

## Validación de un Método de Extracción de Alicina en Ajo y su Cuantificación por HPLC

Lourdes Díaz J.,<sup>a</sup> Karla Jiménez L.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional  
km 13 Carretera Satillo-Monterrey, 25900, Coahuila, México.  
lourdes.diaz@cinvestav.edu.mx

<sup>b</sup> Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara  
Bvd. García Barragán y Cza. Olímpica, 44420, Guadalajara, México.

### RESUMEN

Entre los constituyentes de mayor actividad biológica del ajo destaca la alicina, compuesto sulfurado altamente inestable responsable de sus propiedades farmacológicas además de su olor característico. Debido a la elevada degradabilidad de alicina, es importante el establecimiento de un método eficiente de extracción y de cuantificación que pueda ser usado en procesos de control de calidad en la industria de suplementos alimenticios. En este trabajo se describe un método de extracción de alicina y su cuantificación por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Se realiza una validación del método evaluando parámetros de linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad, selectividad y robustez.

### 1. INTRODUCCIÓN

La alicina (*S*-2-propenil éster del ácido 2-propenol-1-sulfino) representa típicamente el 70% de los compuestos sulfurados presentes en ajo fresco, siendo así el tiosulfinato de mayor abundancia en la planta [1]. Este es un compuesto que se forma a través de la interacción de su precursor (aliina) con la enzima aliinasa.

La aliina constituye el 0.24 % del peso global de la parte comestible del vegetal, se encuentra confinado en las vacuolas celulares y es el componente "madre" (farmacológicamente inactivo e inodoro) del cual se deriva la sustancia activa. La enzima aliinasa se encuentra en el citoplasma, de manera que el sustrato sólo tiene acceso a los precursores cuando se rompe el tejido (al ser machacado o cortado) provocando la formación de alicina acompañada del olor característico del ajo (Fig. 1).

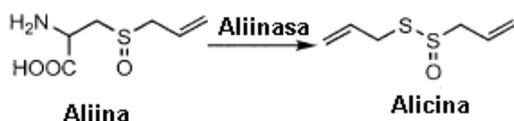


Fig. 1. Reacción de formación de alicina.

La alicina es un compuesto altamente volátil que una vez formado sufre una rápida descomposición hacia compuestos sulfurados, los cuales no poseen actividad biológica de interés farmacológico. Debido

a la elevada inestabilidad de este metabolito es necesario el control de varios factores para realizar una extracción eficiente y su posterior cuantificación.

La determinación y cuantificación de alicina en ajo fresco, seco o productos basados en ajo, ha sido un trabajo difícil de realizar debido a la dificultad de obtención de un compuesto de referencia de alicina, principalmente por la gran inestabilidad que presenta este metabolito. El problema ha sido superado, usando como patrón de referencia a extractos de ajo (Polvo de Ajo Estandarizado- PAE) [3, 5], a los que se ha determinado la concentración de alicina mediante técnicas espectrofotométricas.

Existen reportados varios métodos de análisis y cuantificación de alicina tanto en ajo fresco y seco como en extractos. Se tiene, por ejemplo, el procedimiento que sigue el *Institute of Nutraceuical Advancement* (INA), en el cual, la preparación de la muestra para la extracción del principio activo y su posterior cuantificación se realiza bajo condiciones muy estrictas de temperatura de los solventes y durante el proceso de extracción [2]. En ese método es muy importante que la temperatura se mantenga por debajo de los 10°C con el objetivo de evitar pérdidas de alicina durante el proceso de extracción y cuantificación. Por otra parte, también se pone especial énfasis en que el tiempo de extracción no sea muy largo para evitar la pérdida por degradación de este compuesto.

Sin embargo, existen serias controversias entre los diferentes métodos de extracción reportados en la

bibliografía, ya que otros autores mencionan que es necesario un tiempo determinado para que la formación de alicina se efectúe. Tal es el caso del método propuesto por el Laboratorio de Análisis Fitoquímico de *Southern Cross University* (LAFSCU) [3], en el cual la extracción involucra una etapa de reposo del extracto a temperatura ambiente durante un cierto periodo de tiempo.

