



Cinvestav
Unidad Saltillo

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ALICINA EN AJO Y SU CUANTIFICACIÓN POR HPLC

Dra. Lourdes Díaz Jiménez
Q. Karla Jiménez López

23 de octubre de 2008

Antecedentes



Origen

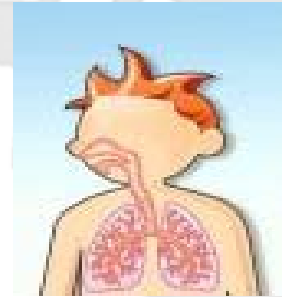
Centro y sur de Asia.

**En el siglo XV es
introducido al continente
americano.**



Actividad biológica

- **Enfermedades respiratorias**
- **Tuberculosis**
- **Antimicrobial**
- **Anticancérigeno**
- **Reductor de colesterol**
- **Anti-inflamatorio**



Química del ajo

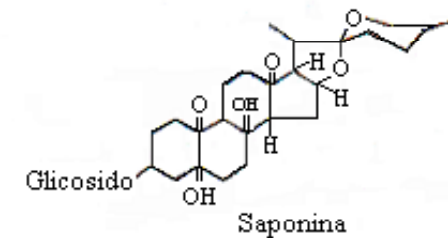
*Compuestos sulfurados

- Disulfuro de alilo
- s- alilcisteína
- ALICINA



*Compuestos no sulfurados

- Saponinas
- Macronutrientes



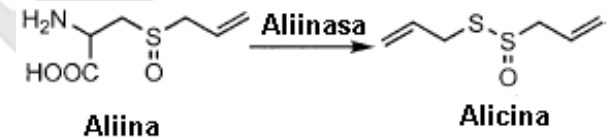
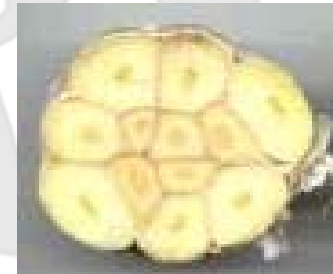
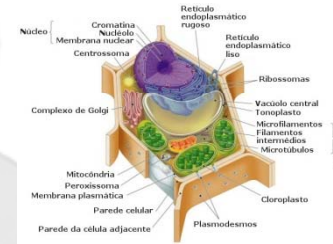
Alicina

- **Formación de la alicina**

- **Sustrato aliina**

- **Enzima aliinasa**

- **Rompimiento del tejido**



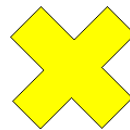
Características

- 70% de los compuestos sulfurados.
- Olor característico
- Propiedades curativas
- Inestable
- Descomposición



Cuantificación de alicina

- **Dificultades.**
 - Inestabilidad
 - Dificultad para obtener un estándar
 - Falta de consenso



- **Diversos métodos analíticos**

Método INA

Condiciones estrictas en la temperatura.

Método propuesto por Dowell (1999)

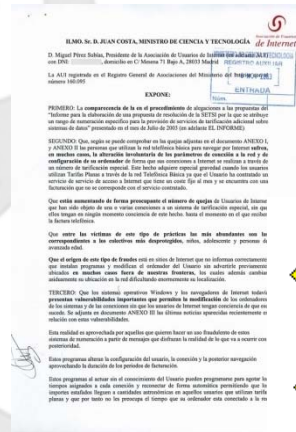
Tiempo de reposo

Lawson y Wang (2001)

Temperatura de 12- 15 °C y tiempo de reposo.

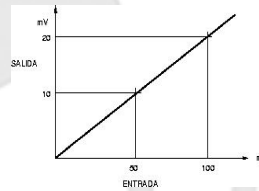
Validación

- Confirmar
- Aceptabilidad
- Fiabilidad



Parámetros de validación

- **Linealidad**



- **Exactitud**



- **Selectividad o especificidad**



- **Precisión**

- **Repetibilidad**
- **Reproducibilidad**

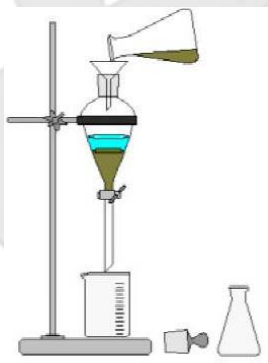


- **Robustez**



Objetivo

Validar un método de extracción y cuantificación de alicina en ajo y extractos de ajo.

