



DIPARTIMENTO DI FARMACIA (DIFAR)

CORSO DI LAUREA IN FARMACIA

TESI DI LAUREA:

**Progetto INNOV: Interreg V-A Francia-Italia (ALCOTRA) (2014 -
2020) PITER progetto singolo n° 4073**

“Innovazione nelle Alpi del Mediterraneo - ALPIMED INNOV”

Metanalisi bibliografica e Indagini fitochimiche sull’aglio di Vessalico

Relatrice:

Prof.ssa Angela Bisio

Laureanda:

Martina Fanciulli

Correlatrice:

Prof.ssa Giuliana Drava

ANNO ACCADEMICO

2020/2021

Indice

<i>Ringraziamenti</i>	4
<i>Introduzione</i>	6
<i>1.1 Botanica</i>	8
<i>1.2 Coltivazione e interesse commerciale</i>	12
<i>1.3 L'aglio in cucina</i>	18
<i>1.4 La chimica dell'aglio</i>	20
<i>1.4.1 I composti organici volatili</i>	39
<i>1.4.2 I composti solforati dei prodotti commerciali</i>	40
<i>1.4.3 Biosintesi dei composti solforati</i>	53
<i>1.5 Metodologie analitiche per l'isolamento e la quantificazione dei composti presenti nell'aglio</i>	56
<i>1.5.1 Cromatografia su strato sottile e su carta</i>	63
<i>1.5.2 Cromatografia liquida ad alta pressione e spettrometria di massa</i>	64
<i>1.5.3 Gascromatografia e spettrometria di massa</i>	73
<i>1.5.4 Spettrometria di massa ambientale</i>	80
<i>1.5.5 Altre tecniche</i>	84
<i>1.5.6 Attuali tendenze nella ricerca</i>	87

<i>1.6 Determinazione dell'origine geografica dei campioni.....</i>	<i>91</i>
MATERIALI E METODI.....	95
<i>2.1 Metanalisi bibliografica</i>	<i>95</i>
<i>2.1.1 Pubblicazioni aventi come argomento la cromatografia liquida e spettrometria di massa</i>	<i>95</i>
<i>2.1.2 Pubblicazioni aventi come argomento la gascromatografia e spettrometria di massa.....</i>	<i>96</i>
<i>2.2 Analisi GC/MS dei campioni di “Aaglio di Vessalico”.....</i>	<i>97</i>
<i>2.3 Analisi LC/MS dei campioni di “Aaglio di Vessalico”</i>	<i>98</i>
RISULTATI E CONCLUSIONI.....	102
<i>3.1 Risultati della metanalisi bibliografica.....</i>	<i>102</i>
<i>3.1.1 Risultati della metanalisi bibliografica avente come argomento la GC/MS....</i>	<i>102</i>
<i>3.1.2 Risultati della ricerca bibliografica aventi come argomento la LC/MS</i>	<i>113</i>
<i>3.2 Risultati delle analisi in GC/MS</i>	<i>125</i>
<i>3.3 Risultati delle analisi in LC/MS.....</i>	<i>127</i>
TABELLA COMPOSTI.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	158

Ringraziamenti

Ringrazio di cuore la mia relatrice, la professoressa Angela Bisio, che mi ha accolta calorosamente in laboratorio dedicandomi il suo tempo e la sua attenzione e che mi ha mostrato cosa si nasconde dietro al meraviglioso mondo della fitochimica.

Ringrazio la dottoressa Valeria, la quale ha saputo dare al tempo passato in laboratorio quel tocco in più che ha permesso di accrescere le mie competenze in un ambiente speciale.

Ringrazio suor Anna, suor Regina, suor Teresina e suor Elisabetta che durante questi anni passati a Genova mi hanno fatto sentire a casa in un luogo lontano accogliendomi a cuore aperto nella loro residenza.

Grazie mamma per avermi fatto appassionare alla tua bellissima professione e grazie papà per avermi trasmesso l'importanza di mettercela tutta sempre. Ringrazio entrambi per essere sempre stati al mio fianco ma al contempo per aver lasciato spazio alle mie scelte spronandomi a seguire non solo la mia testa ma anche il mio cuore.

Ringrazio mio fratello Titta, senza il quale questi anni e non solo, la mia vita fino ad oggi, non avrebbe avuto lo stesso significato; da sempre compagno di giochi, ora compagno di studi e un domani compagno di lavoro.

Grazie Giovanni che con la tua fermezza, la tua tenacia ed al contempo estrema tenerezza e sensibilità hai riservato durante questi anni uno sguardo profondo e sincero verso la mia anima.

Grazie nonna Anna per le lunghe telefonate preziose mentre ero a Genova e per aver pregato per me ogni mattino prima degli esami e grazie nonno Giovanni per aver riservato sempre prima degli esami uno speciale “col vento in poppa” per la tua nipotina.

Grazie Zia Benedetta per avermi accompagnata quel primo giorno a Genova in residenza, ricordo ancora tutto come fosse ieri.

Grazie cara Neda per i nostri pranzi insieme e per avermi ascoltata durante le nostre lunghe chiacchierate in terrazza, in particolare per aver espresso sempre i tuoi pensieri sinceri, sia severi che affettuosi dimostrando quanto tu tenga a me.

Ringrazio tutti i miei compagni di università ed in particolare Alessandra, ricordo ancora quel 24 settembre 2015 in aula A. Ranise quando mi dissi: “Ehi ma noi due ci siamo già viste da qualche parte!” frase d’inizio per una amicizia preziosa senza la quale questi anni di università non sarebbero di certo stati gli stessi.

Infine, ringrazio tutti i professori del Dipartimento di Farmacia per i quali nutro una profonda stima poiché mi hanno trasmesso attraverso il loro metodo severo e diligente, da me tanto temuto in svariate sessioni d’esame, che le difficoltà riscontrate portino ad una maggiore consapevolezza. Vorrei citare in particolare la prof.ssa Fossa che durante la sua ultima lezione di Chimica Farmaceutica 2 mostrò la diapositiva: “*We scare because we care*” Grazie, niente di più vero.

Introduzione

Allium sativum L. è una specie originaria dell'Asia centrale che si è diffusa in diversi territori appartenenti a varie fasce climatiche, inclusa la Liguria, dove le coltivazioni sono situate principalmente nell'entroterra, quindi nella zona appenninica. L'entroterra ligure, per la particolare localizzazione geografica della regione, risente del clima proveniente dal mare, con gli inverni non particolarmente rigidi. Le particolari condizioni pedoclimatiche della zona conferiscono apprezzate proprietà organolettiche all'aglio, tali per cui l'ecotipo comunemente conosciuto come "aglio di Vessalico" è una delle più note varietà d'aglio italiane. La zona geografica di produzione, di lavorazione e confezionamento dell'aglio di Vessalico ricade esclusivamente nei territori dei seguenti comuni dell'Alta Valle Arroscia, in provincia di Imperia: Vessalico, Aquila d'Arroscia, Armo, Borghetto d'Arroscia, Cosio d'Arroscia, Mendatica, Montegrosso Pian Latte, Pornassio, Pieve di Teco, Ranzo, Rezzo, riuniti nell'Unione dei Comuni dell'Alta Valle Arroscia. L'area di origine dell'Aglio di Vessalico è comprovata da etichette rilasciate, numerate e vidimate dal comune di Vessalico, con il patrocinio dell'Unione dei Comuni dell'Alta Valle Arroscia. L'aglio di Vessalico è riprodotto attraverso la messa a dimora dei bulbilli che sono tradizionalmente chiamati, anche se impropriamente, semenza o semi. L'essiccazione viene fatta all'aria, senza l'ausilio di macchinari in grado di diminuire artificialmente e forzatamente il tasso di umidità relativa dei bulbi.

Tra le diverse attività del progetto ALCOTRA ALPIMED INNOV, miranti a fornire supporto scientifico e tecnico alla filiera di produzione di piante officinali e aromatiche in area transfrontaliera, è iniziato uno studio di caratterizzazione dell'aglio di Vessalico,

avente lo scopo di identificare eventuali costituenti peculiari dell'aroma, appartenenti alla classe chimica dei composti organo solforici.

1.1 Botanica

L'aglio, appartenente alla famiglia delle Amaryllidaceae J.St.-Hil., è una pianta erbacea perenne a bassa crescita in cui i bulbi sono importanti organi di immagazzinamento. La parte ipogea è composta dal bulbo (diametro 2-4 cm), spesso prolifero, con bulbilli oblungi o globosi e tuniche papiracee bianche, tenuti insieme da un disco o da un tessuto staminale indurito chiamato piastra basale. Lo scapo è cilindrico, con diametro di 1-1.5 cm, avvolto da guaine fogliari fino a metà. La lamina fogliare è lineare, piatta, liscia, larga 16-12 mm e lunga 30-60 cm, dall'apice acuto. Non vi sono foglie sullo scapo fiorale che risulta liscio pieno e rotondo, tranne la singola spata membranosa lungamente rostrata che racchiude la giovane infiorescenza ad ombrella. L'infiorescenza è subsferica, ricca (diametro 6-10 cm) oppure quasi completamente sterile e bulbillifera. La spata è univalve, lungamente rostrata, più lunga dell'ombrella. I fiori, portati da sottili peduncoli, sono formati da un perianzio di 6 segmenti e misurano circa 4-6 mm di lunghezza; il colore è tendente al rosa; gli stami sono 6 e le antere sono sporgenti; l'ovario è supero, triloculare. La specie è comunemente coltivata e spesso sub spontanea presso gli orti, in areale da 0 a 1500 m. (1)



Figura 1. *Allium sativum* L. (2)

Comunemente si distinguono due principali sotto-specie di aglio, l'aglio a collo duro e l'aglio a collo morbido.(2) L'aglio a collo duro (*A. sativum* ssp. *ophioscorodon*), produce scapi o steli di fiori e preferisce climi settentrionali con inverni freddi. Al taglio, attraverso la sezione mediana del bulbo, il tipo a collo duro rivela un singolo cerchio di 6-11 bulbilli intorno a un gambo legnoso centrale. Prima della fioritura, lo scapo si arriccia verso l'alto man mano che cresce, avvolgendo l'anello con 1-3 spire, prima di raddrizzarsi e dare origine a piccoli bulbilli simili a semi. Gli scapi di aglio vengono generalmente strappati, mentre sono ancora avvolti, tre settimane prima che i bulbi siano pronti per essere raccolti, in modo da migliorare la crescita dei bulbi. La mancata rimozione degli scapi può ridurre la resa dei bulbi del 33%.

L'aglio a collo morbido (*A. sativum* ssp. *sativum*), presenta in sezione mediana del bulbo fino a 24 bulbilli (a volte molti meno) in più strati intorno a un fusto centrale morbido, con grandi bulbilli intorno all'esterno e piccoli bulbilli centrali. Dal momento che si sviluppa solo un breve scapo privo di una sommità fiorale, a volte è chiamato aglio a collo

corto. L'aglio a collo morbido presenta generalmente una migliore capacità di conservazione rispetto all'aglio a collo duro che diversamente si adatta meglio a climi più freddi.

Sebbene l'origine delle specie di *Allium* rimanga speculativa, le prove suggeriscono che l'aglio e la cipolla siano stati domesticati per la prima volta nelle regioni montuose dell'Asia centrale del Tagikistan, della Turkmenia, dell'Uzbekistan, dell'Iran settentrionale, dell'Afghanistan e del Pakistan, e molto probabilmente portato in Medio Oriente da Marco Polo e altri viaggiatori sulla Via della Seta. Ricerche recenti individuano il lato nord-occidentale dei Monti Tien Shan (ad esempio, Kirghizistan, Kazakistan) come il più probabile centro di origine dell'aglio.(3)

Per motivi tassonomici, il suo antenato selvatico (se ancora esistente, o i suoi parenti stretti) dovrebbe crescere ovunque in un'area dal Mediterraneo al sud dell'Asia centrale. Un aglio selvatico a fioritura copiosa con antere lunghe e sporgenti è stato descritto come *A. longicuspis*. Tuttavia, tali lunghi filamenti sono sviluppati in tutti i gruppi di aglio studiati se lo sviluppo del fiore è forzato artificialmente rimuovendo i bulbilli in una fase molto precoce. I discendenti vegetativi dell'aglio selvatico assomigliano ai tipi comuni dell'aglio, che sono stati coltivati per lungo tempo dall'umanità. Così, benché non sia evidente nessun carattere affidabile per mantenere *A. longicuspis* a livello di specie, diversi studiosi continuano a considerarlo come il vero antenato selvatico dell'aglio. Più recentemente, è stata rilevata una notevole somiglianza con l'aglio della specie selvatica turca *A. tuncelianum*, che denota questo taxon come un altro candidato per l'antenato selvatico. A differenza del caso della cipolla portatrice di semi, la perdita di capacità di

moltiplicazione generativa ha portato ad una variazione morfologica e genetica molto più limitata nell'aglio, indipendentemente dalla vasta area in cui è in coltivazione. Contrariamente alle precedenti classificazioni intraspecifiche formali, le recenti proposte classificano le numerose selezioni esistenti in gruppi di cultivar informali. La maggior parte dell'aglio proveniente dall'Asia centrale appartiene al gruppo dei *longicuspis* (grandi piante da semente, bulbi molti piccoli, in qualche misura cultivar ancora fertili). Potrebbero essere stati il pool genetico da cui si sono sviluppati gli altri gruppi cultivar - i sottogruppi subtropicali e Pekinese (piante più piccole, pochi bulbi e grandi) - che si sono eventualmente sviluppati nelle particolari condizioni climatiche dell'Asia meridionale, sudorientale e orientale, il gruppo del *sativum* mediterraneo (tipi da semente e non, grandi bulbi) e il gruppo dell'*ophioscorodon* dell'Europa centrale e orientale (lunghi scapi a spirale, pochi bulbi grandi).(4).

1.2 Coltivazione e interesse commerciale

Il bulbo è l'organo della pianta che principalmente ha valenza economica, anche se in alimentazione vengono consumati anche le foglie fresche, gli pseudofusti e i bulbilli.(4)

Il bulbo di aglio è costituito da numerosi bulbi più piccoli, chiamati bulbilli, anche se occasionalmente i bulbi contengono solo un singolo bulbillo, di solito chiamato "tondo."

I bulbi d'aglio vengono suddivisi nei bulbilli entro 24 ore dalla semina, quando la temperatura inizia a raffreddarsi per prevenire la germinazione prematura. I bulbilli vengono piantati con piastra basale verso il basso, almeno 5 cm sotto la superficie e circa 18 cm tra l'uno e l'altro. Nei climi più caldi, l'aglio a collo duro deve essere conservato a 7-10 °C per circa tre settimane prima della semina. Se lo si desidera, l'aglio può essere coltivato fino alla massima formazione di bulbi e i bulbilli piantati. L'aglio è sensibile ai periodi di luce solare e di temperatura ed ogni pianta arresterà lo sviluppo quando viene raggiunto un determinato punto nel ciclo di luce solare. L'aglio richiede adeguata umidità durante i primi stadi della crescita, mentre durante le ultime settimane risente di un clima umido; viene raccolto quando le foglie inferiori sono marroni dalla metà alla tre quarti (le foglie verdi iniziano a morire dal basso verso l'alto); una pianta campione deve essere sradicata durante questo periodo per verificare lo stato di maturazione ai fini della raccolta. L'aglio viene poi fasciato o intrecciato e immagazzinato lontano dalla luce solare diretta, ad esempio in un locale di stagionatura, a bassa umidità, con buon flusso d'aria, dove nel corso di 10-20 giorni perde il 18-20% del suo contenuto di acqua originale. Lo stoccaggio commerciale a lungo termine dell'aglio comporta la refrigerazione (fino a -5°C) in atmosfera azotata, per evitare la germinazione. L'aglio fresco, appena raccolto da

terra, a volte chiamato "aglio verde", ha un contenuto di umidità più elevato, ha un sapore più mite ed è comune nei mercati agricoli. L'aglio buono deve essere sodo e gli spicchi non devono essere essiccati o scoloriti. L'aglio è relativamente fragile; l'ammaccatura innesca le reazioni chimiche che rilasciano l'allicina; non deve essere conservato in frigorifero poiché la combinazione di bassa temperatura, ossigeno e umidità innesca l'insorgenza di muffe e germogli prematuri, in particolare i frigoriferi "antigelo" seccano il bulbo. È stato effettuato uno studio su bulbilli di aglio coreano portati a bassa temperatura (5°C per 5 settimane) ed è stato evidenziato un decremento di peso della pianta in crescita e un incremento di sintesi di polifenoli e antocianine.(5) L'aglio deve essere quindi conservato a temperatura ambiente in un luogo fresco e ventilato; il metodo migliore di conservazione (in genere per 2-6 settimane) è in un vaso di argilla con fori.(3) I bulbi di aglio, se conservati a -3°C, possono essere utilizzati per la semina successiva,(Volk et al., 2004) ed inoltre è possibile stimare la durata di conservazione dell'aglio calcolando l'indice di germinazione interno.(Vàzquez-Barrios et al., 2006)

Secondo le statistiche della FAO,(6) le specie del genere *Allium* sono il quarto gruppo più abbondante di piante non leguminose prodotte in commercio dopo patate, manioca e pomodori. Cipolla, aglio, cipolla giapponese, scalogno e porri sono le colture commestibili più importanti. Oltre all'aglio, sono consumate dall'uomo circa 20 altre specie di *Allium*. L'aglio è stato usato fino dall'inizio della storia documentata, fu trovato nelle piramidi egizie e negli antichi templi greci e citato diverse volte dalla Bibbia. Antichi testi medici provenienti dall'Egitto, dalla Grecia, da Roma, dalla Cina e dall'India prescrivevano applicazioni mediche per l'aglio. In molte culture, l'aglio è stato somministrato per fornire forza e aumentare la capacità di lavoro per gli operai. Ippocrate

prescriveva l'aglio in numerose patologie. L'aglio veniva dato agli atleti olimpici in Grecia, come agente di "miglioramento delle prestazioni". È interessante notare che culture che si sono sviluppate senza contatto tra loro siano giunte a conclusioni simili sull'efficacia dell'aglio.(3, 7) Esistono anche specie di *Allium* utilizzate per scopi ornamentali, come *A. aflatunense*. Un'altra importante attività economica legata ad *Allium* è la produzione di sementi. Il valore lordo della produzione di specie di *Allium* per il 2014 è stato di 61.348 milioni di dollari; circa il 70% di questo valore è dato dai bulbi secchi di cipolla, il 25% dall'aglio, il 4% da cipolle verdi e scalogni e l'1% dai porri. La produzione delle colture di *Allium*, in particolare di aglio e cipolla, ha mostrato un aumento importante dal 2000, in gran parte motivato da un aumento del consumo pro capite e dalla maggiore consapevolezza da parte dei consumatori delle virtù benefiche delle specie di *Allium*. La produzione mondiale attuale dell'aglio è di circa 24.9 milioni di tonnellate all'anno, coltivate in 1.5 milioni di ettari.(6) Dal 1970, la produzione mondiale di aglio è aumentata di oltre 10 volte, mentre la superficie coltivata è aumentata di circa 4 volte. Oltre al consumo fresco, un altro settore importante per il commercio è dato dalla produzione di prodotti a base di aglio essiccato e trasformato destinati all'industria alimentare e come integratori per la salute.(8) L'aglio essiccato presenta un contenuto maggiore di proteine, fibre, flavonoidi, tannini rispetto ai campioni di aglio fresco, dimostrando quindi una maggiore attività antiossidante.(9)

L'aglio è coltivato principalmente nelle zone temperate. Il bulbo di aglio è adatto per lo stoccaggio e il trasporto, e quindi vi è un importante commercio internazionale. Il principale paese produttore ed esportatore è la Cina, che produce circa l'80% della produzione mondiale totale. La produzione di aglio in Cina ha superato le cifre registrate

dal secondo produttore mondiale, l'India, più di dieci volte. Altri importanti produttori sono Corea del Sud, Egitto, Russia, Myanmar, Spagna, USA, Uzbekistan, Argentina e Brasile. I principali esportatori sono Cina, Spagna e Argentina, mentre i principali importatori sono Indonesia, Brasile, Vietnam, Siria, USA, Pakistan, Russia, Germania, Italia e Francia.(6) Essendo il primo esportatore, la Cina domina il mercato internazionale dell'aglio fresco e disidratato. Secondo la FAO (6), la resa media mondiale è di circa 16 t ha⁻¹ di aglio secco; anche se ci sono paesi con una resa media superiore a 30 t ha⁻¹, per le buone condizioni di crescita, irrigazione e le eccellenti pratiche agronomiche. Sebbene la storia della produzione dell'aglio mostri un costante aumento negli ultimi 45 anni, l'aumento più drammatico della produzione totale e della resa è stato osservato negli ultimi 15 anni; l'aumento delle rese di aglio prodotto in Cina è in gran parte responsabile di questo cambiamento. Per quanto riguarda il consumo, in alcuni paesi come la Repubblica di Corea sono stati segnalati 10 kg/capite/anno. Negli Stati Uniti il consumo è di circa un kg/capite/anno. Negli ultimi decenni il consumo di aglio è passato da 1,6 kg/capite/anno a quasi 3 kg/capite/anno; responsabile di questo incremento è la consapevolezza da parte dei consumatori dei benefici per la salute associati all'assunzione di aglio.(10, 11) In tutto il mondo sono coltivati e consumati diversi tipi di aglio, a collo duro, a collo morbido, asiatici, tipi mediterranei o russi. Le preferenze dei coltivatori e dei consumatori variano a seconda della regione geografica, del contesto culturale e dell'uso finale. Sebbene i bulbi freschi intatti siano la forma abituale di aglio commercializzato, le preparazioni di aglio fresco (ad es. tritate, affettate o tritate), così come le forme disidratate di condimento sono comuni in diversi paesi. In parti dell'Asia e del Nord Africa sono

commercializzate le foglie di aglio. Inoltre, per l'industria nutraceutica vengono impiegati preparati di aglio.(8)

In Italia gli ecotipi d'aglio sono distinti in bianchi, e pigmentati (rosa e rossi). Gli agli bianchi sono caratterizzati da tuniche esterne completamente bianche, generalmente tardivi, di grossa pezzatura. Fra i più noti agli bianchi vi sono il "Piacentino bianco, il "Bianco Polesano", il "Voghera", il "Bianco Piemontese", il "Bianco Napoletano" e l'"aglio dell'Ufita". Gli agli pigmentati, caratterizzati da tuniche colorate più o meno intensamente, presentano bulbilli irregolari, meno serrati e meno serbevoli; sono quindi indicati al consumo fresco. I più noti fra essi sono il "rosa d'Agrigento", il "rosa napoletano", il "Rosso di Nubia", il "Rosso di Sulmona" e il "rosa di Resia". Le maggiori coltivazioni sono quelle di aglio bianco. Nel settentrione l'aglio viene raccolto nel periodo tra giugno e luglio mentre nel meridione la raccolta è anticipata a maggio. Il momento della raccolta corrisponde al disseccamento delle foglie.

L'"aglio di Vessalico" è riconducibile agli ecotipi dei bianchi da serbo, anche se, appena raccolto, evidenzia sempre tipiche striature bruno-rosate sulle tuniche del bulbo su quelle dei bulbilli. Tali striature, più o meno appariscenti, tendono a scomparire durante l'essiccamento. I bulbi hanno dimensione medio piccola con tuniche esterne di spessore medio-fine, ben aderenti. L'altezza media è di 3.15 cm, il diametro maggiore medio di 4.3 cm, il diametro minore medio di 3.56 cm. La forma è leggermente schiacciata e presenta una sezione orizzontale ellittica. I bulbilli, o spicchi, sono asimmetrici, compatti, in numero medio di 8, con diametro medio 1.0 cm e altezza media 2.17 cm. Il colore della polpa è bianco - crema ed il germoglio interno di piccole dimensioni ("anima sottile").

Dal punto di vista organolettico – olfattivo, l'”aglio di Vessalico” presenta buona intensità di profumi, che risultano delicati ed equilibrati, notevole fragranza, gradevolmente pungente con sentori erbacei freschi e lievi note balsamiche. L'”aglio di Vessalico” presenta equilibrio e morbidezza dei profumi, in questo differenziandosi dagli altri ecotipi italiani, con aromi spesso invadenti ed aggressivi.

1.3 L'aglio in cucina

A. sativum L. è tra le più antiche specie coltivate ed è tradizionalmente impiegata come spezia in cucina per insaporire gli alimenti.(2) Per ottenere il massimo sapore da uno spicchio d'aglio, esso deve essere rigorosamente schiacciato, in modo da favorire la reazione tra l'alliina (1), precursore del sapore, e l'enzima alliinasi. L'aglio schiacciato dovrebbe essere lasciato riposare per dieci minuti per massimizzare l'azione enzimatica prima di sottoporlo a riscaldamento. L'uso di una piccola pressa o torchio per l'aglio, che produce aglio schiacciato con uno sviluppo dell'aroma di circa tre volte superiore a quello dell'aglio tritato o sminuzzato, ha raccolto sia sostenitori sia critici. Alcuni buongustai sostengono che al fine di ottenere un sapore superiore si debba tritare finemente e tagliare l'aglio con un coltello da cucina. Si ritiene che l'aglio schiacciato da una pressa abbia un sapore diverso dall'aglio macinato; dal momento che in questo modo vengono rotte più pareti cellulari, vengono liberati più composti responsabili di un forte sapore di aglio. Il sapore e l'aroma dell'aglio cotto o fritto è molto diverso dal gusto pungente e dall'aroma forte dell'aglio crudo appena tagliato. Dopo condimento con olio d'oliva e cottura per 45 minuti a 204°C l'aglio assume un sapore di caramello dolce, morbido, con sentori di nocciola. Il modo migliore per aggiungere delicatamente il sapore dell'aglio a un'insalata è strofinare accuratamente la ciotola con uno spicchio, lasciare asciugare la ciotola per qualche minuto, e poi procedere con l'aggiunta degli ingredienti dell'insalata. L'aglio crudo schiacciato, se rosolato fino all'imbrunimento, diventa amaro e sgradevole; esso va rosolato con cura fino a quando assume un colore dorato chiaro. Tuttavia, interi spicchi d'aglio che sono stati prima brevemente messi in acqua bollente possono essere rosolati o

anche caramellati. Quando gli spicchi d'aglio interi vengono tostati con le membrane esterne diventano marroni, dolci e burrosi. L'aglio può essere gustato anche se messo in salamoia. In Russia sono particolarmente apprezzati i bulbi rosso lucente di aglio sottaceto con succo di barbabietola. In Cina per Capodanno viene servito aglio "Laba", un aglio sottaceto verde intenso. Si noti che le preparazioni di aglio contenenti olio e bulbilli pelati devono essere acidificate a $\text{pH} < 4,5$ con aceto o vino prima dell'immagazzinamento per prevenire l'avvelenamento da botulismo. Quando si essicca l'aglio per scopi commerciali si raccomanda che le fette di aglio (spessore ottimale di 10 mm) vengano essiccate ad aria o sottovuoto a temperature non superiori a 50°C , in quanto l'alliinasi viene denaturata dal riscaldamento, e quindi viene impedito il pieno sviluppo del sapore di aglio fresco. Gli spicchi d'aglio, sbollentati per immersione in acqua bollente per 20 minuti acquistano sapore di popcorn cotto con carattere di aglio dolce e leggermente pungente; gli spicchi affettati e fritti a 180°C in olio di soia per altri 20 minuti o cotti a 180°C per 20-25 minuti acquisiscono un tipico sapore di aglio fritto, ma manca il sapore pungente dell'aglio crudo.(3)

1.4 La chimica dell'aglio

La composizione nota dei composti più abbondanti negli spicchi d'aglio è indicata nella Fig. 2. Il contenuto di vitamine e minerali, paragonato in base al peso alla media delle altre verdure, è molto basso (meno del 2% del bisogno giornaliero) al livello di consumo normale (2-4 g, o uno spicchio). Alcune caratteristiche peculiari dell'aglio sono il basso contenuto di umidità (62-68% rispetto all'80-90% per la maggior parte della frutta e della verdura), l'alto contenuto di fruttani, polimeri di fruttosio di 10-60 unità, che costituiscono circa il 65% del peso secco, l'alto contenuto di amminoacidi liberi comuni, che è simile al contenuto proteico ed è fortemente dominato dall'arginina e il bassissimo contenuto di lipidi e altri composti liposolubili.

