(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 631 834**

(21) Número de solicitud: 201600133

(51) Int. CI.:

G01N 30/02 (2006.01)
A23L 27/00 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

19.02.2016

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

05.09.2017

Fecha de la concesión:

20.02.2018

(45) Fecha de publicación de la concesión:

27.02.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

(72) Inventor/es:

GUIJARRO DÍEZ , Miguel;
CASTRO PUYANA, María;
CREGO NAVAZO, Antonio Luis y
MARINA ALEGRE, María Luisa

(54) Título: **Procedimiento para la detección de adulteraciones de azafrán con gardenia basado en la determinación de genipósido**

(57) Resumen:

El objetivo de la invención es el desarrollo de un procedimiento para la detección de adulteraciones de azafrán con gardenia basado en la determinación de genipósido por cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas. La presencia de genipósido en extractos de gardenia y su ausencia en el azafrán permite proponer dicho compuesto como marcador de adulteración de azafrán con gardenia.

La invención consiste en la separación cromatográfica de genipósido del resto de componentes de las muestras de azafrán utilizando una columna C18 y una elución isocrática con una fase móvil de agua: acetonitrilo (85:15 v/v) con 0.1% de ácido fórmico y detección por espectrometría de masas de quadrupolo-tiempo de vuelo.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

ES 2 631 834 B2

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ADULTERACIONES DE AZAFRÁN CON GARDENIA BASADO EN LA DETERMINACIÓN DE GENIPÓSIDO

DESCRIPCIÓN

El procedimiento analítico propuesto permite la identificación y la cuantificación de genipósido en muestras de azafrán empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con detección por Espectrometría de Masas. Teniendo en cuenta que la presencia de genipósido en azafrán revela la adulteración por gardenia, este procedimiento supone un gran avance por la posibilidad de emplear un solo compuesto, genipósido, como marcador de adulteraciones de azafrán con gardenia con el fin de evaluar la calidad del azafrán así como para evitar fraudes económicos.

SECTOR DE LA TÉCNICA

Esta invención permite detectar adulteraciones de azafrán con gardenia siendo el desarrollo del método analítico para la determinación de genipósido en azafrán de interés para el sector químico y el procedimiento para la detección de adulteraciones de azafrán con gardenia es de interés para el sector alimentario por su potencial para controlar la calidad del azafrán y evitar fraudes económicos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El azafrán se produce a partir de los estigmas secos de la planta *Crocus sativus* L., siendo la especia más cara del mundo debido a la mano de obra necesaria para su cultivo, cosecha y manipulación, así como por tener una producción limitada.

Los tres principales metabolitos secundarios en el azafrán son: las crocinas (responsables del color), una familia de pigmentos amarillos muy solubles en agua; la picrocrocina (responsable del sabor amargo), un glucósido incoloro; y el safranal (responsable del olor), un aceite volátil. Además, el azafrán también contiene flavonoides, proteínas, azúcares,

vitaminas, aminoácidos, minerales y otros compuestos químicos **[1]**. Durante mucho tiempo se ha usado como saborizante y colorante en la preparación de alimentos, sin embargo, también es conocido por una amplia variedad de beneficios para la salud **[2]**. Estudios recientes muestran que el azafrán puede ofrecer cierta protección contra enfermedades coronarias y cáncer, así como un elevado potencial como potenciador de la memoria **[3-6]**.

Debido a su alto precio, el azafrán ha sido sometido a diversos tipos de adulteración a lo largo de los siglos. Destacar que recientemente se ha publicado un informe donde se describe que el azafrán es, junto con el aceite de oliva, la leche y la miel, uno de los ingredientes alimentarios que más comúnmente sufren adulteraciones **[7]**. Las adulteraciones de azafrán se realizan con el fin de aumentar su peso con materias extrañas (normalmente plantas con cierto parecido externo) y/o para mejorar su color con colorantes naturales o sintéticos cuando el azafrán es antiguo o para enmascarar la adición de materias extrañas. Las prácticas fraudulentas más comunes incluyen la adición de diferentes materias vegetales con color y morfología similares. Históricamente, los materiales más frecuentes utilizados en la adulteración del azafrán han sido estambres de la propia planta del azafrán (incluso estilos o tiras de la corola), pétalos de las plantas *Carthamus tinctorius* L. (cártamo) y *Hemerocallis lilioasphodelus* L., rizomas de la *Curcuma longa* L. (cúrcuma), flores de las plantas *Caléndula officinalis* L. (caléndula) y *Arnica montana* L. y semillas de *Bixa orellana* L. **[8, 9]**. Recientemente, se ha descubierto en el mercado europeo un nuevo y sofisticado método de adulteración de azafrán empleando extractos de los frutos de la planta *Gardenia jasminoides Ellis* L. (gardenia) **[10]**, la cual se utiliza ampliamente en países asiáticos en la medicina tradicional y como colorante natural debido a la presencia de un elevado número de flavonoides y crocinas similares a las presentes en el azafrán (responsables de la coloración amarilla) **[11-14]**, estando prohibida su comercialización en Europa. Dadas las diferencias morfológicas de la gardenia frente a los estigmas del azafrán, este tipo de adulteración ocurre cuando el azafrán se encuentra en forma molida, pudiéndose ocultar más fácilmente el extracto de gardenia **[8, 15]**. Por otro lado, los principales metabolitos secundarios de los frutos de gardenia que difieren del azafrán son glucósidos iridoides, los cuales incluyen: genipósido, gardenósido, genipina-1-β-gentiobiósido, ácido geniposídico, acetilgenipósido y gardósido **[16-18]**.