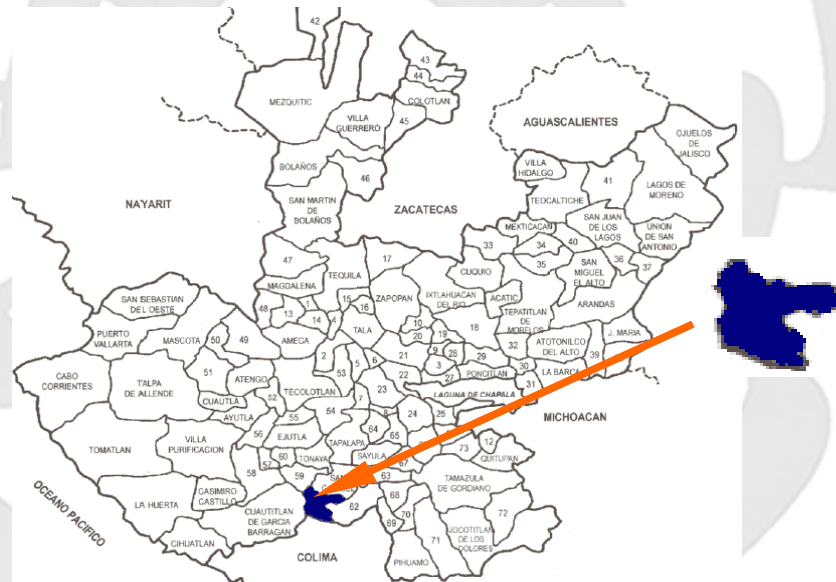


Metodología



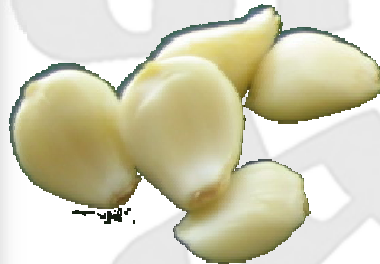
Material biológico

La materia prima fue proporcionada por la empresa Nutrilite S. de R.L. de C.V.