I carboidrati sono i componenti più abbondanti nell'aglio crudo, rappresentando circa l'80% del peso secco. Tra questi, i costituenti principali sono fruttopolisaccaridi non riducibili, solubili in acqua, chiamati fruttani, che hanno la struttura di un legame 2→1 tipo l'inulina ed una molecola di glucosio all'estremità riducente. I fruttani sono i principali composti di stoccaggio dei carboidrati e possono svolgere un ruolo nella regolazione osmotica e nella resistenza al freddo.(12) I fruttani resistono all'idrolisi e alla digestione e quindi rappresentano un dolcificante a basso contenuto calorico con effetti simili a quelli delle fibre alimentari. Nel colon, i fruttani sono fermentati dalla microflora, generando condizioni che proteggono dalla colonizzazione di *Salmonella*. I fruttani possono anche migliorare il recupero da stati anemici.(13) Gli altri carboidrati sono i monosaccaridi glucosio e fruttosio, in un rapporto di 15:1, il disaccaride saccarosio, che costituisce il 4% dei carboidrati non strutturali totali, e i polisaccaridi, galattano,

galacturonani, xiloglucano e pectina.(12) Poiché la concentrazione totale di zucchero negli spicchi d'aglio di peso fresco è compresa tra 125 e 235 mg g⁻¹, le concentrazioni di zucchero nell'aglio sono considerate "elevate". Gli zuccheri nell'aglio possono svolgere un ruolo importante nello sviluppo del sapore attraverso un processo noto come reazione di Maillard, dal nome del chimico francese Louis Camille Maillard. La reazione di Maillard è una reazione chimica tra un amminoacido e uno zucchero riducente, che di solito richiede calore, ed è una forma di brunitura non enzimatica. Per essiccazione e riscaldamento la cipolla e l'aglio possono subire la reazione di Maillard, con conseguente perdita di sapore e cambiamento di colore. Gli *Allium* contengono quantità elevate di flavonoidi: sono stati descritti apigenina (217.0 mg/kg), miricetina (639.0 mg/kg), quercetina (47.0 mg/kg),(14) quercetin-3-*O*- β -D-glucopiranoside (isoquercetina), quercetin-3-*O*- β -D-xilopiranoside (reinoutrina), canferol-3-*O*- β -D-glucopiranoside (astragalina) e isoramnetin-3-*O*- β -D-glucopiranoside.(15)

La caratteristica chimica più importante dell'aglio è quella dell'alto contenuto di composti organosolforati,(13) il 99.5% dei quali contengono l'amminoacido solforato cisteina, anche se la cisteina stessa è assente. Il contenuto di zolfo dell'aglio (circa 3 mg/g) è quattro volte superiore a quello di altre verdure e frutta ad alto contenuto di zolfo, come cipolla, broccoli, cavolfiore e albicocche. È inoltre presente l'1.5% di fibre.

Water	620-680	Adenosine (0 before crush)	0.1 (8 hr)
Water solubles	310-370	Saponins	0.4-1.1
Carbohydrates	260-300	Vitamins	0.15
Fructans	220-250	Ascorbic acid	0.14*
Fiber	15	Thiamine	0.002*
Protein	15-21*	Riboflavin	0.0008*
Amino acids (free, common)	10-15	Minerals	7
Arginine	5-8	Potassium	4.4*
Organosulfur compounds	11-35	Phosphorus	1.8*
Cysteine sulfoxides	6-19	Calcium	0.24*
γ -Glutamylcysteines	5-16	Magnesium	0.18*
S-alkenyl cysteines	0.01-0.03	Sodium	0.11*
Scordinins	0.03	Iron	0.02*
γ -Glutamylphenylalanine	0.4-1.1	Chromium	0.0005*
Lipids	1-2	Selenium	0.0002*
β -Sitosterol	0.015	Germanium	0.00004*
Phenolic acids	0.04	Sulfur	2.3-3.7
Phytic acid	0.8	Nitrogen	6-13

Data from Lawson (22), which also includes additional less abundant compounds.

* Less than 2% of the U.S. Recommended Dietary Allowance in a 3-4 gram clove.

Figura 2. Composizione dei bulbi di aglio (16)

Nelle cellule dell'aglio, l'alliina (**1**) (17), un amminoacido non proteico, (+)-*S*-allil-L-cisteina solfossido o meglio (*R_cS_s*)-(+)-*S*-2-propenilcisteina solfossido, un composto senza odore, si trova nel citoplasma ed è fisicamente compartimentata rispetto all'enzima alliinasi, che invece si trova nel vacuolo.(18, 19) Quando si schiacciano o si tagliano i bulbi d'aglio, come accade per attacco di un predatore o un patogeno, si rompe la cellula e alliina e alliinasi vengono a contatto. L'alliina dà origine ad acido 2-propenesulfenico (**2**), rilasciando acido aminoacrilico che rapidamente viene idrolizzato a piruvato di ammonio. Quasi istantaneamente dalla condensazione di due molecole di acido 2-propenesulfenico si forma allicina (**3**), un tiosulfonato o disolfuro mono-ossidato, -S(O)S-. L'acido 2-propenesulfenico è considerato un intermedio poiché non è mai stato isolato, anche a temperatura molto bassa. L'enzima alliinasi ha una cavità stereochimicamente ben definita, che accetta l'alliina naturale (+) e (-), ma non stereoisomeri non naturali derivati

dalla D-cisteina. La conversione ad allicina (**3**) è particolarmente rapida (>97% completa dopo 30 s) poiché i livelli cellulari di allina e allinasi sono quasi uguali.

Oltre all'allina, esistono altri precursori inodori dell'aroma di aglio, anch'essi aminoacidi solforati non proteici che sono presenti anche nelle altre specie del genere (es. nella cipolla), tra cui i più importanti sono isoallina (**4**), metiina (**5**) e propiina (**6**), indicati come *S*-alch(en)il-L-cisteina solfossidi (Fig.3). Nelle specie di *Allium* gli *S*-alch(en)il-L-cisteina solfossidi sono in quantità pari al 1-5 % del peso secco (20) e sono naturalmente presenti principalmente come (+)-L-enantiomeri.

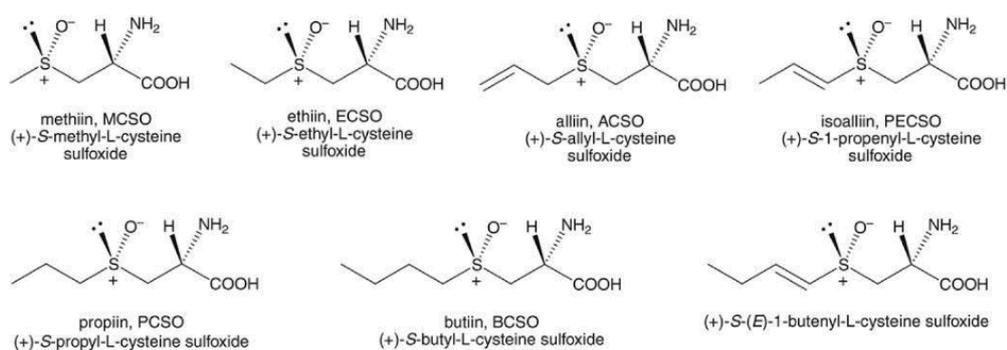


Figura 3. Strutture dei sette precursori del sapore nelle specie di *Allium* (3)

Oltre ai precursori più significativi del sapore, allina (**1**), isoallina (**4**) e metiina (**5**), nel bulbo dell'aglio sono inoltre presenti γ -glutamyl peptidi di aminoacidi solforati. Essi sono considerati come composti di stoccaggio di azoto e zolfo e possono avere un ruolo nel trasporto di aminoacidi attraverso la membrana cellulare. (12, 19) È stato riferito che la concentrazione di *N*-(γ -glutamyl)-*S*-(*E*)-1-propenil-cisteina (**7**) e *N*-(γ -glutamyl)-*S*-(allil)-

L-cisteina (**8**), i γ -glutamyl peptidi dominanti negli omogenati di aglio fresco, diminuisce notevolmente quando viene l'aglio appena raccolto viene conservato, in particolare a 4°C. La conseguenza della conservazione a freddo dell'aglio è un aumento della produzione di *S*-(*E*)-1-propenil-L-cisteina solfossido (isoalliina, **4**) e quindi di composti organosolforati a basso peso molecolare contenenti il gruppo 1-propenile.(20) E' stato dimostrato che i γ -glutamyl peptidi sono convertiti nei corrispondenti solfossidi mediante γ -glutamyl trans-peptidasi e ossidasi presenti nell'aglio e sono quindi loro intermedi metabolici.(21) Tutti i composti indicati nella Figura 4, con eccezione di *N*-(γ -glutamyl)-*S*-(metil)-L-cisteina solfossido (**163**), precedentemente trovato in estratti di altri *Allium*, sono stati trovati in estratti di aglio fresco dopo disattivazione delle alliinasi.

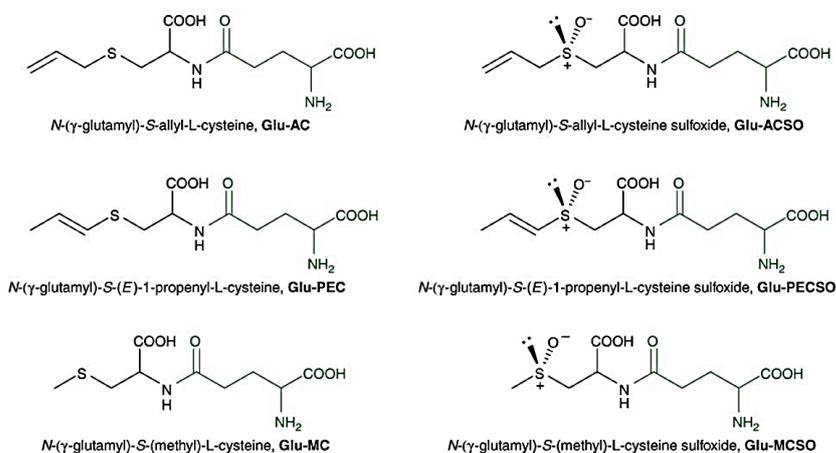


Figura 4. γ -glutamyl-*S*-alch(en)il-L-cisteine isolate dall'aglio (3)

I valori medi del peso secco per i vari componenti del bulbo dell'aglio sono: alliina (**1**), 2.62; allo-alliina (-)-*S*-(2-propenil)-L-cisteina solfossido (**9**), 0.06; *S*-(2-propenil)-L-cisteina (deossialliina, **10**), 0.02; metiina (**5**), 0.36; isoalliina (**4**), 0.13; acido 5-metiltiomorfolin-3-carbossilico solfossido (cicloalliina) (**11**), 0.16; *N*-(γ -glutamil)-*S*-(metil)-L-cisteina (**12**), 0.43; *N*-(γ -glutamil)-*S*-(allil)-L-cisteina (**8**), 2.34; *N*-(γ -glutamil)-*S*-(*E*)-1-propenil-cisteina (**7**), 2.13; *N*-(γ -glutamil)-*S*-(allil)-L-cisteina solfossido (**13**), 0.16; *N*-(γ -glutamil)-*S*-(*E*)-1-propenil-L-cisteina solfossido (**14**), traccia.(3, 22)

Le alliinasi (EC 4.4.1.4),(23) sono liasi α,β -eliminanti-piridossal 5'-fosfato dipendenti (20) che rappresentano fino al 10% del contenuto proteico totale dei bulbi di *Allium*. La alliinasi dell'aglio appartiene ad una famiglia di glicoproteine contenenti circa il 6% di carboidrati ed è stata completamente caratterizzata mediante cristallografia a raggi X come un dimero con due subunità uguali, ciascuna di 448 amminoacidi, con una massa molecolare totale di 103 000 Dalton. Le alliinasi sono localizzate nelle cellule della guaina vascolare, che circondano i fasci conduttori, mentre l'alliina e i relativi derivati della cisteina sono concentrati nelle cellule mesofile di accumulo abbondanti. Poiché l'alliinasi contribuisce alla difesa chimica della pianta producendo tiosolfati e altri composti irritanti e repellenti, la localizzazione specifica strategica nelle cellule della guaina del fascio può essere utile nella protezione contro l'invasione di microrganismi e piccoli erbivori che si muovono attraverso i fasci di conduzione verso le cellule del mesofillo. Gli enzimi possono generalmente funzionare solo in presenza di acqua. Congelando gli spicchi d'aglio in ghiaccio secco e poi polverizzandoli con acetone, l'acqua viene rimossa e l'enzima alliinasi e il composto precursore alliina (**1**) rimangono entrambi intatti sotto

forma di polvere bianca. Dopo l'aggiunta di acqua a temperatura ambiente a questa polvere, la reazione enzimatica può quindi verificarsi, producendo allicina. Tuttavia, se la polvere viene prima bollita con alcool etilico, l'enzima alliinasi viene distrutto (denaturato), in modo che anche con l'aggiunta di acqua l'odore di allicina non viene rilevato. L'ebollizione con acqua non influenza l'alliina (**1**) precursore più robusto chimicamente, in modo che l'aggiunta di una piccola quantità della polvere bianca originale, non riscaldata con alcool etilico, porta alla formazione di allicina. Questo spiega perché un bulbo di aglio ha poco odore rispetto all'aroma emanato quando viene frantumato. L'alliinasi reagisce solo con derivati dell'amminoacido naturale L-cisteina e non con derivati della D-cisteina, non naturale. Nel 2002 (24) è stato identificato nella cipolla un componente dell'enzima alliinasi, il "fattore lacrimale sintasi" o "LFS", che reagisce con la (*E*)-isoalliina (**4**) ed è responsabile della conversione dell'acido (*E*)-1-propenesulfenico (**2**) in (*Z*)-propantiale *S*-ossido (**354**). (3, 20, 24) Sono state evidenziate due diverse attività dell'allinasi nell'aglio: una è specifica per i substrati (+)-*S*-2-propenil-L-cisteina *S*-ossido (alliina) (**1**) e (+)-*S*-1-propenil-L-cisteina *S*-ossido (isoalliina) (**4**), ha un pH ottimale di 4,5, e scinde il 97% dei due substrati entro 0.5 min a 23°C; la seconda è specifica per (+)-*S*-metil-L-cisteina *S*-ossido (metiina) (**5**), ha un pH ottimale di 6.5, e scinde il 97% del substrato entro 5 minuti a 23 °C. Entrambe le allinasi sono disattivate irreversibilmente a pH 1.5-3 (il pH dello stomaco) e a pH > 9. (20)

Come detto, gli *S*-alch(en)il-L-cisteina-*S*-ossidi, situati nel citoplasma, attraverso una reazione enzimatica catalizzata da alliinasi, presente nei vacuoli, dando inizialmente acidi solfenici. Questi sono intermedi altamente reattivi che per reazione di condensazione producono immediatamente i tiosulfinati (Fig.5).(18)

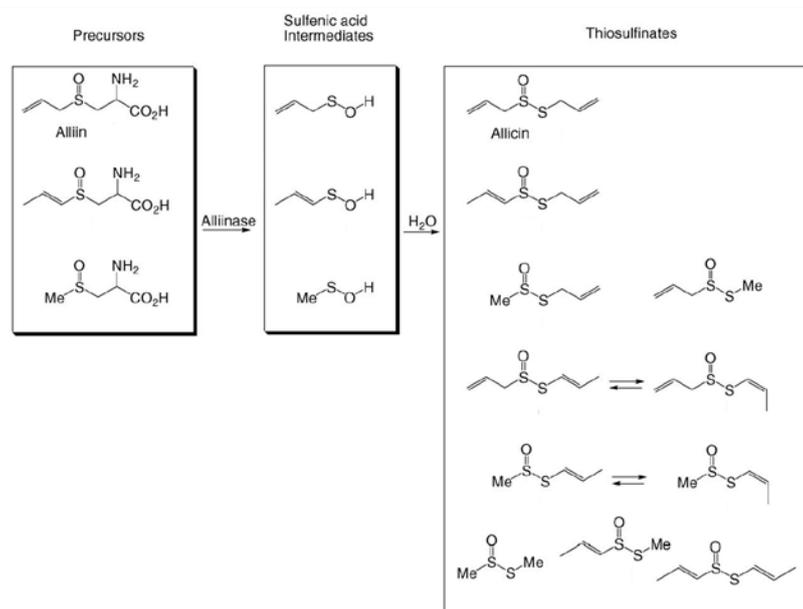


Figura 5. Vie biosintetiche dei tiosulfinati nell'aglio (18)

Volendo rappresentare in una formula generale gli *S*-alch(en)il-L-cisteina-*S*-ossidi come **AS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H**, **BS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H**, **CS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H** e **DS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H**, ne consegue che se sono presenti sia **AS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H** che **BS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H**, in seguito all'esposizione della miscela alle alliinasi si formeranno gli acidi solfenici **ASOH** e **BSOH** e si combineranno immediatamente dando **AS(O)SA**, **AS(O)SB**, **ASS(O)B** e **BS(O)SB**, cioè, quattro tiosulfinati diversi da due acidi polisolfenici precursori e cisteina solfossidi. Se sono contemporaneamente presenti **AS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H**, **BS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H**, **CS(O)CH₂CH(NH₂)CO₂H**, allora si formeranno **ASOH**, **BSOH** e **CSOH** e si combineranno immediatamente, dando **AS(O)SA**, **AS(O)SB**, **ASS(O)B**, **AS(O)SC**,

ASS(O)C, **BS(O)SB**, **BS(O)SC**, **BSS(O)C** e **CS(O)SC**, cioè, nove tiosulfinati diversi da tre acidi solfenici precursori e cisteina solfossidi. Se tutti e quattro gli *S*-alch(en)il-L-cisteina-*S*-ossidi fossero presenti, cosa che si verifica raramente, le alliinasi darebbero sedici tiosulfinati diversi. Quindi, il numero totale possibile di tiosulfinati **RS(O)SR** è pari al quadrato del numero di *S*-alch(en)il-L-cisteina-*S*-ossidi. I rapporti dei vari tiosulfinati dipendono in ultima analisi dai rapporti degli ACSO, dai loro tassi relativi di scissione per alliinasi (che sono sostanzialmente diversi), dalla stabilità a temperatura ambiente dei tiosulfinati e da altri fattori. Sono attualmente noti sette semplici *S*-alch(en)il-L-cisteina-*S*-ossidi. Inoltre, (+)-*S*-(*E*)-3-pentenil-L-cisteina solfossido è stato isolato dai semi di una cipolla rossa, mentre una cisteina solfossido, contenente un gruppo pirrolico attaccato allo zolfo, è stato identificato in estratti di aglio "drumstick". Ogni tiosulfinato **RS(O)SR** ha un odore e un sapore diversi. (3) Gli *S*-alch(en)il-L-cisteina solfossidi identificati nell'aglio, allina (**1**), metina (**5**), isoallina (**4**), presenti in rapporto 50:2:5.(25), vengono convertiti dalle alliinasi nei tre acidi solfenici: CH₂=CHCH₂SOH, CH₃SOH e (*E*)-CH₃CH=CHSOH (quest'ultimo in assenza dell'enzima LFS non si riorganizza in LF). Questi tre acidi solfenici si possono combinare per avere un totale di nove diversi tiosulfinati, **RS(O)SR** (dove **R** e **R** rappresentano i gruppi allile, metile e 1-propenile). L'allicina rappresenta il 70% di tutti i tiosulfinati trovati nell'aglio appena tritato o schiacciato, pari a circa lo 0.4% del peso fresco.(3) ed ha notevoli proprietà benefiche.(26)

Il precursore primario coinvolto nella formazione dei pigmenti rosa o verde-blu generati durante la lavorazione dell'aglio è la isoalliina, *S-(E)*-(1-propenil)-L-cisteina solfossido (4). La scissione enzimatica dell'isoalliina e degli altri solfossidi di *S*-alch(en)il-L-cisteina, produce tiosulfinati contenenti il residuo 1-propenilico aventi gruppi come metile o allile sul lato tiolico. È stato anche trovato un tiosulfinato contenente residui di 1-propenile su entrambi i lati della molecola. Questi composti reagiscono successivamente con gli amminoacidi per produrre i pigmenti. Mentre i derivati 1-propenile e metile formano composti rosa, rosa-rosso e magenta, quelli che contengono il gruppo allile danno origine a prodotti blu dopo aver reagito con glicina a pH 5.0. (18, 27, 28)

Come detto sopra, tutti i composti organici solforati che vengono prodotti a seguito del rilascio degli acidi solfenici catalizzato dall'allinasi non sono presenti nel bulbo di aglio, né la loro formazione richiede il coinvolgimento dell'enzima. D'altra parte, i tiosulfinati volatili sono emessi sul campo da diverse specie di *Allium*, ad esempio dal porro, ed essi sono i composti più attraenti per gli insetti predatori, ad es. la falena di porro, *Acrolepiopsis assectella*. Pertanto, in senso lato, i tiosulfinati e i relativi prodotti secondari come i disolfuri e i tiosulfinati possono essere classificati come "prodotti naturali".(20)

Compound	Whole	Crushed
	(mg/g fresh weight)	
S-(+)-Alkyl-L-cysteine sulfoxides		
Allylcysteine sulfoxide (alliin)	6-14	nd
Methylcysteine sulfoxide (methiin)	0.5-2	nd
<i>trans</i> -1-Propenylcysteine sulfoxide (isoalliin)	0.1-1.2	nd
Cycloalliin	0.5-1.5	0.5-1.5
γ-L-Glutamyl-S-alkyl-L-cysteines		
γ -Glutamyl-S- <i>trans</i> -1-propenylcysteine	3-9	3-9
γ -Glutamyl-S-allylcysteine	2-6	2-6
γ -Glutamyl-S-methylcysteine	0.1-0.4	0.1-0.4
Alkyl alkanethiosulfinates		
Allyl 2-propenethiosulfinate (allicin)	nd	2.5-4.5
Allyl methyl thiosulfinates (2 isomers)	nd	0.3-1.5
Allyl <i>trans</i> -1-propenyl thiosulfinates (2 isomers)	nd	0.05-1.0
Methyl <i>trans</i> -1-propenyl thiosulfinates (2 isomers)	nd	0.02-0.2
Methyl methanethiosulfinate	nd	0.05-0.1

Figura 6. Principali composti solforati dell'aglio (16)

I tiosulfinati sono composti auto-reattivi che possono essere abbastanza instabili, a seconda dell'ambiente (solvente), della temperatura e della concentrazione. Dal momento che subiscono auto-reazione mediante meccanismi sia monomolecolari sia bimolecolari, la loro stabilità può migliorare notevolmente per diluizione ed in presenza di solventi che abbiano un idrogeno legato con ossigeno (acqua e, in misura minore, alcoli). Ad esempio, a temperatura ambiente in assenza di solvente o in presenza di solventi a bassa polarità (esano, etere etilico), l'emivita (il periodo di tempo richiesto per la decomposizione del 50%) dell'allicina pura da aglio schiacciato è di circa 2.5 giorni; in acqua a 23°C a concentrazioni dallo 0.01 allo 0.1%, l'emivita è di circa un mese, mentre a -70°C l'allicina è stabile in modo indefinito. Uno studio più recente sulla stabilità dello 0.1-0.2% delle soluzioni di allicina in acqua indica emivite di circa un anno a 4 °C, 32 giorni a 15 °C e solo un giorno a 37 °C.(3, 28, 29) Anche se l'allicina è troppo instabile per essere presente in qualsiasi prodotto commerciale, è sufficientemente stabile per usi domestici comuni

(ad esempio, gli spicchi di aglio tritati in un'insalata o in un sandwich o conservati in frigorifero).(16)

In generale, in presenza di acqua, i prodotti principali di degradazione dei tiosulfinati sono il diallil disolfuro (**16**) e il diallil trisolfuro (**17**). Per distillazione in corrente di vapore degli spicchi di aglio schiacciati, si ottiene un olio commerciale in cui sono stati trovati fino a 30 diversi solfuri, che comprende diallile (**18, 19**) (57%), allil metile (**20-22**) (37%) e dimetil (**23-26**) (6%) da mono a esasolfuri, insieme a tracce di epta e ottasolfuri e piccole quantità di allil-, 1-propenil e metil, propil, 1-propenil di-, tri-, e tetrasolfuri (**27-47**). (3, 18, 30, 31)

Dopo incubazione a temperatura ambiente in solventi organici, come esano, etere o trigliceridi, si formano due ulteriori tipi di composti: tiosolfonati (**48, 49**), (20, 32, 33) i vinilditiini a struttura anulare, 3-vinil-4*H*-1,2-ditiino (**50**) e 2-vinil-4*H*-1,3-ditiino (**51**), che rappresentano i principali composti (70-80%), e l'ajoene (*E,Z*-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-ossido) (**52, 53**, dalla parola spagnola "Ajo" che significa aglio), presente in quantità minori (12-16%) (34-36). Altri composti evidenziati sono *Z*-4,5,9-tritriadeca-1,6-diene-9-ossido (*Z*-10-devinilajoene) (**54**)(37) e *E*-4,5,9-tritriadeca-1,7-diene-9-ossido (iso-*E*-10-devinilajoene) (**55**)(38). A parte l'ajoene, nessuno dei prodotti di trasformazione del tiosolfato trattiene l'atomo di ossigeno. Ciò si traduce in una maggiore volatilità (odore) e inferiore solubilità in acqua (ad esempio, la solubilità in acqua l'allicina è dell'1%, mentre per il disolfuro di diallile è dello 0.005% e per il trisolfuro di diallile è dello 0.0006%).(16, 35, 36)

In particolare, la decomposizione dell'allicina (39) avviene con formazione di tioacroleina (56) e ad acido 2-propensulfenico (2). La tioacroleina è altamente reattiva e dimerizza facilmente ai vinilditiini (50, 51), (20, 39) mentre l'acido 2-propenesulfenico (2) si auto condensa facilmente rigenerando l'allicina (3) (Fig.7).

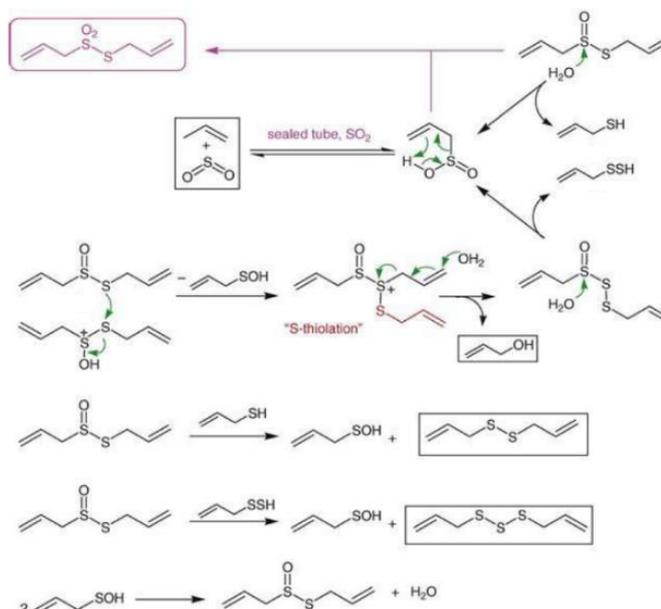


Figura 7. Decomposizione dell'allicina (3)

A temperatura ambiente, e dopo il riscaldamento, l'allicina può reagire con sé stessa con lieve catalisi acida secondo due processi completamente diversi. Il primo processo dà origine a diallil disolfuro (16), trisolfuro e polisolfuri superiori, oltre ad alcol allilico, propene e anidride solforosa. In alcuni studi sono state isolate tracce di 2-propenil 2-propenetiosulfonato (pseudoallicina, 48). (20, 32) Il prodotto principale dell'idrolisi dell'allicina, il dialliltrisolfuro (17), origina da una serie di trasformazioni chimiche che

iniziano con l'S-tiolazione dell'allicina che tramite intermedi origina acido 2-propenesolfonico (**57**) e acido 2-propene-1-solfenotioico (**58**), una classe di composti noti come pertioli. 2-propenetiole (**59**) è formato insieme a **57** da idrolisi diretta dell'allicina (Fig. 6). Questo processo si verifica anche quando gli spicchi d'aglio schiacciati vengono bolliti con acqua e viene raccolto il distillato.(3)

Il secondo processo porta alla formazione di ajoene (Fig. 8).(3) Tutte queste reazioni sono facilitate dall'indebolimento del legame centrale S-S dell'allicina, causato dall'attacco di un singolo ossigeno che ha la capacità di guidare i processi chimici legandosi ad un idrogeno, sia internamente che esternamente.(40)

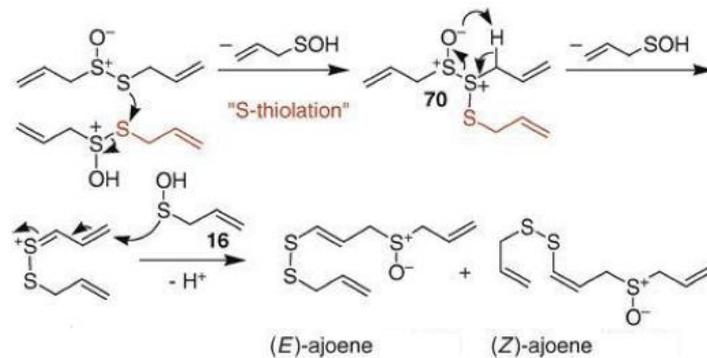


Figura 8. Formazione di ajoene da allicina (3)

In una serie di articoli dal 2010 al 2018, Nohara e colleghi hanno riportato l'isolamento e la caratterizzazione strutturale delle famiglie isomeriche di acidi 3,4-dimetiltiolanosolfenici, anch'essi prodotti di degradazione dei tiosulfinati,(19) che hanno chiamato garlicnina A (**60**),(41) B1-4 (**61-64**),(42, 43), C 1-3 (**65-67**),(42, 43) D (**68**),(42), E (**69**), F (**70**),(44) G (**71**),(45) K 1-2 (**72-73**),(46) H 1 (**74**),(46) I 1-2 (**75-76**),(45, 47) J 1-2 (**77-78**), (45, 48) L 1-4 (**79-82**),(44) M (**83**), N (**84**), O (**85**),(47) P (**86**), Q (**87**), (48). Le garlicnine sono state divise nei seguenti tipi strutturali: tipo aciclico: garlicnine L1-4; tipo 3,4-dimetiltiolano: garlicnine B 1-4, C 1-3, M ed N; tipo ciclico atipico: garlicnine I1, J 1-2, P; tipo tiabicclico: garlicnine O e Q.(48)

I primi solfuri di tipo aciclico sarebbero prodotti mediante arrangiamento e combinazione di acido 1-propenil solfenico e acido alliltiosolfenico derivati dall'allicina.(Fig. 9).(49)

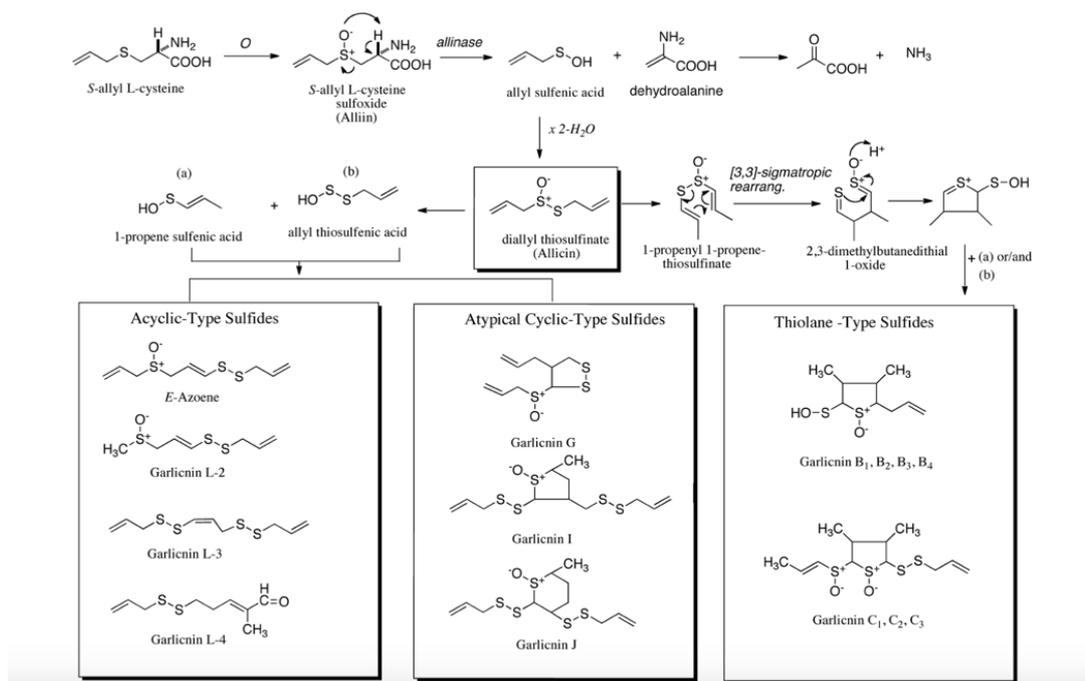


Figura 9. Formazione delle garlicine (49)

Spettroscopicamente identici alle garlicine B1-4 sono risultati essere gli ajotiolani, isolati dal gruppo di Block nel 2018, stereoisomeri del 5-(2-allilsulfinil)-3,4-dimetiltiolan-2-olo, una famiglia di 3,4-dimetiltiolani di formula $C_9H_{16}O_2S_2$ (**88-89**).⁽⁵⁰⁾ Il gruppo di Block ha rivalutato e corretto anche le strutture delle garlicine precedentemente descritte da Nohara et al. ed in particolare garlicina A e D.

