

## Maisto papildų, kurių sudėtyje yra valgomųjų česnakų (*Allium sativum* L.) miltelių, cheminės sudėties tyrimas taikant efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodą

Gintarė Gibiežaitė, Andrejus Ževžikovas, Augusta Ževžikvienė, Liudas Ivanauskas, Mindaugas Marksa, Asta Kubilienė

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Pastaraisiais metais maisto papildų, kurių sudėtyje yra česnakų miltelių, populiarumas akivaizdžiai išaugo, tačiau juose esančios bioaktyvios medžiagos tiriamos retai. Tokių maisto papildų kokybė dažniausiai apibūdinama juose esančio aliino kiekiu, tačiau gausu ir kitų sieros junginių, kurie taip pat pasižymi įvairiu farmakologiniu veikimu. Šiuo validuotu ESC metodu galima kokybiškai nustatyti aliiną, aliciną, S-Alil-L-cisteiną (SAC),  $\gamma$ -Glutamil-S-alil-L-cisteiną (GLUAICs),  $\gamma$ -Glutamil-S-(trans-1-propenyl)-L-cisteiną (GLUPeCs) bei  $\gamma$ -Glutamilfenilalaniną (GLUPheAla). Tyrime naudota kolonėlė: YMC-Triart C18 (150 x 3,0 mm, 3  $\mu$ m), taikytas gradientinis eliuavimas. Naudoti eliuantai, į kurių sudėtį įeina heptansulfoninė rūgštis. Naudotas fotodiodų matricos detektorius (200 - 400 nm bangų ilgio diapazonas). Gauti biologiškai aktyvių junginių UV absorbcijos spektrai, kurie yra identiški mokslinėje literatūroje esantiems spektrams.

Česnakas, maisto papildai, ESC, aliinas, alicinas

### Ivadas

Valgomasis česnakas (*Allium sativum* L.) - daugiamecis žolinis, lelijinių (*Liliaceae*) šeimos augalas. Tai vienas seniausių tradicinių vaistinių augalų, kurių vartojo įvairios pasaulio kultūros daugeliui susirgimų bei ligų gydyti [10]. Šio augalo dėka buvo palaikomos imuninės, širdies ir kraujagyslių sistemos funkcijos, vėliau pastebėtas jo antioksidacinis, priešmikrobinis ir priešvėžinis aktyvumas [4]. Šiandien natūralioji medicina rekomenduoja česnaką vartoti virškinamojo trakto sutrikimų, žarnyno ligų, gerklės, grybelinių infekcijų, parazitinių gydymui [7].

Remiantis PSO duomenimis, širdies ir kraujagyslių ligos yra viena iš dažniausių mirties priežasčių. Apytiksliai apskaičiuota, kad iki 2030 metų šios ligos mirties priežastimi taps 23,3 mln. žmonių [12]. Pastaruoju metu labai susidomėta česnako veiksmingumu gydant širdies ir kraujagyslių ligas, nes daugelis mokslinių tyrimų pagrindė šio augalo efektyvumą mažinant mažo tankio lipoproteinų („blogojo“ cholesterolio), trigliceridų kiekį kraujyje, sukeliant trombocitų agregaciją mažinantį bei hipotenzinį poveikį [4; 6].

Aliinas randamas česnako gumbų ląstelių citoplazmoje, o fermentas alinazė- ląstelių vakuolėse. Kuomet česnakas pjaustomas, traiškomas ar kramtomas, vakuolė pažeidžiama ir iš jos išsiskiria alinazė. Ji dalyvauja fermentinės hidrolizės reakcijoje aliinui virstant alicinu, piruvatu ir amonio jonų ( $\text{NH}_4^+$ ) [2; 11]. Alinazę galima užslopinti vykdant ekstrakciją iš česnako miltelių tablečių ar kapsulių kaip ekstrahentą naudojant metanolio (0,01M): vandenilio chlorido/skrudžių rūgšties mišinį [3; 8].