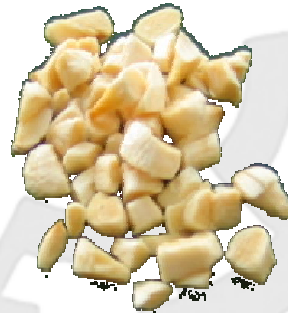


Tratamiento de la muestra

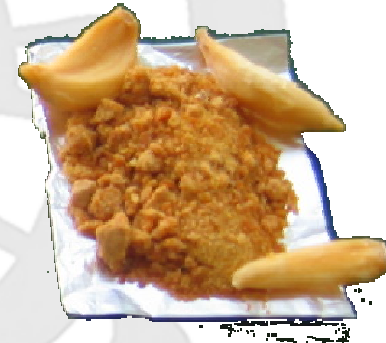
***Fresco**



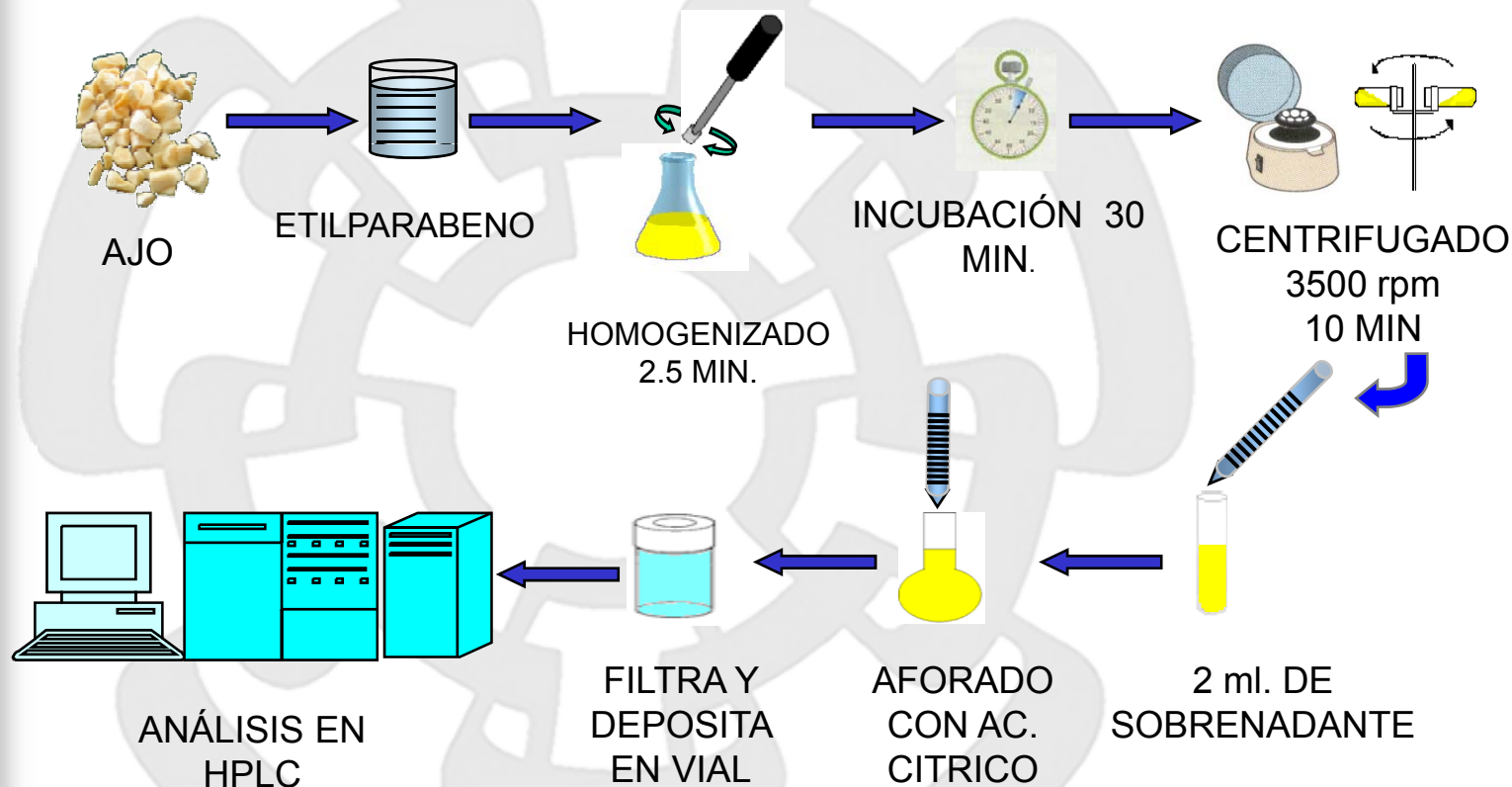
***Liofilizado**



***Seco**



Extracción



Condiciones HPLC: MeOH/Agua
45/55, Flujo 0.80 mL/min, $\lambda = 230$ nm

Validación

- **Selectividad o especificidad:** se utilizó polvo de ajo estandarizado, concentración de alicina al 1.023%
- **Linealidad:** Concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% realizando dos replicas por cada nivel de concentración
- **Repetibilidad:** concentraciones de 20, 50 y 100%, realizando 8 réplicas por cada nivel de concentración (análisis realizados por el mismo analista, equipo y día).

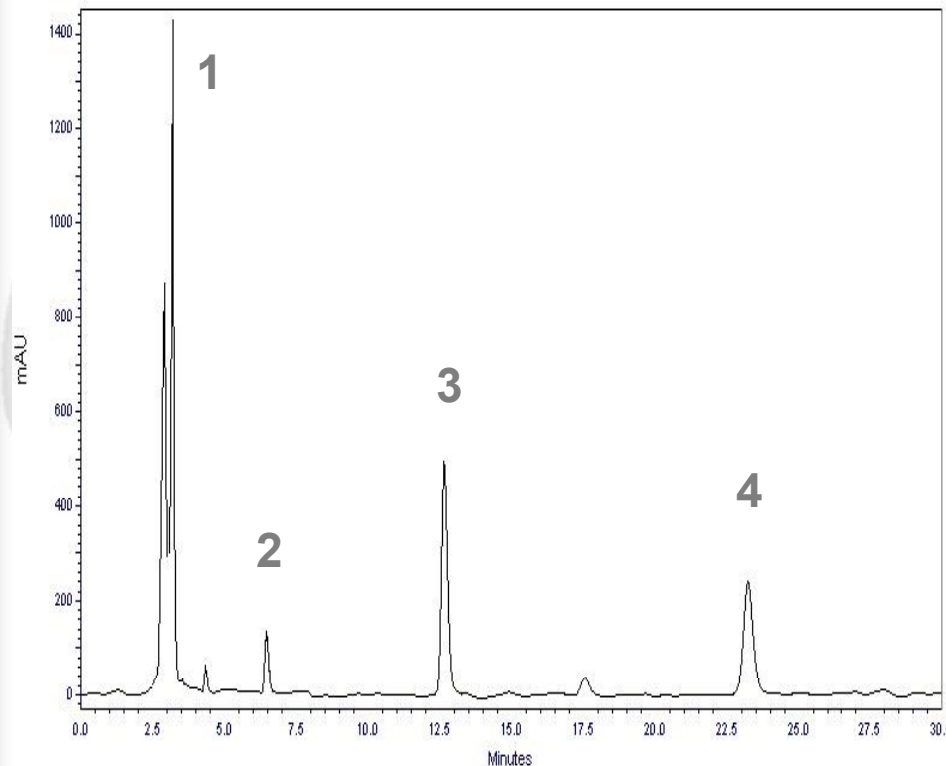
Validación...

