, Biosynthesis, and Uses». Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63485-828-1, (2016).
22. Khazdair M., «The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review». Avicenna J Phytomed. 5(5): 376–391. (2015).
23. Papandreou M., Tsachaki M., Efthimiopoulos S., Cordopatis P., Lamari FN., Margarity M., «Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection». Behavioural Brain Research 219, 197–204, (2011).
24. Saleem S., Ahmad M., Ahmad AS., Yousuf S., Ansari MA., Khan MB., Ishrat T., Islam F., «Effect of Saffron (*Crocus sativus*) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats». J Med Food. 9:246–253, (2006).
25. Mousavi S.H., Tayarani Z.N., Parsaee Z.ZH., «Protective Effect of Saffron Extract and Crocin on Reactive Oxygen Species-Mediated High Glucose-Induced Toxicity in PC12 Cells». Cell Mol Neurobiol, 30:185–191, (2010).
26. Linardaki ZI., Orkoulas MG., Kokkosis AG., Lamari FN., Margarity M., «Investigation of the neuroprotective action of saffron (*Crocus sativus* L) in aluminum-exposed adult mice through behavioral and neurobiochemical assessment». Food Chem Toxicol, 52:163–170, (2013).
27. Moallem S.A., «Effect of aqueous extract of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma against subacute effect of diazinon on specific biomarkers in rats». Toxicology and Industrial Health, DOI: 10.1177/0748233712452609, (2014).
28. Bathaie SZ, Mousavi SZ. «New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients». Crit Rev Food Sci Nutr. 50:761–786. (2010).

29. Li, S., Jiang, S., Jiang, W., Zhou, Y., Shen, X.Y., Luo, T., Kong, L.P., and Wang, H.Q. «Anticancer effects of crocetin in human esophageal squamous cell carcinoma KYSE-150 cells». *Oncol Lett* 9(3):1254-1260, (2015).
30. Abdullaev F. «Biological effects of saffron». *BioFactors* (Oxford England) 4:83–86, (1993).
31. Chryssanthi, D.G., Lamari, F.N., Iatrou, G., Pylara, A., Karamanos, N.K., Cordopatis, P. «Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation by Style Constituents of Different Crocus Species». *Anticancer Res* 27(1A):357-362, (2007).
32. Chryssanthi, D.G., Dedes, P.G., Karamanos, N.K., Cordopatis, P., and Lamari, F.N. «Crocetin inhibits invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells via downregulation of matrix metalloproteinases». *Planta Med* 77(2):146-151, (2011).
33. Ebrahim-Habibi MB, Amininasab M, Ebrahim-Habibi A, Sabbaghian M, Nemat-Gorgani M., «Fibrillation of alpha-lactalbumin: effect of crocin and safranal, two natural small molecules from *Crocus sativus*». *Biopolymers*. 93:854–865, (2010).
34. Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F. «Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model». *Pharmacol Biochem Behav*. 81:805–813, (2005).
35. Purushothuman S, Nandasena C, Peoples CL, El Massri N, Johnstone DM, Mitrofanis J, Stone J. «Saffron pre-treatment offers neuroprotection to Nigral and retinal dopaminergic cells of MPTP-Treated mice». *J Parkinsons Dis*. ;3:77–83, (2013).
36. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Rahimi A. «Effect of safranal on extracellular hippocampal levels of glutamate and aspartate during kainic acid treatment in anesthetized rats». *Planta Med*. 74:1441–1445, (2008).
37. Moosavi SM, Ahmadi M, Amini M, Vazirzadeh B, Sari I. «The Effects of 40 and 80 mg Hydro-alcoholic Extract of *Crocus Sativus* in the Treatment of Mild to Moderate Depression». *J Mazandaran Univ Med Sci (JMUMS)*, (2014)
38. Shahmansouri N., «A randomized, double-blind clinical trial comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L with fluoxetine for improving mild to moderate depression in post percutaneous coronary intervention patients». *J Affect Disord*. 155:216–222, (2014).