Gaminant česnakų miltelius česnakų skiltelės smulkiai supjaustomos, išdžiovinamos ir sutrinamos grūstuvėje. Vėliau iš gautų miltelių gaminamos tabletės ar kapsulės. Manoma, kad česnakų miltelių cheminė sudėtis išlieka nepakitusi lyginant su šviežiu sveiku česnaku, tačiau gali skirtis junginių kiekiai. Pagrindinis junginys tiek šviežiame česnake, tiek jo milteliuose- aliinas [1; 8]. Taip pat randama ir vandenyje tirpių sieros organinių junginių- S-alil-L-cisteino (SAC), jo pirmtako  $\gamma$ -Glutamil-S-alil-L-cisteino (GLUAICs). [7].

Pastaraisiais metais maisto papildų, kurių sudėtyje yra česnakų miltelių, populiarumas akivaizdžiai išaugo, tačiau juose esančios bioaktyvios medžiagos tiriamos retai [9], todėl šio darbo tikslas - atlikti valgomųjų česnakų (*Allium sativum* L.) miltelių biologiškai aktyvių medžiagų kokybinę analizę Lietuvoje notifikuotuose maisto papilduose. Tyrimo objektas - dviejų skirtingų gamintojų maisto papildai: Maisto papildas-1 (Danija) bei Maisto papildas-2 (JAV).

### Tyrimo metodika

*Efektivioji skysčių chromatografija.* Siekiant pritaikyti efektyviosios skysčių chromatografijos metodiką biologiškai aktyvių medžiagų kokybiniam įvertinimui maisto papilduose, kurių sudėtyje yra česnakų miltelių, buvo tiriami skirtingų valstybių gamintojų maisto papildai: česnakų miltelių tabletės, Danija (toliau - Maisto papildas-1), česnakų miltelių kapsulės, JAV (toliau - Maisto papildas-2). Tyrime naudotas skysčių chromatografas Waters 2695 su fotodiodų matricos detektoriumi (Waters 996, 200 - 400 nm bangų ilgio diapazonas). Chromatografavimo kolonėlė - YMC-Triart C18 (150 x 3,0 mm, 3  $\mu$ m). Judrioji fazė sudaryta iš A ir B tirpiklių-eliuentų sistemos.

*Eliuentų parinkimas.* Eliuentas A: 10 mM natrio-divandenilio fosfato dihidratas, 5 mM natrio 1-heptansulfonato monohidratas (pH 2,1, reguliuojamas su fosforo rūgštimi). Eliuentas B: acetonitrilas, 10 mM natrio-divandenilio fosfato dihidratas, 5 mM natrio 1-heptansulfonato monohidratas (50:50, V/V, pH 2,1). Eliuentų tėkmės greitis 0,4 ml/min, injekcijos tūris 10  $\mu$ l, kolonėlės temperatūra 38  $^{\circ}$ C, detekcija vykdyta prie 208 nm UV šviesos bangos ilgio. Aliinas įvertintas kokybiškai, remiantis aliino standartu (*Sigma-Aldrich*, JAV).

*Tiriamųjų mėginių paruošimas.* Mėginiai paruošti remiantis literatūroje nurodyta ekstrakcijos metodika [3].

### Rezultatai ir aptarimas

Biologiškai aktyvios medžiagos, esančios maisto papilduose, buvo nustatytos remiantis jų sulaukymo laikais ir UV absorbcijos spektrais. Tyrimu metu naudota keletas

chromatografinių kolonėlių, tačiau geriausias junginių išskirstymas pasiektas naudojant *YMC-Triart C18* (150 x 3,0 mm, 3  $\mu$ m) kolonėlę. Atsižvelgiant į mokslininkų tyrimus (Arnault ir kt., 2003), tiriamųjų junginių atskyrimui taikytas gradientinis eliuavimas. Eliuavimo gradientas nurodytas 1 lentelėje. Optimalus junginių atskyrimas buvo pasiektas, kuomet eliuentų tėkmės greitis buvo 0,4 ml/min. Vieno mėginio chromatografavimo trukmė - 30 min.

