

Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXIX. N° 2. Año 2007. 61-70.



Obtención de un estándar secundario de cuantificación para la síntesis y purificación de alicina.

Obtention of a quantitative secondary standard for allicin synthesis and purification.

Roxana E. González ¹
Alejandra B. Camargo ¹
José Luis Burba ²

Originales
Recepción: 23/11/2006
Aceptación: 02/10/2007

RESUMEN

Desde tiempos ancestrales, el ajo (*Allium sativum* L.) ha sido utilizado para la prevención y el tratamiento de dolencias. Sus efectos benéficos para la salud han sido atribuidos a los tiosulfatos, siendo la alicina el más abundante. La determinación rutinaria de la alicina es dificultosa dada su inestabilidad y la naturaleza reactiva de la misma.

El objetivo del trabajo fue obtener un estándar secundario para la cuantificación de alicina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Fueron ensayadas diferentes metodologías de síntesis y purificación de alicina. En el Laboratorio de Residuos Tóxicos de la Fac. Cs. Agrarias (UNCuyo), bajo condiciones controladas, se preparó polvo de ajo para ser utilizado como estándar secundario de cuantificación. La cuantificación de muestras problema contra ambos estándares (alicina pura y polvo de ajo estandarizado, respectivamente) no presentó diferencias significativas. El empleo de polvo de ajo estandarizado ofrece una alternativa viable simple para la cuantificación de alicina.

ABSTRACT

Since ancient times garlic has been used for the prevention and treatment of many health disorders. Garlic health benefits are attributed to thiosulphinates, being allicin the most abundant one. Its instability and highly-reactive nature represent a major drawback for routine HPLC-based analysis of this compound.

The aim of the present work was to obtain a secondary standard for the quantification the allicin by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Different methods for allicin synthesis and purification were evaluated. A dry garlic powder obtained under controlled conditions in the Toxic Residues Analytical Laboratory was prepared and it was used as secondary standard of the quantification. The results from the quantification of allicin in garlic samples, using both primary and secondary standards (pure allicin and dry garlic powder standardized for allicin content), were not significantly different. The use of standardized dry garlic powder offers a viable, simple and inexpensive alternative for allicin quantification.

Palabras clave

ajo • alicina • síntesis • purificación • cuantificación

Keywords

garlic • allicin • synthesis • purification • quantitation

- 1 Laboratorio de Residuos Tóxicos. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. rtoxicos@fca.uncu.edu.ar
- 2 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental La Consulta. C. C. 8. (5567) La Consulta. Mendoza. Argentina.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos ancestrales, el ajo (*Allium sativum* L.) ha sido empleado para la prevención y el tratamiento de diversas patologías: es uno de los más antiguos ejemplos documentados de plantas utilizadas como agentes medicinales (9). Fue citado por primera vez en el Codex Ebers (1550 a.C.), un papiro medicinal egipcio que reporta fórmulas terapéuticas basadas en el consumo de ajo como remedio útil para una gran variedad de dolencias tales como problemas cardíacos, dolor de cabeza, mordeduras, parásitos y tumores (6).

Muchos de estos efectos benéficos han sido atribuidos a los tiosulfatos, compuestos organoazufrados relacionados con el flavor característico de esta especie. Dichos compuestos se generan cuando el tejido es dañado, mediante la hidrólisis de los alquenil cisteinsulfóxidos (presentes en el citoplasma), mediada por la enzima allinasa para generar los tiosulfatos, amonio y ácido pirúvico. La alicina (diallil tiosulfato o allil-2-propentiosulfato) es más abundante: representa el 70% (peso/peso) del total de los tiosulfatos (aproximadamente el 0,4% de peso fresco) presentes en ajo fresco. Diversos estudios han demostrado que es un potente agente antimicrobiano y existe evidencia sustancial que sugiere que es responsable de la actividad anticancerígena y antioxidante observada (1).

La determinación rutinaria de la alicina es dificultosa dada su inestabilidad y su naturaleza reactiva. Su vida media puede variar dependiendo de la concentración, temperatura y solvente en el cual sea almacenada. La descomposición de la alicina puede producirse tras varias secuencias de reacciones que conducen a la formación de productos tales como polisulfuros, vinilditinas y ajoenos (9).