Hasta el momento, la calidad del azafrán está certificada en el mercado internacional a través de la normativa ISO 3632 **[19, 20]**. Sin embargo, esta normativa sólo caracteriza al azafrán a través de los contenidos de picrocrocina, safranal y crocinas, así como la posible presencia de algunos de los colorantes artificiales que puedan resultar tóxicos. Por tanto, la metodología empleada en la normativa ISO es una combinación de medidas espectrofotométricas de picrocrocina a 250 nm y safranal a 310 nm con perfiles cromatográficos de colorantes y pigmentos polares (crocinas) a 440 nm. Esta normativa se encuentra actualmente en proceso de revisión dada su baja fiabilidad en la detección de materias vegetales con color y morfología similares al azafrán. En particular, se ha demostrado recientemente que no es posible detectar empleando la normativa ISO una adulteración en el azafrán con cantidades de hasta un 20% de cártamo, caléndula o cúrcuma **[21]**. Por tanto, en los últimos años varios autores han propuesto nuevos métodos analíticos para la detección de adulterantes en azafrán empleando muy diversas técnicas de análisis: Espectrofotometría UV-Vis **[22-24]**, Espectrofotometría de Infrarrojo cercano (NIR) **[25]**, Espectroscopía Raman y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) **[26]**, Electroforesis Capilar (CE) **[27]** y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) sin y con detección por Espectrometría de Masas (MS) **[21, 28-30]**. Asimismo, destacar el empleo reciente de métodos moleculares novedosos para detectar marcadores de ADN de diferentes plantas (cártamo y cúrcuma) en azafrán los cuales han permitido obtener resultados alentadores pudiéndose llegar a detectar hasta un 1% de adulteración **[15, 31-33]**.

Por otro lado, recientemente se ha desarrollado una estrategia metabolómica basada en la utilización de RMN que ha sido aplicada a la diferenciación de azafrán auténtico de azafrán adulterado con 20 % de gardenia, cúrcuma, cártamo y estambres de azafrán **[34]**. Sin embargo, existe una clara demanda de métodos sensibles que permitan detectar bajos porcentajes de adulteración en azafrán.

Genipósido ha sido descrito como el glucósido iridoide mayoritario en la gardenia por lo que podría utilizarse como marcador de adulteraciones de azafrán con gardenia. Aunque se han desarrollado varios métodos para determinar genipósido en el fruto de la gardenia

utilizando como técnicas HPLC y CE **[35-42]**, no existe ningún método que permita la determinación de genipósido en azafrán.

El objetivo de esta invención es el desarrollo de un procedimiento por Cromatografía Líquida con detección por Espectrometría de Masas de Quadrupolo-Tiempo de Vuelo que permita determinar genipósido en azafrán, con el fin de proponer por primera vez este compuesto como marcador de adulteraciones de azafrán con extractos de gardenia.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El procedimiento para la determinación de genipósido por cromatografía líquida se basa en la utilización de una columna C18 y un equipo de cromatografía líquida Agilent Technologies 1100 acoplado a un detector de espectrometría de masas (MS) de quadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) Agilent Technologies 6530 a través de una fuente de ionización por electrospray ortogonal con tecnología de enfoque térmico Jet Stream. El espectrómetro de masas está equipado con un software Mass Hunter de Agilent Technologies (B.040.00) para el control del espectrómetro de masas y la adquisición y análisis de los datos.

Tabla 1. *Resumen del procedimiento para la determinación de genipósido en azafrán por LC-MS.*

Columna	Ascentis Express *Fused-core* C18 (100 mm x 2.1 mm, con partículas peliculares de tecnología "fused-core" de 2.7 µm (0.5 µm de espesor de fase estacionaria)
Fase móvil	Agua:Acetonitrilo (85:15 v/v) conteniendo 0.1 % de ácido fórmico
Flujo de fase móvil	0.4 mL/min
Volumen de inyección	5 µL
Temperatura	40ºC
Detección por Espectrometría de Masas Quadrupolo-Tiempo de vuelo	Ionización por Electrospray en modo negativo (ESI -). Rango de masas de 100-1700 *m/z* (rango dinámico extendido) con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. Condiciones para la fuente de ionización: potencial de electronebulización, 3500 V con un voltaje de tobera (*nozzle*)

	500 V; condiciones de gas de secado, 10 L/min y 350 °C; presión de nebulizador, 1.7 bar; gas envolvente, 7.5 L/min y 350 °C. Otras condiciones: fragmentador, 150 V. Voltajes de espumadera (*skimmer*) y octopolo 60 V y 750 V, respectivamente.
Preparación de la muestra	Las muestras de azafrán se trituran en un mortero y se pesan (0.3 g de muestra). Se extraen con 25 mL de disolución etanol:tampón borato a pH 9.0 (50:50, v/v) mediante extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente. Tras centrifugación (15 min, 4000*g* y 25 °C) el sobrenadante se diluye 1/50 con agua y 4 mL de esta disolución se someten a ultra-filtración a través de filtros de corte de 3 kDa con el fin de eliminar carbohidratos y proteínas.