39. Makri O.E., Ferlemi A.V., Lamari F.N., Georgakopoulos C.D., «Saffron administration prevents selenite-induced cataractogenesis». *Mol Vis* 19:1188-1197, (2013).
40. Φερλέμη Α.Β., «Φυτοχημικά συστατικά των φύλλων του *Vaccinium corymbosum* και των στύλων του *Crocus sativus* για την αντιμετώπιση του καταρράκτη και άλλων σεληνιο-επαγόμενων οξειδωτικών βλαβών». Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, (2016).

41. Βούκλιζα Φ. «Διερεύνηση της επίδρασης της κροκετίνης στο ένζυμο της καλπαΐνης». Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, (2016).
42. «*Crocus nivalis*», https://species.wikimedia.org/wiki/Crocus_nivalis
43. Σκούρη Ε., «*Crocus nivalis*, ο προάγγελος της άνοιξης». <https://dasarxeio.com/2016/05/07/31206/>
44. «*Crocus nivalis*», <http://www.greekflora.gr/el/flowers/0198/Crocus-nivalis>
45. «*Crocus macedonicus*», <https://dasarxeio.com/2018/10/07/61490/>
46. «The '*C. sieberi-clade*' in Greece». <http://wildgreeceeditions.com/crocus-of-greece/2-uncategorised/52-crocus-sieberi-clade.html>
47. Λυμπεροπούλου Χ., «Φυτοχημική Ανάλυση Στύλων Διαφορετικών Ταξα του Γένους *Crocus*». Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, (2016).
48. <http://chimikoergastirio.blogspot.com/2009/11/s.html>
49. http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/G/gc_ms.html
50. Gates P., «High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Hplc/Ms)». University of Bristol, (2004).
51. Kanakis C.D., Daferera D.J., Tarantilis P. and Polissiou M.G., «Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of Safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron». J. Agric. Food Chem. 52:4515-4521, (2004).
52. Ταραντίλης ΠΑ., Παπάς Χ., «Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)». Ενόργανη Ανάλυση-Εργαστήριο, Πανεπιστημιακή Παράδοση-Παρουσίαση, <https://docplayer.gr>, (2018)
53. Μαρκοπούλου Α., «Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης». Πανεπιστημιακή Παράδοση-Παρουσίαση, <http://www.markopoulou.gr>, (2018).
54. Κουλακιώτης Ν. «Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθοδολογίας Για Τον Χρωματογραφικό Προσδιορισμό Βιοδραστικών Συστατικών Του *Crocus sativus* L. Και Άλλων Ενδημικών ταξα». Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, (2009)
55. Tarantilis PA., Tsoupras G., Polissiou M., «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, (1995)..107-118

56. Carmona M., Zalacain A., Salinas M.R., Alonso G.L., «A new approach to saffron aroma». *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(2): 145-59, (2007).
57. Tarantilis P., Orloudi S., «Spectroscopic Database for authentic saffron (*Crocus sativus* L.)». COST Action FA1101 "SAFFRONOMICS".
58. Tarantilis P., Polissiou M., «Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus* L.)». *J. Agricultural and Food Chemistry*, 45: 459-462, (1997).
59. Rodel W., Petrzika M., «Analysis of the volatile components of saffron». *J. High Resolution Chromatography*. 14: 771–774, (1991).
60. D'Auria M., Mauriello G., Rana G., «Volatile organic compounds from saffron», *J. Flavour Frag.* 19: 17–23, (2004).
61. Carmona M, Zalacain A, Pardo JE, López E, Alvarruiz A, Alonso GL. «Influence of different drying and aging conditions on saffron constituents». *J Agric Food Chem.* 18;53(10):3974-9, (2005).
62. Carmona M. «Crocetin Esters, Picrocrocin and Its Related Compounds Present in *Crocus sativus* Stigmas and *Gardenia jasminoides* Fruits. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC-ESI-MS». *J. Agric. Food Chem*, 54, 973-979 973, (2006).
63. Verma R., Middha D., «Analysis of Saffron (*Crocus sativus* L. Stigma) Components by LC–MS–MS». *Chromatographia*, 71, 117–123, (2010).