Debido al gran número de compuestos organoazufrados presentes tanto en ajo fresco como en los distintos subproductos es que se han desarrollado diversas metodologías para la cuantificación de los mismos. Para evaluar el contenido de tiosulfatos totales, las primeras determinaciones consistían en el dosaje de ácido pirúvico. El inconveniente de este método es que los niveles de ácido pirúvico se asocian al contenido total de tiosulfatos, por lo cual no se lo puede correlacionar solamente con la cantidad de alicina (4).

Los primeros métodos para la cuantificación de alicina fueron realizados mediante Cromatografía Gaseosa (GC) y Cromatografía Gaseosa-Espectroscopia de Masa (GC-MS), los cuales tenían como desventaja la rápida descomposición térmica en di- y trisulfuros de la alicina (3). Otra alternativa fue la cuantificación indirecta por conversión de la alicina en otros diallil disulfuro o allil mercaptan mediante GC: este método fue muy útil para analizar homogenatos de ajo fresco, con el inconveniente de que no podía ser utilizado en preparaciones de ajo que contuvieran tanto alicina como diallil disulfuros (7). En 1985 Miething realizó los primeros reportes de cuantificación mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase normal, de extractos éter dietílicos de ajo y otros productos. Los métodos han ido evolucionando y actualmente el empleo de HPLC en fase reversa es la modalidad analítica que ha permitido obtener los mejores resultados (4).

Hasta 2002 la cuantificación de la alicina fue realizada en el Laboratorio de Residuos Tóxicos de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo), siguiendo el método propuesto por Lancaster (5). Se empleaba un equipo HPLC-UV (254 nm), acoplado a una columna RP-C18 y fase móvil metanol:agua (50:50). Para la cuantificación se construía una curva de calibración mediante la adición de una solución de concentración conocida de alliina a una cantidad determinada de tejido de ajo, el cual era triturado para liberar la enzima allinasa que convierte la alliina directamente en alicina. Mediante los resultados cromatográficos de los tejidos de ajo con y sin la adición de alliina se calibraba el sistema.

Si bien mediante el empleo de esta técnica se obtuvieron resultados satisfactorios, los costos que insume resultan hoy inaccesibles para un laboratorio como éste en el que se llevó a cabo el estudio. Dado el creciente interés por el ajo y sus diferentes constituyentes resulta necesario contar con un método analítico rápido y reproducible para estandarizar y evaluar tanto el ajo fresco, deshidratado, como otros subproductos.

En este contexto se analizaron otras opciones, entre ellas el empleo de un estándar secundario de cuantificación, que consiste en la preparación de polvo de ajo bajo condiciones controladas de laboratorio y cuantificación de su potencial de alicina contra un estándar primario de cuantificación (alicina sintetizada y purificada) (7).

Objetivos

- Determinar las metodologías más adecuadas para la síntesis y la purificación de alicina.
- Adecuar una nueva modalidad de cuantificación empleando un estándar secundario para el análisis de alicina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de alicina

Tras la consulta bibliográfica se seleccionaron las síntesis propuestas por Mayeux (8) y Freeman (2) que consisten en la oxidación del dialdisulfuro con peróxido de hidrógeno en medio ácido. Las diferencias entre ambas pueden apreciarse en la figura 1 (pág. 64).

Purificación de la alicina sintetizada

Se ensayaron tres metodologías: cromatografía en placa delgada de sílica gel (7); cromatografía preparativa en columna RP-C18 (4) y colección de fracciones directamente del HPLC.

Cromatografía en placa delgada Si-TLC

La alicina sintetizada fue sembrada en Si-TLC. Los solventes de desarrollo fueron hexano:acetato de etilo (60:40) y la cubeta cromatográfica inmersa en agua a 0 °C. Para evaluar la resolución, la Si-TLC fue observada bajo luz UV (254 nm).