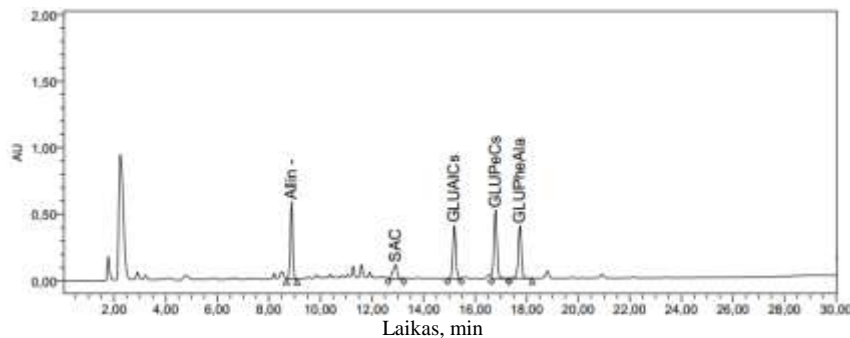
**1 lentelė.** Eliuavimo gradientas.  
**Table 1.** Gradient elution program.

Tirpiklių sistema	Laikas, min					
	0	5	25	26	28	30
<b>A</b>	100	70	46	0	0	100
<b>B</b>	0	30	54	100	100	0

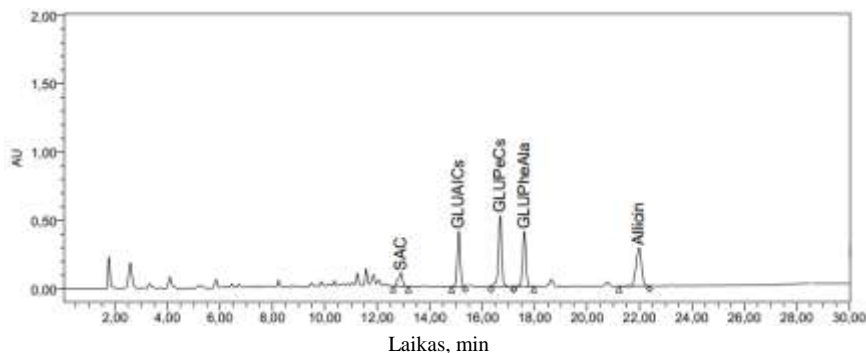
Chromatografavimas atliktas slopinant (1 pav., 3 pav.) ir aktyvinant (2 pav., 4 pav.) fermentą alinazę. Slopinant

alinazę nustatomas tik aliinas (alicinas susidaro tik aktyvinant alinazę). Be aliino maisto papilduose buvo nustatyta: S-Alil-L-cisteinas (deoksialiinas-SAC),  $\gamma$ -Glutamil-S-alil-L-cisteinas (GLUAICs),  $\gamma$ -Glutamil-S-(*trans*-1-propenyl)-L-cisteinas (GLUPeCs),  $\gamma$ -Glutamilfenilalaninas (GLUPheAla) bei dialiltiosulfinas (alicinas). Šie junginiai identifikuoti pagal chromatografinį profilį [3] ir jų UV spektrus literatūroje (5 pav.) [5]. Sulaikymo laikų ( $R_t$ ) vidurkis abiejuose papilduose yra: (-)aliino - 8, 905 min, SAC - 12, 939 min, GLUAICs - 15, 215 min, GLUPeCs - 16, 805 min, GLUPheAla - 17, 749 min, alicin - 22, 073 min.

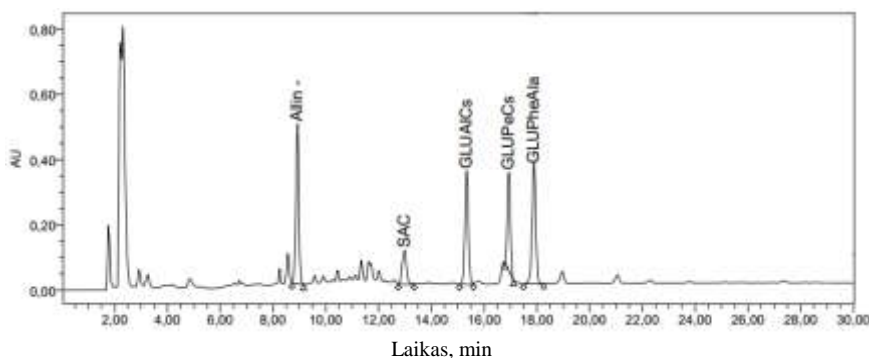
Taikant šį ESC metodą galima kokybiškai nustatyti aliiną, aliciną bei kitus sieros organinius junginius česnakų miltelių maisto papilduose. Pasirinktas metodas turi nemažai privalumų - geras biologiškai aktyviųjų junginių skirstymas, nesudėtingas mėginių paruošimas, gana trumpas analizės laikas, galimybė identifikuoti aliiną ir aliciną taikant vieną metodiką.