- **Reproducibilidad:** concentración al 100% realizando 2 réplicas de concentración, por dos analistas diferentes.
- **Exactitud:** concentraciones del 20, 50 y 100% realizando 3 réplicas por cada nivel.
- **Robustez:** se evaluaron las diferentes condiciones que pueden llegar a representar cambios significativos, las modificaciones que se hicieron al método fueron la concentración de fase móvil, dos columnas de diferentes marcas, cambios de analistas.

Resultados y discusión



Calidad de la materia prima



1.- Compuestos sulfurados

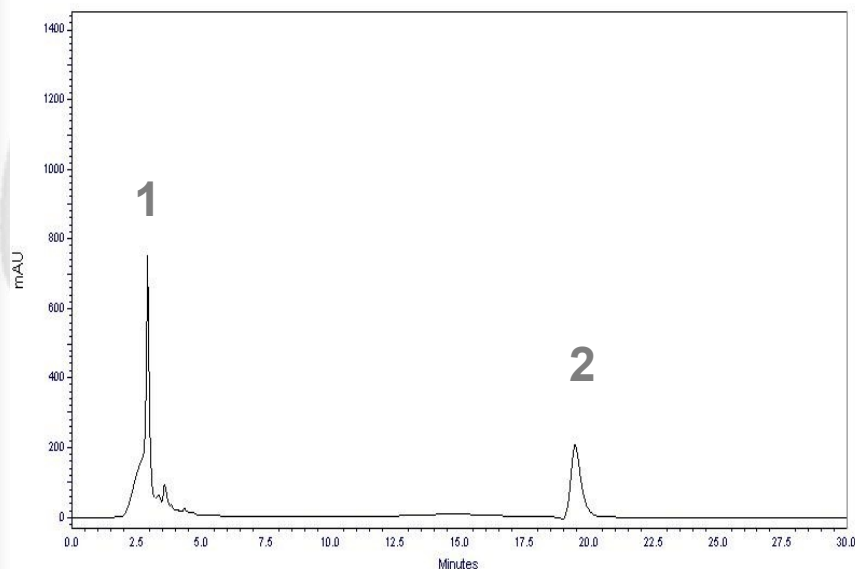
2.- Allyl metano tiosulfonato, Metil 2-propenotiosulfonato.

3.- Alicina

4.- Etilparabeno

Determinación del método de conservación del ajo

•Ajo deshidratado (por calentamiento)