Mayeux, 1988

Freeman, 1995

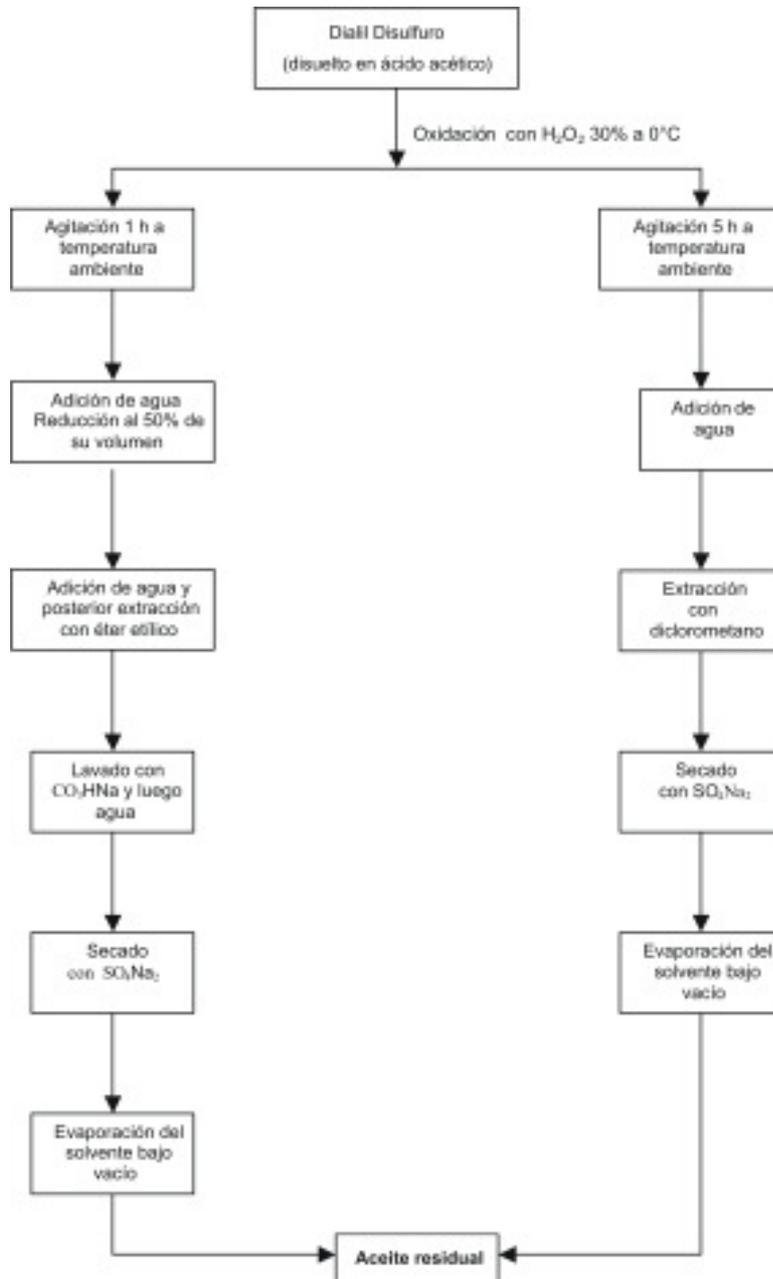


Figura 1. Esquema comparativo de los métodos de síntesis de alicina ensayados.

Estándar secundario de cuantificación: síntesis y purificación de alicina

Cromatografía preparativa

Se empleó una columna de 10 mm diámetro interno, rellena con 10 g Perisorb RP-C18 (30-40 μm); fue acondicionada con metanol, luego equilibrada con metanol:agua (50:50). La alicina sintética fue disuelta en el eluyente a razón de 10 μl en 2 ml de fase móvil y fue sembrada en la columna.

Para la elución del aceite a purificar se ensayaron distintas proporciones de fase móvil (metanol:agua). Se colectaron 30 fracciones cada una de las cuales fueron analizadas por RP-HPLC.

Colección de fracciones directamente del HPLC

La alicina sintética fue disuelta en fase móvil a razón de 15 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ e inyectada al HPLC. Se trabajó con una columna de fase reversa, como fase móvil metanol:agua, grado HPLC (50:50); flujo 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; loop de 100 μl ; longitud de onda del detector 254 nm. Las fracciones colectadas fueron mantenidas en una mezcla frigorífica (hielo+cloruro de sodio, 1:3) para su conservación y cada una hora y media fueron adicionadas de cloruro de sodio, extraídas con diclorometano, secadas con sulfato de sodio anhidro, concentradas bajo corriente de nitrógeno, y conservadas a -70°C . Para evaluar la calidad de la purificación, el residuo fue redisolto e inyectado al HPLC y se le realizó un barrido espectral (UV) desde los 200 nm a los 300 nm; el espectro obtenido fue comparado con los que figuran en la bibliografía (7).