Anche il livello dell'elemento micronutriente essenziale selenio nell'aglio (0.000028%; 0.28 mg/g), sebbene molto inferiore a quello dello zolfo, è relativamente alto rispetto ad altri comuni ortaggi. Si ritiene che i composti derivati dal selenio nell'aglio provengano dai seleniti (SeO_3^{2-}) o seleniati (SeO_4^{2-}) del suolo. L'identificazione di questi composti

naturali è di notevole interesse attuale in vista della scoperta che l'aglio arricchito di Se e come anche il lievito arricchito di Se possiedono proprietà di prevenzione del cancro.

La rivelazione di composti di Se naturali, mescolati a livelli molto più elevati di composti di zolfo chimicamente simili, richiede l'uso di metodi analitici specifici per gli elementi come gascromatografia con rilevatore a emissione atomica o GC-AED e la cromatografia liquida ad alte prestazioni-spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (HPLC-ICP-MS). Utilizzando la tecnica GC-AED, la linea di emissione di Se a 196 nm viene monitorata per identificare le specie di organo selenio e contemporaneamente monitorare S e C dai segnali a 181 e 193 nm, rispettivamente.(13)

L'analisi dello spazio di testa sopra l'aglio tritato usando GC-AED mostra MeS_nMe , MeS_nAll e AllS_nAll ($n = 1-3$, All = allil) nel canale S. Il canale Se mostra sette picchi: dimetil selenide (**90**), acido metansolfenoselenoico metil estere (**91**), dimetil diselenide (**92**), bis(metiltio)selenide (**93**), allil metil selenide (**94**), acido 2-propenesolfenoselenoico metil estere (**95**), e (allitio) (metiltio)seleniuro (**96**). Le strutture sono state stabilite mediante GC/MS utilizzando standard sintetici. L'aglio normale liofilizzato (0.02 ppm Se) o moderatamente arricchito con Se (68 ppm Se; coltivato nel suolo arricchito con Se) è stato derivato con etilcloroformio per volatizzare i selenoaminoacidi, probabili precursori dei composti di Se rilevati nello spazio di testa.(51) L'analisi GC-AED sia di aglio sia di aglio moderatamente arricchito con Se ha mostrato selenocisteina (**97**), identificata dal confronto con la frammentazione dello spettro di massa e il tempo di ritenzione di uno standard autentico. Nell'aglio più fortemente arricchito con Se (1355 ppm Se), il principale selenoaminoacido è la Se-metilselenocisteina (**98**), con piccole quantità di selenocisteina

e tracce di selenometionina (**99**). L'analisi HPLC-ICP-MS di estratti di aglio ad alto contenuto di selenio mostra che la Se-metilselenocisteina (**98**) è il componente principale, insieme a minori quantità di selenometionina (**99**), selenocisteina (**97**), selenato e sali di selenite. Resta da identificare un numero considerevole di componenti sconosciuti contenenti selenio.(51-54)Un meccanismo proposto per la formazione dei vari composti del selenio finora identificati a partire dal l'aglio è illustrato nella Figura 10.

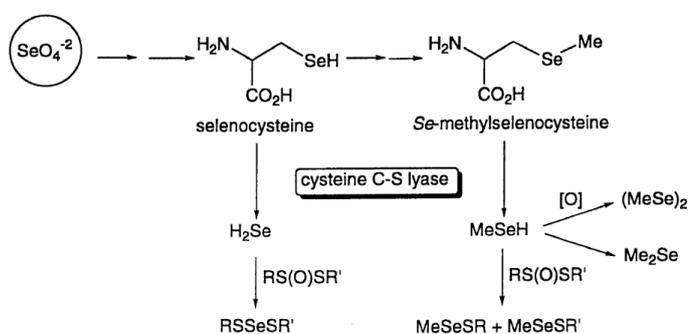


Figura 10. Meccanismo proposto per la trasformazione dei seleniati del suolo in composti organo selenio dell'aglio (13, 51)

Le piante del genere *Allium* producono sostanze saponiniche.(55, 56) Il proto-eruboside B è stata la prima saponina furostanolica isolata dai bulbi di aglio.(57) L'analogo spirostanolo, eruboside B, è stato ottenuto mediante idrolisi enzimatica del proto-eruboside B derivato del furostanolo. Successivamente, è stato riportato (58) l'isolamento di due saponine strettamente correlate, denominate proto-iso-eruboside B (**102**) e iso-eruboside-B (**103**), rispettivamente gli epimeri 25S del proto-eruboside B e dell'eruboside B. Ulteriori studi hanno portato all'isolamento dalle radici di aglio di una altra saponina

furostanolica, sativoside B1 (**104**), caratterizzazione di proto-desgalactotigonina (**105**), e di due glicosidi steroidici, sativoside R1 (**106**) e sativoside R2 (**107**)(59) e di altre saponine steroidiche furostanoliche dai bulbi (60).

1.4.1 I composti organici volatili

L'odore di aglio tritato e l'alito dopo aver mangiato aglio è sempre stato una caratteristica saliente dell'aglio, sia positiva che negativa. L'odore dell'aglio fresco tagliato è dovuto principalmente all'allicina (**3**), che ha aroma leggermente dolce ma piccante e un sapore che lascia un formicolio sulla lingua. Dopo 30 minuti, il disolfuro di diallile (**16**) diventa il composto dominante, mentre l'odore dell'aglio cotto è dovuto principalmente al diallil e al allil metil trisolfuro (**17**, **22**) e a quantità minori dei loro disolfuri. Quando si mangia aglio fresco, l'odore di alito iniziale è dovuto principalmente all'allil mercaptano (**172**); tuttavia, questo rappresenta l'odore che viene dalla gola e scompare in circa un'ora. L'odore che viene dai polmoni aumenta lentamente e dura più di 24 ore; esso è costituito principalmente da allil metil solfuro (**20**) (che rappresenta l'87% dei composti solforati presenti dopo nove ore) e dimetil solfuro (**23**) (11%) ed è dovuto al metabolismo dei tiosulfinati. Il dimetil selenide (**90**) si trova anche nel respiro a livelli che possono influire sull'odore. Anche se l'odore di aglio viene portato nel latte materno umano, i bambini sembrano gradire il gusto in quanto richiedono l'allattamento più a lungo di quando le loro madri non mangiano l'aglio. (16, 61, 62) Durante la conservazione degli spicchi, le γ -glutamylalch(en)ilcisteine possono essere convertite negli alch(en)ilcistein S-ossidi correlati; e dopo la rottura cellulare, gli alch(en)ilcistein S-ossidi sono convertiti enzimaticamente negli alch(en)tiosulfinati di etile correlati, i composti aromatici primari dell'aglio crudo. (30)

1.4.2 I composti solforati dei prodotti commerciali

Oltre agli spicchi freschi o cotti, l'aglio è spesso consumato come spezia (aglio in polvere e sale d'aglio), come spicchi in salamoia, e come integratori (comprese e capsule di aglio in polvere; capsule di olio distillato al vapore; capsule di olio macerato; compresse di estratto invecchiato, capsule e liquido). Anche se i prodotti dell'olio e gli estratti invecchiati sono stati pensati per essere estratti, in realtà dovrebbero essere chiamati prodotti di trasformazione, dal momento che nessuno dei principali composti solforati di questi prodotti si trovano in modo significativo in spicchi di aglio interi o schiacciati (Fig.11).

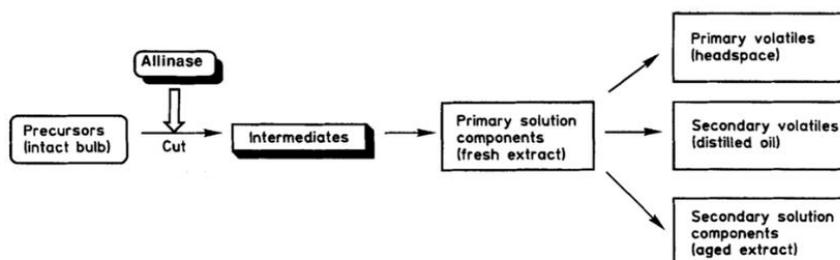


Figura 11. Rappresentazione schematica dei diversi tipi di composti associati ai metodi di trattamento dell'aglio (20)

Negli ultimi decenni i prodotti di aglio come integratori alimentari hanno sperimentato una popolarità crescente. I prodotti di aglio possono essere classificati in quattro grandi gruppi: olio essenziale di aglio, olio di aglio macerare, aglio in polvere, e l'estratto di aglio (Fig. 12). Quando si sceglie un integratore di aglio, una considerazione importante da fare riguarda il processo di fabbricazione. Come descritto in precedenza, la chimica dell'aglio

è piuttosto complicata, e diversi tipi di trasformazione producono prodotti che sono più di semplici preparazioni in forme diverse. Le varie forme differiscono anche per costituenti, effetti e tossicità. La concentrazione finale dei componenti chimici in ogni preparazione dell'aglio varia in modo significativo e dipende fortemente dal metodo di lavorazione. I processi di fabbricazione e manipolazione dell'aglio modificano le caratteristiche chimiche, l'efficacia e la sicurezza delle preparazioni finali di aglio. In particolare, si rilevano variazioni elevate nella composizione tra le diverse marche commerciali di compresse contenenti la polvere intera di aglio (3 volte per i prodotti standardizzati, 35 volte per non standardizzati) e di oli (50 volte) rispetto agli spicchi di aglio (2-3 volte). I prodotti all'aglio che contengono i componenti più sicuri, efficaci, stabili e inodori sono i più preziosi come integratori alimentari.(16, 63)

Type of Product	Main compounds and characteristics
Garlic Essential Oil	Only 1% of Oil-soluble sulfur compounds (DAS, DADS, etc.) in 99% vegetable oil No water-soluble fraction No allicin* Not well-standardized No safety data
Garlic oil macerate Oil	soluble sulfur compounds and alliin No allicin* Not well-standardized No safety data
Garlic powder	Alliin and a small amount of oil-soluble sulfur compounds No allicin* Not well-standardized Results on cholesterol is not consistent. No safety data
Aged garlic extract (AGE)	Mainly water-soluble compounds (SAC, SAMC, saponins, etc.) Standardized with SAC Small amount of oil-soluble sulfur compounds Various beneficial effects Well-established safety Heavily researched (400+ papers)

Figura 12. Principali prodotti dell'aglio presenti sul mercato (63)

L'aglio in polvere è il prodotto più simile agli spicchi freschi, in quanto è stato disidratato solo a basse temperature di forno (50-60°C) (a queste temperature c'è solo una perdita del 5-15% di allicina, **3**) e poi polverizzato. Tuttavia, la quantità di allina (**1**) presente può variare notevolmente a seconda del tipo di affettatura e manipolazione degli spicchi. Se le fettine sono più sottili possono essere asciugate più velocemente; affettare troppo aumenta la perdita di allina (**1**) e di conseguenza l'odore della polvere (solfuri di allile). Quindi, le polveri di aglio hanno un contenuto di allina (**1**) (o rendimento di allicina, **3**) che è in genere circa il 50% inferiore a quello delle polveri utilizzate per produrre compresse standardizzate di allina/allicina di qualità. La resa in allicina (**3**) dei prodotti di aglio in polvere è abbastanza stabile, con una perdita media di 5 anni del 36%. Un aspetto molto importante della effettiva qualità dei prodotti di aglio in polvere è la loro capacità di formare allicina dopo il consumo, dato che l'allinasi viene inibita rapidamente e irreversibilmente ai livelli acidi tipici dello stomaco (pH 1.5-3). Quando si consumano spicchi d'aglio, la formazione di allicina (**3**) non è un problema, poiché essa è stabile all'acido e si forma entro 6 secondi dalla masticazione, ben prima di raggiungere lo stomaco. È pertanto essenziale che i prodotti in polvere a base di aglio siano protetti con un rivestimento resistente agli acidi. Un rivestimento resistente agli acidi diminuisce anche l'odore del respiro ritardando tutta la formazione di allicina (**3**) e il rilascio di solfuri di allile fino a quando la compressa è passata nello stomaco. L'efficacia dei prodotti a base di aglio nella formazione dell'allicina nel corpo umano è meglio stimata come l'effettiva resa in allicina (**3**), che è definita in termini generali come la quantità di allicina (**3**) formata in condizioni gastrointestinali simulate, o in termini più specifici come la quantità di allicina (**3**) formata (o di allina, **1**, persa) dopo che i prodotti siano stati agitati a 37 °C

in liquido gastrico simulato (pH 1.5) per un'ora, seguita da aggiunta di liquido intestinale simulato (pH 7.5) e agitazione continua per due ore (secondo una modifica del protocollo U.S.P. 701 per la valutazione della disintegrazione delle tavolette). La resa effettiva di allicina (3) deve essere considerata come il livello di qualità per tutti gli integratori di aglio in polvere.(16)

A differenza della maggior parte degli oli vegetali, gli oli d'aglio non sono effettivamente presenti negli spicchi d'aglio. Gli spicchi d'aglio contengono solo piccole quantità (0.2%) di olio naturale - principalmente trigliceridi, fosfolipidi e glicolipidi, nessuno dei quali contiene zolfo. Vi sono tre tipi di oli d'aglio: l'olio di aglio schiacciato distillato in corrente di vapore, l'olio di aglio schiacciato macerato in un olio vegetale, e l'olio prodotto per estrazione eterea dei tiosulfinati di aglio schiacciato seguita da rimozione del solvente.(64)

Gli oli d'aglio commerciali sono il risultato della conversione dei tiosulfinati idrosolubili degli spicchi tritati in solfuri liposolubili mediante l'uso del vapore (olio distillato in corrente di vapore, spesso chiamato erroneamente olio essenziale di aglio) o mediante incubazione in un olio vegetale comune (olio di macerazione), come l'olio di soia. Gli oli distillati in corrente di vapore sono molto comuni, mentre i macerati a olio, usati a lungo popolarmente in Europa, sono poco usati negli Stati Uniti. Tutti gli oli commerciali di aglio vengono diluiti con oli vegetali comuni per ottenere un contenuto di prodotti di trasformazione dei tiosulfinati (solfuri) che rappresenti la quantità di tiosulfinati presenti negli spicchi d'aglio schiacciati da cui sono stati ottenuti; questo standard è soddisfatto dalla maggior parte degli oli distillati in corrente di vapore, ma solo da pochi macerati. Attualmente, nessun olio distillato in corrente di vapore prodotto dichiara una quantità specifica di solfuri, e solo poche marche dichiarano una quantità specifica di "olio di aglio

puro." Pochissime marche dichiarano un contenuto specifico di determinati composti (un'indicazione per composti specifici (es. 0.9 mg di vinilditiini, (50-51), e 0.15 mg di ajoene, (52-53), per ogni capsula da 280 mg).(16) Gli oli distillati in corrente di vapore sono stabili per almeno cinque anni, mentre i macerati in olio sono meno stabili, a causa dell'instabilità dell'ajoene (52-53) dopo circa 18 mesi. Gli unici composti derivati dall'aglio negli oli d'aglio sono i composti derivati dai tiosulfinati (derivati per il 95% dall'alliina, 1), composti che hanno conservato l'importante residuo ditioallilico (allil-SS-) dell'allicina e degli altri allil tiosulfinati. Pertanto, gli oli di aglio di qualità forniscono gran parte dell'attività farmacologica dell'aglio schiacciato e sono utili per dimostrare l'attività farmacologica dell'allicina.(12, 16)

L'aglio invecchiato viene ottenuto per trattamento dell'aglio in una miscela di acqua/etanolo e sottoposto ad estrazione/maturazione naturale per un periodo superiore a 10 mesi a temperatura ambiente. Durante il processo di invecchiamento, i composti odorosi, aspri e irritanti caratteristici dell'aglio fresco crudo sono convertiti naturalmente in composti stabili. L'aglio invecchiato ha un sapore dolce e acido e consistenza gelatinosa. I suoi costituenti comprendono composti sia idrofili che idrofobici.(12, 65-72) Anche gli estratti invecchiati e gli spicchi in salamoia comportano una incubazione a lungo termine, e quindi un invecchiamento.(16) Gli estratti invecchiati sono preparati a partire da spicchi tritati che vengono incubati in etanolo diluito (20%) per 18-20 mesi prima dell'essiccazione dell'estratto, mentre gli spicchi in salamoia vengono incubati e confezionati in aceto (5% acido acetico). Il tempo di incubazione dipende dal momento in cui gli spicchi vengono mangiati. I cambiamenti nella composizione che si verificano in questi prodotti in un periodo di due anni, in particolare negli estratti invecchiati, sono

notevoli.(73) L'unico composto solforato che non è influenzato dall'invecchiamento è la cicloalliina (**11**). Per gli spicchi tritati invecchiati in etanolo diluito, le modifiche principali sono (a) la perdita iniziale di alliina (**1**) con formazione del tiosulfonato, (b) la perdita completa dei tiosulfonati dopo 3 mesi (convertiti in solfuri allilici volatili che evaporano quasi completamente), e (c) idrolisi completa delle γ -glutamincisteine.(16, 74, 75) Nell'aglio invecchiato, le principali *S*-alch(en)ilcisteine sono *S*-allilcisteina (**108**), *S*-1-propenilcisteina (**109**), *S*-allilmercaptocisteina (**110**).⁽⁷⁶⁾ Esse sono formate enzimaticamente da γ -glutamincisteine attraverso l'idrolisi catalizzata da γ -glutamiltiosulfonasi durante il processo di invecchiamento. *S*-allilmercaptocisteina (**110**) è generata mediante γ -glutamiltiosulfonasi da γ -glutamincisteina (**111**), a sua volta formata dalla reazione di γ -glutamincisteina (**112**) / γ -glutamincisteina (**113**) con allicina (**3**). In alternativa, le *S*-alch(en)ilcisteine possono anche essere generate dalle reazioni chimiche del rispettivo composto precursore con allilsolfuri derivati dall'allicina (**3**). E' stato dimostrato che 3-alliltrisulfanil-alanina (**114**) è formata dalla reazione che coinvolge *S*-allilmercaptocisteina (**110**) con solfuri di allile come diallildisolfuro (**16**) e dialliltrisolfuro (**17**) durante il processo di invecchiamento.^(12, 74) Ci sono anche aumenti sostanziali di cisteina (a causa di idrolisi della proteina) e *S*-allilmercaptocisteina (**110**) (probabilmente a causa della reazione dell'allicina (**3**) con la cisteina derivata dalla proteina). Il contenuto di *S*-allilcisteina (**108**) rimane costante dopo 3 mesi, ma *S*-1-propenilcisteina (**109**) diminuisce costantemente.^(12, 16, 72, 74, 75) Un altro composto caratteristico dell'aglio invecchiato è *cis*-*S*-1-propenilcisteina (**115**), un isomero di *S*-allilcisteina (**108**) prodotto da alliina (**1**), γ -glutamincisteina (**112**) per reazione enzimatica. L'aglio contiene

abbondantemente la forma *trans* di γ -glutamyl-*S*-1-propenilcisteina, plausibile precursore di *S*-1-propenilcisteina. Il contenuto su base molare di *cis*-*S*-1-propenilcisteina (**115**) nell'aglio fresco è <50% al contenuto di *cis*-*S*-1-propenilcisteina nell'aglio invecchiato, anche se il contenuto di *cis*-*S*-1-propenilcisteina (**115**) aumenta gradualmente durante il periodo di invecchiamento. La differenza di contenuto tra il precursore e il prodotto suggerisce che *cis*-*S*-1-propenilcisteina (**115**) sia prodotto non solo dal composto precursore, peptide γ -glutamyl contenente forma *cis* di *S*-1-propenilcisteina, ma anche dagli altri composti. L'analisi del contenuto delle forme *cis*- e *trans*- può servire da indicatore del processo di invecchiamento, in quanto il contenuto della forma *cis* nell'aglio fresco è molto piccolo rispetto a quello della forma *trans*; tuttavia, la sua quantità aumenta con il tempo.(12) Come detto sopra, nel processo di invecchiamento il contenuto dei dipeptidi γ -glutamyl-*S*-alk(en)-ilcisteine diminuisce con l'aumento del contenuto di *S*-alk(en)ilcisteine. Sono invece stati identificati dei tripeptidi, γ -glutamyl- γ -glutamyl-*S*-alilcisteina (**116**), γ -glutamyl- γ -glutamyl-*cis/trans*-*S*-1-propenilcisteina (**117**), γ -glutamyl- γ -glutamyl-*S*-metilcisteina (**118**).(12) I tripeptidi di γ -glutamyl sono prodotti mediante il trasferimento di γ -glutamyl-*S*-alch(en)ilcisteine all'acido glutammico in altre γ -glutamyl-*S*-alch(en)ilcisteine mediante un catalizzatore endogeno presente nell'aglio, che aiuta a produrre simultaneamente γ -glutamyl- γ -glutamyl-*S*-alch(en)ilcisteine e *S*-alch(en)ilcisteine durante il processo di invecchiamento. Inoltre, il processo di invecchiamento in una soluzione alcolica acquosa può fornire le condizioni in cui produrre tripeptidi γ -glutamyl che sono formati da γ -glutamyl transpeptidasi endogeni nell'aglio fresco.(12) Nell'aglio invecchiato è stato individuato Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-L-arginina (**119**) come un prodotto della reazione di Maillard, che avviene fra gli zuccheri

riduttori ed il gruppo amminico in amminoacidi e peptidi, in questo caso reazione tra glucosio ed arginina. L'arginina è l'amminoacido più abbondante nell'aglio crudo, anche se il glucosio libero non è rilevabile. La reazione di Maillard non si verifica enzimaticamente e produce doratura, sapori e sapori caratteristici. Sebbene l'aglio crudo contenga abbondanti polisaccaridi e amminoacidi, il contenuto di monosaccaridi riducenti, come glucosio, galattosio e fruttosio, è molto basso. Anche se Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-L-arginina non è rilevabile entro quattro mesi di invecchiamento, il suo contenuto aumenta gradualmente con l'ulteriore progressione dell'invecchiamento stesso, mano a mano che viene prodotto glucosio dalla degradazione dei fruttani.(77) Nell'aglio invecchiato sono stati identificati composti solforati di Amadori di tipo Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-L-arginina, come Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-S-allilcisteina (**120**), Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)- γ -glutamyl-S-allilcisteina (**121**) e Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)- γ -glutamyl-S-1-propenil-cisteina (**122**).(65) Questi composti contenenti zolfo Amadori sono composti caratteristici prodotti durante il processo di invecchiamento da γ -glutamyl-S-allilcisteina e γ -glutamyl-S-1-propenilcisteina. Altri composti dell'aglio invecchiato derivanti da reazioni di Maillard sono composti con nucleo pirrolico (**123-129**), con nucleo pirazinico (**130-137**), composti con nucleo pirrolidinico, (**138-140**), oltre ad altri composti (**141-148**).(78) Le pirazine si trovano comunemente negli alimenti cotti, arrostiti e tostati.(3) Dall'aglio invecchiato sono anche stati isolati derivati 1,2,3,4-tetraidro-b-carbolinici (**149-152**),(79-81) numerose saponine furostanoliche e spirostanoliche,(55) e composti antiossidanti (**153-157**).(65)

Quando l'aglio in polvere viene incubato in acido acetico al 5% (simula gli spicchi interi nell'aceto; risultati simili sono stati trovati nei prodotti commerciali), non si formano

tiosulfinati perché il pH acido (3.5) inibisce l'azione della alliinasi. L'ambiente acido rallenta notevolmente anche l'idrolisi delle γ -glutamilsteine, ma influisce negativamente sulle *S*-alchenilcisteine, in particolare i composti *S*-1-propenilici, dal momento che a 24 mesi sono stati trovati rispettivamente solo il 2% e il 42% di *S*-1-propenilcisteina (**109**) e *S*-allicisteina (**108**). In genere i valori di contenuto trovati nelle marche che li specificano sono quasi sempre abbastanza accurati. Gli estratti invecchiati rappresentano un tentativo riuscito di rimuovere l'odore dell'aglio (alliina (**1**), composti derivati dall'alliina e alliinasi attiva). Tuttavia, nel processo viene persa la maggior parte dei composti solforati. Gli estratti invecchiati sono venduti sia in forma secca sia come un liquido contenente il 10% di etanolo. Anche se durante il periodo di invecchiamento si verificano cambiamenti importanti con la maggior parte dei composti solforati, la quantità totale di *S*-allil-cisteine (γ -glutamilsteina-5-allicisteina, **112**, più *S*-allicisteina, **108**) dovrebbe essere quasi la stessa, su base molare, come era originariamente presente negli spicchi di aglio; tuttavia, sulla base di un contenuto totale tipico di 5-allicisteina negli spicchi (41 μ mol/g peso secco), il contenuto totale di *S*-allicisteina (**108**) negli estratti invecchiati commerciali (7.8 μ mol/g peso secco, dopo aver corretto per 40% gli eccipienti) è solo il 19% di quello che ci si aspetterebbe, il che indica notevoli perdite di fabbricazione o l'uso di spicchi con un contenuto insolitamente basso di γ -glutamilsteine. In genere i prodotti commerciali invecchiati dichiarano di essere standardizzati su *S*-allilcisteina (**108**), ma non è mai stato dichiarato nessun importo specifico o anche minimo.(16)

Il trattamento in salamoia degli spicchi interi inattiva anche l'alliinasi e previene la formazione di tiosulfinati e dell'odore con solo una perdita relativamente modesta dei composti solforati originali. Pertanto, gli spicchi in salamoia commerciale hanno un

tenore totale di *S*-allicisteina (**108**) di circa 22 pmoli/g di peso secco. La maggior parte della perdita è dovuta alla diffusione nella soluzione della salamoia. Un metodo molto più breve e semplice di preparare un prodotto d'aglio non odorante in cui ci sia poca perdita di composti solforati può essere raggiunto cuocendo spicchi di aglio interi (a vapore, al microonde, o per ebollizione) per inattivare le alliinasi prima del consumo o prima dell'essiccazione e polverizzazione. Occorre tuttavia tenere presente che i prodotti di aglio con le alliinasi inattivate, pur producendo poco odore, non possiedono alcuni dei benefici medicinali dell'aglio fresco, a causa della mancanza dei tiosulfinati.(16)