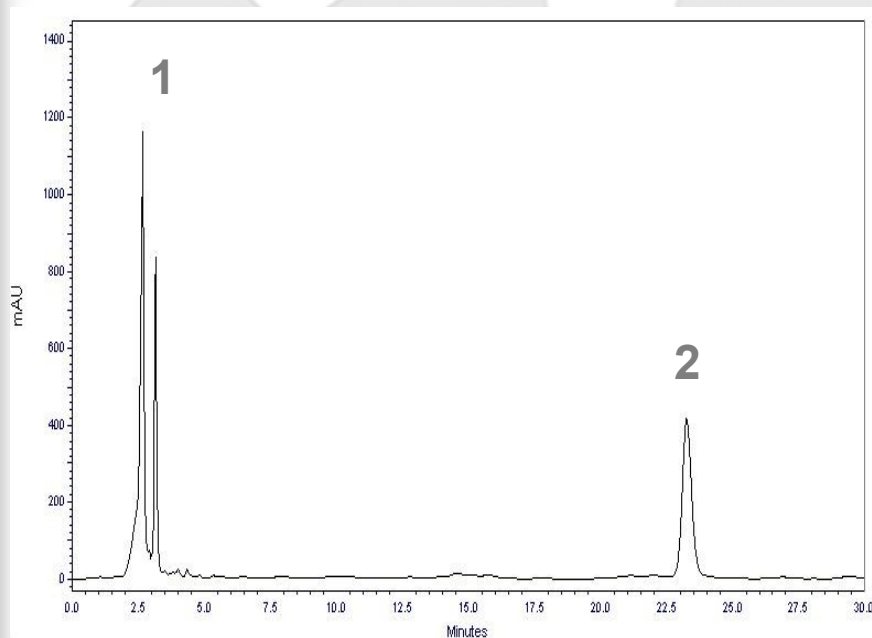
-Liberación de
sustrato y
enzima

-Degradación de
alicina

1.- Compuestos sulfurados

2.- Etilparabeno

- **Ajo deshidratado (por liofilización)**



Congelamiento muy rápido

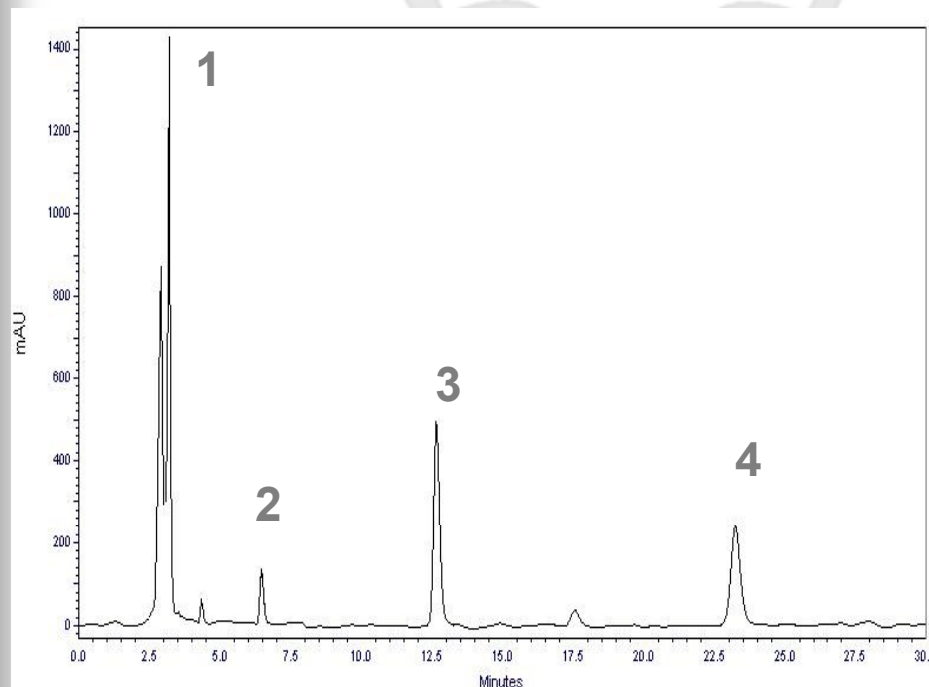
Inactivación de la aliinasa

1.- Compuestos sulfurados

2.- Etilparabeno

Resultados y discusión

- **Ajo congelado a -80°C**

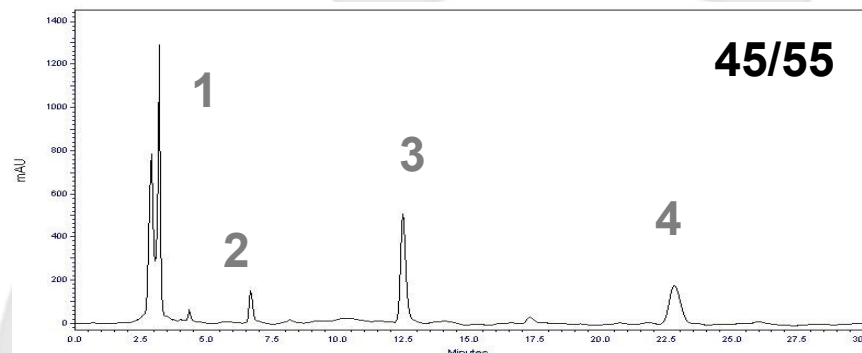


- Congelado a -80°C
- Refrigeración previa antes al análisis.
- Temperatura ambiente.