Lawson y Wang, a su vez, proponen una metodología donde la muestra es tratada con diferentes solventes orgánicos, y se mantiene a una temperatura entre 12°C y 15°C, y el tiempo de análisis dura aproximadamente 6 h desde el momento en que comienza el tratamiento de la muestra hasta que la reacción es detenida [4].

Bocchini y col., por su parte, reportan un método analítico de determinación de alicina en ajo fresco usando HPLC en fase reversa con detección electroquímica y ultravioleta y reacción fotoquímica post-columna en línea [5].

A pesar de existir reportados varios métodos para la extracción y determinación de alicina en ajo fresco y extractos, no existe un consenso entre dichas metodologías, de manera que dependiendo del método elegido, la concentración de alicina evaluada en una muestra puede presentar variaciones importantes.

Adicionalmente, debido a los numerosos reportes donde se ha demostrado la actividad biológica de alicina, y a la cada vez mayor demanda del consumidor por los productos elaborados a base de principios naturales, se ha observado un notable incremento en la aparición en el mercado de nuevos productos que dicen contener alicina. De manera que resulta necesario contar con una técnica de análisis estandarizada que permita un control de los productos comercializados.

El presente trabajo se realizó como resultado de una solicitud de la empresa Nutrilite S. de R.L. de C.V. la cual necesitaba la validación de un método para la determinación de alicina en sus productos.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Material Vegetal

Las muestras vegetales fueron proporcionadas por la empresa Nutrilite S. de R.L. de C.V. (Tolimán, Jal.). Todas las muestras usadas en las pruebas del presente trabajo correspondieron a un lote. Debido a la alta inestabilidad del metabolito de interés, para

la evaluación de todos los parámetros que permitan la validación del método fue necesario mantener las muestras en idénticas condiciones antes de realizar las diversas pruebas. De esa manera, las muestras una vez proporcionadas por el productor, fueron conservadas a -80°C. Antes de cada análisis las muestras se pasaron a refrigeración (entre 0°C y 4°C) para descongelarse por un periodo de 12 h y posteriormente se dejaron a temperatura ambiente durante 20 min.

Previamente a la elección de la ultracongelación como método de conservación se hicieron pruebas del método de conservación usando liofilización y secado por deshidratación calorífica. Así, una parte de las muestras fue liofilizada y otra parte se sometió a deshidratación por secado a 55°C durante una semana. La elección del mejor método de conservación del material vegetal se realizó a través de la extracción y cuantificación de alicina.

### 2.2. Extracción del Analito (Método LAFSCU)

El método incluyó la preparación de una Disolución de Estándar Interno de p-hidroxibenzoato de etilo diluyendo aproximadamente 0.53 g del compuesto en 1 000 mL de agua. Adicionalmente fue necesaria la preparación de una solución acuosa 1 mM de ácido cítrico cuya función es detener la reacción de formación de alicina.

*Extracción:* Se pesó con exactitud de 0.001 g, aproximadamente de 1 a 5 g de ajo y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL seguido de la adición de aproximadamente 30 g de la disolución del estándar interno. La mezcla de ajo y disolución de etilparabeno se homogenizó durante aproximadamente 2.5 min, y al finalizar se mantuvo en reposo a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 3 500 rpm durante 10 min. Del sobrenadante se tomaron 2 mL y se aforaron a 10 mL con la disolución de ácido cítrico. Finalmente la disolución final se filtró a través de una membrana Millipore para su análisis por HPLC.

*Análisis por HPLC:* Las condiciones de análisis fueron: fase móvil Metanol/Agua 45/55 a flujo de 0.8 mL/min; Temperatura de análisis 25 °C y detección UV a 230 nm.