Preparación de patrones y muestras

La preparación de las disoluciones patrón de genipósido se realiza a partir de una disolución inicial de genipósido 1 mg/mL en acetonitrilo. Esta disolución se guarda a 4°C y se toman distintas alícuotas que se diluyen en agua hasta la concentración requerida.

Se emplea el siguiente procedimiento de tratamiento de muestra: la muestra de azafrán se tritura en un mortero y se pesa (0.3 g de muestra). Se extraen con 25 mL de disolución etanol:tampón borato a pH 9.0 (50:50, v/v) mediante extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente. Tras centrifugación (15 min, 4000*g* y 25 °C) el sobrenadante se diluye 1/50 con agua y 4 mL de esta disolución se someten a ultra-filtración a través de filtros de corte de 3kDa con el fin de eliminar carbohidratos y proteínas.

Características analíticas del procedimiento

Las características analíticas evaluadas para el procedimiento objeto de la invención son la linealidad, los límites de detección y de cuantificación, la precisión (instrumental e intermedia) y la exactitud (**Tabla 2**).

La *linealidad* se comprueba en el intervalo de concentraciones de trabajo de 0.8 a 8 µg/mL de genipósido inyectadas por triplicado durante tres días consecutivos.

El *límite de detección* se determina como la concentración de genipósido que da lugar a un valor de la relación señal/ruido de 3. El *límite de detección* es 0.01 µg/mL lo que permite detectar 41.7 µg de genipósido por gramo de muestra analizada, es decir, hasta un 0.004 % lo que demuestra la elevada sensibilidad del método desarrollado para la determinación de genipósido en azafrán. Para el cálculo del *límite de cuantificación* se considera una relación señal/ruido de 10 y se obtiene un valor de 0.03 µg/mL.

La *precisión* se evalúa como repetibilidad instrumental y precisión intermedia. La repetibilidad instrumental se determina como el valor de la desviación estándar relativa (RSD) en % para las áreas de pico obtenidas cuando se realizan 3 inyecciones consecutivas de una disolución patrón de genipósido a dos niveles de concentración (0.8 y 8 µg/mL) y de una disolución de una muestra de azafrán auténtico adulterado con porcentajes del 10 y 90 % de extracto de gardenia. Los valores obtenidos para la RSD fueron inferiores al 1.5 %. La precisión intermedia se determinó a partir de los valores de RSD de las áreas de pico obtenidas al inyectar (por triplicado durante dos días consecutivos) tres replicados de una disolución patrón de genipósido a dos niveles de concentración (0.8 y 8 µg/mL) y de una disolución de una muestra de azafrán auténtico adulterado con porcentajes del 10 y 90 % de extracto de gardenia. Los valores obtenidos para la RSD fueron inferiores al 1.8 % para las disoluciones patrón de genipósido y al 2.9 % para las muestras de azafrán.

El procedimiento descrito en la presente invención es aplicable a la cuantificación de genipósido en azafrán. La cuantificación se lleva a cabo utilizando el método de calibrado del patrón externo. Este método de cuantificación se emplea porque se comprueba, mediante comparación de los intervalos de confianza de las pendientes obtenidas por los métodos de calibrado del patrón externo y de adiciones patrón, la ausencia de efectos de matriz, es decir, que la señal analítica para genipósido no se ve afectada por los demás componentes de la muestra.

La *exactitud* del método analítico desarrollado se evaluó como la recuperación obtenida para genipósido cuando una muestra de azafrán auténtico se enriqueció con genipósido

patrón a una concentración de 1 µg/mL. La media de los valores de recuperación obtenidos fue de 89±14%.

Tabla 2. *Características analíticas del procedimiento desarrollado para la determinación de genipósido en azafrán por LC-MS.*

Intervalo lineal de trabajo[a]	0.8-8 µg/mL	
Pendiente ± t·sb	$(1.91 \pm 0.21) \times 10^6$	
Ordenada en origen ± t·sa	$(6.7 \pm 9.5) \times 10^5$	
R^2	0.997	
p-valor de ANOVA[b]	0.078	
Interferencias de Matriz[c] **(n=5)**	*Muestra*	*Intervalo de confianza (pendiente ± t·sb)*
	Patrón genipósido	$(1.91 \pm 0.21) \times 10^6$
	Azafrán auténtico	$(2.06 \pm 0.21) \times 10^6$
	Azafrán/Extracto Gardenia (50:50)	$(2.06 \pm 0.22) \times 10^6$
LOD[d]	0.01 µg/mL (41.7 µg/g extract)[d]	
LOQ[e]	0.03 µg/mL (138.9 µg/g extract)[e]	
Exactitud[f]	*Concentración añadida*	*(% medio ± $t(n-1)*s/n^{1/2}$)*
Recuperación	1 µg/mL	89 ± 14
Precisión	*Nivel de concentración*	RSD (%)
Repetibilidad[g] (n = 3)	0.8 µg/mL patrón genipósido	1.5
	8 µg/mL patrón genipósido	0.7
	90 % de extracto de gardenia en azafrán	0.8
	10 % de extracto de gardenia en azafrán	0.6
Precisión intermedia[h] (n = 6)	0.8 µg/mL patrón genipósido	1.8
	8 µg/mL patrón genipósido	1.6
	90 % de extracto de gardenia en azafrán	0.9
	10 % de extracto de gardenia en azafrán	2.9