- 1.- Compuestos sulfurados
- 2.- Allyl metano tiosulfonato, Metil 2-propenotiosulfonato.
- 3.- Alicina
- 4.- Etilparabeno

Resultados y discusión

- **Fase móvil**

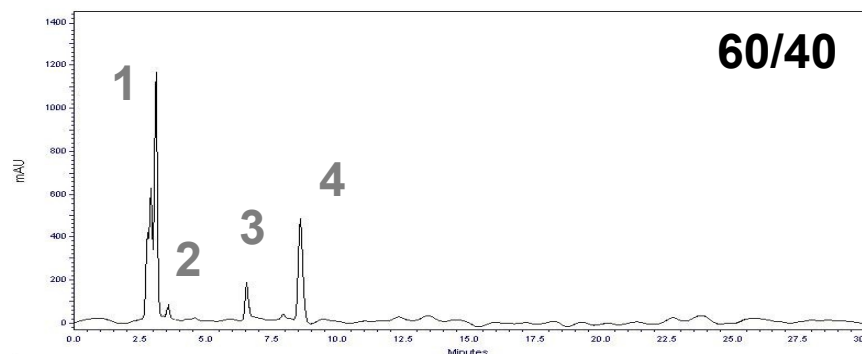
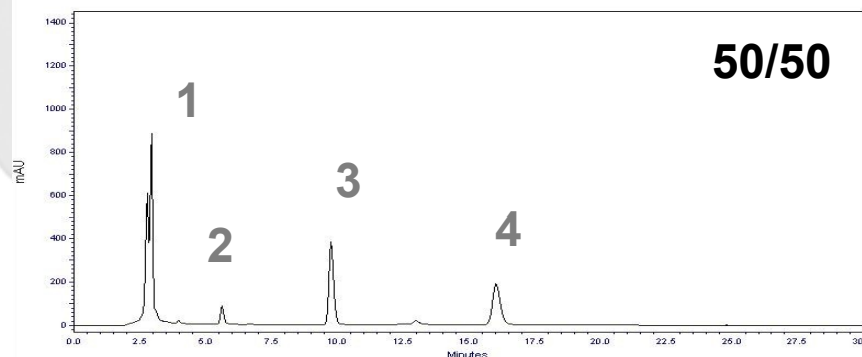


1.- Compuestos sulfurados

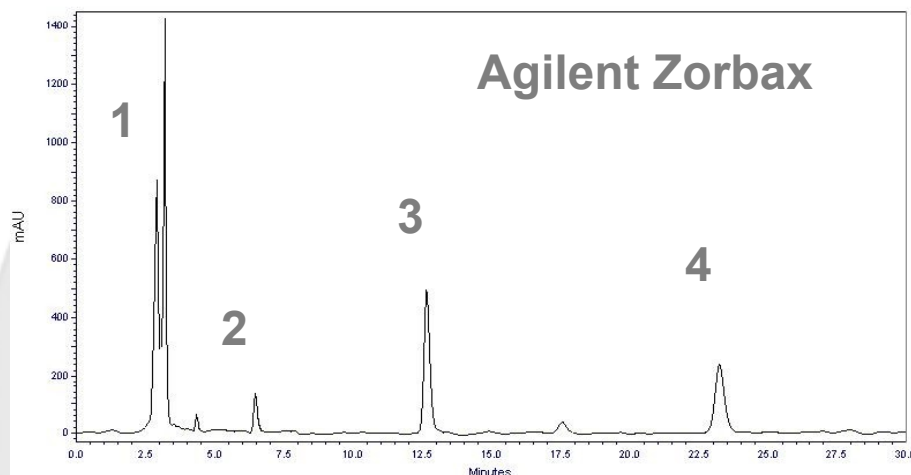
2.- Allyl metano tiosulfonato, Metil 2-propenotiosulfonato.