*Cuantificación:* Para la determinación de la concentración de alicina, se realizó un análisis cromatográfico usando el Polvo de Ajo Estandarizado (PAE) como patrón. El factor de respuesta de alicina se calculó usando la Ec. (1):

$$R_f = \frac{[Alicina]_{FGP}}{A_{FGP}}, \quad (1)$$

donde  $[Alicina]_{FGP}$  es la concentración de alicina (g/g) en la disolución de ajo estandarizado que se calcula mediante la Ec. (2); y  $A_{FGP}$  es el área de la señal del cromatograma;

$$[Alicina]_{FGP} = \frac{m_2 \times C_{FGP} \times 0.2}{m_2 + m_3} \frac{g}{g}, \quad (2)$$

donde  $C_{FGP}$  es la concentración de alicina de ajo estandarizado (%),  $m_2$  es la masa de ajo seco estandarizado (g), y  $m_3$  es la masa de la disolución estándar interna (g).

Y finalmente la concentración de alicina se calcula a partir de la Ec. (3):

$$[Alicina] = \frac{A_m \times R_f \times (m_4 + m_5)}{m_4 \times 0.2} \times \frac{10}{1}, \quad (3)$$

donde  $[Alicina]$  es la concentración de alicina (mg/g), en la mezcla desconocida,  $R_f$  es el factor de respuesta de alicina,  $m_4$  y  $m_5$  son los pesos de la muestra y de la disolución estándar interna, respectivamente, ambas en (g).

### 2.3. Validación

La validación del método se realizó evaluando los siguientes parámetros:

**Selectividad o especificidad:** Se usó como patrón polvo de ajo estandarizado (PAE) proporcionado por Cotter Foods (Australia) con una concentración de alicina certificada de 1.023 %.

**Linealidad:** Se usaron concentraciones de 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 % partiendo del peso indicado por la metodología, realizando el análisis por duplicado para cada nivel de concentración.

**Repetibilidad:** Se consideraron 3 concentraciones (20 %, 50 % y 100 %) con 8 réplicas de cada nivel de concentración. Los análisis se realizaron por un analista, en un equipo y en un día.

**Reproducibilidad:** Para ésta se utilizó la concentración del 100 % de la muestra. Se contó con la colaboración de dos analistas con un mínimo de dos réplicas por analista.

El coeficiente de variación se calculó a partir de la siguiente relación:

$$\text{Coeficiente de variación}(\%) = \frac{\text{Desviación estándar} \times 100}{\text{Media}} \quad (4)$$

**Exactitud:** Para su determinación se usaron tres concentraciones (20 %, 50 %, y 100 %) con tres replicas por cada nivel de concentración. Para la exactitud se relacionaron las concentraciones previamente utilizadas para la curva de calibración.

**Robustez:** En este parámetro se evaluó el efecto del cambio de la concentración de la fase móvil, la marca de la columna analítica y el analista.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como primer paso se realizó una extracción y cuantificación siguiendo el método LAFSCU a una muestra de ajo fresco inmediatamente recibido el lote.

En la Fig. 2.a se presenta el cromatograma correspondiente al PAE. De acuerdo a lo reportado, las señales a bajos tiempos de retención corresponden a los compuestos sulfurados, mientras que la señal (1) a alicina y la señal (2) a etilparabeno [3].

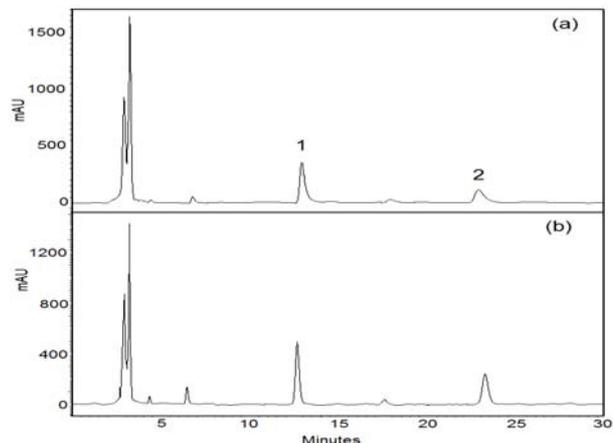


Fig. 2. Cromatogramas de (a) PAE y (b) ajo fresco.

El cromatograma obtenido para la muestra de ajo fresco (Fig. 2.b), presenta un perfil cromatográfico similar al del PAE. La intensidad de la señal de alicina indica que la muestra presenta una alta concentración del metabolito, de manera que la muestra no representaría ninguna limitante para realizar la validación del método.