64. Zeka K., Arroo R. «Saffron *Crocus (Crocus sativus* L.) as a Source of Kaempferol Keti Zeka and Randolph Arroo». Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63485-828-1, (2016).
65. Vignolinia P., Heimlerb P., Pinellia P., Ieria F., Sciuiloc A., Romani A., «Characterization of By-products of Saffron (*Crocus sativus* L.) Production». *Natural product communications* Vol. 3 No. 12 1959 – 1962, (2008).
66. Benjamin M., Loïc, L., Stéphane, R., «Quality assessment of saffron (*Crocus sativus* L.) extracts via UHPLC-DAD-MS analysis and detection of adulteration using gardenia fruit extract (*Gardenia jasminoides* Ellis)». *Food Chemistry*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem>, (2018).
67. Μερμύγκη Π., «Ανάλυση συστατικών φύλλων *Vaccinium corymbosum*». Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, (2014).
68. Termentzi A., Kokkalou E., «LC-DAD-MS (ESI+) Analysis and Antioxidant Capacity of *Crocus sativus* Petal Extracts». *Planta Med*; 74: 573–581, (2008).
69. Guijarro-Díez M., Nozal L., Marina ML., Crego AL., «Metabolomic fingerprinting of saffron by LC/MS: novel authenticity markers». *Anal Bioanal Chem* 407:7197–7213, (2015).

70. Moras B., Loffredo L., Rey S., «Quality assessment of saffron (*Crocus sativus* L.) extracts via UHPLC-DAD/MS analysis and detection of adulteration using gardenia fruit extract (*Gardenia jasminoides* Ellis)». *Food Chemistry*, S0308-8146(18)30452-7, (2018).
71. Norbaek R., Kondo T., «Flavonol glycosides from flowers of *Crocus speciosus* and *C. antalyensis*». *Phytochemistry* 51, 1113±1119, (1999).
72. Nørbæk R., Nielsen JK., Kondo T., «Flavonoids from flowers of two *Crocus chrysanthus-biflorus* cultivars: "Eye-catcher" and "Spring Pearl" (Iridaceae)». *Phytochemistry* 51, 1139±1146, (1999).
73. Nørbæk R., Brandt K., Nielsen JK., Ørgaard M., Jacobsen N., «Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation». *Biochemical Systematics and Ecology*, 30 763–791, (2002).
74. Goupy P., Vian A., F., Caris-Veyrat C., «Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections». *Industrial Crops and Products* 44, 496-510, (2013).
75. Rubio-Moraga A., Ahrazem O., Rambla JL., Granell A., Gómez L., «Crocins with High Levels of Sugar Conjugation Contribute to the Yellow Colours of Early-Spring Flowering *Crocus* Tepals». *PLOS ONE*, Vol. 8, Issue 9, e71946, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071946>, (2013).
76. Zengin G., Aumeeruddy MZ., Diuzheva A., Jekó J., Cziáky Z., Yıldızıtugay A., Yıldızıtugay E., Mahomoodally MF., «A comprehensive appraisal on *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. flower extracts with HPLC–MS/MS profiles, antioxidant and enzyme inhibitory properties». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164 581–589, (2019).
77. Tuberoso CI., Rosa A., Montoro P., Fenu MA., Pizza C., «Antioxidant activity, cytotoxic activity and metabolic profiling of juices obtained from saffron (*Crocus sativus* L.) floral by-products». *Food Chemistry* 199, 18–27, (2016).
78. Luo C., Wang X., Gao G., Wang L., Li Y., Sun C. «Identification and Quantification of Free, Conjugate and Total Phenolic Compounds in Leaves of 20 Sweetpotato Cultivars by Hplc-Dad and Hplc-Esi-MS/MS». *Food Chem* 141, no. 3, 2697-706, (2013).
80. Ichi, T.; Higashimura, Y.; Katayama, T.; Koda T.; Shimizu, T.; Tada M. «Analysis of crocetin derivatives from gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits.» *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 42, 776-783, (1995).
81. Straubinger, M.; Jezussek M.; Waibel R.; Winterhalter, P. «Novel glycosidic constituents from saffron. » *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1678-1681. (1997)