Determinación de la concentración de la alicina purificada

Se leyeron las absorbancias a 240 nm y 254 nm empleando la relación de Lambert y Beer y teniendo en cuenta los coeficientes de extinción citados en la bibliografía (7).

Obtención del estándar secundario de cuantificación

Como material vegetal se utilizó ajo cultivar Sureño INTA perteneciente al banco de germoplasma del INTA La Consulta. El polvo de ajo fue preparado a partir de dientes de ajo que fueron feteados, deshidratados a 50°C (7) y pulverizados; se mantuvieron en envases de vidrio color caramelo bajo atmósfera inerte de nitrógeno.

La solución acuosa de alicina purificada, de concentración conocida, fue empleada como estándar primario de cuantificación del polvo de ajo.

Cuantificación de muestras problema contra el estándar primario y secundario de cuantificación

Dos muestras problema fueron analizadas por triplicado contra el estándar primario y secundario de cuantificación. La cuantificación de alicina de dichas muestras se realizó mediante HPLC en fase reversa, empleando como fase móvil metanol:agua (50:50), detector UV, 254 nm (6).

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de significancia por comparación de la media de dos muestras, por el programa Statgraphics Plus 4.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de alicina

Mediante los métodos de síntesis ensayados en ambos casos se obtuvo un aceite amarillento con un leve aroma a ajo recién picado. Mediante la dilución de 2 μ l del aceite en 1 ml de fase móvil (metanol:agua 50:50) e inyección al RP-HPLC se obtuvieron los cromatogramas que se presentan en la figura 2.

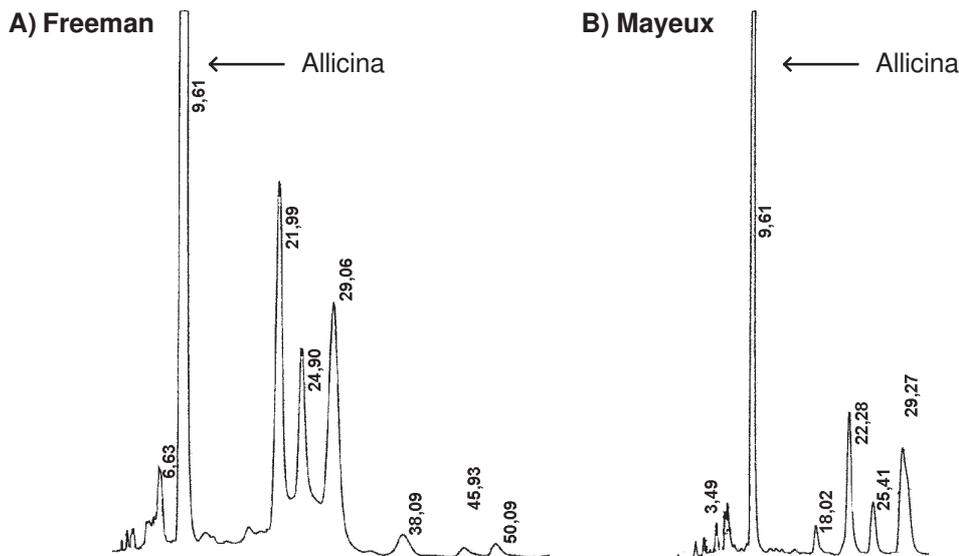


Figura 2.

Alicina sintetizada: HPLC-RP, fase móvil metanol:agua (50:50), flujo 0,8 ml/min λ :254 nm.

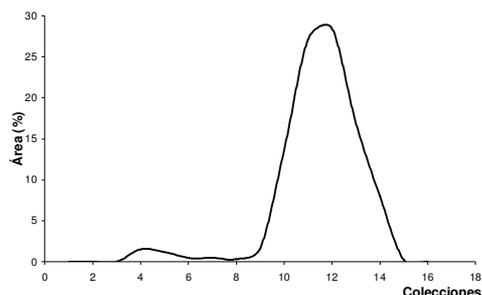
Los cromatogramas obtenidos al analizar ambos aceites muestran que el área correspondiente a la alicina sintetizada representa un 75% según el método propuesto por Freeman y un 54% según Mayeux, respecto del resto de las sustancias que aparecen en el cromatograma del aceite sintetizado. Estas diferencias de áreas permiten inferir que el rendimiento de síntesis puede deberse a los tiempos en los que se produce la reacción de oxidación del diallil disulfuro: según Freeman son 5 horas (tiempo de agitación a temperatura ambiente) lo cual permitiría una mayor oxidación de este compuesto; según Mayeux, es 1 hora. En los cromatogramas se observan además otros picos que corresponden a compuestos azufrados también sintetizados, junto con diallil disulfuro y diallil trisulfuro, debido a que el diallil disulfuro utilizado en la síntesis se presenta comercialmente al 80 % de pureza.