### 3.1. Conservación de la Materia Prima

Si bien se ha reportado que el ajo fresco puede tener un promedio de vida de 3 meses almacenado a temperatura ambiente, se ha observado que la concentración de alicina disminuye progresivamente desde el primer día hasta ser casi indetectable [6]. Tan sólo en 15 días puede disminuir su concentración en un 50 %. De esta manera, se realizó un estudio de almacenaje de la materia prima, a fin de asegurar que durante el desarrollo experimental se contara con material vegetal de concentración constante del metabolito de interés.

En la Fig. 3 se presenta el perfil cromatográfico de la muestra sometida a deshidratación por calentamiento. En ella no se aprecia la señal correspondiente a alicina, observándose sólo la presencia de los compuestos sulfurados entre los 2 min y 5 min y la elusión de etilparabeno al tiempo de retención esperado (20 min).

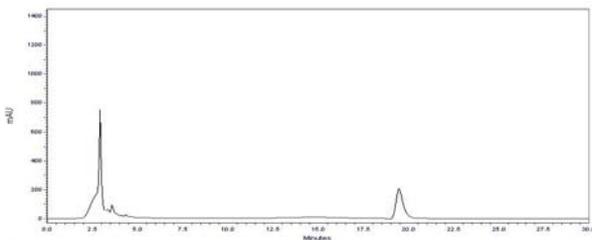


Fig. 3. Cromatograma de ajo deshidratado.

La ausencia de la señal de alicina, esperada alrededor de los 12.5 min, se explica en términos de la inestabilidad del compuesto al efecto de la temperatura [6]. Como se ha mencionado, la temperatura es un factor importante en el proceso de degradación de alicina. Así, al someter la muestra a deshidratación por calentamiento, probablemente las vacuolas liberaron a la aliinasa entrando en contacto con la aliina para formar la alicina y posteriormente, degradarla. El análisis se hizo por duplicado obteniéndose similares resultados.

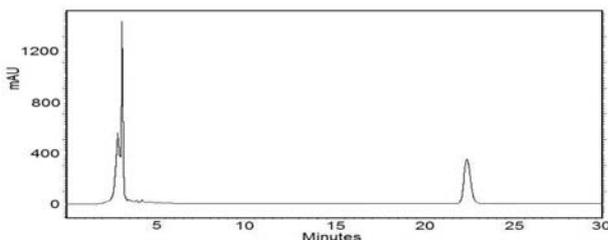


Fig. 4. Cromatogramas de ajo liofilizado.

En el caso en que la muestra se sometió a liofilizado, el comportamiento fue similar al caso del ajo deshidratado por calentamiento. La señal de alicina no se presenta en el cromatograma (Fig. 4).

La explicación que se dio a este fenómeno es que en el liofilizado, la muestra se somete a un proceso de congelado muy brusco (con nitrógeno líquido), lo que seguramente provoca una inhibición de la enzima aliinasa, de manera que el tiempo de extracción usado no es suficiente para que la enzima se active y comience reaccionar con la aliina para formar la alicina. Este hecho se soporta con estudios previos en los que se realizaron extracciones a baja temperatura seguido de análisis por HPLC o Cromatografía de Gases criogénico; donde se reporta que con extracción a baja temperatura sólo se forman tres compuestos, ninguno de ellos alicina [7].

Finalmente, se probó como método de conservación la ultra-congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Como puede verse en la Fig. 5, el perfil cromatográfico es prácticamente idéntico al obtenido previamente de la muestra fresca recién llegada del proveedor (Fig. 1). Se observa con claridad la presencia de las señales correspondientes a los compuestos sulfurados, alicina y etilparabeno. Al respecto de la concentración de alicina determinada en la muestra fresca y después del proceso de congelamiento, se obtuvo una desviación menor al 0.2 %.