[a] Cinco disoluciones de patrón de genipósido a diferentes niveles de concentración inyectadas por triplicado durante tres días consecutivos.

[b] p-valor del ANOVA para confirmar que el modelo experimental se ajusta a un modelo lineal.

[c] Comparación de las pendientes obtenidas por los métodos de patrón externo y adiciones patrón.

[d] LOD calculado como la concentración de genipósido correspondiente a una relación señal/ruido (S/N) igual a 3.

[e] LOQ calculado como la concentración de genipósido correspondiente a una relación señal/ruido (S/N) igual a 10.

[f] Exactitud calculada a partir de los valores de recuperación obtenidos al añadir 1 µg/mL del patrón de genipósido a tres disoluciones diferentes de azafrán auténtico inyectadas por duplicado.

[g] Repetibilidad expresada como RSD (%) de las áreas obtenidas al inyectar tres veces consecutivas en un mismo día una disolución de patrón de genipósido a dos niveles de concentración y una disolución de azafrán auténtico adulterado con porcentajes del 10 y 90 % de extracto de gardenia.

[h] Precisión intermedia expresada como RSD (%) del valor medio de las áreas obtenidas al inyectar tres veces consecutivas durante dos días consecutivos tres réplicas de una disolución patrón de genipósido a dos niveles de concentración y una disolución de azafrán auténtico adulterado con porcentajes del 10 y 90 % de extracto de gardenia.

Ventajas principales del procedimiento

Las ventajas principales del procedimiento objeto de la presente invención son las siguientes:

- El procedimiento descrito permite determinar el contenido de genipósido en azafrán.
- El procedimiento desarrollado permite separar el pico de genipósido del resto de componentes del azafrán en un tiempo inferior a 2 min.
- El procedimiento desarrollado permite identificar el genipósido a través de su espectro de masas.
- El procedimiento desarrollado pone de manifiesto la ausencia de genipósido en azafrán auténtico, siendo una herramienta valiosa para los laboratorios de control de calidad y para la industria alimentaria porque el genipósido puede emplearse como marcador de adulteraciones de azafrán con gardenia.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cromatogramas de ión extraído a una relación *m/z* 433.1384 ± 50 ppm obtenidos por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas de quadrupolo-tiempo de vuelo, para cuatro muestras de azafrán sospechosas de haber sido adulteradas. A), B), C) muestras de azafrán adulteradas con gardenia. D) muestra de azafrán no adulterada con gardenia. El procedimiento para la preparación de las muestras, las condiciones utilizadas

para el análisis por cromatografía de líquidos y las condiciones utilizadas para la detección por espectrometría de masas se han detallado en la **Tabla 1**.

MODO DE REALIZACIÓN

El procedimiento descrito en la presente invención se aplica a la detección de adulteraciones de azafrán con extractos de gardenia. Para ello, se analizan muestras de azafrán auténticas y muestras de azafrán sospechosas de haber sido adulteradas.

La preparación de muestra se lleva a cabo triturando las muestras de azafrán en un mortero y pesando 0.3 g de muestra. Se extraen con 25 mL de disolución etanol:tampón borato a pH 9.0 (50:50, v/v) mediante extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente. Tras centrifugación (15 min, 4000*g* y 25 ºC) el sobrenadante se diluye 1/50 con agua y 4 mL de esta disolución se someten a ultra-filtración a través de filtros de corte de 3 kDa. 5 µL del ultrafiltrado se inyectan en una columna Ascentis Express Fused-core C18 (100 mm x 2.1 mm, con partículas peliculares de tecnología "fused-core" de 2.7 µm (0.5 µm de espesor de fase estacionaria) utilizando una elución isocrática con una fase móvil agua: acetonitrilo (85:15 v/v) con ácido fórmico al 0.1 %, un flujo de fase móvil 0.4 mL/min y una temperatura de 40 ºC. La detección por espectrometría de masas se realiza mediante Ionización por Electrospray en modo negativo (ESI -) con un rango de masas de 100-1700 m/z (rango dinámico extendido) y una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. Las condiciones para la fuente de ionización son: un potencial de electronebulización de 3500 V con un voltaje de tobera de 500 V, unas condiciones de gas de secado de 10 L/min y 350 ºC, una presión de nebulizador de 1.7 bar y de gas envolvente de 7.5 L/min y 350 ºC. El fragmentador es 150 V y los voltajes de espumadera y octopolo son 60 V y 750 V, respectivamente.