Purificación de la alicina sintetizada

Mediante la purificación de la alicina por Si-TLC, el valor de relación de frente (R_f) obtenido no coincidió con el valor el R_f citado en la bibliografía (7); por otra parte, la resolución cromatográfica alcanzada no fue la suficiente para lograr la separación de la alicina de los subproductos de reacción.

Empleando cromatografía preparativa, la mejor resolución se logró con una fase móvil metanol:agua 30:70, con un flujo de $0.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Los mayores porcentajes de alicina se evidenciaron en las fracciones 9 a 15 (figura 3) que fueron reunidas, concentradas y recromatografiadas para optimizar su purificación, eluyendo en metanol:agua 10:90. Las fracciones colectadas fueron luego inyectadas al HPLC.

Figura 3. Porcentaje de áreas correspondientes a las fracciones eluidas en metanol:agua 30:70 e inyectadas al HPLC.



Mediante esta metodología se logró reunir fracciones con altas concentraciones de alicina. La dificultad residió en que no se logró optimizar lo suficiente como para obtener alicina pura. Además el tiempo durante el cual la alicina permanece en contacto con los solventes es muy prolongado, lo que tiene como desventaja la descomposición de la misma en otros compuestos azufrados.

Las fracciones colectadas directamente del HPLC fueron extraídas con diclorometano cada una hora y media -para evitar su descomposición-. Luego de la extracción y concentración se obtuvo alicina pura de aspecto aceitoso, color amarillento y con leve aroma a ajo recién picado. Se realizó una dilución de la misma en fase móvil y se inyectó al HPLC (figura 4). El análisis cromatográfico reveló un solo pico correspondiente a alicina pura. Además fue disuelta en agua y se realizó un barrido espectral UV de 200 a 300 nm, obteniéndose un perfil de absorbancias que fue comparado con el citado en la bibliografía (3, 7). Pudo observarse un hombro característico a los 240 nm (7) (figura 5).



Figura 4. Alicina purificada. HPLC, RP-C18, fase móvil metanol:agua (40:60), fórmico (0,1%).

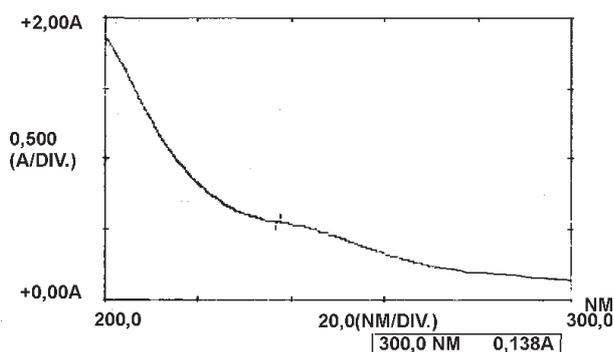
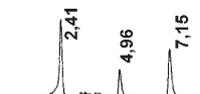


Figura 5. Espectro de absorción de la solución acuosa de alicina purificada.

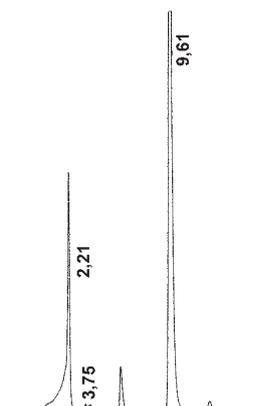
También se realizó una co-cromatografía adicionando una cantidad medida de la alicina purificada a una muestra de ajo y posterior inyección en HPLC. Comparando los cromatogramas obtenidos sin alicina y con la adición de la misma se observó un incremento en el área del pico correspondiente a alicina, lo cual confirma la identidad de la sustancia purificada (figura 6).

Figura 6.

Polvo de ajo.
HPLC-RP, metanol:agua (50:50),
1 ml/min, detector UV (254 nm).