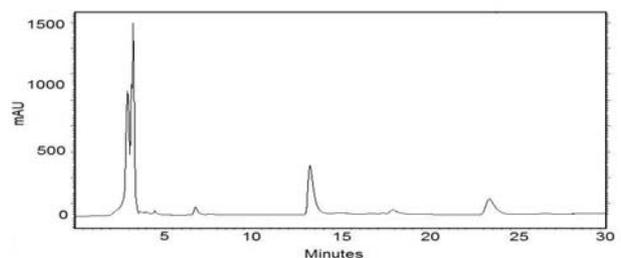


Fig. 5. Cromatograma de ajo congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tomando en consideración los resultados anteriores, se determinó como mejor método de conservación el de congelamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. Robustez

Se evaluó el efecto de la composición de la fase móvil y de la marca de la columna analítica de acuerdo a la Tabla 1.

Los perfiles cromatográficos obtenidos de las diferentes pruebas fueron muy similares al cambiar la composición de la fase móvil. La única diferencia

se observó en los tiempos de elusión de los analitos. Al usar una fase móvil de baja polaridad, la elusión de los sustratos se llevó a cabo en un menor tiempo, mientras que al usar una fase móvil de mayor polaridad el tiempo de elusión de todos los analitos es mayor. Al respecto del efecto de usar diferentes marcas de columnas analíticas, si bien con ambas columnas, la separación de los analitos es eficiente, resultó evidente que la resolución e intensidad de las señales fue mejor al usar la columna Zorbax que la Waters. Lo anterior puede atribuirse a la estructura "cross-linked" de la fase estacionaria de la columna Zorbax, lo cual da una mayor retención y por tanto mejor resolución de los picos. Sin embargo, desde el punto de vista analítico práctico, el usar una u otra columna no afecta a los resultados de identificación ni cuantificación de los compuestos de interés. De esta manera se pone de manifiesto que la variación de los factores composición de la fase móvil y marca de la columna analítica no influye en los valores de concentración del analito de interés, quedando demostrada la robustez del método.

Tabla 1. Parámetros probados para robustez.

Columna	Composición fase móvil (%)		Ref.
	Metanol	Agua	
Agilent Zorbax SB-C18, 4.6X250 mm, 5µm.	60	40	[6]
	50	50	[8]
	45	55	[5]
Waters Symmetry C18, 4.6X250 mm, 5µm.	60	40	[6]
	50	50	[8]
	45	55	[5]

**3.3. Selectividad**

Este parámetro se estudió realizando un ensayo de inhibición de la enzima. Se encontró que al no verificarse la formación de alicina, hay una ausencia de la señal correspondiente en el cromatograma. La ausencia de señal también es un indicativo de que a ese tiempo de retención no se eluye algún otro analito. Por otro lado, la especificidad hacia alicina también queda de manifiesto al evaluar la pureza del pico de alicina, la cual se encontró dentro del rango del límite de amplitud/pureza calculada ( $\geq 990$ ). En general el factor de pureza de la señal de alicina se calculó como  $< 999$ .

La especificidad está directamente relacionada con la selectividad, basándose en la respuesta específica de los compuestos presentes en la muestra. Como se ha podido observar en casi todos los cromatogramas anteriormente mencionados, el

método cumple el requisito de especificidad para el analito de interés en la determinación.

**3.4. Linealidad**

Para establecimiento de este parámetro se realizó una serie de análisis, variando la concentración de alicina del 20 %, 40 %, 80 % y 100 %. Los ensayos se realizaron con un mínimo de dos repeticiones por cada nivel de concentración. Los resultados arrojaron un coeficiente de correlación mayor a 0.984. El resultado es ligeramente menor al valor de aceptación de este parámetro (0.99), sin embargo considerando que el analito es un compuesto altamente inestable, el valor del coeficiente de correlación obtenido puede considerarse como satisfactorio para este análisis. Lo anterior se basa en que un coeficiente menor al 0.99 puede ser producto de una causa o de un efecto de factores que pueden estar involucrados en el análisis [8]. Tal es el caso de la gran inestabilidad de la alicina de manera que al momento de estarla analizando puede haber interacción entre el sustrato y la enzima que se provoca la degradación del mismo.