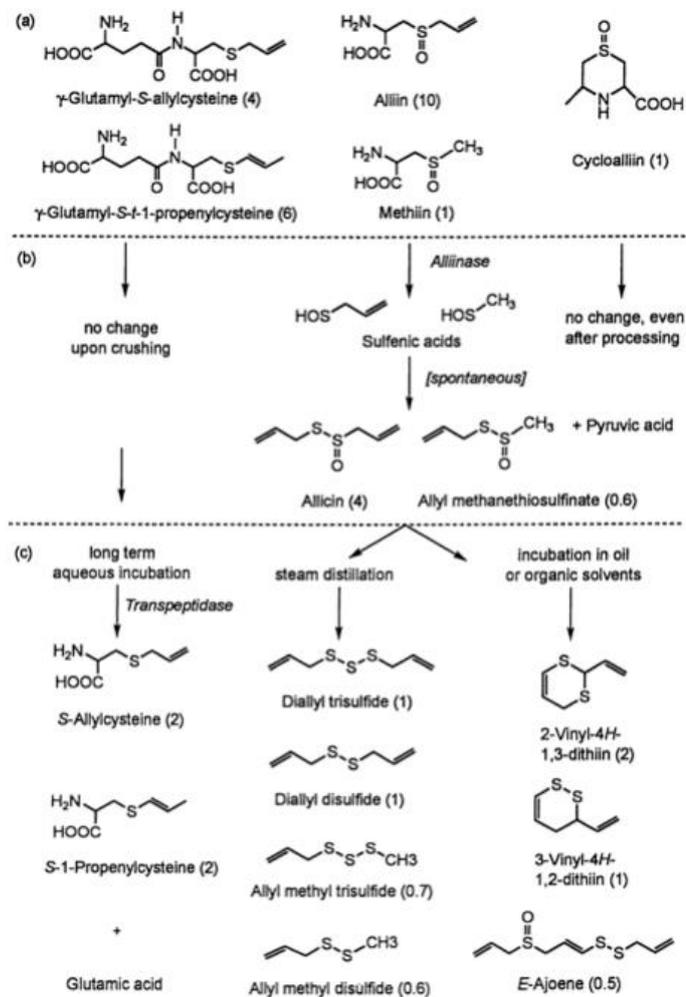


Figura 13. Strutture dei principali composti solforati trovati (a) in spicchi d'aglio interi e (b) dopo la frantumazione degli spicchi e (c) dopo la trasformazione in oli o per invecchiamento. Le quantità tipiche sono indicate in mg/g di spicchi di aglio. (16)

Un altro prodotto commerciale è l'aglio fermentato. La fermentazione può fornire diversi vantaggi aggiuntivi come il miglioramento del sapore, l'arricchimento con metaboliti desiderabili prodotti da microrganismi, e una maggiore sicurezza. In particolare, dopo la fermentazione con una coltura iniziale di *Lactobacillus pentosus*, l'aglio presenta un tenore di zolfo bioattivo inferiore rispetto all'aglio sbollentato. La concentrazione di composti solforati nell'aglio fermentato è influenzata da condizioni di fermentazione diverse e può essere un fattore importante nel controllo di qualità e nella valutazione dei prodotti a base di aglio fermentato.(82, 83). Anche la concentrazione di vitamine e amminoacidi si modifica attraverso il processo della fermentazione; in particolare il contenuto di tiamina, acido ascorbico e alfa-tocoferolo.(84)

La pasta di aglio è una potenziale alternativa commerciale che mantiene l'odore delicato e fresco dell'aglio. Il processo di produzione della pasta di aglio nasce dalla necessità di trovare un prodotto con un processo industriale o semi-industriale in grado di competere sul mercato internazionale. Un altro vantaggio è che per la fabbricazione della pasta di aglio può essere utilizzata l'eccedenza della parte non vendibile del raccolto (bulbi rotti, spicchi sciolti, ecc.). La lavorazione della pasta di aglio consiste essenzialmente nella sbucciatura del bulbo, separando gli spicchi che vengono quindi macinati e addizionati di conservanti e antiossidanti. Il processo si conclude con un trattamento termico della pasta, che viene infine confezionata in vasi di vetro ermeticamente sigillati o in contenitori metallici. Alcuni metodi di preparazione della pasta di aglio sono basati sull'inattivazione dell'alliinasi, che altrimenti darebbe luogo a composti odorosi e irritanti. Gli spicchi d'aglio vengono riscaldati a 99-120°C con acqua calda, vapore o microonde prima della frantumazione. Il liquido ottenuto dalla pressatura dei solidi viene poi mescolato con

farina di soia o farina di latte di soia per formare una pasta. La pasta di aglio risultante non presenta l'odore indesiderato di aglio, ma mantiene ancora un sapore eccellente e può essere utilizzata in salse per carne arrostita, bevande nutrienti, burro di aglio, sale d'aglio, snack, cracker di riso, ecc. Altri metodi di produzione di pasta di aglio con lo stesso sapore di aglio fresco si basano sulla preparazione di una pasta di aglio salato con aggiunta di NaCl per garantire un aspetto piacevole e buona conservabilità. Un ostacolo nella fabbricazione della pasta di aglio è la colorazione per ossidazione dei componenti fenolici. Come detto sopra, *S*-(1-propenil)-cisteina solfossido (4) è responsabile dello sviluppo del colore verde. Per questo motivo i bulbi di aglio devono essere conservati a temperatura uguale o superiore di 23°C per almeno un mese per evitare l'inverdimento del prodotto. Tuttavia, non sono disponibili informazioni specifiche sulla produzione di pasta e sul suo inverdimento durante la preparazione e lo stoccaggio. L'imbrunimento è un'altra reazione irreversibile causata dai componenti reattivi dell'aglio attivati durante la lavorazione. Gli additivi contenenti solfito, ora proibiti, sono stati ampiamente utilizzati come agenti anti-imbrunimento. È stato riportato l'impiego di acido citrico e ascorbico per prevenire l'imbrunimento enzimatico. L'acido ascorbico è un agente riducente molto efficace. L'acido citrico ha un doppio effetto inibitorio sulla fenolasi, abbassando il pH dei mezzi e chelando la porzione di rame di alcune fenolasi. L'acido citrico ha anche un effetto protettivo sull'acido ascorbico, e tende a rallentare la sua auto-ossidazione. La forte proprietà chelante dell'acido citrico provoca il sequestro di tracce di metalli che hanno un effetto deleterio sull'acido ascorbico.(85)

1.4.3 Biosintesi dei composti solforati

Gli *Allium*, come altre piante, sono in grado di "fissare" lo zolfo nel solfato, convertendolo nell'amminoacido cisteina, che viene poi trasformata in una serie di composti solforati attraverso varie vie biosintetiche, tra cui glutamilazione e glicilazione per produrre glutatione, deglicilazione per produrre γ -glutamyl-*S*-alk(en)il-cisteine, e *S*-ossigenazione e deglutamilazione per produrre *S*-alk(en)ilcisteina solfossidi.(12) La biosintesi e l'accumulo di questi composti contenenti zolfo diventa più attiva da uno a due mesi prima della raccolta. Anche altri componenti, come gli altri amminoacidi, i carboidrati, le proteine e i lipidi, sono prodotti attivamente e si accumulano nello stesso periodo in cui i bulbi d'aglio si accrescono. L'aglio maturo viene raccolto dall'inizio dell'estate fino a metà estate.(12) È noto che la concentrazione di alliina (**1**) nell'aglio aumenta con livelli di concimazione di zolfo del suolo fino a un certo punto (oltre 200 kg ha⁻¹ di concimazione di zolfo non c'è nessun ulteriore aumento). La fissazione del solfato è guidata da specifiche proteine di trasporto del solfato. La riduzione del solfato avviene principalmente nel fusto della pianta attraverso le seguenti fasi: (1) il solfato minerale assunto dalla radice viene trasportato al fusto; (2) il solfato nel fusto viene attivato all'adenosina 5-fosfosolfato (APS); (3) l'APS è ridotta enzimaticamente dalla APS reduttasi a solfito, SO₃⁻²; (4) l'enzima solfito reduttasi riduce il solfito a solfuro, S⁻²; e (5) il solfuro è incorporato nella cisteina da una reazione enzimatica diretta con O-acetilserina (CH₃C(O)OCH₂CH(CO₂H)NH₂). Ciò che accade dopo dipende dallo stadio di sviluppo della pianta, dalla temperatura e da altri fattori ambientali. Nelle foglie, la cisteina, sotto forma di γ -glutamyl cisteina (**159**) o glutatione (un tripeptide contenente cisteina, glicina e glutammato), viene convertita nei suoi derivati *S*-alchil o *S*-alch(en)il per mezzo di

composti come γ -glutamyl-S-(β -carbossilpropil) cisteinilglicina (**160**) (Fig.14). Man mano che la pianta si sviluppa, questi composti vengono trasportati al bulbo, dove funzionano principalmente come composti di stoccaggio di zolfo e azoto.

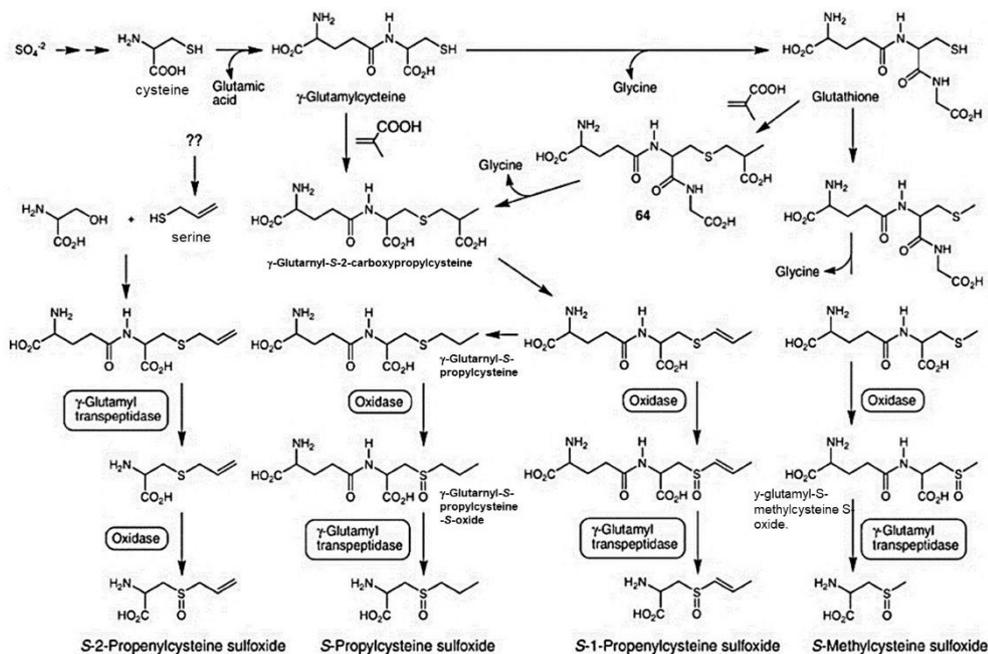


Figura 14. Panoramica della biosintesi dal solfato dei precursori amminoacidici dei composti dell'aglio. (17, 20)

Quando la pianta si avvicina alla maturazione, o il bulbo viene esposto a temperature più basse, si verificano due processi sequenziali: (1) i vari composti di stoccaggio di zolfo vengono convertiti in alliina, isoalliina e metiina mediante processi che richiedono l'ossidazione stereo controllata tramite enzimi ossidasi che danno un gruppo chirale solfoossido; e (2) si verifica un'idrolisi dei legami peptidici da parte degli enzimi γ -glutamyl transpeptidasi.(20, 86)

La posizione e la composizione del suolo, il clima, le differenze di varietà, della data di raccolta e della manipolazione post-raccolta incidono sul contenuto di composti bioattivi. Circa l'85% dell'alliina (**1**) e di altri solfossidi di cisteina di una pianta di aglio si trovano nel bulbo, con circa il 12% nelle foglie e il 2% nelle radici; le γ -glutamilsteine si trovano solo nei bulbi. La quantità di alliina e di γ -glutamilsteine presenti nei bulbi aumenta di diverse volte nelle quattro settimane precedenti il raccolto. Inoltre, l'alliina (**1**) aumenta di circa il 25% durante il processo tipico di stagionatura del bulbo (piante intere essiccate all'ombra per almeno due settimane); un prolungamento della normale data di raccolta di 2 settimane, fino a quando le piante sono quasi completamente marrone, aumenta il contenuto di questi composti un ulteriore 20% su una base di peso secco. Pertanto, una scelta attenta della data di raccolta può essere molto importante.(16, 87-89)

1.5 Metodologie analitiche per l'isolamento e la quantificazione dei composti presenti nell'aglio

Attualmente il consumo di prodotti a base di aglio è in crescita a causa di una maggiore consapevolezza dei benefici per la salute associati al consumo dei composti solforati, come la diminuzione dell'incidenza di malattie croniche, ed è quindi risultato importante caratterizzare la composizione dei prodotti solforati in diverse preparazioni a base di aglio.

La selezione delle procedure di estrazione e isolamento dei prodotti solforati dell'aglio dipende dal tipo di matrice e dalla relativa volatilità e polarità dei composti da analizzare. Esiste un'abbondante letteratura che descrive l'uso di diverse metodologie analitiche per l'isolamento e la quantificazione dei composti solforati presenti nei campioni di aglio.(3, 18, 30, 87, 90-92)

Le prime indagini riguardanti la determinazione dei composti solforati dell'aglio risalgono alla fine del XIX secolo, quando Semmler (1892) identificò il disolfuro di diallile (**16**) negli oli distillati all'aglio.(87) Cavallito e Bailey nel 1944 (93) isolarono e caratterizzarono l'allicina (**3**) per la prima volta, e dimostrarono che la decomposizione dell'allicina (**3**) porta alla formazione di disolfuro di diallile. Più tardi, Brodnitz (61), attraverso l'analisi GC/MS, ha fornito la prova di un altro modo di decomposizione dell'allicina, che ha dato luogo ai prodotti di degradazione 3-vinil-3,4-diidro-1,2-ditiino e 3-vinil-3,6-diidro-1,2-ditiino. Gli studi di Block et al. (3, 35, 36) hanno permesso la prima identificazione degli ajoeni dalla decomposizione dell'allicina (**3**) in miscele di solventi. Successivamente Block et al. (3, 20) hanno dimostrato che questi composti e altri composti che caratterizzano l'aroma dell'aglio sono formati enzimaticamente da

precursori presenti in spicchi d'aglio interi. Ad oggi, esiste una grande varietà di tecniche disponibili per l'estrazione degli ajoeni, vinilditiini e solfuri dalle loro matrici, senza una preferenza evidente per una particolare tecnica. Per quanto riguarda i tipi di matrice, i composti organo solforici sono stati analizzati in aglio fresco, preparazioni culinarie di aglio e olio di aglio. (94-103)

L'estrazione dei composti solforati da campioni vegetali polverizzati o finemente tagliati viene fatta tradizionalmente mediante distillazione in corrente di vapore o mediante estrazione in fase liquida (104). Altre tecniche impiegate per l'estrazione dell'olio da spicchi di aglio fresco sono l'estrazione con idrodistillazione assistita da microonde (MWH) e l'estrazione con ultrasuoni (USE). L'applicazione di ultrasuoni per l'estrazione dell'olio è considerata meno dannosa sui composti termolabili e quindi più affidabile per l'identificazione dei composti responsabili dell'odore e del gusto di aglio appena tritato. Tutte le procedure di isolamento termico differenziano il profilo della frazione volatile analizzato da GC/MS.(95, 102, 105) Vi è una ulteriore tecnica di estrazione mediante ultrasuoni (UAE) che è stata utilizzata in particolare per l'estrazione dell'allicina (3) e i risultati hanno portato alla conclusione che sia un valido metodo da utilizzare.(106)

Le procedure di estrazione degli *S*-alch(en)ilcisteina *S*-ossidi (ACSO) si basano principalmente su una semplice estrazione liquido/solido. Essi comportano generalmente l'uso di acqua (87, 107) o solventi organici, come il metanolo, a temperatura ambiente o riscaldati sotto riflusso immersi in 24 ore. In alcuni casi, il metanolo è acidificato con acido cloridrico, trifluoroacetico o acido formico al fine di garantire la completa inattivazione delle alliinasi. In alternativa, si può usare una miscela di CH₃OH/H₂O (50:50

v/v) (108), CH₃OH/H₂O (80:20, v/v) più 0.05% HCOOH (pH <3) (109) C₂H₅OH/H₂O (80:20) (110) o CH₃OH/CHCl₃/H₂O (12:5:3 v/v/v) a -20°C (111). Dopo la semplice estrazione, l'estratto ottenuto può essere pulito con estrazione in fase solida con cartuccia Sep-Pak C18 (112); o può essere eluito attraverso una colonna di resina a scambio di cationi (113) o colonna di scambio anionico Amberlite IR 120.(87, 114) Lo svantaggio di queste tecniche è la necessità di una operazione di pulizia del campione necessaria per separare gli ACSO dai composti concomitanti. Per ovviare a tale svantaggio, è stata proposta la derivatizzazione pre-colonna, utilizzando o-ftaldialdeide (OPA)/ter-butiltiolo,(115-118) fluorenilmetilcloroformiato (FMOC),(111) molto meno frequentemente, dansilcloruro (5-dimetil-amino-naftalene-1-sulfonil cloruro) (100) o fenil isotiocianato (PITC).(119, 120) Questi reagenti sono stati applicati con successo all'analisi degli ACSO, e OPA/ter-butiltiolo risulta il più usato. I derivati formati presentano coefficienti di estinzione molto elevati, permettendo una rilevazione sensibile e specifica. Inoltre, i protocolli di derivatizzazione non implicano fasi di clean-up che richiedono tempo, che consentono un elevato flusso di campioni in applicazioni di routine. Va notato che la maggior parte dei metodi di cui sopra può determinare quantitativamente derivati sostituiti della cisteina, tra cui γ -glutamyl peptidi. In alternativa alla derivatizzazione pre-colonna, è stato anche riportato un metodo basato sull'eptansulfonato di sodio, usato come reagente di accoppiamento ionico.(109)

I tiosulfinati sono instabili e reattivi, sono facilmente ossidabili e possono subire cambiamenti durante i processi termici. Queste proprietà vanno considerate quando si sceglie un metodo adeguato alla loro determinazione. Così, la metodologia analitica ideale

dovrebbe essere sensibile, di costo moderato ed evitare le trasformazioni chimiche e termiche degli analiti. A causa di questi inconvenienti, è frequente che vengano rilevati i prodotti di degradazione dei tiosulfinati (ad esempio, ajoene, vinilditiini e polisolfuri).(87)

Poiché i tiosulfinati sono solubili in acqua, le estrazioni acquose sono le più comuni, sebbene alcuni autori abbiano riportato tecniche di estrazione con metanolo (35, 109, 121, 122), etanolo (93, 123), diclorometano (20, 100, 124) e acetato di etile (121). Attualmente, vi è la tendenza a sviluppare e utilizzare procedure di estrazione "green", tra cui l'estrazione mediante fluidi supercritici (SC-CO₂) (125-127), microestrazione in fase solida (SPME) (99), microestrazione liquida-liquida dispersiva (DLLME) (128). I fluidi supercritici sono solventi più efficienti con migliori proprietà di trasporto (diffusività, coefficiente di trasferimento di massa, capacità di penetrazione) rispetto ai normali solventi da estrazione allo stato liquido. In particolare, quando si utilizza l'anidride carbonica (CO₂), è possibile ottenere un'elevata selettività per i microcostituenti. Un ulteriore vantaggio per le sostanze suscettibili di ossidazione è che non sono esposte ad ossigeno o ad alte temperature durante il trattamento con CO₂ supercritica.(3, 18, 87) La SFE evita anche i problemi incontrati con la formazione di emulsioni, che complicano la separazione del solvente organico dalla pianta omogeneizzata ricca di acqua. Gli omogeneizzati di aglio vengono estratti a 240 atmosfere con 40 g di CO₂ liquida per grammo di pianta e il prodotto risultante viene disciolto in metanolo per essere analizzato da LC/MS utilizzando RP HPLC. Mentre per ogni analisi sono necessari meno di 15 minuti, la separazione dei tiosulfinati è incompleta. Una migliore separazione dei tiosulfinati si ottiene con HPLC in fase normale, ma in questo caso non si può usare LC/MS.(3) Nel 2006 del Valle et al. (127) hanno condotto analisi su estratti d'aglio

convenzionali ed estratti ottenuti utilizzando come solvente anidride carbonica supercritica (SC-CO₂). La resa varia tra lo 0.65 e l'1.0% e aumenta con la pressione di estrazione (150-400 bar) ad una temperatura costante di 50°C. Sulla base di considerazioni di resa e qualità, le migliori condizioni di estrazione con SC-CO₂ erano 35-50°C e 300-400 bar. Un rendimento del 5.5% è stato ottenuto mediante estrazione convenzionale utilizzando etanolo come solvente, ma l'etanolo sembra essere meno selettivo per i tiosulfinati rispetto alla SC-CO₂. L'uso di aglio fresco ha portato a estratti che assomigliano più strettamente ai prodotti commerciali, forse a causa della degradazione termica e ossidativa di microcostituenti preziosi che avviene durante l'essiccazione. La micro-estrazione in fase solida (SPME) è una tecnica di preparazione del campione che utilizza una fibra di silice fusa, rivestita con un'adeguata fase stazionaria. L'allicina (3) e gli altri composti solforati possono essere desorbiti dal materiale di rivestimento in un solvente appropriato, come il metanolo, e infine analizzati mediante HPLC. La microestrazione in fase solida, associata alla cromatografia liquida con rivelazione UV (HPLC-UV) per l'analisi di composti organosolforati, ha dimostrato di essere una metodologia affidabile, veloce, sensibile e selettiva.(99). Per quanto riguarda i metodi cromatografici per la caratterizzazione e la quantificazione di composti instabili, come i tiosulfinati formati durante l'alterazione dei tessuti d'aglio, occorre tener conto di alcune considerazioni. I metodi cromatografici più delicati come l'HPLC forniscono una misura qualitativa e quantitativa affidabile sia dei volatili dello spazio della testa che dei composti estratti a temperatura ambiente dall'aglio.(91)

Sebbene sia noto che gli ajoeni, i vinilditiini e i solfuri sono più stabili dei tiosulfinati, anche questi composti sono reattivi alle variazioni di temperatura e pertanto la

decomposizione termica dovrebbe sempre essere considerata quando si analizzano i campioni di aglio crudo. In questi casi, le alte temperature richieste per la distillazione possono causare la formazione di artefatti, portando a profili cromatografici non rappresentativi della composizione nei campioni originali. Per quanto riguarda le estrazioni in fase liquida, le estrazioni con acqua non sono impiegate per l'isolamento degli ajoeni, vinilditiini e solfuri poiché questi composti, a differenza dei tiosulfinati, hanno una bassa polarità. Invece, sono comunemente utilizzate le tecniche di estrazione con solvente, impiegando diversi solventi organici non polari come *n*-esano 98% in 2-propanolo,(129) dietil etere,(3, 25, 101, 107, 130, 131) acetonitrile,(132, 133) isoottano,(134) pentano,(135) e diclorometano.(98, 136)

Queste procedure presentano i seguenti svantaggi: sono lunghe, richiedono grandi quantità di solventi, generano abbondanti rifiuti e possono portare a distorsioni dei risultati dovuti ad impurezze presenti nei reagenti e/o mediante manipolazione prolungata dei composti. Per prevenire tali problemi, alcuni autori hanno utilizzato moderne tecniche di estrazione, tra cui SPME, DLLME, estrazione mediante fluidi supercritici e criotrapping. Di questi, la SPME è il metodo più utilizzato, in particolare per lo studio dei composti volatili dello spazio di testa e non solo, anche per l'analisi in tracce di composti in matrici complesse, mentre il criotrapping è utilizzato per l'isolamento di composti volatili aglio a basse temperature e bassa pressione. (94, 96, 99, 128, 136-140) Nel 2018 Block (50) ha pubblicato uno schema estrattivo per la separazione dei diversi composti dell'aglio (Fig. 15).

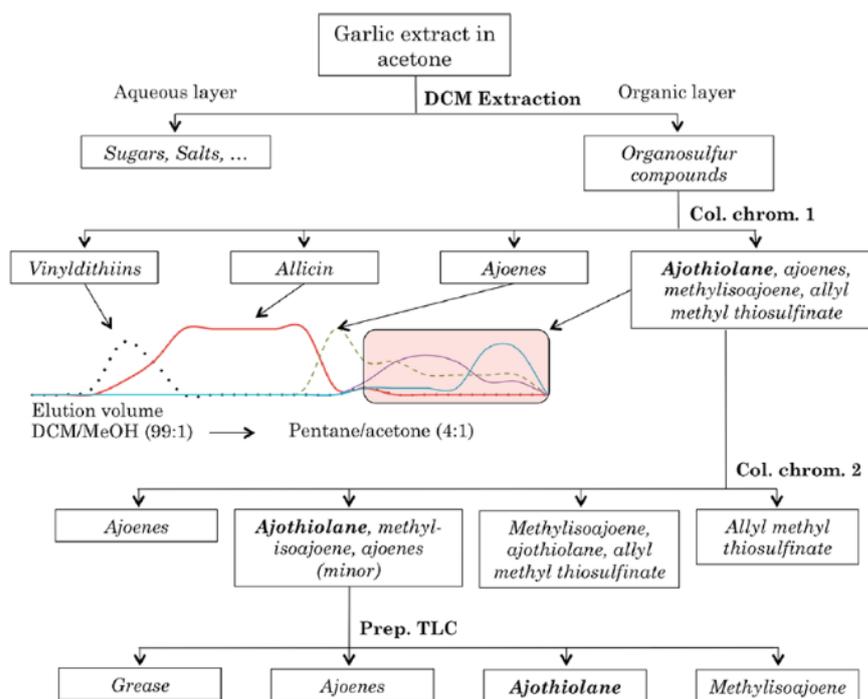


Figura 15. Procedura per la separazione e l'isolamento dei componenti degli estratti di aglio. (50)

Per la determinazione dei componenti aromatici dell'aglio mediante gascromatografia-spettrometria di massa (GC/MS) sono state applicate diverse tecniche di campionamento basate sulla distillazione in corrente di vapore (SD), sulla distillazione simultanea e sull'estrazione con solvente (SDE) l'estrazione con solvente di cattura in fase solida (SPTE) e la microestrazione in fase solida nello spazio di testa (HS-SPME). La degradazione termica di componenti come il solfuro di allile, il disolfuro di dimetile e il solfuro di etilene (tiirano) è stata osservata per SDE e SD, ma non per SPTE o HS-SPME. HS-SPME ha avuto diversi vantaggi rispetto a SD, SDE e SPTE - estrazione rapida senza solventi, nessuna degradazione termica apparente, manipolazione meno laboriosa e meno

fabbisogno di campioni. Gli analiti nel campione sono estratti sul materiale di rivestimento della fibra, e quindi analizzati da GC. Sono stati valutati anche diversi rivestimenti in fibra per selezionare una fibra adatta per HS-SPME di componenti aromatizzati all'aglio. DVB/CAR/PDMS è stato il più efficiente tra i cinque tipi di fibra studiati.(96) La micro-estrazione in fase solida è stata utilizzata per l'analisi dei composti volatili dello spazio di testa in campioni di aglio schiacciato e crudo e di aglio invecchiato nero.(87, 94, 137).