A) Sin adición de alicina pura



B) Con adición de alicina pura

Determinación de la concentración de la alicina purificada

En la siguiente tabla pueden observarse los valores de absorbancia leídas a 240 nm y 254 nm de la solución acuosa de la alicina purificada. A partir de estos valores de absorbancia y los coeficientes de extinción extraídos de la bibliografía (7), se aplicó la relación de Lambert y Beer. Para la determinación de la concentración de la solución acuosa de alicina se consideró el valor obtenido a 254 nm, por lo que la concentración de alicina obtenida fue de 77,9 ppm.

Absorbancia	
λ_{240}	λ_{254}
0,989	0,727

Obtención del estándar secundario de cuantificación

El polvo de ajo obtenido bajo condiciones de laboratorio fue cuantificado por sextuplicado; se empleó la solución acuosa de alicina pura como estándar externo de cuantificación. La concentración de alicina en el polvo de ajo fue de 16,3 mg.g⁻¹ sobre sustancia seca.

Cuantificación de muestras problema contra el estándar primario y secundario de cuantificación

Dos muestras problema fueron cuantificadas por triplicado contra el estándar primario y secundario de cuantificación.

Muestras	Cuantificación contra estándar primario (mg.g ⁻¹)	Cuantificación contra estándar secundario (mg.g ⁻¹)
M1R1	13,7	13,02
M1R2	13,39	12,72
M1R3	11,49	10,92
M2R1	7,26	6,9
M2R2	6,7	6,37
M2R3	7,04	6,7

M: muestra

R: repetición

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de **t** para la comparación de medias de dos muestras. Esta prueba exige el supuesto que las desviaciones estándar no sean significativamente diferentes, para lo cual se realizó una prueba **F**: el resultado mostró que no existen diferencias significativas entre las desviaciones estándar de las dos muestras con un nivel de confianza del 95%.

De los resultados de la comparación de las medias de dos muestras se puede decir que las medias obtenidas cuantificando contra el estándar primario y secundario no difieren significativamente ($p: 0.54$).

CONCLUSIONES

- ❖ Ambos métodos de síntesis ensayados resultaron satisfactorios. Mediante el de Freeman se obtienen mayores rendimientos, pero el tiempo que insume es mayor. La situación contraria se da con el de Mayeux: menor rendimiento y menor tiempo de procedimiento.
- ❖ De las tres metodologías de purificación ensayadas, los mejores resultados se obtuvieron mediante la colección de fracciones del HPLC. El inconveniente de esta modalidad es que las cantidades (mg) de alicina pura obtenidas resultan bajas, pero suficientes para ser empleadas como estándar analítico. Sería necesario optimizar la purificación con el fin de obtener mayores cantidades de alicina pura para ser empleada en otros ensayos.
- ❖ El empleo de polvo de ajo estandarizado, como patrón secundario de cuantificación para el análisis de alicina, resultó una alternativa viable y de menor costo. El dosaje de muestras mediante esta modalidad no evidenció diferencias significativas respecto de la cuantificación contra patrón primario.

BIBLIOGRAFÍA

1. Das, S. 2002. Garlic. A natural source of cancer preventive compounds. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. Vol. 3. p. 305-311.
2. Freeman, F.; Kodera Y. 1995. Garlic Chemistry: Stability of S-(-2-Propenyl) 2-propene. -1-sulfinothioate (Allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. J. Agric. Food. Chem. Vol. 43. p. 2332-2338.
3. Iberl, B.; Georg, W.; Knobloch, K. 1990. Products of Allicin transformation: Ajoene and Dithiins, Characterization and their Determination by HPLC. In: Planta Medica. Vol. 56. p. 202-211.
4. Jansen, H.; Müller, B.; Knobloch, K. 1987. Allicin Characterization and its Determination by HPLC. Planta Medica N° 53. p. 559-562.
5. Lancaster, J. 2000. Agric Food Solutions Methodology for Allicin analysis in garlic. Comunicación personal.
6. Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. Journal of Chromatography A, 1112. p. 3-22.

7. Lawson, L.; Wood; S.; Hughes, B. 1991. HPLC Analysis of Allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. *Planta Med.* Vol. 57. p. 263-270.
8. Mayeux, P. et al. 1988. The pharmacological effects of allicin, a constituent of galic oil. *Agents and Actions.* Vol. 25. p. 182-190.
9. Rivlin, R. S. 2001. Historical Perspective on the Use of Garlic. *J. Nutr.* Vol. 131. p. 951S-954S.