3.- Alicina

4.- Etilparabeno



- **Columnas**

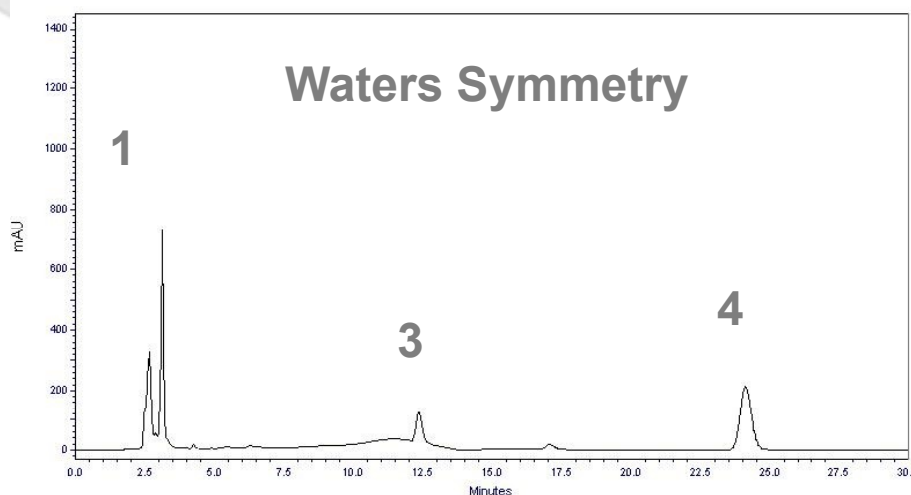


1.- Compuestos sulfurados

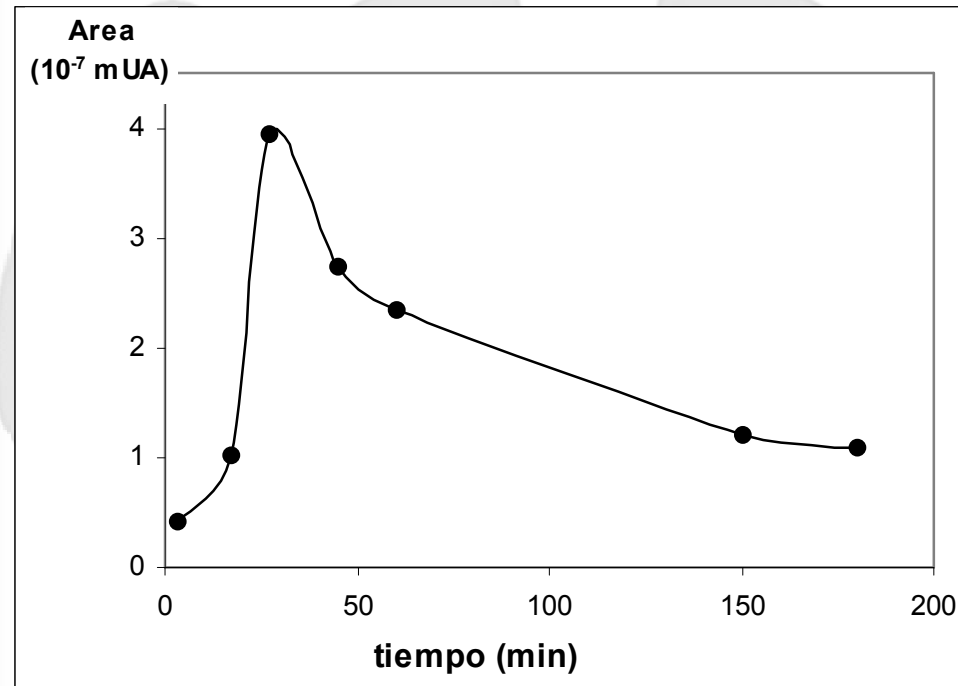
2.- Allyl metano tiosulfinato, Metil 2-propenotiosulfinato.

3.- Alicina

4.- Etilparabeno



Cinética de formación de alicina



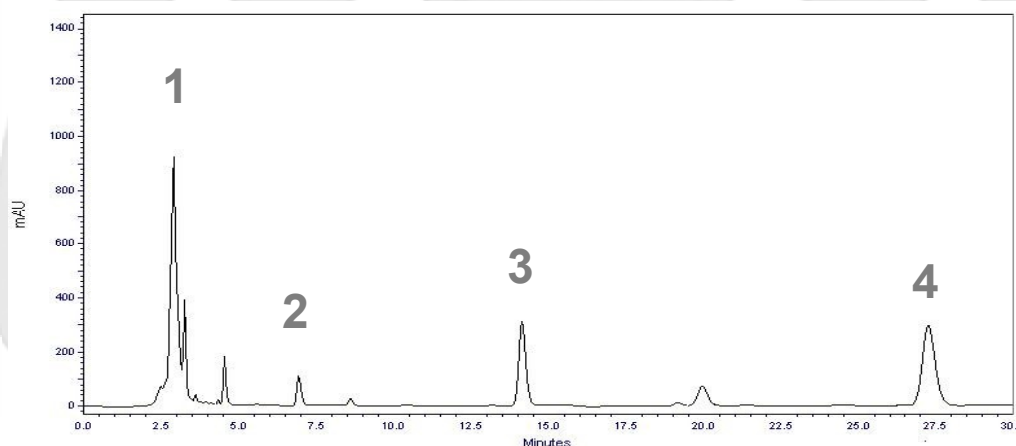
-Cañizares y col. (2004)
y Lawson y Wang
(2001)