1.5.1 Cromatografia su strato sottile e su carta

La cromatografia su strato sottile (TLC) è una delle tecniche più comunemente usate negli screening veloci. Nei primi lavori per la rilevazione di solfossidi sono state usate miscele eluenti *n*-BuOH:H₂O:AcO:HCOOH (28:8:9:2) e la rivelazione con ninidrina, oppure con ninidrina e Co(NO₃)₂ in AcOH glaciale, *n*-BuOH, HCOOH e collidina (2,4,6-trimetilpiridina); per la rivelazione UV (366 nm) è stata usata una soluzione di SnCl₂ in HCl conc. e MeOH.(141) Per la rilevazione dell'allicina (**3**), le piastre sono state sviluppate in CHCl₃:MeOH (99:1) e rivelate con il reagente SnCl₂ seguito da una miscela di anisaldehyde, AcOH glaciale, MeOH e H₂SO₄ conc. (5ml).(141) Un altro metodo, per la rilevazione di allicina (**3**), diallil disolfuro (**16**), S-metilcisteina (**164**) ha impiegato come miscela eluente CHCl₃/MeOH/10%NH₃ (80:40:15) e rivelazione UV.(142) Successivamente sono stati pubblicati metodi HPTLC, anche per l'alliina (**1**), prevedendo una inattivazione iniziale delle alliinasi mediante trattamento con MeOH degli spicchi freschi schiacciati, miscela eluente *n*-BuOH: H₂O:AcO (6:2:2) e rivelazione con reagente

a ninidrina e densitometria a 540 nm. (143); recentemente è stata utilizzata la HPTLC, sempre per la determinazione dell'alliina (**1**), utilizzando come fase mobile una miscela eluente di *n*-esano:acetato di etile (29:1 v/v) ed in particolare è stato ottenuto come risultato una macchia corrispondente all'alliina (**1**) a $RF = 0,19 \pm 0,01$ ed il metodo proposto è risultato selettivo, sensibile ed accurato per la determinazione dell'alliina nell'aglio.(144) Metodi TLC per i composti solforati di degradazione impiegano piastre di gel di silice (Kieselgel 60 F254; Merck) e rivelazione mediante luce UV (254/366 nm), dopo spray con H₂SO₄ 10% e anisaldeide, e successivo riscaldamento.(46)

Anche la cromatografia su carta è stata impiegata nei derivati dell'aglio sempre con eluenti e sistemi di rivelazione analoghi ai precedenti. (145-147)

1.5.2 Cromatografia liquida ad alta pressione e spettrometria di massa

Nei primi anni '90, la bassa affidabilità dei profili dei composti solforati analizzati mediante la GC, ha portato allo sviluppo di metodologie basate sull'HPLC. Da allora, RP-HPLC è stata la metodologia più comunemente utilizzata, principalmente impiegando fasi mobili metanolo-acqua o acetonitrile-metanolo-acqua. Oltre agli spettrometri di massa, i rivelatori UV sono di uso frequente poiché i gruppi funzionali di questi composti sono UV attivi. Una revisione dei metodi più usati per HPLC nell'analisi dei composti di aglio è stata fatta da Arnault et al.(109)

Come già detto fattori genetici, condizioni di crescita, fertilizzanti a base di zolfo e diverse condizioni post-raccolta possono influenzare i profili delle *S*-alch(en)ilcisteina *S*-ossidi (ACSO), che sono determinanti sull'aroma ed il sapore dell'aglio; ad esempio la

fertilizzazione a base di zolfo incrementa il contenuto di cisteina, glutatione ed alliina.(148, 149) Sono quindi stati sviluppati numerosi metodi per la quantificazione dei precursori del sapore. (108, 116, 141, 150) Questi metodi coinvolgono le tecniche che variano da uno screening quantitativo semplice all'uso di metodi cromatografici moderni e possono essere classificati come metodi indiretti o diretti. I metodi indiretti si basano sulla determinazione di vari prodotti derivanti dalla conversione enzimatica dei precursori del sapore (ad es. tiosulfinati, piruvato o ammoniaca). Tuttavia, questi metodi non determinano il profilo o le quantità relative di ACSO presenti nei campioni. I metodi diretti permettono la determinazione di ACSO prima della loro decomposizione enzimatica. La cromatografia liquida ad alte prestazioni mediante fase inversa (RP-HPLC) accoppiata ad un rivelatore UV svolge un ruolo di primo piano tra i metodi diretti, nonostante il fatto che questo metodo non possa risolvere completamente la separazione di alcuni ACSO e che siano necessarie ampie fasi di pulizia del campione. La determinazione HPLC dopo la derivatizzazione pre-colonna è usata meno frequentemente come alternativa al metodo precedente. Le tecniche cromatografiche che utilizzano alte temperature, come la gascromatografia, non sono raccomandate per l'analisi ACSO, a causa della loro instabilità termica.(87) Il metodo di derivatizzazione basato sull'eptansulfonato di sodio,(109) usato come reagente di accoppiamento ionico ha reso possibile la quantificazione dell'alliina e di alcuni altri metaboliti secondari dello zolfo come l'allicina (**3**) e *S*-allilcisteina (**108**). Tuttavia, con questo metodo non è stato possibile determinare altri derivati della cisteina, come la metiina e l'isoalliina. Successivamente è stata sviluppata una procedura per determinare gli ACSO, *S*-allilcisteina (**108**) e γ -glutamyl peptidi in spicchi e polvere di aglio, utilizzando una preparazione del campione

in un'unica fase, seguita dalla HPLC sia in fase normale (NP) sia inversa (RP) HPLC.(89)

In questo caso, l'uso di MeOH al 90% (v/v) con HCl 0.01 N ha permesso una migliore estrazione dei solfossidi. Sebbene l'HPLC consenta generalmente una determinazione relativamente semplice, riproducibile e accurata degli ACSO, il suo potere risolutivo è il fattore più limitante per l'identificazione di tracce di quantità di analoghi minori dell'alliina (**1**). Questo può essere dovuto al fatto che la maggior parte degli analoghi dell'alliina (**1**) sono (+)-diastereoisomeri e in alcune condizioni HPLC co-eluiscono. Inoltre, lievi variazioni del tempo di ritenzione possono portare a possibili errori di identificazione dei picchi. D'altra parte, i composti che hanno un assorbimento UV minore possono essere sovrastimati. Come alternativa per minimizzare questi problemi, è stato sviluppato un metodo con un biosensore basato sull'alliinasi immobilizzata.(151) Questo metodo a flusso continuo presenta alcuni vantaggi, come tempi di analisi ridotti rispetto al corrispondente metodo HPLC; e il fatto che non è necessario alcun pretrattamento complesso del campione (si utilizzano solo piccoli volumi di solventi organici) e non sono necessari solventi organici per il funzionamento dell'apparecchio a flusso continuo.(87)

Per quanto riguarda LC/MS, è stato riportato un metodo che comporta eluizione isocratica e O-(carbossimetil) idrossilammina emicloruro (OCMHA) come inibitore dell'alliinasi (per evitare la lisi enzimatica degli ACSO quando si preparano estratti di aglio), con conseguente quantificazione positiva dei singoli ACSO.(3, 87, 152)

I tiosulfinati sono i composti più noti e più studiati del genere *Allium*. Si trovano in tutte le specie del genere, e le differenze tra le specie sono dovute al tipo e al contenuto relativo dei loro precursori (ACSO) (18). L'allicina (**3**) è il composto più importante su cui giudicare la qualità degli spicchi d'aglio e delle polveri d'aglio, poiché i tiosulfinati sono

gli unici composti identificati dell'aglio che sono stati riconosciuti come essenziali per le attività farmacologiche dell'aglio a concentrazioni compatibili con il normale consumo di aglio (2-4 g/giorno). Anche se l'allicina (**3**) non può essere responsabile di alcuni degli effetti dell'aglio essa funge ancora da importante composto marcatore anche per questi effetti.(16) Cavallito e Bailey (93) sono stati i primi a descrivere l'isolamento e la caratterizzazione dell'allicina (**3**) dall'aglio, ottenuta per estrazione di etanolo a temperatura ambiente (3, 91). Stoll e Seebeck (153, 154) determinarono la struttura dell'allicina (**3**) e dimostrarono che questo composto si era formato enzimaticamente dall'alliina (**1**).

La prima relazione che ha valutato il contenuto totale di tiosulfinati ha utilizzato una determinazione indiretta, valutando spettrofotometricamente il contenuto dell'acido piruvico nella cipolla fresca, liofilizzata ed essiccata al forno dopo l'estrazione in esano.(155) Negli anni '80 e nei primi anni '90, a causa delle incoerenze riscontrate nei risultati ottenuti da GC/MS, sono state sviluppate analisi HPLC per identificare e quantificare i composti volatili degli estratti di aglio evitando la degradazione termica. Miethig (156) ha riportato un'analisi HPLC per determinare l'allicina (**3**) negli estratti eterici di aglio, utilizzando HPLC in fase normale, e successivamente, Jansen et al. (122) ha riferito una tecnica RP-HPLC per determinare l'allicina (**3**) negli estratti acquosi. La quantificazione dell'allicina (**3**), il tiosulfinato predominante,(86) è importante perché essa è considerata un indicatore di qualità delle varietà commerciali di aglio. Il contenuto minimo di allicina (**3**) necessario per garantire la bioattività nei prodotti di aglio in polvere dovrebbe essere di 455 mg g⁻¹.(157) Tuttavia, la determinazione dell'allicina (**3**) comporta alcune difficoltà data la sua instabilità e reattività. Sono state effettuate determinazioni

quantitative di allicina (**3**) e altri composti organosolfurati da omogenati di aglio, utilizzando l'analisi RP-HPLC, tecnica che è stata utilizzata anche al fine di determinare la stabilità dell'allicina (**3**) in estratti acquosi di aglio.(116, 133, 158) Lawson et al. (133) hanno effettuato un'analisi quantitativa di tutti gli alchil e alchenil tiosulfinati rilevabili, compresi gli isomeri configurazionali, in omogenati freschi di aglio. Gli spicchi d'aglio interi sbucciati sono stati tritati e mescolati per un minuto utilizzando 10 ml di acqua per grammo di aglio oppure usando la polvere (30-60 mL di acqua/g). L'omogenato è stato lasciato riposare a temperatura ambiente per cinque minuti (la produzione massima di tutti i tiosulfinati è stata raggiunta in due minuti), filtrato e iniettato direttamente nell'HPLC. Per proteggere le colonne di guardia, è stato aggiunto un volume di metanolo al campione per precipitare alcuni dei carboidrati e delle proteine. Lo standard di allicina (**3**) può essere sintetizzato da diallile disolfuro (**16**) puro o isolato da spicchi di aglio o polvere mediante TLC e poi quantificato con il metodo della cisteina-deplezione. Poiché 1 mg di allicina (**3**) è formato da 2.185 mg di aliina, l'allicina (**3**) può anche essere quantificata aggiungendo una quantità nota di aliina (**1**) ad un omogeneizzato di aglio filtrato e misurando l'aumento della concentrazione di allicina (**3**) dall'area del picco.(16)

I tiosulfinati puri sono stati sintetizzati o isolati e identificati da ¹H NMR. Alcuni isomeri configurazionali sono stati separati mediante HPLC in fase diretta. È stata inoltre studiata la variazione della resa di tiosulfinati tra aglio proveniente da vari paesi, bulbi interi, bulbilli e tempi di stoccaggio. L'analisi è stata estesa anche ai prodotti commerciali a base di aglio e i dati ottenuti indicano che i tiosulfinati vengono rilasciati solo da spicchi d'aglio e prodotti in polvere a base di aglio.(159) Bauer (160) ha sviluppato un metodo HPLC utilizzando fasi chirali stazionarie, silica gel rivestito di (+)-poli(trifenilmetil metacrilato)

[Chiralpak OT (+)] e MeOH come eluente per la separazione enantiomerica degli esteri racemici di tiosulfinati di origine naturale o sintetica. È stata anche messa a punto una tecnica preparativa su colonna Hibar (Merck) con fase stazionaria triacetato di cellulosa ed etanolo come eluente. Nel 1992 Block (161) ha pubblicato un metodo di analisi HPLC impiegando gradienti di 2-propanolo/esano. Sebbene con metanolo/acqua 1:1 sia stata ottenuta una separazione più povera di regio- e stereoisomeri, queste condizioni sono risultate preferibili per la ionizzazione termospray in LC/MS. (91)

Anche il contenuto di alliina (**1**) degli spicchi o dei prodotti a base di aglio può essere una valida misura della qualità, a condizione che sia verificata l'attività di alliinasi (da un rapido esaurimento di alliina (**1**) o un rapido aumento di allicina (**3**)). Il contenuto di alliina (**1**) può essere misurato mediante analisi HPLC dopo aver estratto al microonde gli spicchi per 30 secondi o averli omogeneizzati o polverizzati dopo trattamento con aminoossiacetato 10 mM per inibire l'alliinasi (sono stati utilizzati anche gli alcoli, ma non danno inibizione completa). Lo standard di alliina (**1**) è reperibile in commercio (LKT Labs, St. Paul, MN; Indofine, Somerville, NJ; and Extrasynthese, Lyon Nord, France).(16)

A causa del gran numero di tiosulfinati e di altri composti organosolforati presenti sia nell'aglio fresco sia in diverse formulazioni a base di aglio, e data la loro importanza biologica, sono state sviluppate diverse metodologie analitiche per determinarli e quantificarli.

Anche le γ -glutamylcisteine e le *S*-alchenilcisteine sono analizzate mediante HPLC in fase inversa. Le γ -glutamylcisteine non sono disponibili in commercio, ma possono essere

isolate da spicchi d'aglio (5-allil) o semi di cipolla (5-1-propenil). Esse possono essere quantificati dal rilascio di glutammato dopo il trattamento con γ -glutamyl transpeptidasi. γ -glutamyl-S-allilcisteina (**112**) può anche essere saggiata da rilascio di S-allilcisteina (**108**) con la transpeptidasi. S-allilcisteina (deossiallina, **108**) può essere sintetizzata o acquistata (LKT Labs). S-1-propenil-cisteina (**109**) non è disponibile in commercio.(16)

Il contenuto di solfuri dell'olio d'aglio distillato in corrente di vapore può essere standardizzato su disolfuro di diallile (**16**) più trisolfuro di diallile (circa il 45% dei solfuri totali), entrambi disponibili in forma pura (>98%, LKT Labs), come determinato da HPLC o GC. Altri solfuri presenti nell'olio possono essere stimati utilizzando i relativi coefficienti di estinzione. I principali composti dei prodotti di macerazione dell'olio (vinilditiini e ajoene) possono essere analizzati con HPLC, ma gli standard non disponibili in commercio e sono un po' difficili da preparare in forma pura. La standardizzazione grezza dei prodotti dell'olio può essere ottenuta dal contenuto totale di zolfo.(16)

Negli anni '90 Calvey et al.(162) hanno avviato un progetto basato sull'applicazione della tecnica di estrazione di fluidi supercritici (SFE) per l'analisi dei composti organosolforati presenti nelle specie di *Allium*. Il loro obiettivo era di sviluppare un metodo robusto per l'analisi di routine di piante fresche e prodotti derivati, nonché per le misurazioni *in vivo*. A tal fine sono state presentate le prestazioni del processo SFE abbinato a diversi approcci di taratura per HPLC e LC/MS. In un primo documento, la tecnica SFE-MS è stata anche utilizzata con successo per identificare l'allicina (**3**), il tiosulfonato predominante nell'aglio appena tagliato. Una bassa temperatura del forno (50°C) e una bassa temperatura della punta del restrittore (115°C) erano necessarie per ottenere uno spettro di massa di

ionizzazione chimica (CI) di allicina (**3**) con lo ione molecolare protonato, m/z 163, come ione principale. Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca (125) ha caratterizzato mediante cromatografia liquida (LC) e spettrometria di massa a ionizzazione chimica il profilo dei tiosulfinati di estratti ottenuti mediante SFE da omogeneizzati di aglio, cipolla e rampa (porro selvatico, *A. tricoccum* Ait.). Con questa tecnica sono stati identificati e quantificati i principali tiosulfinati e non solo, è stato possibile anche identificare composti fenolici in particolare attraverso la tecnica di estrazione di fluidi supercritici e cromatografia fluidi supercritici accoppiata a spettrometria su massa (SFE-SFC-MS/MS).(163) Inoltre, sono stati identificate piccole quantità di ajoene. Sono anche state evidenziate tracce di composti allilici non evidenziabili facilmente nelle analisi con GC/MS con iniezione a freddo su colonna e LC in fase inversa o in fase normale con rilevamento UV.(87) Negli anni successivi, i metodi basati su HPLC che utilizzano sia la fase inversa che la fase normale sono stati migliorati, e l'analisi è stata estesa anche ai prodotti commerciali all'aglio (127, 164) e diverse matrici biologiche, come sangue, plasma e fluidi corporei simulati.

Estrazioni con metanolo di aglio fresco sminuzzato e successive cromatografie su colonna hanno portato all'isolamento dei composti di degradazione dei tiosulfinati, vinilditiini e solfuri (34) Nel 1984 Block ha isolato l'ajoene mediante cromatografia su colonna usando come eluente l'acetato di etile e HPLC (alcol isopropilico/esano 8:92) (35)

Le tecniche di identificazione usate con l'HPLC includono di solito la spettroscopia e la spettrofotometria; nella maggior parte dei casi vengono impiegati rivelatori UV (con o senza serie di diodi) e gli spettrometri di massa. È importante notare che, sebbene sia

abbondante la letteratura relativa alla determinazione di questi composti, la maggior parte degli studi pubblicati mancano di analisi dei dati, che sono della massima importanza, in quanto consentono di rispondere a domande in merito alle prestazioni analitiche dei metodi proposti. Della letteratura disponibile, solo gli studi di Bocchini et al. (124), De Diego et al. (164), Locatelli et al. (99), Wang et al. (157), Ramirez et al. (128) e Yoo et al. (100) hanno validato le metodologie che hanno introdotto. Il resto degli studi ha determinato solo allicina (3) e altri tiosulfinati con l'obiettivo di caratterizzare chimicamente diversi campioni di aglio e preparati di aglio, o per studiare le associazioni tra i composti e un particolare effetto biologico.

Nell'analisi di miscele complesse di componenti non polari presenti negli oli distillati di aglio, poiché nelle condizioni standard di LC-ESI-MS si ha bassa sensibilità (a causa della bassa basicità di Lewis dello zolfo divalente) e lunghi tempi di eluizione, è stata valutata con successo l'applicazione di metodologie UPLC. Le tecniche separative recentemente sviluppate, come la cromatografia liquida ultra-performante (UPLC) e la cromatografia liquida ultraveloce, hanno contribuito a tali progressi. La riduzione della dimensione delle particelle della fase stazionaria ha migliorato, di conseguenza, l'efficienza e la risoluzione dell'analisi. L'UPLC, che impiega pressioni più elevate, rispetto all'HPLC ha il vantaggio di ridurre significativamente i tempi di eluizione con un conseguente affilatura dei picchi, ed è quindi utile per l'analisi MS di componenti presenti in tracce che hanno tempi lunghi di eluizione.(25, 165) Si è visto che i risultati dell'analisi dei composti solforati mediante UPLC/MS è più performante rispetto all'approccio micro-estrazione in fase solida (SPME) accoppiata alla spettrometria gas-cromatografia di massa (GC/MS).(166) UPLC-QTOF e UPLC Orbitrap con analisi MS/MS sono state usate per identificare gli

ajotiolani.(50) UPLC-[Ag⁺]-CIS-MS (cromatografia liquida ultra-performante dello spray dello ione di coordinazione argento)(25, 167) è un metodo di ionizzazione chimica in cui complessi carichi positivamente o negativamente sono formati dall'aggiunta di un atomo centrale adatto agli analiti, e questi complessi possono essere rilevati mediante spettrometria di massa. Poiché sia i composti organici polari che quelli non polari possono formare composti di coordinazione con un atomo centrale appropriato, questa forma di ionizzazione è altamente versatile. Viene applicata una nebulizzazione nella sorgente ionica stabilizzata mediante l'applicazione di una tensione di supporto.(165) L'applicazione di UPLC-(Ag⁺)CIS-MS ad un campione di olio d'aglio ha formato rapidamente come ¹⁰⁷Ag/¹⁰⁹Ag addotti di disolfuro di diallile (16). In questa metodica, subito dopo la separazione cromatografica, nel campione liquido viene introdotta una soluzione di AgBF₄.(168)

1.5.3 Gascromatografia e spettrometria di massa

Dal momento che una definizione rigorosa di "olio essenziale" è "una sostanza volatile contenuta in alcune piante aromatiche che impartisce odore distintivo alla pianta" e dal momento che le sostanze volatili dell'aglio non si trovano nella pianta, ma sono il risultato della rottura delle cellule della pianta, è preferibile descrivere il processo che porta ad un particolare prodotto derivato come ad es. "componenti volatili ottenibili mediante distillazione in corrente di vapore" o "componenti volatili dello spazio di testa".(20) A causa della loro eccellente risoluzione e capacità di identificazione di massa, sia la GC sia la GC/MS hanno avuto un ruolo importante nello sforzo di caratterizzare i composti

volatili dell'aglio. Il primo riferimento alla gascromatografia (GC) è stato fatto negli anni '60 quando Carson e Wong (169) hanno proposto una tecnica per separare alchil di- e trisolfuri. Tuttavia, Bernhard et al. (170) notarono che molti dei composti rilevati nelle specie di *Allium* dall'analisi GC corrispondevano a "artefatti dell'analisi".(91) L'analisi degli estratti di aglio o dei distillati ottenuti sottovuoto mediante HPLC sia in fase normale che in fase inversa, utilizzando la rivelazione UV a diode array e LC/MS, seguita dall'analisi NMR, indica che i costituenti predominanti sono i tiosulfinati. Nelle analisi HPLC non si trova alcuna prova di quantità significative dei polisolfuri e dei tiofeni evidenziati dalle analisi GC/MS.(91) Questo fatto era già stato evidenziato negli anni '70 del secolo scorso. Si era visto infatti che sottoponendo un estratto di aglio appena preparato all'analisi GC/MS, apparivano due picchi principali sconosciuti a m/z 144 ($C_6H_8S_2$). L'iniezione di un campione sintetico di allicina (**3**) dava gli stessi due picchi.(61) Tuttavia, inducendo la decomposizione dell'allicina sintetica a 20°C per 20^oore, e poi sottoponendola a GC/MS, i due picchi a m/z 144 non si trovavano; gli unici prodotti rilevati erano diallil solfuro, disolfuro (**16**) e trisolfuro, insieme ad anidride solforosa. Si concluse quindi che i composti a m/z 144 erano prodotti di decomposizione dell'allicina (**3**) durante GC e non erano componenti dell'aglio; erano cioè artefatti.(3, 104, 171, 172). Infatti, al fine di volatilizzare rapidamente i campioni iniettati, il punto di ingresso nella GC è in genere riscaldato a temperature fino a 250°C. È stato dimostrato che i tiosulfinati originariamente presenti nei campioni di aglio possiedono sia una bassa stabilità che un'alta reattività associata al debole legame S-S (energia di legame 46 kcal mol⁻¹ o inferiore) (91, 173) e quindi si decompongono nelle condizioni di alta temperatura usate nella GC dando polisolfuri come artefatti. Solo in condizioni particolari, come la

distillazione sotto alto vuoto a temperature inferiori a 50 °C, sopravvive la maggior parte dei tiosulfinati alifatici, che possiede fino a otto atomi di carbonio.(91) Per evitare quindi la presenza di artefatti, è meglio testare le proprietà GC di standard noti, e confrontare i risultati analitici con quelli ottenuti con un metodo di separazione che non comporta riscaldamento, come HPLC. In effetti, l'uso a temperatura ambiente delle condizioni HPLC-APCI-MS per l'analisi diretta dei composti dell'aglio ha confermato la presenza di tiosulfinati e l'assenza di di- e polisolfuri e dei loro prodotti di riarrangiamento. Se un composto risulta essere instabile in una serie di condizioni GC, è possibile ottenere risultati migliori raffreddando la porta di iniezione o anche utilizzando condizioni di iniezione criogenica (a bassa temperatura) (ad es. con una colonna di gel di silice 1.8 m x 3 mm e basse temperature sia all'iniezione sia in colonna (91); accorciando la lunghezza della colonna e aumentando la portata in modo che il campione passi meno tempo nella colonna; o utilizzando una colonna GC con una fase stazionaria più spessa (4 µm).(174) Con questo tipo di tecnica, variando le condizioni, si è potuto identificare i composti a m/z 144 come i dimeri di Diels-Alder della tioacroleina, 2-vinil-4H-1,2-ditiino (**50**) e 3-vinil-4H-1,3-ditiino (**51**). Spettri GC/MS di alcune preparazioni di aglio mostrano anche un picco a m/z 104, identificato come il composto eterociclico 3H-1,2-ditiolo (**315**). Sebbene non sia stato evidenziato un meccanismo per la formazione di (**315**), è possibile che esso sia formato dal riarrangiamento dell'allicina (**3**) a tiosolfossilato (59 in figura) analogo all'equilibrio osservato tra tiosulfinato (59 in figura) e tiosolfossilato (62 in figura) seguita da una decomposizione di 59-60 e di alcol allilico, presente in quantità analoghe a 60.(3)

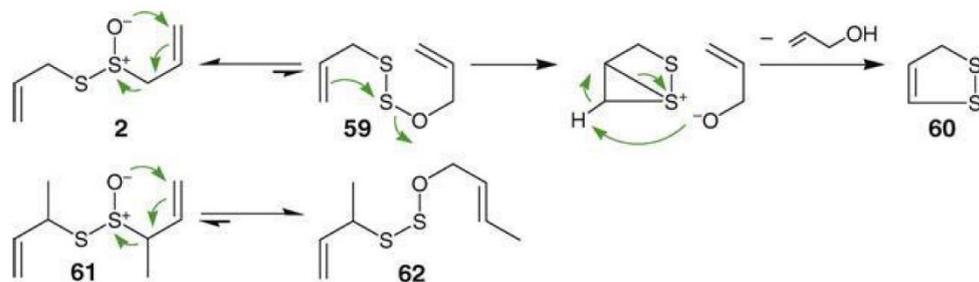


Figura 16 Meccanismo proposto per la formazione di 3H-1,2-ditiolo (315) da allicina (3) (3)

La maggior parte degli studi presenti nella letteratura ha impiegato la distillazione, con alcune variazioni nel processo (distillazione in vapore, idrodistillazione, distillazione assistita da microonde),(175). La procedura di distillazione più comune utilizza l'apparecchiatura Lickens-Nickerson.(87) Nel 1992, Sinha et al. (176) hanno pubblicato un metodo basato sull'estrazione supercritica di biossido di carbonio (SC-CO₂) delle cipolle e la loro analisi quantitativa mediante gascromatografia-spettrometria di massa. L'analisi ha evidenziato la presenza di 28 composti contenenti zolfo, tra cui allicina (**3**) (o il suo isomero, di-1-propeniltiosulfinato), propil metilmetantiosulfinato, derivati ditiinici, diallil solfuro, diallil trisolfuro. In un olio commerciale di cipolla distillato a vapore erano presenti in concentrazione elevata metilpropiltrisolfuro, dipropil trisolfuro e dipropil tetrasolfuro. Sono stati inoltre confrontati oli essenziali provenienti da diverse piante autoctone abruzzesi, tra cui l'aglio mediante analisi attraverso estrattore oli essenziali E0105 12 lt PLUS e successivamente è stata effettuata GC/MS; sono stati identificati 6 composti tra i quali il principale componente è stato il diallildisolfuro (**16**) (65%) seguito dal dialliltrisolfuro (20%) (175, 177, 178)

Gli *S*-alch(en)ilcisteina-*S*-ossidi (ACSO) sono termolabili e, pertanto, l'applicazione della gascromatografia alla loro analisi è molto controversa, in quanto può portare a stime errate. Per questo motivo, in letteratura si trovano solo pochi studi in cui è stata utilizzata l'analisi GC, la maggior parte dei quali impiegano agenti derivati accoppiati a rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) o rivelatore fotometrico a fiamma (FPD) (179, 180). Sono state operate derivatizzazioni, come la formazione di *terz*butildimetilsililderivati (112), o la derivatizzazione mediante cloroformio etilico.(181)

Mediante GC/MS può essere analizzato un gran numero di tiosulfinati. utilizzando colonne tubolari aperte a foro largo (0.53- mm id..) con iniezione criogenica (0°C) in colonna. I tiosulfinati contenenti un gruppo 2-propenilico (allile), tuttavia, non sono identificati in modo soddisfacente nemmeno utilizzando tali lievi condizioni GC. Sebbene le tecniche HPLC e GC/MS forniscano analisi complementari per i tiosulfinati, nessuna delle due tecniche da sola può caratterizzare pienamente i componenti del sapore dell'aglio.(182) L'estrazione mediante fluidi supercritici può essere usata accoppiata alla GC/MS.(182)

L'analisi GC/MS è utilizzata principalmente per i vantaggi che ha in termini di profili cromatografici ad alta risoluzione e facilità di identificazione del composto. Per l'identificazione e la quantificazione dei composti solforati sono stati impiegati anche il rivelatore a ionizzazione di fiamma e il rivelatore fotometrico di fiamma.(31, 99, 183) Al fine di minimizzare gli errori nella quantificazione dei composti dell'aglio mediante l'analisi GC, è consigliabile testare le proprietà GC di composti standard noti, e confrontare i risultati analitici con quelli ottenuti da tecniche di separazione più miti, come

HPLC. Se un certo composto è instabile in condizioni GC, è possibile ottenere risultati migliori raffreddando la porta di iniezione, o anche utilizzando condizioni di iniezione criogenica.(3, 25, 174)

Mediante analisi GC sono stati anche studiati metaboliti dell'aglio nei fluidi biologici. Sono stati fatti anche studi mediante gascromatografia-spettrometria di massa/olfattometria (GC/MS/O).(184) Le analisi hanno rivelato metaboliti derivati dall'aglio nelle urine, come solfuro di allile metile (AMS), solfossido di allile metile (AMSO) e solfone di allile metile (AMSO₂). (185)

La gascromatografia-spettrometria di massa/olfattometria (GC/MS/O) è stata anche usata nella determinazione dei componenti dell'aroma dell'aglio arrostito, (186) e dell'aglio nero.(187)

I polisolfuri più volatili possono essere rilevati mediante gascromatografia nello spazio di testa (HS/GC), una tecnica che può aumentare la sensibilità di rilevamento di 2-3 ordini di grandezza rispetto ai metodi convenzionali di campionamento e contemporaneamente riducono al minimo i cambiamenti chimici nei componenti di aroma e sapore volatili durante l'analisi HS/GC riduce o elimina la preparazione del campione ed è ideale per l'analisi di tracce di sostanze volatili.(167, 188, 189) E' stata inoltre usata la gascromatografia spazio di testa con rilevazione delle emissioni atomiche (HS-GC-AED). L'emissione spettrale di plasma atomico fornisce alla gascromatografia una forte rilevazione specifica per singoli elementi. Essa presenta importanti vantaggi come l'alta sensibilità, la selettività degli elementi e la possibilità di un'analisi simultanea di più elementi. La risposta dell'AED può segnalare composti che contengono elementi specifici,

anche se questi composti possono essere presenti in quantità molto ridotte o possono essere coeluiti con altri componenti. La tecnica è stata applicata all'analisi dell'alito umano dopo consumo di aglio fresco, ed è stata vista efficace per la rilevazione di composti organoseleniati e composti organoselenio-solforati misti, nonché di composti organosolforati mai identificati in precedenza.(52)

In questi studi talvolta è stato trovato lo zolfo elementare (S₈). Esso può formarsi attraverso la decomposizione di composti organosolforati, come polisolfuri diallici (All₂S_n) o isotiocianati, o attraverso l'azione batterica. A volte può verificarsi come un artefatto, ingannando l'analista a pensare che si tratti di un composto contenente carbonio. Lo zolfo elementare eluisce durante la GC o HPLC come un composto organico non polare, per esempio co-elueno con octadecano su una colonna GC. Il suo spettro di massa mostra un M⁺ a *m/z* 256 con un forte ione M⁺² a *m/z* 258 (35.2% dell'abbondanza di M⁺), mentre il modello di frammentazione consiste in una serie di picchi separati da 32 Amu. Mentre un picco S₈ viene visto con GC/MS e GC a cattura di elettroni, esso non può essere rilevabile utilizzando un rivelatore a ionizzazione di fiamma. separazione (13 min) di una serie di picchi identificati dal monitoraggio ionico selettivo.(168)

La GC/MS è stata utilizzata anche come analisi di conferma nel tentativo di classificare diverse cultivar di aglio attraverso la tecnica dei rivelatori di gas accoppiati a semiconduttori chiamati “nasi elettronici” e i risultati sono stati ulteriormente visionati ed analizzati attraverso la tecnica di analisi dei dati denominata PCA; i risultati, confermati attraverso GC/MS, hanno portato alla conclusione che si possano classificare diverse coltivazioni di aglio attraverso la tecnica dei “nasi elettronici”.(190)

1.5.4 Spettrometria di massa ambientale

Nel paper del 1996, Ferary e Auger (138) posero una domanda cruciale: "Qual è il vero odore di *Allium* tagliato?". I metodi standard di estrazione e di analisi potrebbero fornire un quadro falso di questa chimica se le reazioni iniziali sono sufficientemente veloci e se i composti formati sono sufficientemente reattivi e/o instabili.(167) Oltre alle metodologie precedenti, una famiglia di tecniche, chiamata spettrometria di massa ambientale (Ambient Mass Spectrometry),(191, 192) è stata applicata per esaminare la chimica dell'aglio. Queste tecniche permettono il campionamento diretto delle molecole nel loro ambiente nativo senza preparazione o separazione del campione, generando gli ioni al di fuori dello spettrometro di massa. La "ambient ionization" è una forma di ionizzazione in cui la preparazione del campione avviene in tempo reale e prossimale alla ionizzazione e durante l'analisi degli analiti. Un metodo puramente ambientale è quello in cui il campione è disponibile per l'analisi con spettrometria di massa senza preparazione preliminare del campione o, in ultima analisi, lo spettrometro di massa è generato direttamente sul campione per l'analisi senza disturbare il campione dal suo ambiente("leaf spray").(193) Poiché nella "leaf spray" gli analiti sono campionati applicando un'unica gocciolina di solvente oppure sfruttando il contenuto di acqua intrinseco del tessuto vegetale, la durata della risposta della MS è relativamente breve, il che potrebbe ostacolare l'osservazione delle specie a bassa abbondanza. Lo stesso problema esiste nelle tecniche in cui un piccolo pezzo di tessuto viene campionato per MS dalla punta di un ago appuntito.(194) La preparazione del campione, l'introduzione e la ionizzazione avvengono quindi in modo

concertato e simultaneo durante un'unica fase di analisi in prossimità del punto di introduzione degli ioni nel sistema di vuoto dello spettrometro di massa.(195) Queste tecniche comprendono la ionizzazione per elettrospray (DESI), l'analisi diretta in tempo reale (DART),(3, 25, 191) il desorbimento/ionizzazione assistito dal plasma (PADI),(196, 197) e la ionizzazione con elettrospray estrattivo (EESI). Tutte queste tecniche sono state usate per esaminare la chimica dell'aglio.