En la **Figura 1** se muestran los cromatogramas de ión extraído a una relación *m/z* 433.1384 ± 50 ppm para tres de las muestras adulteradas con gardenia y para una muestra sospechosa de adulteración para la que se confirma que no ha sido adulterada con gardenia. Se observa el pico del genipósido en las tres muestras adulteradas con gardenia y la ausencia del pico del genipósido en la muestra no adulterada con gardenia.

Para la determinación de genipósido en las tres muestras adulteradas con gardenia, se utiliza el método de calibrado del patrón externo utilizando disoluciones patrón de genipósido. Las cantidades determinadas de genipósido en las tres muestras de azafrán adulterado (muestra 1, 2 y 3, respectivamente) son 5.90 ± 0.01, 13.2 ± 0.2 y 15.30 ± 0.01 mg/g de muestra analizada.

Los resultados de los análisis confirman la ausencia de genipósido en las muestras de azafrán auténticas por lo que se propone genipósido como marcador de adulteraciones de azafrán con gardenia. Los resultados también confirman la presencia de genipósido en algunas de las muestras sospechosas de haber sido adulteradas demostrando el nuevo método de adulteración de azafrán con gardenia que ha alcanzado el mercado europeo de azafrán.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

Tanto a la industria alimentaria como a la administración les interesa que existan procedimientos analíticos sensibles que permitan el control de calidad y seguridad del azafrán. El empleo de genipósido como marcador de adulteraciones de azafrán con extractos de gardenia permite realizar un control de calidad del azafrán y detectar adulteraciones de azafrán con gardenia de forma sensible e inequívoca.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Winterhalter, P., Straubinger, M.S., *Food Rev. Int.*, **2000**, *16*, 39-59.

[2] Melnyk, J.P., Wang, S., Marcone, M.F., *Food. Res. Int.*, **2010**, *43*, 1981-1989.

[3] Ríos, J.L., Recio, M.C., Giner, M.R., Manez, S., *Phytother. Res.*, **1996**, *10*, 189-193.

[4] Abdullaev, F.I., *Exp. Biol. Med.*, **2002**, *227*, 20-25.

[5] Karimi, G., Hosseinzadeh, H., Khaleghpanah, P., Irn. *J. Basic Med. Sci.*, **2001**, *4*, 11-15.

[6] Hosseinzadeh, H., Younesi, H., *BMC Pharmacol.*, **2002**, *2*, 1-8.

[7] Moore, J.C., Spink, J., Lipp M.J., *Food Science,* **2012**, *77*, 118-126

[8] Hagh-Nazari, S., Keifi, N., *Acta Hortic.*, **2007**, *739*, 411-416.

[9] Kanti, R., Sushma, K., Ghandi, R., *J. Trop. Med. Plants*, **2011**, *12*, 135-140.

[10] Sánchez, A.M., Carmona, M., Pardo, J.E., Alonso, G.L., *Acta Horticult.*, **2010**, *850*, 261-264.

[11] Pfister, S., Meyer, P.A., Steck, H., Pfander, J., *Food Engng.*, **1996**, *56*, 257-259.

[12] van Calsteren, M., Bissonnette, M.C., Cormier, F., Dufresne, C., Ichi, T., LeBlanc, J.C.Y., Perreault, D., Roewer, I., *J. Agr. Food Chem.*, **1997**, *4*, 1055-1061.

[13] Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A.M., Novella, J.L., Alonso, G.L., *J. Agr. Food Chem.*, **2006**, *54*, 973-979.

[14] Ordoudi, S., Tsimidou, M., "Saffron quality: effect of agricultural practices, processing and storage", in *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops, Vol. 1* eds. Dris, S., Jain, S.M., Kluver Academic, Publisher, The Netherlands, 209-260, **2004**.

[15] Torelli, A., Marieschi, M., Bruni, R., *Food Control*, **2014**, *36*, 126-131.

[16] Parmar, V.S., Sharma, S.K., Poonam., *J. Sci. Ind. Res.*, **2000**, *59*, 893-903.

[17] Wang, S-C., Tseng, T-Y., Huang, C-M., Tsai, T-H., *J. Chromatogr. B.*, **2004**, *812*, 193-202.

[18] Ding, Y., Xiang, L-Y., Zhang, T., Ji, S., Xu. L-Y., J. Food Drug Anal., **2010**, *18*, 180-190.

[19] International standard ISO 3632-2: Spices-Saffron (*Crocus sativus L.*)-Part 2: Test methods. (Reference number: ISO 3632-2:2010(E))

[20] International standard ISO 3632-1: Spices-Saffron (*Crocus sativus L.*)-Part 1: Specification. (Reference number: ISO 3632-1:2011(E))

[21] Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M., Belligno, A., Traulo, P., Gagliano, G., *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*, 1873-1876.

[22] Zalacain, A., Ordoudi, A.S., Blázquez, I., Diaz-olaza, E.M., Carmona, M., Tsimldou, M.Z., *Food Addit. Contam.*, **2005**, *22*, 607-615.