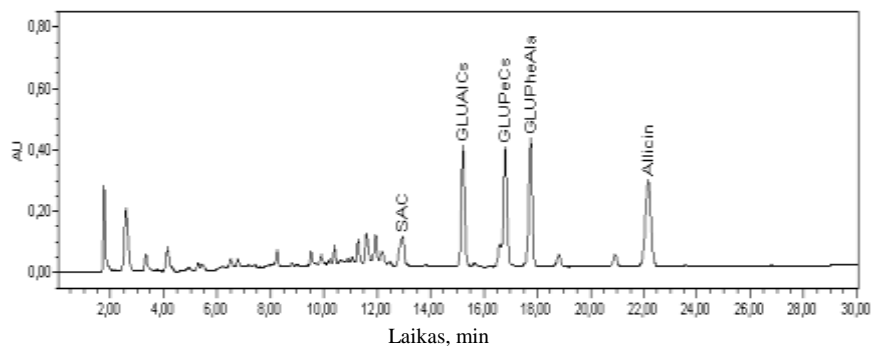
**1 pav.** Maisto papildo-1 chromatograma slopinant fermentą alinazę.  
**Fig. 1.** Chromatogram of food supplement-1 with inhibited allinase.



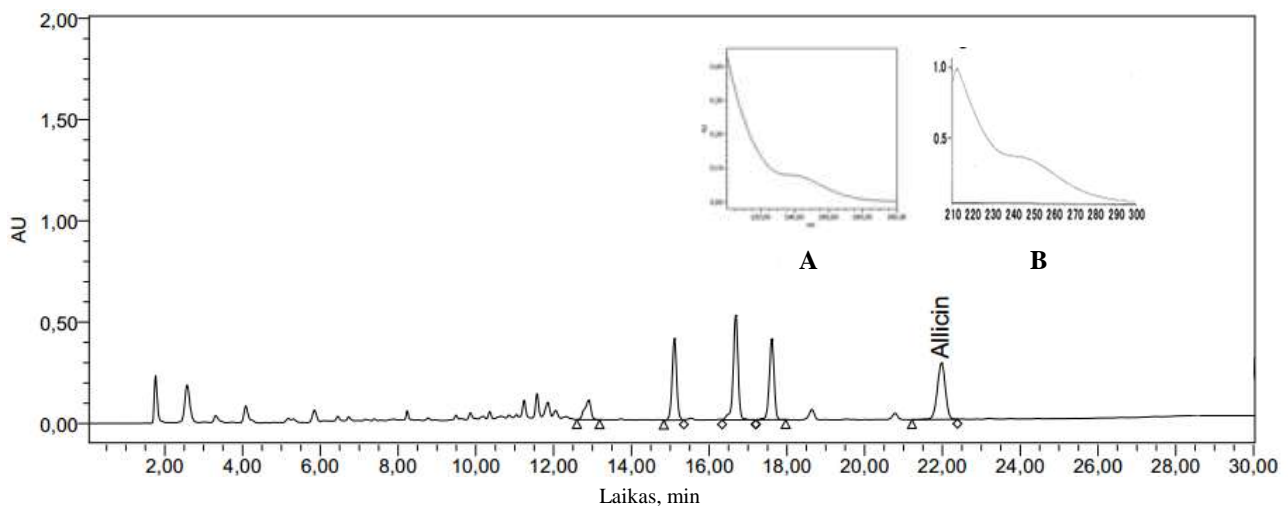
**2 pav.** Maisto papildo-1 chromatograma aktyvinant fermentą alinazę.  
**Fig. 2.** Chromatogram of food supplement-1 with activated allinase.