Con la Desorption Electrospray Ionization (DESI) è stato possibile osservare direttamente l'allicina (**3**) e l'allil metil tiosulfinato. La metodologia DESI convenzionale (cioè senza reagente) è stata applicata alle fettine di aglio grezzo. DESI è stato eseguito in modalità sia positiva che negativa spruzzando acqua sulla fettina. Nessun segnale è stato osservato in modalità a ione negativo. Nella modalità a ione positivo, sebbene la sensibilità complessiva fosse bassa, sono stati osservati i segnali dello ione molecolare protonato di allicina (**3**) (m/z 163), quello di allil metil tiosulfinato a m/z 137, quello dell'addotto con NH_4^+ di allil metil tiosulfinato a m/z 154, quello dell'allicina (**3**) a m/z 180 e, significativamente, un segnale per un complesso allicina-cisteina a m/z 284 (= 162+121+1), che si pensa che preceda la formazione di S-allilmercaptocisteina.(3, 198)

La sorgente DART è generalmente utilizzata con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione. Il DART è un metodo di "ionizzazione morbida", che per la maggior parte dei composti fornisce spettri di massa semplici che sono facilmente ottenibili tenendo momentaneamente il campione nel flusso di gas, manualmente o utilizzando un dispositivo di campionamento automatico. La ionizzazione in condizioni di ione positivo (PI-DART) dà specie ioniche formate quando gli analiti collidono con clusters di molecole

di acqua protonate $[(H_2O)_n+H]^+$, producendo uno ione $[M+H]^+$ per gli analiti con elevate affinità protoniche. La capacità di eseguire DART-MS ad alta risoluzione in condizioni di PI senza la necessità di preparazione del campione o solvente presenta opportunità uniche nella chimica dei prodotti naturali, consentendo l'osservazione diretta della rapida, complessa cascata di gusto indotta enzimaticamente che genera l'aroma a seguito del danneggiamento delle cellule vegetali.(199) La PI-DART (PI positive ion) ha mostrato forti segnali per l'allicina (**3**) come suoi addotti con un protone (m/z 163, $[C_6H_{10}S_2O+H]^+$) e con NH_4^+ , una specie dimerica protonata (m/z 325, $[2(C_6H_{10}S_2O)+H]^+$), segnali più deboli per l'allil metil tiosulfinato protonato (abbondanza relativa 5%; m/z 137, $[C_4H_8S_2O+H]^+$) e alcole allilico protonato (m/z 59) e segnali molto deboli per il diallil trisolfuro S-ossido protonato (m/z 195) e il suo addotto NH_4^+ (m/z 212). Tutti i picchi di cui sopra erano caratterizzati da misure di massa ad alta risoluzione. Come previsto, non sono stati osservati segnali per i polisolfuri, dal momento che non sono prodotti primari formati quando l'aglio viene tagliato.(3) L'analisi dei composti volatili dell'aglio in condizioni di NI-DART (NI negative ion) mostra segnali significativi corrispondenti a SO_2 e piruvato, nonché agli anioni dell'acido 2-propenesolfenico, $CH_2=CHCH_2SO$, acido 2-propenesulfinico, $CH_2=CHCH_2SO_2$, e un altro composto di formula $CH_2=CHCH_2SO_3$. In queste stesse condizioni, un campione autentico di allicina (**3**) mostra solo segnali per l'acido 2-propenesulfinico e $CH_2=CHCH_2SO_3$. Il segnale spettrale di massa per il solfenato è di breve durata, e scompare in meno di un secondo. Questa è la prima osservazione diretta della formazione di un acido sulfenico al taglio dell'aglio, nonché la prima osservazione di acido 2-propenesulfinico da aglio. L' SO_2 deriva presumibilmente dalla decomposizione dell'acido 2-propenesulfinico a propene, che viene rilevato in

quantità paria a tracce.(3) Quando l'aglio tagliato di fresco è esaminato in condizioni PI-DART a 24°C, il rapporto tra la somma dei picchi associati con allil metil tiosulfinati a m/z 136 e quella dei picchi associati con l'allicina (**3**) e i tiosulfinati isomerici a m/z 162 è di 5:100. Questo rapporto aumenta a 6,8:100 a 40 °C. I dati a 24 °C si confrontano bene con i dati sui rapporti di metiina, alliina e isoalliina. I livelli relativi leggermente più elevati di metil tiosulfinato osservati con il DART, possono riflettere la maggiore volatilità di questi composti rispetto all'allicina (**3**). L'aumento di questo rapporto con la temperatura è coerente con le aspettative che, mentre la metiina è scissa più lentamente dell'alliina, una maggiore percentuale di metiina reagisce durante il tempo di campionamento a 40°C rispetto a 24°C. Così, il tempo per raggiungere un rendimento massimo del 50% per i metil tiosulfinati isomerici a m/z 136, diminuisce da 0.6 a 0.2 min mentre la temperatura aumenta da 23°C a 37°C, mentre la formazione di allicina (**3**) è quasi istantanea a entrambe le temperature.(3, 167, 168, 200)

La spettrometria di massa a desorbimento assistito da plasma/ionizzazione (PADI) usa un plasma atmosferico non termico ("freddo"), radiofrequenza-guidato che è diretto sulla superficie dell'analita senza estrazione della particella carica e senza riscaldare il campione. Per l'allicina viene visto un segnale molto debole $[M+H]^+$ a m/z 163.(3, 197)

La ionizzazione elettrospray estrattiva (EESI) è stata impiegata nell'analisi di composti solforati nell'aglio fermentato (82). La spettrometria di massa a quadrupolo e tempo di volo con ionizzazione elettrospray estrattiva (EESI-QTOF-MS) è stata impiegata usando una soluzione $AgNO_3$ / acqua per generare un elettrospray per facilitare il rilevamento di composti solforati non polari dell'aglio nel respiro umano, catturati come loro addotti

107Ag/ 109Ag.(201) Nella spettrometria di massa a ionizzazione elettrospray interna (iEESI MS) per l'analisi diretta continua di composti contenuti nei tessuti vegetali, il solvente viene alimentato attraverso il tessuto vegetale per estrarre direttamente gli analiti endogeni, che vengono successivamente ionizzati con l'aiuto di un forte campo elettrico. iEESI MS favorisce l'estrazione di sostanze chimiche "interne", che si trovano all'interno del tessuto vegetale piuttosto che sulla superficie. Gli analiti vengono estratti con una perturbazione minima dell'integrità della pianta, prontamente rilevata in pochi secondi. Inoltre, il profilo molecolare può essere continuamente raccolto sulla scala temporale di decine di minuti, a seconda della velocità del flusso, del tipo di tessuto e del volume del campione.(194, 202) La iEESI MS è stata efficacemente applicata per l'analisi di composti organosolforati (ad es. alliina, allicina (**3**)), amminoacidi (ad es. arginina) e saccaridi (glucosio, polisaccaridi), con l'identificazione direttamente mediante dissociazione indotta da collisione (CID) in modalità di rilevazione dello ione positivo.(203)

1.5.5 Altre tecniche

La spettroscopia a microonde (MW) è una tecnica che è stata usata nello studio della stereochimica, tautomerismo, e strutture di molecole altamente reattive (ad esempio, CH₃S-O-H) non facilmente ottenibili con altri metodi, come ad esempio nello studio dei solfossidi di cipolla. (20, 204, 205)

La spettroscopia di assorbimento dei raggi X è stata applicata nello studio dei composti di aglio (sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy - XAS) come una sonda diretta della

biochimica dello zolfo nelle cellule viventi per generare mappe di diverse forme chimiche dello zolfo. In particolare, i campioni di cellule possono essere scansionati in un fascio microfoco di raggi X ad una serie di diverse energie incidenti, fornendo sensibilità a diverse forme chimiche di zolfo.(25, 167)

Per la determinazione quantitativa degli ACSO sono state sviluppate altre procedure, come l'elettroforesi capillare (CE) o i metodi spettrofotometrici. Horie et al.(206) hanno messo a punto un metodo per la separazione di allina e metiina mediante elettroforesi capillare (CE) senza derivatizzazione. Un altro metodo si basa sull'estrazione con metanolo, la derivatizzazione mediante fluorenilmetilcloroformiato e la successiva separazione mediante cromatografia capillare micellare elettrocinetica. I principali vantaggi del nuovo metodo sono la semplicità, la sensibilità, l'elevata specificità e i costi di esercizio molto bassi, che lo rendono adatto per l'analisi di routine di un gran numero di campioni.(207)

Una procedura spettrofotometrica semplice e rapida per il rilevamento dell'attività allicina (**3**) e allinasi, basata sulla reazione tra 2-nitro-5-tiobenzato (NTB) e allicina (**3**), è stata descritta da Miron et al. (208). NTB reagisce con il legame disolfuro attivo S(O)S dell'allicina (**3**), formando l'allilmercapto-NTB misto disolfuro, come caratterizzato dallo spettro NMR. Il metodo può essere utilizzato per individuare allicina (**3**) e tiosolfati totali nelle preparazioni di aglio e nei prodotti derivati dall'aglio. Può anche essere utilizzato per rilevare l'attività delle allinasi negli estratti di aglio grezzi. Tuttavia, questo metodo presenta lo svantaggio che il reagente NTB non è disponibile in commercio e deve essere sintetizzato. Questa è stata la ragione che ha spinto Miron et al. a pubblicare un ulteriore

documento (209) che descrive l'analisi quantitativa di alliina, allicina (**3**), e l'attività alliinasi con l'uso di 4-mercaptopiridina (4-MP), un tiolo cromogenico disponibile in commercio. Il saggio è stato basato sulla reazione di 4 MP ($\lambda_{\max} = 324 \text{ nm}$) con il legame disolfuro attivato di tiosulfinati S(O)S, che forma il disolfuro misto, 4-allil-mercaptopiridina, che non ha assorbanza in questa regione. La struttura della 4-allil-mercaptopiridina è stata confermata dalla spettrometria di massa. Il metodo è stato utilizzato per il rilevamento della concentrazione di alliina e allicina (**3**) nella loro forma pura e per la determinazione delle concentrazioni di alliina e tiosulfinati totali nelle preparazioni di aglio grezzo e nei prodotti derivati dall'aglio in concentrazione mM. Il saggio di 4-MP ha dimostrato di essere metodo facile, sensibile, veloce, non costoso e altamente efficiente per il rilevamento di allicina (**3**), alliina e alliinasi nelle preparazioni di aglio. Olech et al. (210) hanno proposto un metodo spettrofotometrico per la determinazione della concentrazione di tiosolfato negli estratti e negli integratori di aglio. Si basa sulle reazioni tra i tiolati e composti cromogenici selezionati: 2-mercaptopiridina (2-MP), 4-mercaptopiridina (4-MP), 1-ossido-2-mercaptopiridina (MPO), 2-mercaptopirimidina (MPM) e acido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB).

Il contenuto totale in polifenoli viene calcolato mediante una tecnica che prevede l'utilizzo del reagente Folin-Ciocalteu.(71, 103, 211-213)Analisi dei polifenoli vengono anche impiegate per confronti tra campioni di aglio di diversa origine geografica e diverso trattamento post-raccolta.(163)

1.5.6 Attuali tendenze nella ricerca

La più recente tendenza è verso l'applicazione di metodologie "ecocompatibili", rapide e poco costose. Ciò è dimostrato, per esempio, durante le fasi di preparazione del campione, dove il metodo corrente di scelta sono le tecniche miniaturizzate di microestrazione.

La spettrometria di massa (MS) è, probabilmente, lo strumento spettroscopico analitico più importante, specialmente se accoppiato a GC e LC. La spettrometria MS permette di ottenere le abbondanti informazioni relative all'identificazione di nuovi composti, caratterizzazione varietale e di specie e studi della metabolomica. Di recente è stata prestata molta attenzione alle scienze "omiche". Nella ricerca su *Allium* sono state usate le tecnologie omiche quali genomica, transcriptomica, micro RNAs, proteomica, metabolomica e metagenomica. Questi approcci omici sono stati utilizzati per la scoperta di marcatori, lo studio della risposta allo stress biotico e abiotico, la sterilità maschile, lo sviluppo di organi, lo studio dei flavonoidi e del colore del bulbo, la scoperta di micro RNA e microbioma associato alle colture di *Allium*.(214) Nell'ambito dell'analisi alimentare, sono stati utilizzati approcci metabolomici per studiare la qualità, la sicurezza e la lavorazione dei prodotti grezzi e trasformati, nonché per effettuare caratterizzazioni e distinzioni tra specie vegetali e cultivar (215)

Un'ampia gamma di tecniche, come la cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC/MS), la gascromatografia/MS (GC/MS), la risonanza magnetica nucleare (NMR), spettroscopia di massa con risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier (FTICR)-MS, la spettroscopia di massa a LC-tandem quadrupolo (Qqq)-MS, la spettroscopia di massa LC-Quadrupole a tempo di volo (QTOF)-MS/MS, UHPLC/ESI-QTOF-MS,(65)

cromatografia liquida a prestazione ultra elevata-spettrometria ad alta risoluzione (UHPLC-HMRS) sono state utilizzate per esplorare, determinare e caratterizzare il profilo metabolico delle specie di *Allium*. (189, 214, 216-222) L'approccio metabolomico in *Allium* è focalizzato verso l'esplorazione delle differenze in metaboliti, la caratterizzazione dell'attività enzimatica, e la rilevazione e l'assegnazione chimica dei metaboliti in diversi genotipi e cultivar.(189, 217, 223, 224) Tra le specie di *Allium*, il profilo metabolico è stato finora eseguito nei bulbi di cipolla, considerando le cultivar e gli anni di coltivazione;(216) modifica degli organosolfuri dopo trattamento termico nella cipolla;(82) differenziazione dei profili di aglio nero e fresco;(189) profiling dei costituenti volatili della cipolla e dell'aglio dopo essere stati sottoposti a diversi metodi di essiccazione;(166) autenticazione dell'origine geografica dell'aglio.(221) Sono state eseguite analisi non mirate per discriminare diverse specie, tra cui porri (220) cipolla (218) e specie di *Allium* selvatiche.(225) E' stato studiato anche il metaboloma dell'aglio, (226, 227) ma sono stati riportati solo aminoacidi, zuccheri, acidi organici e flavonoli. Un approccio untargeted mediante con spettrometria di massa con analizzatore a risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier e ionizzazione per elettrospray ad alta risoluzione (ESI FT-ICR) è stato usato per l'identificazione di metaboliti primari e secondari, compresi amminoacidi, alcaloidi, acidi organici e grassi, nucleotidi, vitamine, composti organosolforati e flavonoidi.(228) HRMAS-NMR (High Resolution Magic Angle Spinning-Nuclear Magnetic Resonance) si applica direttamente su campioni semisolidi e gel eterogenei ed è stato utilizzato per analizzare l'aglio appartenente a diverse varietà di diverse regioni geografiche italiane, al fine di affrontare il problema della tracciabilità.(229, 230)

Gli spettri 1D e 2D NMR, eseguiti direttamente su piccoli pezzi di aglio non trattati, quindi senza alcuna manipolazione del campione, hanno permesso l'assegnazione di diversi composti: acidi organici, zuccheri, acidi grassi, amminoacidi e fructo-oligosaccaridi e allil-composti organosolforati.(227)

La spettroscopia ^1H NMR è utile nell'analisi metabolomica dei costituenti di aglio per determinazioni di origine geografica.(218, 229) Un approccio metabolomico, unitamente all'analisi dei dati mediante reti neurali artificiali, è stato utilizzato per la valutazione sensoriale dell'aglio e prodotti di aglio utilizzando 89 indicatori di qualità).(231)

La spettroscopia ^1H NMR è stata utilizzata anche per analizzare il cambiamento di composizione dell'aglio invecchiato dopo esser stato sottoposto a processo termico. In particolare 11 L-aminoacidi hanno avuto un incremento iniziale (primi 5 giorni) e l'analisi multivariata ha rilevato cambiamenti anche nel contenuto di fruttosio, glucosio, acido acetico, acido formico, acido piroglutamico, cicloalliina (**11**). (232)

Una tecnica spettroscopica comunemente usata, anch'essa per l'analisi metabolomica, è la spettroscopia di risonanza magnetica localizzata (MRS), essenzialmente un metodo spettroscopico basato sulla risonanza magnetica nucleare (NMR) *in vivo* ed applicata in imaging a risonanza magnetica (MRI). Tuttavia, MRS presenta una limitazione ovvero la mancanza di alta risoluzione spettrale per dedurre un profilo metabolico completo; per questo motivo la MRS è raramente applicata nella ricerca alimentare. Al contrario il progresso dell'imaging in spettrometria di massa (MSI) è ora diventato un prezioso strumento di profilometria nella scienza alimentare che consente di localizzare molecole con pesi molecolari specifici. La rotazione ad angolo magico ad alta risoluzione (HR-

MAS) ha dimostrato di essere un utile strumento analitico per un'ampia gamma di morfologie di campioni inclusi i tessuti alimentari. La risoluzione spettrale elevata di HR-MAS consente di fornire un esauriente profilo metabolico localizzato in un campione di grandi dimensioni effettuando un campionamento sistematico regione per regione di quel campione. Tuttavia, in alcuni casi, il grande volume di campionamento (in mm^3) da HR-MAS potrebbe non essere sufficiente per una analisi accurata in piccola scala; infatti, un piccolo volume (in μm^3) faciliterà l'ottenimento del campione ma comprometterà la sensibilità NMR. Per superare questo problema è stata introdotta recentemente una tecnologia basata su una sonda micrometrica MAS capace di alta risoluzione (indicata come HR- μ MAS Highresolution micro-sized MAS) mirata ad applicazioni metaboliche di campionamento su scala di μg che è stata utilizzata per mappare la distribuzione dei diversi profili metabolici di tessuto di uno spicchio d'aglio in base alla granulometria selezionando in particolare alcune regioni istologiche come lo strato superficiale di protezione e gli strati interni come il "core" ovvero il nucleo per la germinazione. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti analizzando le stesse parti istologiche attraverso HRMAS-NMR ed è stata evidenziata una significativa presenza di fruttosio negli strati superficiali del bulbo mentre il saccarosio e il glucosio sono stati riscontrati principalmente nelle parti interiori (core) così come l'allicina (3).(233)

1.6 Determinazione dell'origine geografica dei campioni

Uno di metodi più comuni per stabilire l'origine geografica dell'aglio consiste nella determinazione del profilo dei metalli in traccia seguita dal confronto con una banca dati consolidata di profili di metalli in traccia del prodotto provenienti da vari paesi.(234) La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS), per l'analisi di 18 elementi, permette l'identificazione del paese di origine dei bulbi di aglio con elevata precisione.(235) Il profilo di metalli in traccia può anche essere analizzato mediante spettrometria ad emissione ottica a plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES); in particolare questa tecnica è stata utilizzata per analizzare 9 elementi (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, e Zn) al fine di trovare differenze tra campioni provenienti dalla Corea del Sud e dalla Cina. I risultati hanno evidenziato come il potassio sia l'elemento principalmente presente in entrambi i campioni (leggermente maggiore nei campioni di aglio sud-coreano), seguito da fosforo, calcio e magnesio.(234)

	South Korea		China	
	Aver. \pm S.D.	Min. – Max.	Aver. \pm S.D.	Min. – Max.
Ca	349.94 \pm 146.32	158.15–773.99	411.91 \pm 108.58	168.90–572.95
Cu	3.69 \pm 2.20	0.57–17.02	4.58 \pm 1.87	1.45–13.18
Fe	30.71 \pm 9.64	18.28–58.27	26.37 \pm 6.71	10.47–46.24
K	16047.61 \pm 4325.06	10223.52–25021.66	13054.78 \pm 3268.80	7495.83–17962.51
Mg	737.20 \pm 167.62	502.29–1128.47	764.16 \pm 201.00	416.19–1056.78
Mn	8.70 \pm 2.84	3.53–20.10	9.13 \pm 1.39	5.04–11.36
Na	123.38 \pm 59.12	41.26–308.81	422.75 \pm 269.61	34.61–1045.56
P	4906.33 \pm 1319.29	2901.03–9129.31	3902.31 \pm 653.29	2571.68–5440.07
Zn	27.91 \pm 12.58	10.20–68.79	19.93 \pm 6.30	8.95–43.27

Aver., average; S.D., standard deviation; Min., minimum; Max., Maximum.

Figura 17 Contenuto di elementi in campioni di aglio provenienti dalla Corea del sud e dalla Cina (236)

La stessa tecnica (ICP-OES) è stata utilizzata per confrontare campioni della varietà “aglio rosso” proveniente da 4 paesi italiani: Sulmona (SU), Castelliri (CL), Nubia (NU) e Proceno (PR). L’analisi della varianza (ANOVA) mostra che gli elementi analizzati, ad eccezione di Cu e Mg, abbiano valori medi significativamente diversi all’interno delle quattro aree. Il successivo confronto tramite LSD test (Least Significant Difference) rivela che il contenuto di alcuni elementi nei campioni di aglio coltivati in una determinata area come, ad esempio, il Ba presente nei campioni di Castelliri (CL), il Mn nei campioni di Proceno (PR) e il Ca nei campioni di Nubia (NU) siano significativamente diversi e di conseguenza possano essere considerati elementi descrittivi per la discriminazione geografica dei campioni di aglio.(237)

Lo studio delle proprietà chimico-fisiche è importante al fine di analizzare l’origine geografica di un campione di aglio. Uno dei parametri calcolati è, ad esempio, l’umidità. In uno studio di confronto tra aglio Sud-Coreano e Cinese, è risultata più elevata nell’aglio cinese ($66.76 \pm 2.28\%$) rispetto al Sud-Coreano ($63.43 \pm 2.85\%$) ed è stata calcolata determinando la differenza di peso tra il campione prima e dopo il processo di

essiccamento. È stato analizzato anche il pH risultato minore nell'aglio coreano (6.39 ± 0.21) rispetto all'aglio cinese (6.79 ± 0.37). (236)

Un metodo meno comune utilizzato per la determinazione dell'origine geografica dell'aglio è l'analisi della composizione isotopica mediante spettrometro di massa per rapporti isotopici (IRMS), in particolare $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, e $\delta^{15}\text{N}$, poiché essa risulta essere fortemente dipendente dall'origine geografica. Attraverso questo metodo sono stati studiati campioni provenienti dalla Corea del Sud, dal Vietnam, dalla Cina, da Taiwan e dall'Argentina. (235) È stato osservato che $\delta^{13}\text{C}$ è in concentrazioni molto simili in tutti i paesi e di conseguenza non può essere utilizzato come discriminante mentre la concentrazione di $\delta^{15}\text{N}$ risulta essere leggermente maggiore nei campioni provenienti dall'Argentina rispetto ai campioni di aglio asiatico. È quindi difficile discriminare il paese di origine dell'aglio confrontando i valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ non solo per la sovrapposizione di composizioni isotopiche tra i paesi studiati ma anche perché il valore risultante può essere influenzato dal metodo di fertilizzazione (ad esempio l'utilizzo di un fertilizzante chimico organico). Tuttavia, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$ possono essere utilizzati per differenziare le colture; ciò è probabilmente dovuto a differenze significative riguardanti i valori dell'acqua presente nelle diverse aree di coltivazione compresa l'acqua proveniente dalle precipitazioni atmosferiche e quella presente nel terreno.(235) Così come le caratteristiche chimico -fisiche, anche la composizione qualitativa e quantitativa dell'aglio varia a seconda dell'area geografica di provenienza. È stato effettuato un confronto tra nove coltivazioni di aglio provenienti da differenti aree geografiche: Polonia (varietà: Harnas), Spagna (varietà: Castano, Morado e Violetta), Cina, Portogallo, Birmania, Thailandia, e Uzbekistan. Il contenuto proteico è risultato estremamente

variabile; in particolare nelle varietà cinesi è maggiore rispetto alla varietà “Violetta” spagnola e vi sono notevoli differenze anche all’interno dello stesso paese: la varietà “Castano” ha un contenuto proteico maggiore rispetto alla varietà “Violetta” entrambe di origine spagnola. Il contenuto di polifenoli, calcolato mediante il reagente Folin-Ciocalteu risulta essere simile tra i diversi paesi.(238) Ulteriori confronti sono stati effettuati per valutare le differenze tra varietà di aglio all’interno di una determinata regione geografica. Ad esempio, sono state valutate le proprietà nutrizionali dell’aglio bianco e dell’aglio viola del Pakistan, analizzati mediante HPLC, evidenziando un maggior contenuto di proteine, grassi e fibre nell’aglio viola. (239) In India sono stati analizzati diversi genotipi di aglio di cui 6 varietà locali provenienti da 26 aree di coltivazione per studiare come le diverse coordinate geografiche possano influenzare la composizione chimica, in particolare il contenuto totale in polifenoli calcolato mediante il reagente Folin-Ciocalteu, e le conseguenti proprietà antiossidanti. (240)

Il contenuto di composti organosolforici è stato valutato mediante combustione a secco in presenza di ossigeno che consente la conversione da solfuri a solfossidi, per osservare possibili differenze che intercorrono tra diverse varietà d’aglio (Mojmír, Záhorský, Anton, Makoi) provenienti da un’unica regione della Slovacchia, Nitra. I risultati hanno evidenziato un maggior contenuto di composti organosolforici nella varietà Mojmír (0.751%) e il minor contenuto nella varietà Makoi (0.523%).(241) L'aglio coltivato in climi più freddi contiene molto meno *S*-propil-L-cisteina solfossido (propilina, **6**) rispetto all’aglio coltivato in climi più temperati, anche se i livelli di composti precursori, come γ -glutamyl-*S*-metil-L-cisteina (**161**), sono normali (20) ed ha un rapporto allicina/tiosolfato più elevato rispetto all'aglio coltivato in climi più caldi.(91).