[23] Sánchez, A.M., Carmona, M., Zalacain, A., Carot, T.M., Jabaloyes, J.M., Alonso, G.L., *J. Agr. Food Chem.*, **2008**, *56*, 3167-3175.

[24] Maggi, L., Sánchez, M.A., Carmona, M., Kanakis, D.C., Anastasaki, E., Tarantilis, A.P., *Food Chem.*, **2011**, *127*, 369-373.

[25] Zalacain, A., Ordoudi, S.A., Blázquez, I., Diaz-Plaza, E.M., Carmona, M., Blazquez, M.Z.I., *J. Agr. Food Chem.*, **2005**, *53*, 9337-9341.

[26] Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., *Acta Hortic.*, **2004**, *650*, 447-461.

[27] Zougagh, M., Simonet, B.M., Rios, A., Valcárcel, M., *J. Chromatogr. A,* **2005**, *1085*, 293-298.

[28] Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R., Abdullaex, F.I., *Food Chem.*, **2007**, *100*, 1126-1131.

[29] Lage, M., Cantrell, C.L., *Sci. Hortic.*, **2009**, *121*, 366-373.

[30] Loskutov, A.V., Beninger, C.W., Hoseld, G.L., Sink, K.C., *Food Chem.*, **2000**, *69*, 87-95.

[31] Javanmardi, N., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Sharifi, A., Hemati-Kakhki, A.J., *Cell. Mol. Res.*, **2011**, *3*, 31-37.

[32] Marieschi, M., Torelli, A., Bruni, R., *J. Agr. Food Chem.*, **2012**, *60*, 10998-11004.

[33] Babaei, S., Talebi, M., Bahar, M., *Food Control,* **2014**, *35*, 323-328.

[34] Petrakis, E.A., Cagliani, L.R., Polissiou, M.G., Consonni, R., *Food Chem.*, **2015**, *173*, 890-896.

[35] Hou, Z., Sun, G., Shi, C., Sun, Y., *Asian J. Trad. Med.*, **2007**, *2*, 34-38.

[36] Wang, Y., Liu, H., Shen, L., Yao, L., Ma, Y., Yu, D., Chen, J., Li, P., Chen, Y., Zhang, C., *J. Sep. Sci.*, **2015**, *38*, 4119-4126.

[37] He, M.-L., Cheng, X.-W., Chen, J.-K., Zhou, T.-S., *Chromatographia*, **2006**, *64*, 713-717.

[38] Coran, S.A., Mulas, S., Vasconi, A., *J. Chromatogr. A,* **2014**, *1325*, 221-226.

[39] Lee, E.J., Hong, J.K., Whang, W.K., *Arch. Pharm. Res.*, **2014**, *37*, 992-1000.

[40] Gao, Y., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, J., Xu, B., Zhang, H., Song, D., *Anal. Methods,* **2013**, *5*, 4112-4118.

[41] Bergonzi, M.C., Righeschi, C., Isacchi, B., Bilia, A.R., *Food Chem.,* **2012**, *134*, 1199-1204.

[42] Tsai, T.R., Tseng, T.Y., Cheng, C.F., Tsai, T.H., *J. Chromatogr. A,* **2002**, *961*, 83-88.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección de adulteraciones de azafrán con gardenia **caracterizado** porque se basa en la determinación de genipósido en azafrán por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con detección por Espectrometría de Masas de Quadrupolo-Tiempo de vuelo.

2. El procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque requiere el siguiente tratamiento de muestra: la muestra de azafrán se tritura en un mortero y se pesan 0.3 g, se extraen con 25 mL de disolución etanol:tampón borato 50:50, v/v, a pH 9.0 mediante extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente, y tras centrifugación durante 15 min a 4000*g* y 25 ºC, el sobrenadante se diluye 1/50 con agua y 4 mL de esta disolución se someten a ultra-filtración a través de filtros de corte de 3kDa.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por realizar la determinación de genipósido mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en una columna C18 de 100 mm de longitud y 2.1 mm de diámetro interno, con partículas peliculares de tecnología "fused-core" de 2.7 µm y 0.5 µm de espesor de fase estacionaria.

4. El procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** por el empleo de una elución isocrática con una fase móvil agua: acetonitrilo 85:15, v/v, con un contenido de ácido fórmico del 0.1 %.

5. El procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4 **caracterizado** por los siguientes parámetros instrumentales en cromatografía líquida: flujo de fase móvil 0.4 mL/min, volumen de inyección 5 µL, temperatura 40ºC.

6. El procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la detección se realiza mediante un detector de espectrometría de masas de quadrupolo-tiempo de vuelo utilizando los siguientes parámetros instrumentales: presión de nebulización, 1.7 bar; flujo de gas de secado, 10 L/min; flujo de gas envolvente, 7.5 L/min;

potencial de electronebulización, 3500 V; temperatura de gas de secado, 350 °C, temperatura de gas envolvente, 350 °C; voltaje de tobera, 500 V y voltaje de fragmentación, 150 V. Voltajes de espumadera y octopolo 60 V y 750 V, respectivamente.