3 pav. Maisto papildo-2 chromatograma slopinant fermentą alinazę.  
Fig. 3. Chromatogram of food supplement-2 with inhibited allinase.



4 pav. Maisto papildo-2 chromatograma aktyvinant fermentą alinazę.  
Fig. 4. Chromatogram of food supplement-1 with activated allinase.



5 pav. Alicino UV absorbcijos spektrai: A) gautas eksperimento metu; B) pateiktas literatūros šaltinyje [5].  
Fig. 5. UV absorption spectra of alliin: A) experimental; B) literature data [5].

**Metodo validacija.** Metodika validuota pagal šiuos validacinius parametrus: specifiškumą, atkartojamumą, tarpinį preciziškumą. Atlikus tyrimus nustatyta, kad visi validaciniai parametrai atitinka jiems keliamus reikalavimus.

## Išvados

Pasirinkta efektyviosios skysčių chromatografijos metodika yra tinkama biologiškai aktyvių medžiagų maisto papilduose, kuriuose yra česnakų miltelių, kokybiniam įvertinimui, skirstymui bei identifikavimui.

## Literatūra

- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *American Society for Nutritional Sciences*. 2001; 955-962
- Apawu AK. Reversed-Phase HPLC Determination of Aliin in Diverse Varieties of Fresh Garlic and Commercial Garlic Products. A thesis presented to the faculty of the Department of Chemistry East Tennessee State University. 2009; 1-71
- Arnault I, Christides J.P, Mandon N., Haffner T, Kahane R, Auger J. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *Journal of chromatography A*. 2003; 69-75
- Brace LD. Cardiovascular Benefits of Garlic (*Allium sativum* L.). *J Cardiovasc Nurs* 2002;16(4):33-49
- Fujisawa H, Suma K, Origuchi K et al. Biological and Chemical Stability of Garlic-Derived Allicin. *J.Agric. Food Chem*. 2008; 4229-4235
- Gorinstein S, Jastrzebski Z, Namieskin J et al. The atherosclerotic heart disease and protecting properties of garlic: Contemporary data. *Mol. Nutr. Food Res*. 2007; 51(11); 1365- 1381
- Iciek M, Kwiecien I, Włodek L. Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009; 50:247-265
- Yi L, Su Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulphide. *Food Chem Toxicol* 2013;57:362-370
- Yoo M, Kim S, Lee S, Shin D. Validated HPLC Method and Temperature Stabilities for Oil-Soluble Organosulfur Compounds in Garlic Macerated Oil. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;1-8
- Majewski M. *Allium sativum*: Facts and Myths Regarding Human Health. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2014; 65(1):1-8
- Mason P. *Dietary Supplements*. *Pharmaceutical Press*, 4th edition. 2012; 214-220
- Tocmo R, Liang D, Lin Y, Huang D. Chemical and Biochemical Mechanisms Underlying The Cardioprotective Roles of Dietary Organopolysulfides. *Frontiers in Nutrition*. 2015 Febr; 2:1-1

Gintarė Gibiežaitė, Andrejus Ževžikovas, Augusta Ževžikoviėnė, Liudas Ivanauskas, Mindaugas Marksa, Asta Kubiliėnė

**High performance liquid chromatography (HPLC) method for chemical composition analysis of food supplements, containing garlic (*Allium sativum* L.) powder**

Summary

In recent years, the popularity of food supplements, containing garlic powder, obvious increased. However, bioactive substances in garlic powder are tested infrequent. The quality of such food supplements are mainly defined by alliin content, but there are a lot of other sulfur rich compounds, which also have various pharmacological effects. This validated HPLC method allows to determine qualitatively alliin, allicin, S-Allyl-L-cysteine (SAC),  $\gamma$ -Glutamyl-S-allyl-L-cysteine (GLUAICs),  $\gamma$ -Glutamyl-S-(*trans*-1-propenyl)-L-cysteine (GLUPeCs) and  $\gamma$ -Glutamyl phenylalanine (GLUPheAla). In this study *YMC-Triart* C18 (150 x 3,0 mm, 3  $\mu$ m) column has been used, gradient elution mode has been applied. Eluent system contains heptanesulfonic acid. Photodiode array detector (200 – 400 nm range) has been used. UV absorption spectra of biologically active compounds obtained during experiment are identical to the spectra listed in the scientific literature.