MATERIALI E METODI

2.1 Metanalisi bibliografica

2.1.1 Pubblicazioni aventi come argomento la cromatografia liquida e spettrometria di massa

È stata eseguita una accurata ricerca bibliografica online sui principali motori di ricerca (Scopus, Pubmed, Scifinder) su pubblicazioni riguardanti analisi in cromatografia liquida e spettrometria di massa di campioni di aglio. Sono state consultate 84 pubblicazioni relative al periodo dal 1987 al 2020 e relative a campioni di aglio provenienti da aree geografiche localizzate in 4 continenti (Europa, Asia, Africa, America).

Tenendo conto del fatto che alcune pubblicazioni riportano analisi eseguite con più modalità (ad esempio, colonne diverse, differente eluizione, ecc.), sono stati presi in esame, per ogni pubblicazione, i seguenti descrittori della procedura analitica utilizzata:

- 1) tipo di pretrattamento del campione;
- 2) procedura estrattiva;
- 3) solvente di estrazione;
- 4) numero di estrazioni;
- 5) fase stazionaria della colonna (diretta o inversa);
- 6) gruppo legato;
- 7) diametro della colonna;
- 8) lunghezza della colonna;
- 9) granulometria della colonna;

- 10) flusso;
- 11) fase mobile;
- 12) eluizione (gradiente o isocratica);
- 13) rivelatore;
- 14) analizzatore MS.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software Systat 13. L'Analisi delle Corrispondenze (242) è stata utilizzata per poter visualizzare in semplici grafici bidimensionali le relazioni tra variabili qualitative, ad esempio tra procedura estrattiva e solvente usato per l'estrazione, oppure nel caso in cui si sia reso necessario trasformare variabili quantitative in variabili qualitative: ad esempio, per avere categorie di numerosità paragonabile tra loro e sufficiente ad uno studio statistico, la variabile quantitativa "anno di pubblicazione" è stata convertita nella variabile qualitativa "decade di pubblicazione" a 3 livelli (fino al 2000, dal 2001 al 2010, dal 2011 al 2020).

2.1.2 Pubblicazioni aventi come argomento la gascromatografia e spettrometria di massa

È stata eseguita una ricerca bibliografica on line sui principali motori di ricerca (Scopus, Pubmed, Scifinder) su pubblicazioni riguardanti analisi in gascromatografia e spettrometria di massa di campioni di aglio. Sono state consultate 47 pubblicazioni tra il 1980 e il 2020.

Sono stati presi in esame, per ogni pubblicazione, i seguenti descrittori della procedura analitica utilizzata:

- 1) tipo di pretrattamento del campione;
- 2) procedura estrattiva;
- 3) solvente di estrazione;
- 4) libreria/software;
- 5) flusso;
- 6) diametro della colonna;
- 7) lunghezza della colonna;
- 8) granulometria della colonna;
- 9) rivelatore;
- 10) analizzatore MS.

L'analisi statistica è stata eseguita come descritto nel paragrafo 2.1.1.

2.2 Analisi GC/MS dei campioni di “Aaglio di Vessalico”

I campioni di aglio (Fig. 18) raccolti nel giugno 2020 sono stati analizzati mediante analisi gascromatografica in spettrometria di massa. Le analisi sono state condotte in triplicato. La tecnica estrattiva utilizzata è la SPME con fibra di tipo PDMS (Polydimetilsiloxane). 2 g di aglio fresco sono stati pesati in vial ambrata con tappo dotato di setto e addizionati con 8 mL di soluzione satura di NaCl. I campioni così preparati sono stati posti su piastra riscaldante a temperatura controllata (80°C) per 15 minuti. Successivamente la fibra riscaldata è stata esposta al gas di trasporto per 15 minuti nello spazio di testa per ottenere il desorbimento degli analiti. L'iniezione è stata fatta in GC/MS con colonna Thermo

Scientific™ Trace GOLD TG-5SiIMS. I composti vengono riconosciuti in base allo spettro di massa per confronto con librerie NIST. Esse facilitano il riconoscimento di composti o miscele incognite tramite confronto, possono essere generiche o specifiche per una classe di sostanze. La quantificazione relativa % viene fatta considerando l'area del picco identificato a fronte del totale delle aree dei picchi rilevati.

2.3 Analisi LC/MS dei campioni di “Aglione di Vessalico”

I campioni di aglio (Fig. 18) raccolti nel giugno del 2020 sono stati analizzati mediante cromatografia liquida e spettrometria di massa per determinarne il profilo dei composti organosolfurici (Fig. 19). I bulbi di aglio precedentemente liofilizzati, sono stati tritati meccanicamente mediante un frullatore elettrico e sono stati aggiunti ad una soluzione di 300 ml di solvente (50% metanolo, 50% etanolo e acqua distillata). La miscela è stata sonicata per 5 minuti in bagnetto ad ultrasuoni e successivamente posta in agitazione per 6 ore. La miscela è stata successivamente filtrata e portata a secco mediante evaporatore rotante.

Campioni	Provenienza	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Quantità utilizzata per estrazione (g)	Residuo secco (g)
VM_1= A 24	Vessalico, azienda XXX	123.6	100.9	86.3	15.2
VM_2 = A 6	Vessalico, azienda XXX	126.6	117.7	103.4	42.7
VM_3 = A 19	Vessalico, azienda XXX	338.6	319.6	112.9	22.3
VG_1 = A 14	Vessalico, azienda YYY	119.8	113.0	61.9	9.2
VG_2 = A1	Vessalico, azienda YYY	132.6	110.6	72.6	18.0
VG_3 = A 23	Vessalico, azienda YYY	134.6	123.6	80.8	11.0
V_1 = A 13	Vessalico	236.0	191.0	36.0	28.8
M1_1 = A 4	Vessalico, Messidor, azienda XXX	1490.6	1316.2	125.4	16.7
M1_2 = A 21	Vessalico, Messidor, azienda ZZZ	1553.7	1285.4	159.9	51.0
M1_3 = A 25	Francia, Messidor	736.1	528.0	74.9	12.7
M2_1 = A 11	Francia, Messidor	270.2	233.0	107.3	17.3
M2_2 = A 18	Francia, Messidor	244.1	223.7	125.5	22.0
M2_3 = A 12	Francia, Messidor	251.4	218.2	113.0	26.63
M3_1 = A 5	Francia, Messidrome	415.4	399.4	130.5	18.0
A 26	Francia, Messidrome	404.7	376.6	118.3	9.4
M3_2 = A 7	Francia, Messidrome	446.4	429.9	126.3	37.0
A 27	Francia, Messidrome	436.5	411.9	113.4	24.0
M3_3 = A 17	Francia, Messidrome	375.2	361.6	123.0	70.0
A 28	Francia, Messidrome	369.0	354.8	112.0	58.0
M4_1 = A 9	Vessalico, Messidrome, azienda XXX	1588.2	1397.6	178.7	28.5
M4_2 = A 22	Vessalico, Messidrome, azienda ZZZ	1581.7	1329.1	94.6	20.2
C_1 = A 20	Caraglio	654.4	629.0	73.9	11.0
A 3	Caraglio	589.0	543.9	50.6	7.0
C_2 = A 8	Caraglio	680.0	658.6	75.6	27.0
A 15	Caraglio	600.1	587.9	60.4	22.0
C_3 = A 16	Caraglio	617.0	594.6	75.8	8.0
A 2	Caraglio	585.7	567.1	55.3	3.0

Figura 18 – Elenco campioni utilizzati per le analisi

SAC	S-allyl-cysteine
Alliin	S-allyl-cysteine sulfoxide
GSMC	γ -glutamyl-S-methyl-cysteine
Methiin	S-methyl-cysteine sulfoxide
Fru-SAC	Fructosyl-S-allyl-cysteine
Fru-GSAC	Fructosyl- γ -glutamyl-S-allyl-cysteine
Fru-GSPC	Fructosyl- γ -glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-cysteine
GSAC	γ -glutamyl-S-allyl-cysteine
GSPC	γ -glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-cysteine
GGSMC	γ -glutamyl- γ -glutamyl-S-methyl-cysteine
GGSAC	γ -glutamyl- γ -glutamyl-S-allyl-cysteine
GGSPC	γ -glutamyl- γ -glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-cysteine
GSAMC	γ -glutamyl-S-allyl-mercapto-cysteine
SAG	S-allyl-glutathione
SAMC	S-allyl-mercapto-cysteine
SAMG	S-allyl-mercapto-glutathione
GPA	γ -glutamyl-phenylalanine
SMC	S-methyl-cysteine
FRU-SAC ISOMER	Fructosyl-S-allyl-cysteine- isomer

Figura 19. Elenco analiti considerati nelle analisi LC/MS

L'analisi cromatografica è stata effettuata mediante lo strumento Nexera X2 UPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) accoppiato con uno spettrometro di massa ABSciex API6500 Q-Trap. È stata utilizzata la colonna Luna Omega C18 (100x2.1-1.6 μ m): fase mobile A: acido formico 0.1 % in acqua; fase mobile B: metanolo. Gradiente: dal 3% al 8% di B in 5min, dal 8% al 27% di B in 12 min.

I parametri utilizzati nello spettrometro di massa sono riportati nella tabella sottostante (Fig.20).

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (min)	ID	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
162.000	145.000	2.42	SAC_1	50.000	11.000	14.000
162.000	73.000	2.42	SAC_2	50.000	18.000	14.000
265.000	136.000	2.38	GSMC_1	50.000	20.000	10.000
265.000	119.000	2.38	GSMC_2	50.000	20.000	16.000
265.000	130.000	2.38	GSMC_3	50.000	20.000	10.000
291.000	162.000	7.65	GSAC_1	50.000	20.000	10.000
291.000	145.000	7.65	GSAC_2	50.000	20.000	10.000
291.000	73.000	7.65	GSAC_3	80.000	40.000	6.000
291.000	84.000	7.65	GSAC_4	50.000	20.000	6.000
152.000	88.000	0.98	Methiin_1	50.000	20.000	10.000
324.000	145.000	3.66	Anal_S_1	50.000	20.000	12.000
324.000	73.000	3.66	Anal_S_2	50.000	20.000	12.000
453.000	208.000	9.00	Anal_E_1	80.000	40.000	12.000
453.000	145.000	9.00	Anal_E_2	80.000	40.000	12.000
453.000	256.000	9.00	Anal_E_3	80.000	40.000	12.000
394.000	162.000	6.20	GGSMC_1	50.000	20.000	12.000
394.000	144.000	6.20	GGSMC_2	80.000	40.000	12.000
394.000	230.000	6.20	GGSMC_3	50.000	20.000	12.000
420.000	145.000	10.70	GGSAC_GGS1P	80.000	40.000	12.000
420.000	162.000	10.70	GGSAC_GGS1P	50.000	20.000	12.000
323.000	73.000	14.50	gGlutamyL_SallyL	50.000	20.000	12.000
323.000	194.000	14.50	gGlutamyL_SallyL	50.000	20.000	12.000
323.000	152.000	14.50	gGlutamyL_SallyL	50.000	20.000	12.000
348.000	202.000	7.50	Sallyglutathione_	50.000	20.000	12.000
348.000	219.000	7.50	Sallyglutathione_	50.000	20.000	12.000
194.000	105.000	5.98	S_AlyL_Mercapto	50.000	20.000	12.000
194.000	120.000	5.98	S_AlyL_Mercapto	50.000	20.000	12.000
194.000	73.000	5.98	S_AlyL_Mercapto	50.000	20.000	12.000
380.000	177.000	13.70	SAMG_1	50.000	20.000	12.000
380.000	130.000	13.70	SAMG_2	50.000	20.000	12.000
380.000	148.000	13.70	SAMG_3	50.000	20.000	12.000
295.000	195.000	11.60	GPA_1	80.000	40.000	12.000
295.000	166.000	11.60	GPA_2	50.000	20.000	12.000
295.000	120.000	11.60	GPA_3	50.000	20.000	12.000
136.000	119.000	2.26	SMC_1	50.000	20.000	10.000
136.000	91.000	2.26	SMC_2	50.000	20.000	12.000
178.000	88.000	1.29	Alliin_1	50.000	20.000	12.000
178.000	161.000	1.29	Alliin_2	50.000	20.000	12.000
162.100	145.000	3.26	SAC_1	50.000	11.000	14.000
162.100	73.000	3.26	SAC_2	50.000	18.000	14.000
291.100	162.000	9.70	GSAC_1	50.000	20.000	10.000
291.100	145.000	9.70	GSAC_2	50.000	20.000	10.000
291.100	73.000	9.70	GSAC_3	80.000	40.000	6.000
291.100	84.000	9.70	GSAC_4	50.000	20.000	6.000
420.100	145.000	12.80	GGSAC_GGS1P	80.000	40.000	12.000
420.100	162.000	12.80	GGSAC_GGS1P	50.000	20.000	12.000
453.100	208.000	11.00	Anal_E_1	80.000	40.000	12.000
453.100	145.000	11.00	Anal_E_2	80.000	40.000	12.000
453.100	256.000	11.00	Anal_E_3	80.000	40.000	12.000
324.100	145.000	5.05	Anal_S_1	50.000	20.000	12.000
324.100	73.000	5.05	Anal_S_2	50.000	20.000	12.000

Figura 20. Parametri della spettrometria di massa.

RISULTATI E CONCLUSIONI

3.1 Risultati della metanalisi bibliografica

3.1.1 Risultati della metanalisi bibliografica avente come argomento la GC/MS

Il numero di studi pubblicati in letteratura riguardanti l'analisi di campioni di aglio mediante GC/MS è aumentato negli ultimi decenni; quasi la metà dei lavori riportati in letteratura si collocano negli ultimi 10 anni (Fig. 21).

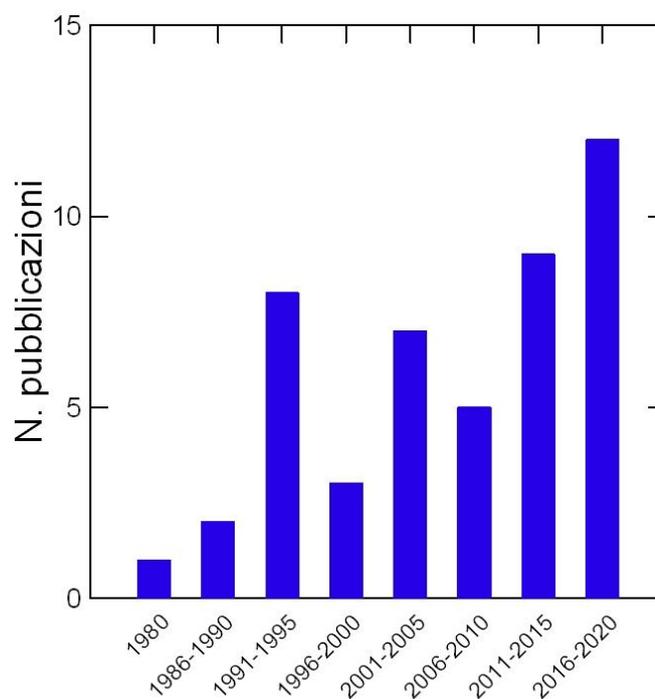


Figura 21– Numero di pubblicazioni inerenti analisi di campioni di aglio mediante GC/MS dal 1980 al 2020.

I campioni di aglio oggetto delle pubblicazioni esaminate sono in massima parte (oltre il 50%) provenienti dall'Asia, seguita da Europa (27% dei lavori). Il rimanente 20% delle pubblicazioni riguarda campioni provenienti da America e Africa (Fig. 22).

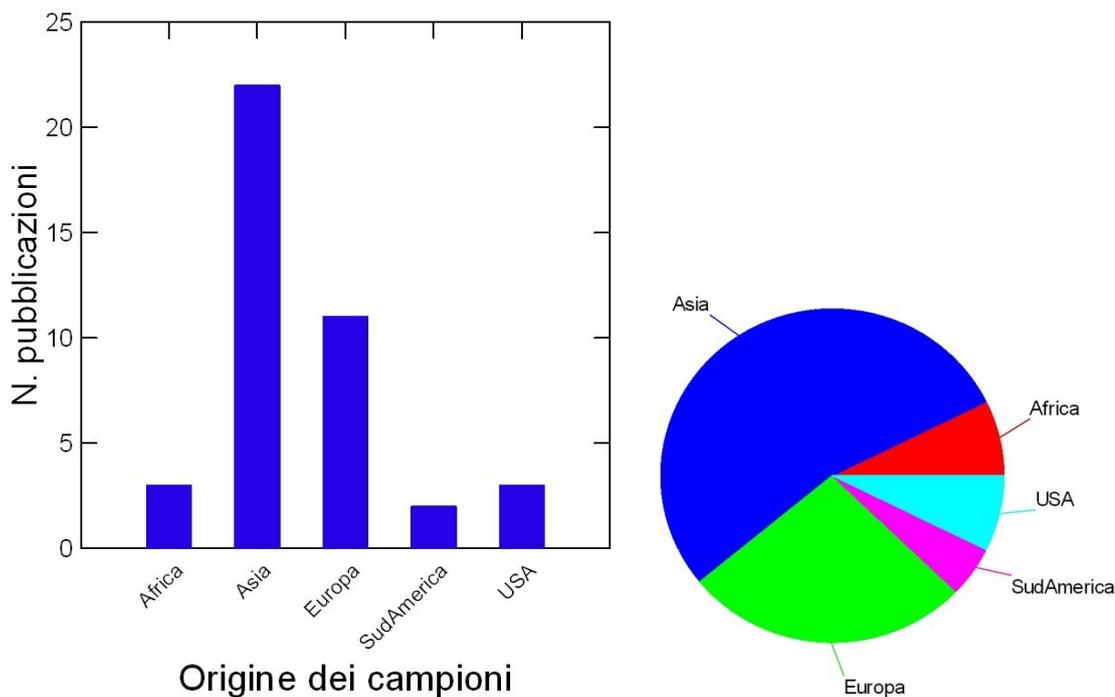


Figura 22. Origine geografica dei campioni di aglio oggetto delle pubblicazioni in esame.

Per quanto riguarda le fasi che precedono l'analisi GC/MS, nel 75% dei casi sono stati analizzati campioni liofilizzati; nei rimanenti studi sono stati analizzati campioni freschi. Il tipo di pretrattamento del campione è significativamente correlato con l'anno delle pubblicazioni: la liofilizzazione compare nei lavori pubblicati a partire dal 2012.

La procedura estrattiva comprendente uso di solventi e omogenizzazione / agitazione / centrifugazione è la più frequentemente adottata; anche la macerazione è usata. La procedura adottata meno frequentemente è AGE.

Per quanto riguarda i solventi di estrazione, si usano soprattutto acqua e solventi lipofili; l'impiego di alcol o miscele di alcol e acqua o miscele solventi lipofili/alcol è presente in pochissimi lavori.

Le librerie di riferimento sono in maggioranza NIST e NIST e Wiley.

Le colonne più utilizzate hanno diametro 0.25 cm, lunghezza 30 cm e granulometria 0.25 µm.

Il flusso varia da 0.1 a 1.9 ml/min nella maggior parte dei casi. Valori di flusso 30-40 ml/min sono presenti solo in 3 pubblicazioni. (243-245)

Il rivelatore è sempre FID, tranne in un'unica pubblicazione (101) dove è usato AED (Atomic Emission Detector).

Sono usati sia l'analizzatore quadrupolo (nelle pubblicazioni più recenti) sia Ion Trap; ToF è impiegato in un'unica pubblicazione (187).

I composti riscontrati attraverso GC/MS sono di seguito riportati:

○ **Componenti volatili riscontrati nell'aglio fresco:**

- Derivati organosolfurici: 3,5-dimetil-1,2,4-tritriolano (**15**); diallildisolfuro (**16**); dialliltrisolfuro (**17**); diallilsolfuro (**18**); dialliltetrasolfuro (**19**); allilmetilsolfuro (**20**); allilmetildisolfuro (**21**); allilmetiltrisolfuro (**22**); dimetilsolfuro (**23**); dimetildisolfuro (**24**); dimetiltrisolfuro (**25**); dimetiltetrasolfuro (**26**); allilpropilsolfuro (**27**); allilpropildisolfuro (**28**);

allil-1-propenil-disolfuro (30); allil-1-propenil-trisolfuro (31); metil-1-propenil-trisolfuro (33); metilpropiltrisolfuro (34); metilpropildisolfuro (35); metil-1-propenil-disolfuro (38); dipropildisolfuro (39); dipropiltrisolfuro (40); 3-vinil-4*H*-1,2-ditiino (50); 2-vinil-4*H*-1,3-ditiino (51); 2-propene-tiolo (59); 1,3-ditiano (173); 4-metil-1,2,3-tritiolano (225); 2-vinil-1,3-ditiano (238); 2-viniltiofene (272); 3-metiltiopropionale (273); 2-etil-1,3-ditiano (288); 3*H*-1,2-ditiolo(315); alliltiopropionale (316); allilpropiltrisolfuro (317); metiltiirano (318); 2-metiltiofene (319); 2-metiltiazolo (321); 2,5-ditia-esano (322); 1,4.ditiacicloept-5-ene (324); 3,6-dimetil1,4-ditiano (325).

- *Altri derivati*: 4-eptenale (184); 2-propen-1-olo (198); alcol allilico (206); 1,3-diidrossiacetone dimero (208); acetaldeide (210); acetamide (211); acido acetico (212); dodecilacrilato (213); acido propanoico (214); 2-metossiimino-imidazolidine (215); eptadecano (217); acido esadecanoico (218); 3-furan-carbossaldeide (219); acido 9,12-ottadecadienoico (220); propene (232); 2,5-dimetiltiofene (258); 2-vinilciclopropanale (314); 2-etil-piridina (336); 2-pentilfurano (337); metiletilpiridina (338); fenilacetaldeide (339).
- *Derivati pirazinici*: metilpirazina (327); 2,5-dimeilpirazina (328); 2-etil-6-metilpirazina (329); 2-etil-5-metilpirazina (330); trimetilpirazina (331); 2-etil-3-metilpirazina (332); metilpropilpirazina (333); 3,5-dietil-2-metilpirazina (334); metilallilpirazina (335).

- **Componenti volatili riscontrati nell'aglio invecchiato mediante microestrazione in fase solida accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (SPME-GC/MS)**
 - *Derivati organosolforici*: diallildisolfuro (16); dialliltrisolfuro (17); diallilsolfuro (18); allilmetildisolfuro (21); allilmetiltrisolfuro (22); dimetildisolfuro (24); dimetiltrisolfuro (25); allilpropildisolfuro (28); 2-vinil-4H-1,3-ditiino (51); 3-vinil-1,2-ditiacicloes-4-ene (174); 3,4-dimetiltiofene (223); allilpropiltrisolfuro (226); 1-(2-furanil)-1-propanone (257); metiltirano (318); 3-metiltio-propionaldeide (323).
 - *Altri derivati*: diidro-4-idrossi-2-3H-furanone (201); 5-epitldiidro-2-3H-furanone (203); acido acetico (212); 2-furanil-metanolo (216); 2-5H-furanone (224); 2-propionil-furano (234); 1-idrossi-2-butanone (326).
- **Componenti volatili riscontrati nell'aglio invecchiato:**
 - *Derivati organosolforici*: diallildisolfuro (16); dialliltrisolfuro (17); diallilsolfuro (18); allilmetildisolfuro (21); allilmetiltrisolfuro (22); dimetildisolfuro (24); dimetiltrisolfuro (25); allilpropildisolfuro (28); 2-vinil-4H-1,3-ditiino (51); 3-vinil-1,2-ditiacicloes-4-ene (174); 3,4-dimetiltiofene (223); dimetilsolfossido (255); 3-metiltio-propionaldeide (323); 2-metil-1,3-ditiano (320).
 - *Altri derivati*: 2,3-diidro-3,5-diidrossi-6-metil-4H-piran-4-one (142); furfurale (191); diidro-4-idrossi-2-3H-furanone (201); 4-metossi-2,5-dimetil-3-2H-furanone (207); 5-epitldiidro-2-3H-furanone (203); acido acetico (212); 2-furanil-metanolo (216); 2-5H-furanone (224); 2-

propionil-furano (234); acido-2-metil-propanoico (237); 1-idrossi-2-butanone (326); 2,6-dimetilpirazina (345).

○ **Componenti volatili riscontrati attraverso gas cromatografia dello spazio di testa (HS-GC/MS)**

- *Derivati organosolfurici*: dialliltrisolfuro (17); diallildisolfuro (16); diallilsolfuro (18); dialliltetrasolfuro (19); allilmetilsolfuro (20); allilmetildisolfuro (21); allilmetiltrisolfuro (22); dimetilsolfuro (23); dimetildisolfuro (24); dimetiltrisolfuro (25); allilpropilsolfuro (27); allil-1-propenil solfuro (29); allil-1-propenil-disolfuro (30); metil-1-propenil-disolfuro (38); di-1-propenilsolfuro (41); di(1-propenil)-disolfuro (42); di-2-propenil-trisolfuro (45); 3-vinil-4*H*-1,2-ditiino (50); 2-vinil-4*H*-1,3-ditiino (51); 4-(metilsulfinil)-butanonitrile (158); allilmercaptano (172); 1,3-ditiano (173); 3-vinil-1,2-ditiacicloes-4-ene (174); 3-vinil-1,2-ditiacicloes-5-ene (175); benzotiazolo (176); di-1-propenil-trisolfuro (202); 3-etenil-1,2-ditia-4-ene (222); 3,4 dimetiltiofene (223); N,N' dimetil-tio-urea (236); 2-vinil-1,3-ditiano (238); acido-4-metiltio-butirrico (240); 1,3 benzen-ditiolo (242); 1,5-dimetil-3,7-ditiabicclo-nonan-9-idrazone (243); 5,7-dimetil-2-metiltio-1-azaciclo-azine (244); 2,4-dimetil-tiofene (245); 2,5-dimetil-tiofene (258); 1-ossa-4,6-diazacicloottano-5-tione (266); 2-metossi-tiofene (267); allilisotiocianato (268); acido acetico-metil-estere-2-metil-ossiran-2-il-estere (269); acido-3-fenil-2-propenoico (270); metiltiirano (318).

- Composti di Organoselenio: dimetilselenide (90); acido metansolfenoselenoico metil estere (91); dimetil diselenide (92); bis(metiltio)selenide (93); allilmetilselenide (94); acido 2-propenesolfenoselenoico metil estere (95); (allitio) (metiltio)seleniuro (96); Se-metilselenocisteina (98); selenometionina (99).
- Altri derivati: 2-butenale (177); 3-penten-2-one (178); 2-metil-4-pentenale (179); 2-esanolo (180); 5-esen-2-one (181); 5-esenale (182); esanale (183); 4-eptenale (184); 2,4-esadienale (185); benzaldeide (186); 3-metil-benzaldeide (187); 3-metilbutanale (188); 2-metilbutanale (189); 2-pentenale (190); furfurale (191); 3-etilpiridina (192); 1-idrossi-2-propanone (193); 2-acetilfurano (194); 2-etil-2-butenale (195); 5-etil-2metilpiridina (196); acetone (197); 2-propen-1-olo (198); 2-metilene-4-pentenale (199); acetaldeide (210); tetrametilpirazina (204); 2-propeniltioacetone nitrile (205); alcol allilico (206); propene (232); 2,4-dimetilfurano (233); acido pentanoico (235); 2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenolo (241); 2,3-diidrofurano (259).
- **Componenti volatili riscontrati mediante distillazione in corrente di vapore (oli essenziali):**
 - Derivati organosolforici: diallildisolfuro (16); dialliltrisolfuro (17); diallilsolfuro (18); dialliltetrasolfuro (19); allilmetilsolfuro (20); allilmetildisolfuro (21); allilmetiltrisolfuro (22); dimetildisolfuro (24); dimetiltrisolfuro (25); dimetiltetrasolfuro (26); allilpropilsolfuro (27); allilpropildisolfuro (28); allil-1-propenil-disolfuro (30); allil-1-propenil

trisolfuro (31); allil-2,3-epossipropilsolfuro (32); metilpropildisolfuro (35); metilbutiltrisolfuro (36); metil-1-propenil-disolfuro (38); di-1-propenilsolfuro (41); bis-2-propenil-tetrasolfuro (46); bis-2-propenil-pentasolfuro (47); 3-vinil-4H-1,2-ditiino (50); 2-vinil-4H-1,3-ditiino (51); 1,3-ditiano (173); 1,2-ditiolano (200); 3-metil-tiofene (221); 4-metil-1,2,3-tritiolano (225); 3,4 dimetiltiofene (223); allilpropiltrisolfuro (226); 2-vinil-1,3-ditiano (238); 3-vinil-1,2-ditiano (239); 3,5-dietil-1,2,4-tritiolano (256); 2-vinil-tiofene (272); 3-metiltiopropinale (273); 2-(1-tia-2-cicloesen-6-il)-1,3-ditia-cicloes-5-ene (276); 3-(2-tia-4-pentenil)-1-tiacicloes-5-ene (277); 3-(2,3,4-tritia-5-eptenil)-1-tia-cicloes-5-ene (278); etilvinilsolfuro (281); propilene solfuro (300); 4-metil-5-viniltiazolo (341); tetraidro-2,5-dimetiltiofene (342); isobutilisotiocianato (348); 3-metil-2-ciclopentene-1-tione (350).