7. El procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la identificación del pico de genipósido en las muestras de azafrán se realiza a través del espectro de masas obtenido en el cromatograma de ion extraído a una relación *m/z* 433.1384 ± 50 ppm.

8. El procedimiento según las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque permite la identificación y determinación cuantitativa de genipósido en muestras de azafrán.

9. El procedimiento según las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque establece la ausencia de genipósido en muestras de azafrán auténtico.

10. El procedimiento según las reivindicaciones 8 y 9 **caracterizado** por la propuesta de genipósido como marcador de adulteraciones de azafrán con extractos de gardenia.

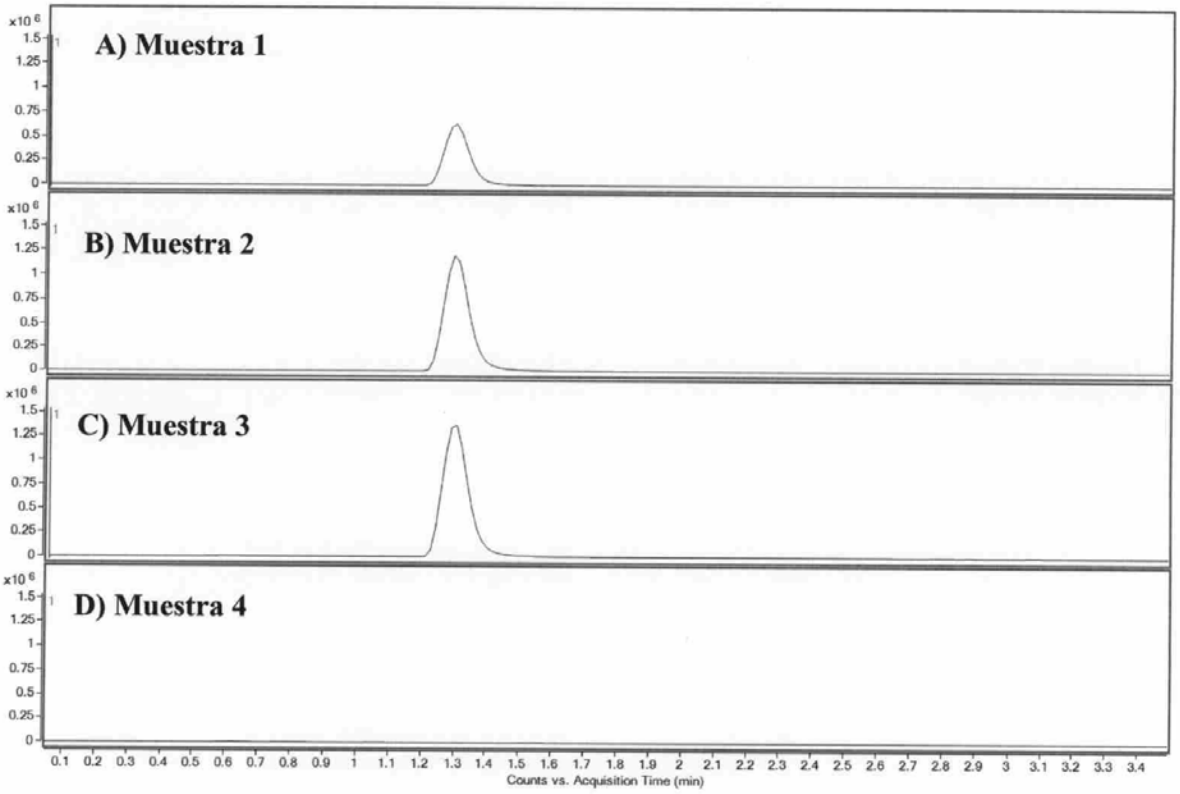
A) Muestra 1
B) Muestra 2
C) Muestra 3
D) Muestra 4
x10 6
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 2 2.1 2.2 2.3 2.4 2.5 2.6 2.7 2.8 2.9 3 3.1 3.2 3.3 3.4
Counts vs. Acquisition Time (min)

FIG. 1

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201600133

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 19.02.2016

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N30/02*** (2006.01)
A23L27/00 (2016.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PETRAKIS E A et al. Evaluation of saffron (Crocus sativus L.) adulteration with plant adulterants by<1>H NMR metabolite fingerprinting. Food Chemistry 20150415 Elsevier Ltd gbr 15.04.2015 VOL: 173 Págs: 890-896 ISSN 0308-8146 (print) ISSN 1873-7072 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.107.	1-10
A	GUIJARRO-DIEZ MIGUEL et al. Metabolomic fingerprinting of saffron by LC/MS: novel authenticity markers. Analytical and Bioanalytical Chemistry SEP 2015 (09.2015) VOL: 407 No: 23 Págs: 7197-7213 ISSN 1618-2642(print) ISSN 1618-2650(electronic) Doi: doi:10.1007/s00216-015-8882-0.	1-10
A	CARMONA MANUEL et al. Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in Crocus sativus stigmas and Gardenia jasminoides fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS. Journal of agricultural and food chemistry United States 8 Feb 2006 08.02.2006 VOL: 54 No: 3 Págs: 973-979 ISSN 0021-8561 (Print) Doi: pubmed:16448211.	1-10
A	RUBERT J et al. Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis. Food Chemistry 20160108 Elsevier Ltd gbr 08.01.2016 VOL: 204 Págs: 201-209 ISSN 0308-8146 (print) ISSN 1873-7072 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.003.	1-10
A	CARMONA M et al. Detection of adulterated saffron through UV-Vis spectral analysis. Journal of Food Science and Technology Julio/Agosto 2004 Cental Food Technological Res. Institute Campus in (07.2004) VOL: 41 No: 4 Págs: 451-455 ISSN 0022-1155 (print).	1-10