*Garlic, food supplements, HPLC, alliin, allicin*

*Gauta 2017 m. kovo mėn., atiduota spaudai 2017 m. balandžio mėn.*

**GINTARĖ GIBIEŽAITĖ.** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros magistrantė. Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas. Tel. (8-37) 32 72 46, el. paštas: gyntag@gmail.com.

**GINTARĖ GIBIEŽAITĖ.** Lithuanian University of Health Sciences Medicinal academy Faculty of Pharmacy Department of analytical and toxicological chemistry postgraduate student. Address: Sukilėlių 13, LT-50162, Kaunas. Tel (+370 37) 32 72 46, e-mail: gyntag@gmail.com.

**ANDREJUS ŽEVŽIKOVAS.** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros biomedicinos mokslų daktaras, docentas. Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas. Tel. (8-37) 32 72 46, el. paštas: andrejuszevzikovas@gmail.com.

**ANDREJUS ŽEVŽIKOVAS.** Lithuanian University of Health Sciences Medicinal academy Faculty of Pharmacy Department of analytical and toxicological chemistry doctor of biomedical sciences, assoc. prof. Address: Sukilėlių 13, LT-50162, Kaunas. Tel (+370 37) 32 72 46, e-mail: andrejuszevzikovas@gmail.com.

**AUGUSTA ŽEVŽIKOVIENĖ.** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros biomedicinos mokslų daktaras, docentas. Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas. Tel. (8-37) 32 72 46, el. paštas: augustazev@gmail.com.

**AUGUSTA ŽEVŽIKOVIENE.** Lithuanian University of Health Sciences Medicinal academy Faculty of Pharmacy Department of analytical and toxicological chemistry doctor of biomedical sciences, assoc. prof. Address: Sukilėlių 13, LT-50162, Kaunas. Tel (+370 37) 32 72 46, e-mail: augustazev@gmail.com.

**LIUDAS IVANAUSKAS.** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros biomedicinos mokslų daktaras, profesorius. Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas. Tel. (8-37) 32 72 46, el. paštas: liudas.ivanauskas@lsmuni.lt.

**LIUDAS IVANAUSKAS.** Lithuanian University of Health Sciences Medicinal academy Faculty of Pharmacy Department of analytical and toxicological chemistry doctor of biomedical sciences, professor. Address: Sukilėlių 13, LT-50162, Kaunas. Tel (+370 37) 32 72 46, e-mail: liudas.ivanauskas@lsmuni.lt.

**MINDAUGAS MARKSA.** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros lektorius. Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas. Tel. (8-37) 32 72 46, el. paštas: mindaugas.m.lsmu@gmail.com.

**MINDAUGAS MARKSA.** Lithuanian University of Health Sciences Medicinal academy Faculty of Pharmacy Department of analytical and toxicological chemistry lecturer. Address: Sukilėlių 13, LT-50162, Kaunas. Tel (+370 37) 32 72 46, e-mail: mindaugas.m.lsmu@gmail.com..

**ASTA KUBILIENĖ.** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros biomedicinos mokslų daktaras, lektorė. Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas. Tel. (8-37) 32 72 46, el. paštas: Asta.Kubiliene@lsmuni.lt.

**ASTA KUBILIENĖ.** Lithuanian University of Health Sciences Medicinal academy Faculty of Pharmacy Department of analytical and toxicological chemistry doctor of biomedical sciences, lecturer. Address: Sukilėlių 13, LT-50162, Kaunas. Tel (+370 37) 32 72 46, e-mail: [Asta.Kubiliene@lsmuni.lt](mailto:Asta.Kubiliene@lsmuni.lt)