**3.5. Precisión**

La precisión del método analítico se evaluó en términos de la repetibilidad y precisión intermedia. Para lo cual se evaluó el grado de dispersión de los datos obtenidos, realizando 5 réplicas y tres niveles de concentración (20 %, 50 % y 100 %). Los resultados se muestran en la Tabla 2. De acuerdo a Morris-Quevedo [9], el valor aceptado coeficiente de variación (CV) es menor a 5 %, por lo que el método presenta una buena repetibilidad.

Tabla 2. Resultados de repetibilidad.

Concentración	Valor
20%	S= 77886.8
	CV= 4 %
50%	S= 201086.1
	CV= 4.4 %
100%	S= 135569.7
	CV= 1.7 %

Tabla 3. Reproducibilidad con dos analistas.

Factor	Valor
Analista 1	S= 120527
	CV= 0.4%
Analista 2	S= 447329
	CV= 1.5%

Para la precisión intermedia se evaluó el efecto del cambio de analista. Las pruebas se hicieron por triplicado, con un nivel de concentración. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

De acuerdo con Gutiérrez-Gaitén [10], el criterio aceptado entre distintos analistas, es un CV menor a 3 %. Como se observa en la tabla, los valores fueron menores al 2 %, de manera que el método puede ser ejecutado por cualquier persona con los conocimientos mínimos de preparación de soluciones aun cuando no esté familiarizado con el método y lo ejecute por primera vez.

### 3.6. Exactitud

Para determinar este parámetro se tomaron 3 concentraciones del peso indicado en el método (Tabla 4). Los coeficientes de variación obtenidos de los análisis demostraron un coeficiente de variación inferior al 2.5 %. El criterio de aceptación de este parámetro es del 3 % [10], lo cual nos indica que el método presenta una exactitud dentro del rango aceptable.

Tabla 4. Resultados de exactitud.

Concentración	Valor
20%	S= 0.04
	CV= 2.2 %
50%	S= 0.07
	CV= 1.5 %
100%	S= 0.21
	CV=0.8 %

## 4. 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 del método analítico.

## REFERENCIAS

[1] L.D. Lawson, Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. J. Amer. Chem. Soc., Vol. 691, 1998, pp. 176-209

[2] Allacin by High-Performance Liquid Chromatography, <<http://www.nsf.org/business/ina/garlic.asp?program=INA>>, mayo de 2008

[3] A. Dowell. Quantitation of Allacin in Garlic- High Performance Liquid Chromatography Meted with Internal Standard. *Phytochemical Analytical Laboratory*, Southern Cross University, Lismore, Australia, 1999.

[4] L.D. Lawson, Z.J. Wang, Low allacin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 49, 2001, pp. 2592-2599

[5] P.Bocchini, C.Andalo, R.Pozzi, G.C.Galletti, A.Antonelli, Determination of diallyl thosulfinate (allacin) in garlic (*Allium sativum* L.) by high-performance liquid chromatography with a post-column photochemical reactor. *Analytica Chemic.*, Vol. 441/1, 2001, pp. 37-43

[6] P. Cañizares, I. Gracia, L. Gómez, A. García, C. Martín de Argila, D. Boixeda, L. De Rafael, Thermal degradation of allacin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the in vitro growth of *Helicobacter pylori*. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 20, 2004, pp. 32-37.

[7] S.Abu-Lafi, J.W.Dembicki, P.Goldshlag, L.O. Hanu, V.M. Dembitsky, The use of the "Cryogenic" GC/MS and on-column injection for study of organosulfur compounds of the *Allium sativum*. *J. Food Comp. Analysis*. Vol. 17, 2004, pp. 235-245.

[8] J. Freund, G.A. Simon, *Estadística Elemental*, Pearson Prentice Hall, 8ª edición. México, 1994.

[9] H.Morris-Quevedo, A.Almarales-Arceo, K. Romero-Viamonte, M.Vidal-Colás, Validación de un método potenciométrico para la determinación de nitrógeno amínico en hidrolizados proteicos de microalgas. *Rev Cubana Farm.*, Vol. 36(1), 2002, pp. 56-61.

[10] Y. Gutiérrez-Gaitén, M. Miranda-Martínez, N. Varona-Torres, T. Rodríguez, Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba* L. *Rev. Cubana Farm.*, Vol. 34 (1), 2000, pp. 50-55.