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
29.06.2016	J. Manso Tomico	1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.06.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-10	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-10	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PETRAKIS E A et al. Evaluation of saffron (Crocus sativus L.) adulteration with plant adulterants by<1>H NMR metabolite fingerprinting. Food Chemistry 20150415 Elsevier Ltd gbr 15.04.2015 VOL: 173 Págs: 890-896 ISSN 0308-8146 (print) ISSN 1873-7072 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.107.	15.04.2015
D02	GUIJARRO-DIEZ MIGUEL et al. Metabolomic fingerprinting of saffron by LC/MS: novel authenticity markers. Analytical and Bioanalytical Chemistry SEP 2015 (09.2015) VOL: 407 No: 23 Págs: 7197-7213 ISSN 1618-2642(print) ISSN 1618-2650(electronic) Doi: doi:10.1007/s00216-015-8882-0.	31.08.2015
D03	CARMONA MANUEL et al. Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in Crocus sativus stigmas and Gardenia jasminoides fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS. Journal of agricultural and food chemistry United States 8 Feb 2006 08.02.2006 VOL: 54 No: 3 Págs: 973-979 ISSN 0021-8561 (Print) Doi: pubmed:16448211.	08.02.2006
D04	RUBERT J et al. Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis. Food Chemistry 20160108 Elsevier Ltd gbr 08.01.2016 VOL: 204 Págs: 201-209 ISSN 0308-8146 (print) ISSN 1873-7072 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.003.	01.08.2016
D05	CARMONA M et al. Detection of adulterated saffron through UV-Vis spectral analysis. Journal of Food Science and Technology Julio/Agosto 2004 Cental Food Technological Res. Institute Campus in (07.2004) VOL: 41 No: 4 Págs: 451-455 ISSN 0022-1155 (print).	30.06.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

D01 se refiere a la detección de adulterantes en azafrán por medio de RMN H1 y quimiometría. En una muestra de azafrán griego se analizaron cuatro muestras típicas derivados de plantas utilizadas como agentes de relleno en azafrán, como son: estambres secos de Crocus sativus, cártamo, cúrcuma, y gardenia (figura 1, panel D).

D02 describe la utilización de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray de tiempo de vuelo, para identificar nuevos marcadores de autenticidad y adulteración de azafrán. Los compuestos característicos de azafrán (kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-sophoroside, kaempferol 3,7-O-diglucósido, kaempferol 3,7,4'-O-triglucósido, kaempferol 3-O-sophoroside-7- O-glucósido, y geranilo-O-glucósido) fueron confirmados mediante la comparación de los patrones de fragmentación MS / MS experimentales con los proporcionados en la literatura científica, y se proponen como nuevos marcadores de autenticidad.

D03 un divulga un método cromatográfico con detección UV para identificar distintos esteres de crocetina presentes en azafrán y en gardenia, y determinar los compuestos precursores responsables del aroma en cada uno de ellos. Entre los compuestos analizados se identificó el glucósido iridoide, geniposido, de gardenia mediante esta técnica, y se menciona que la ionización de este compuesto vía electrospray para su detección por espectrometría de masa es difícil de conseguir (página 977, columna izquierda).

D04 divulga un método para la identificación de marcadores de tipo glicerofosfolípidos que permitan decidir sobre la autenticidad y procedencia de diversos azafranes mediante la combinación de técnicas de HPLC unidas a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HMRS).

D05 describe el estudio de posibles adulterantes del azafrán mediante el análisis de espectros UV-Vis en donde se detectaron 12 de los 14 colorantes añadidos a 9 muestras de azafrán. Otras adulteraciones han sido también analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con respecto a la norbixina y tartrazina que no pudieron ser determinadas por esta técnica espectrofotométrica UV-Vis.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un procedimiento de detección de genipósido de gardenia por HPLC/MS, por lo que el objeto de las reivindicaciones 1-10 sería nuevo tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Tomando D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención, la diferencia entre D01 y el objeto reivindicado sería la identificación del genipósido, glucosido iridoide. El efecto técnico conseguido sería la identificación de azafrán adulterado con gardenia.

Por tanto, el problema técnico que plantea la invención sería la provisión de un marcador que identificase la adulteración de azafrán con gardenia, y la solución sería la identificación de genipósido, por HPLC/MS.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica, tomados solos o en combinación, permiten deducir de manera obvia el objeto de la invención que aparece en las reivindicaciones 1-10, por lo que la presente solicitud cumpliría con el requisito de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.