-Tiempo de extracción

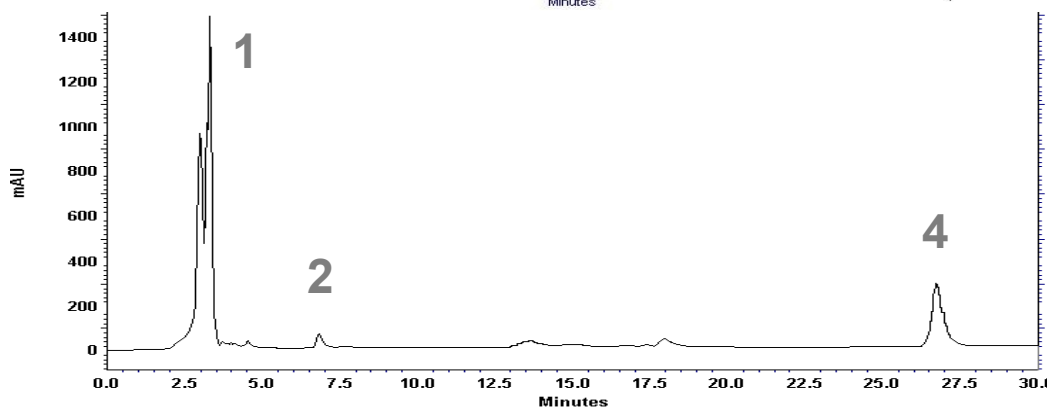
- Temperatura
adecuada entre 19-
26°C

• Validación del método

Selectividad o especificidad



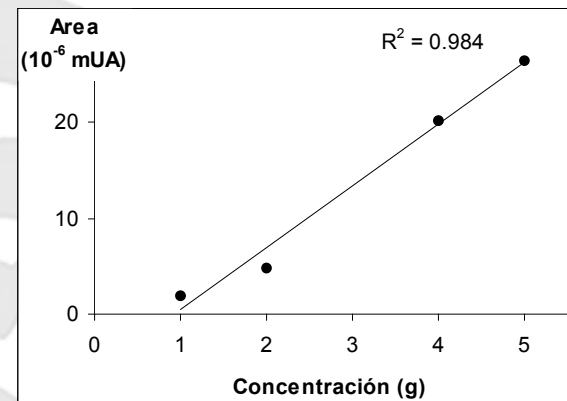
Inhibición de
la enzima
aliinasa



- 1.- Compuestos sulfurados
- 2.- Allyl metano tiosulfonato,
Metil 2-propenotiosulfonato.
- 3.- Alicina
- 4.- Etilparabeno

Resultados y discusión

- Linealidad**



- Precisión**

Repetibilidad

Criterio establecido: <5%

Concentración	Valores obtenidos.
20%	$X_{media} = 1951337$
	$S = 77887$
	$CV = 4\%$
50%	$X_{media} = 4527597$
	$S = 201086$
	$CV = 4.4\%$
100%	$X_{media} = 7788429$
	$S = 135570$
	$CV = 1.7\%$

Resultados y discusión

- Reproducibilidad**

Criterio establecido: <3%

Concentración	Valores obtenidos.
Analista 1	$X_{media} = 27118989$
	$S = 120527$
	$CV = 0.4\%$
Analista 2	$X_{media} = 29522974$
	$S = 447329$
	$CV = 1.5\%$

- Exactitud**

Criterio establecido: <3%

Concentración	Valores obtenidos.
20%	$X_{media} = 1.92$
	$S = 0.04$
	$CV = 2.2 \%$
50%	$X_{media} = 4.55$
	$S = 0.07$
	$CV = 1.5 \%$
100%	$X_{media} = 26.4$
	$S = 0.21$
	$CV = 0.8 \%$

•Robustez

Fase móvil

Columna

Analistas

No presentan cambios
significativos en el
método

Conclusiones

El método de cuantificación y extracción de alicina quedó validado en base a los resultados de los principales parámetros evaluados: coeficiente de correlación en la linealidad (0.984), coeficientes de variación en reproducibilidad (<2 %) y repetibilidad (<5 %).

De igual manera ha sido demostrada la precisión, selectividad y robustez.

Gracias por su atención

Dra. Lourdes Díaz Jiménez
Recursos Naturales y Energéticos
Cinvestav-Unidad Saltillo
lourdes.diaz@cinvestav.edu.mx