- Altri derivati: 2-metil-4-pentenale (179); esanale (183); 4-eptenale (184); alcol allilico (206); acetaldeide (210); propene (232); 2,4-dimetil-furano (233); 2-metil-2-butenale (260); pentadecene (274); eptadecene (275); anilina (343); 1-esanolo (347); 2-metil-benzaldeide (349); 3-metil-2-ciclopentene-1-tione (350); 2-metil-5-etilpiridina (351); 2-metilpiridina (352); piridina (353).
- Derivati pirazinici: 2,3-dimetilpirazina (344); 2,6-dimetilpirazina (345); etilpirazina (346).

- **Componenti volatili riscontrati mediante distillazione in corrente di vapore assistita da microonde (oli essenziali):**

- Derivati organosolforici: diallildisolfuro (16); dialliltrisolfuro (17); diallilsolfuro (18); allilmetilsolfuro (20); allilmetildisolfuro (21); allilmetiltrisolfuro (22); dimetildisolfuro (24); dimetiltrisolfuro (25); allilpropilsolfuro (27); allilpropildisolfuro (28); metilpropildisolfuro (35); metil-1-propenil-disolfuro (38); di-1-propenilsolfuro (41); 3-vinil-4H-1,2-ditiino (50); 2-vinil-4H-1,3-ditiino (51); sulfamide (227); 2-vinil-tiofene (272); 3-metil-2-ciclopentene-1-tione (350).
 - Altri derivati: 4-eptenale (184); ditriaciclopentano (200); alcol allilico (206); acetaldeide (210); dietilftalato (228); 6-(2,3-diidrossi-3-metil-butil)-metil-benzopirano (229); metilsteirato (230); 1-metil-(1-pent-4-enoil)-idrazina (231); 2-metil-2-butenale (260); 2-metil-5-etilpiridina (351); 2-metilpiridina (352); piridina (353).
 - Derivati pirazinici: 2,3-dimetilpirazina (344); 2,6-dimetilpirazina (345); etilpirazina (346).
- **Componenti volatili riscontrati mediante microestrazione in fase solida accoppiata a GC/MS (SPME-GC/MS):**
- Derivati organosolforici: diallildisolfuro (16); dialliltrisolfuro (17); diallilsolfuro (18); dialliltetrasolfuro (19); allilmetilsolfuro (20); allilmetildisolfuro (21); allilmetiltrisolfuro (22); dimetilsolfuro (23); dimetildisolfuro (24); dimetiltrisolfuro (25); dimetiltetrasolfuro (26); metilpropildisolfuro (35); metil-2-propinilsolfuro (37); metil-1-propenil-disolfuro (38); di-1-propenilsolfuro (41); propil-1-propinil solfuro (43); butil-1-propenil-solfuro (44); di-2-propenil-trisolfuro (45); 3-vinil-4H-

1,2-ditiino (50); allilmercaptano (172); 1,3-ditiano (173); 3-vinil-1,2-ditiacicloes-4-ene (174); 3-vinil-1,2-ditiacicloes-5-ene (175); 4-eptenale (184); 1,2-ditiolano (200); 3,4 dimetiltiofene (223); 2-vinil-1,3-ditiano (238); 2-metil-3,4-dididrido-2*H*-tiopirano (247); 5-metil-1,2,3,4-tetratiacicloesano (248); 1,3,5-tritiano (249); diossido di zolfo (250); 2,5-dimetiltiofene (258); tiaciclobutan-3-olo (261); 1,4-ditiano (263); 1-ossa-4,6-diazacicloottano-5-tione (266); 2-metossi-tiofene (267); allilisotiocianato (268); 1,2-diidro-5-metil-3*H*-1,2,4-triazol-3-tione (271); *N*-morfolinometil isopropil solfuro (279); ciclopentilesilsolfuro (280); metilalliltioacetato (282); 3-metil-1,1-bis(metiltio)-1,3-butadiene (283); metiltiocicloesano (284); metiltiociclopentano (285); 3-(metiltio)penta-2,4-dione (286); 5-(metiltio)-4-penten-2-olo (287); 2-etil-1,3-ditiano (288); 2-etilidene-1,3-ditiano (289); etil-2-tiofeneacetato (290); 2-(1-propentio)tiofene (291); tiazolo (292); 2-tiofenecarbossialdeide (293); metossimetilisotiocianato (295); 1,3-ditiolano (298); 5-metil-1,2,3-tiadiazolo (299); propilene solfuro (300); tiirano (301); 2-metil-3-pentanolo (302).

- *Altri derivati*: 2-butenale (177); 2-metil-4-pentenale (179); esanale (183); 2,4-esadienale (185); 2-pentenale (190); 2-propen-1-olo (198); 2-metilene-4-pentenale (199); tetrametilpirazina (204); 2-propeniltioacetone nitrile (205); acido acetico (212); 1-idrossi-4-metil-2,6-di-*tert*-butilbenzene (251); 1-metil-3-pirrolin-2-one (252); feniletilbutirrato (253); 2,3-diidrofurano (259); 2-metil-2-butenale (260);

2,5-diidrofurano (**262**); 2-propil-1-pentanol (264); 2-etil-1-esanol (**265**); acido acetico-metil-estere-2-metil-ossiran-2-il-estere (**269**); 2,5-dimetilpiridina (**294**); 2-metilfurano (**296**); 3-metilpiridina (**297**).

3.1.2 Risultati della ricerca bibliografica aventi come argomento la LC/MS

Il numero di studi pubblicati in letteratura riguardanti l'analisi di campioni di aglio mediante LC/MS è aumentato notevolmente negli ultimi anni (Fig. 23); tale aumento risulta statisticamente significativo come si vede dal risultato della Trend Analysis, mostrato nella stessa figura, ma molto probabilmente il trend in crescita riflette l'aumento del numero di pubblicazioni scientifiche che si osserva negli ultimi anni in qualunque ambito disciplinare.

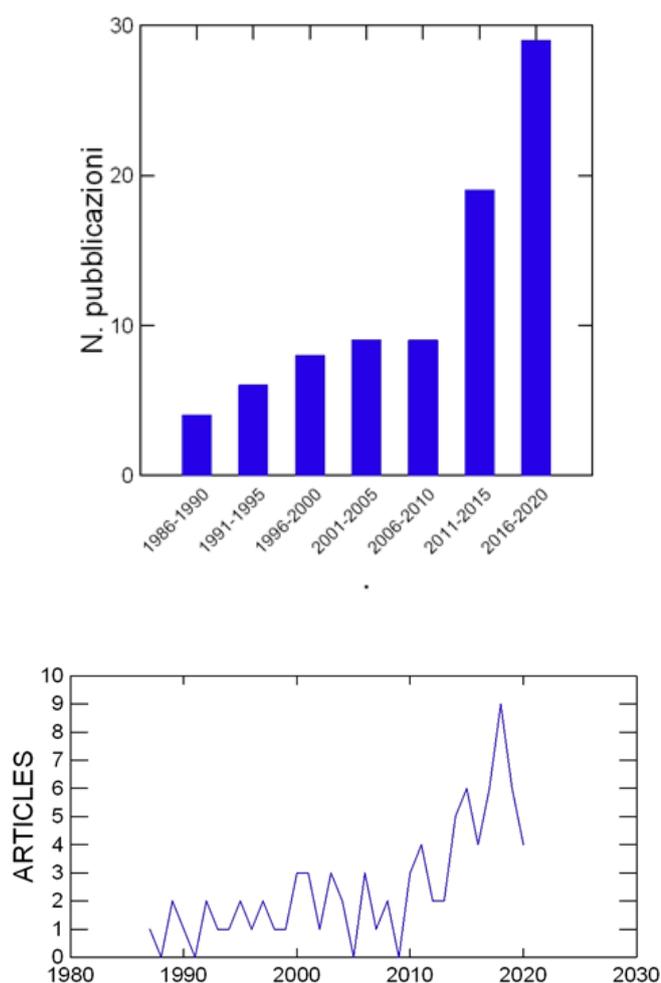


Figura 23. Numero di pubblicazioni inerenti analisi di campioni di aglio mediante LC/MS dal 1986 al 2020 e relativo grafico della serie temporale (Mann-Kendall test, $p < 0.05$).

I campioni di aglio oggetto delle pubblicazioni esaminate sono in massima parte provenienti dall'Asia, seguita da America, Europa e Africa. Gli studi che riguardano campioni europei sono il 10% (Fig. 24).

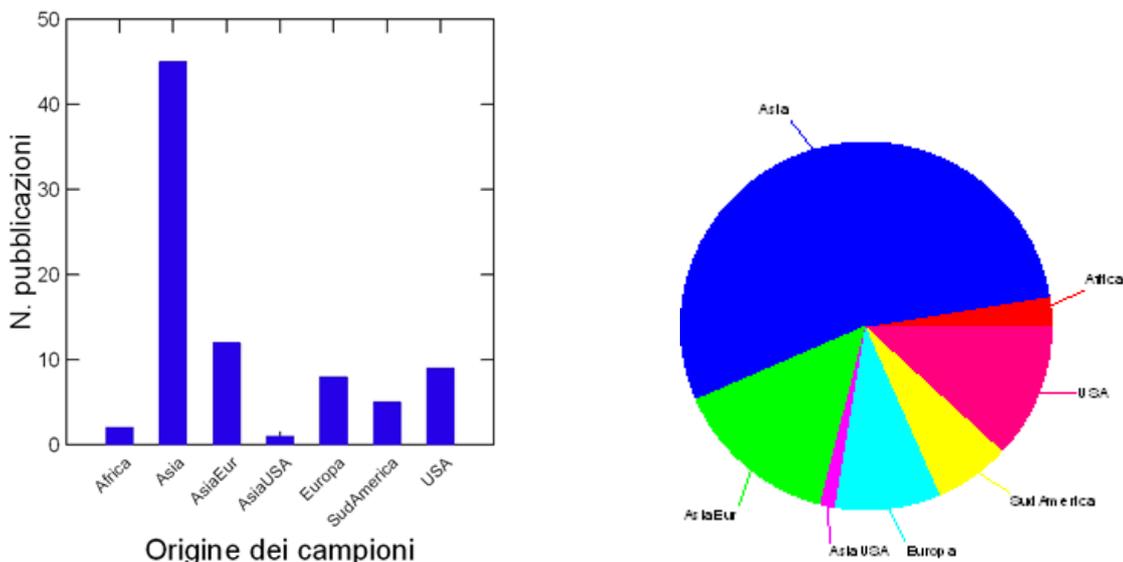


Figura 24. Origine geografica dei campioni di aglio oggetto delle pubblicazioni in esame.

Per quanto riguarda le fasi che precedono l'analisi LC/MS, per oltre il 66% dei casi sono stati analizzati campioni freschi, senza alcun pretrattamento; l'essiccamento all'aria è stato eseguito nel 10% degli studi in esame e la liofilizzazione nel 25%. L'Analisi delle Corrispondenze mostra un significativo grado di associazione del pretrattamento del campione con l'anno delle pubblicazioni: nei lavori più recenti i campioni sono liofilizzati, mentre nelle pubblicazioni più datate l'analisi era eseguita quasi sempre su campioni freschi.

La procedura estrattiva comprendente uso di solventi e omogenizzazione / agitazione / centrifugazione è la più frequentemente adottata; anche la macerazione è usata e, soprattutto nei lavori più recenti, AGE. In pochi casi si effettua l'estrazione a caldo. Per quanto riguarda i solventi di estrazione, nei lavori più recenti si usano alcol o miscele alcol/acqua o solventi lipofili; l'impiego di sola acqua o miscele acqua/solventi lipofili è in diminuzione, così come CO₂ e le miscele solventi lipofili/alcol, presenti in pochissimi lavori (Fig. 25).

Correspondence Plot

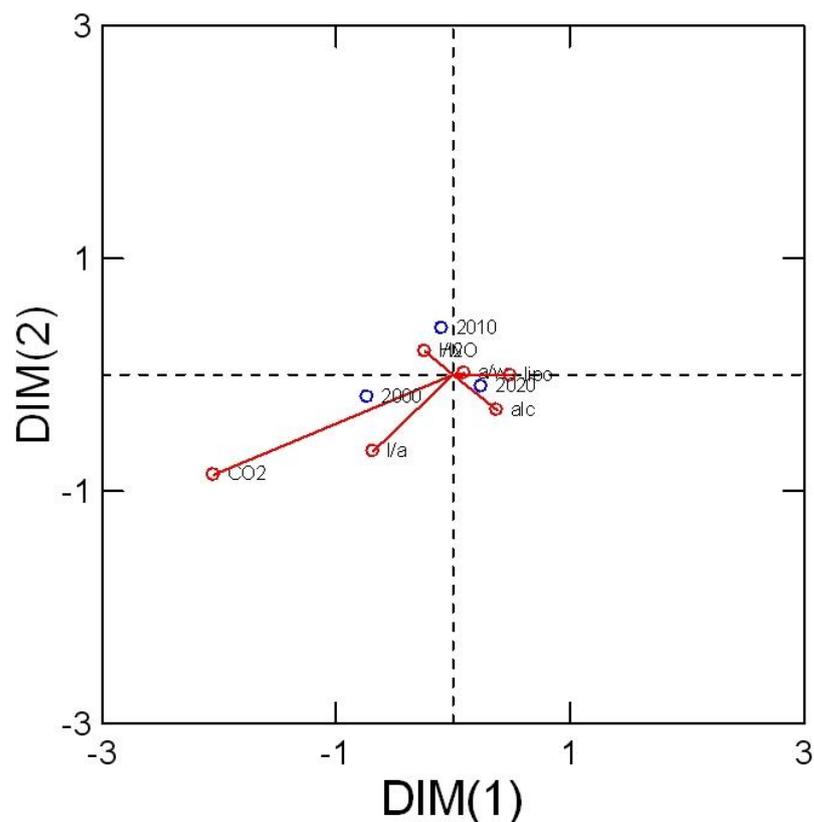


Figura 25. Relazione tra solvente di estrazione e decade della pubblicazione.

Il numero di estrazioni non è un parametro valutabile, in quanto l'80% delle pubblicazioni riporta una sola estrazione; pochi autori riportano 2 o 3 estrazioni.

In più dell'80% delle pubblicazioni si utilizza una fase stazionaria inversa: il gruppo legato è sempre C18, tranne in 2 lavori ((65) con fenilesile, (246) con pentafluorofenile). Nel caso di fase diretta, invece, i gruppi legati possono essere –OH oppure –NH₂: quest'ultimo è più presente nei lavori degli ultimi anni, ma la bassa numerosità del campione non permette di valutare la significatività statistica.

Le colonne più utilizzate hanno diametro nell'intervallo 0.40-0.49 cm e lunghezza 11-29 cm; le colonne con diametro superiore a 0.78 cm e lunghezza superiore a 30 cm sono presenti solo nei lavori più recenti e non sono mai utilizzate con gruppi diversi da C18. L'unica eccezione è il lavoro di Wang et al. (247), dove si usa una colonna avente gruppo –OH con queste caratteristiche di diametro e lunghezza.

La granulometria è nell'intervallo 3.1-5.0 µm: colonne con granulometria inferiore sono presenti solo nei lavori più recenti. Questo parametro è correlato significativamente con la lunghezza e il diametro della colonna (Fig. 26 e 27).

Correspondence Plot

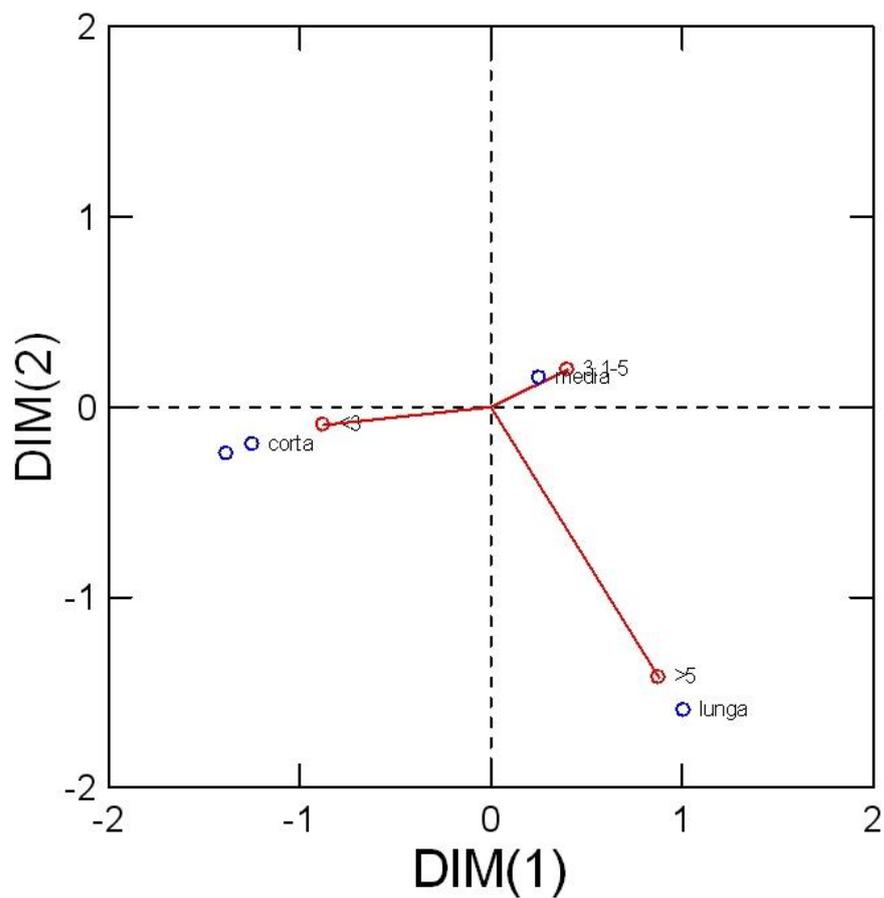


Figura 26. Relazione tra lunghezza (corta = 1-10 cm; media = 11-29 cm; lunga = 30 cm e oltre) e granulometria della colonna (inferiore a 3 μm ; tra 3.1 e 5 μm ; > 5 μm).

Correspondence Plot

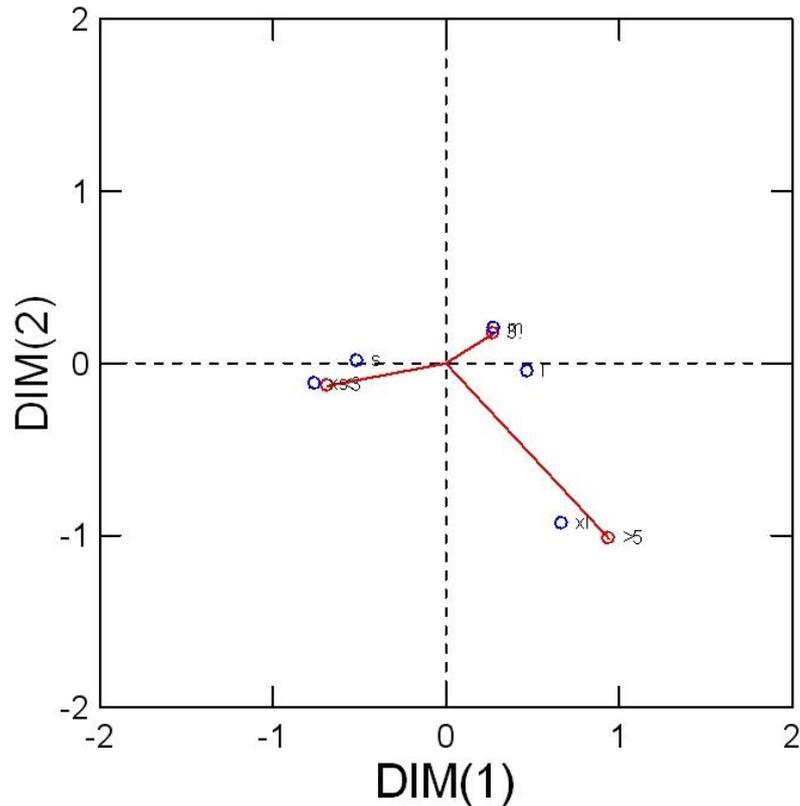


Figura 27. Relazione tra diametro ($x_s = 0.20-0.29$ cm; $s = 0.30-0.39$ cm; $m = 0.40-0.49$ cm; $l = 0.78-1.9$ cm; $x_l = 2.00-3.30$ cm) e granulometria della colonna (inferiore a $3 \mu\text{m}$; tra 3.1 e $5 \mu\text{m}$; $> 5 \mu\text{m}$).

Anche il flusso è significativamente correlato con i precedenti parametri relativi alla colonna. Valori di flusso superiori a 2 ml/min si trovano nei lavori a partire dal 2003.

L'eluizione isocratica e l'eluizione con gradiente sono quasi egualmente rappresentate; l'uso del gradiente si è affermato nei lavori più recenti.

Nel caso di eluizione isocratica le fasi mobili più usate sono date da miscele alcol + acqua (oltre la metà dei lavori) e da miscele solventi lipofili + acqua (circa un quarto delle pubblicazioni). Nel caso di eluizione con gradiente, nella maggior parte dei lavori si utilizzano acqua come fase mobile A (75% dei lavori) e solventi lipofili come fase mobile B (poco meno del 50% dei lavori).

Il rivelatore LC è nella maggior parte dei casi UV: in pochi casi si usa il rivelatore a fluorescenza e ancor meno frequente è l'uso del rivelatore RI (a Indice di Rifrazione), quest'ultimo limitato alle pubblicazioni più recenti.

L'analizzatore MS non è un parametro valutabile, in quanto i dati sono disponibili per poche pubblicazioni recenti, che impiegano soprattutto ToF e quadrupolo.

I composti riscontrati attraverso LC/MS sono di seguito riportati:

○ **Composti organosolforici:**

- Derivati γ -glutamyl-S-alchenil-L-cisteina: *N*-(γ -glutamyl)-S-(*E*)-1-propenil-L-cisteina (**7**); *N*-(γ -glutamyl)-S-(allil)-L-cisteina (**8**); *N*- γ -glutamyl-S-metil-L-cisteina(**12**); *N*-(γ -glutamyl)-S-(*E*)-1-propenil-L-cisteina solfossido (**14**); *N*- γ -glutamyl-S-allilmercaptocisteina(**111**); *N*- γ -glutamyl-S-allilcisteina(**112**); γ -glutamyl-S-1-propenilcisteina(**113**); γ -glutamyl-cisteina (**159**); γ -glutamyl-S-(β -carbossilpropil) cisteinilglicina (**160**); γ -glutamyl-S-(1-propenil)cisteinilglicina (**161**); γ -glutamyl-S-metil-cisteinilglicina(**162**); γ -glutamyl-S-metil-L-cisteina-solfossido (**163**); S-allilmercapto-glutatione (**310**).

- Derivati S-alchenil-L-cisteina: alliina [(+)-S-allil-L-cisteina solfossido] (**1**); acido-2-propenesulfenico (**2**); allicina (**3**); isoalliina [(+)-S-(E)-1-propenil-L-cisteina-solfossido] (**4**); metiina [(+)-S-metil-L-cisteina-solfossido] (**5**); propiina [(+)-S-propil-L-cisteina-solfossido] (**6**); alloalliina - (-)-S-(2-propenil)-L-cisteina solfossido (3-(R)-2-propenilsulfinil-L-alanina) (**9**); cicloalliina [acido 5-metiltiomorfolin-3-carbossilico solfossido] (**11**); dialliltrisolfuro (**17**); diallildisolfuro (**16**); diallilsolfuro (**18**); dimetiltrisolfuro (**25**); S-allilcisteina (**108**); S-allilmercaptocisteina (**110**); S-metilcisteina (**164**); S-2-carbossipropilcisteina (**165**); trans-S-(1-propenil)-L-cisteina (**167**); acido-3-(alliltrisulfanil)-2-amminopropanoico (**254**).
- Vinilditiini: 3-vinil-4H-1,2-ditiino (**50**); 2-vinil-4H-1,3-ditiino (**51**).
- Ajoeni: (Z)-ajoene (**52**); (E)-ajoene (**53**).
- Garlicnine: garlicnina G (**71**); garlicnina I1 (**75**); garlicnina I2 (**76**); garlicnina J1 (**77**); garlicnina J2 (**78**); garlicnina M (**83**); garlicnina N (**84**); garlicnina O (**85**); garlicnina P (**86**); garlicnina Q (**87**).
- Altri derivati: 2-propenil 2-propenetiosolfonato (pseudoallicina) (**48**); metanotiosolfonato (**49**); N-trans-feruloiltiramina (**156**); acido S-allilsolfenico (**168**); metionina solfossido (**169**); N-caffeoiltrammina (**246**); N-trans-cumaroiloctopamina (**303**); N-trans-feruloiloctopamina (**304**); acido etere-guacilglicerol- β -ferulico (**305**); acido etere-guacilglicerol- β -caffaico (**306**); acido-trans-cumarinico (**307**); acido-trans-ferulico (**308**);

acido *S*-(*Z,E*)-1-propenilestere-2-propene-1-solfinoioico (**311**); acido *S*-metilestere-2-propenesolfinoioico (**312**); acido *S*-(*Z,E*)-1-propenilestere-metanosolfinoioico (**313**).

- **Nell'aglio invecchiato** sono stati trovati composti analoghi:
 - Derivati γ -glutamyl-*S*-alchenil-*L*-cisteinici: γ -glutamyl-*S*-metil-*L*-cisteina (**12**); *N*-(γ -glutamyl)-*S*-(*E*)-1-propenil-*L*-cisteina solfossido (**14**); γ -glutamyl-*S*-allilmercaptocisteina (**111**); γ -glutamyl-*S*-allilcisteina (**112**); γ -glutamyl-*S*-1-propenilcisteina (**113**); γ -glutamyl- γ -glutamyl-*S*-allilcisteina (**116**); γ -glutamyl- γ -glutamyl-*cis/trans*-*S*-1-propenilcisteina(**117**); γ -glutamyl- γ -glutamyl-*S*-metilcisteina (**118**); Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)- γ -glutamyl-*S*-allilcisteina (**121**); Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)- γ -glutamyl-*S*-1-propenil-cisteina (**122**); γ -glutamyl-*S*-(β -carbossilpropil) cisteinilglicina (**160**) γ -glutamyl-*S*-(1-propenil)cisteinilglicina (**161**); γ -glutamyl-*S*-metil-*L*-cisteina-solfossido (**163**).
 - Derivati *S*-Alchenil-*L*-Cisteinici: metiina [(+)-*S*-metil-*L*-cisteina-solfossido] (**5**); *S*-allilcisteina (**108**); *S*-1-propenilcisteina (**109**); *S*-allilmercaptocisteina (**110**); *cis*-*S*-1-propenilcisteina (**115**); Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-*S*-allilcisteina (**120**); *S*-metilcisteina (**164**); *S*-2-carbossilpropilcisteina (**165**); *trans*-*S*-(1-propenil)-*L*-cisteina (**167**); *S*-propilcisteina (**170**).
 - Altri derivati: 3-alliltrisulfanil-alanina (**114**); Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-*L*-arginina (**119**); acido *S*-allilsolfenico (**168**); metionina solfossido (**169**); alcol (-)-(2*R*,3*S*)-diidrideidrodiconiferilico (**153**) alcol (+)-(2*S*,3*R*)-

deidrodiconiferilico (154); treo-guaiacilglicerol- β -O-4'-coniferil etere (155).

○ **Nell'aglio fermentato:**

- Derivati S-alchenil-L-cisteinici: alliina - (+)-S-allil-L-cisteina solfossido (1); isoalliina - (+)-S-(E)-1-propenil-L-cisteina-solfossido (4); metiina - (+)-S-metil-L-cisteina-solfossido (5); cicloalliina (acido 5-metiltiomorfolin-3-carbossilico solfossido) (11); S-allilcisteina (108); S-1-propenilcisteina (109); S-metilcisteina (164).
- Derivati γ -glutamil-S-alchenil-L-cisteinici: N-(γ -glutamil)-S-(E)-1-propenil-L-cisteina (7); N-(γ -glutamil)-S-(allil)-L-cisteina (8); N-(γ -glutamil)-S-(metil)-L-cisteina (12); glutamil fenilalanina (171).

○ **Composti polifenolici:**

- **Nell'aglio fresco:** acido vanillico; acido gallico; acido caffeico; acido ferulico; (+)-catechina; (-)-epicatechina; epigallocatechina; acido clorogenico (222) inositolo; dulcitol; acido gluconico; inositolo-1,4-bisfosfato; glucosio-1-fosfato; glucosamina. (189)
- **Nell'aglio invecchiato** sono stati trovati composti analoghi: acido gallico; acido caffeico; acido cumarico; epigallocatechina gallato.(222) N-acetilglucosamina; fruttosio-6-fosfato; acido muramico.(189)

○ **Tetraidro- β -carboline:** acido (1R,3S)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolin-3-carbossilico (149); acido (1S,3S)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolin-3-carbossilico (150); acido (1R,3S)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolin-1,3-

dicarbossilico (151); acido (1S,3S)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolin-1,3-dicarbossilico (152).

○ **Derivati amminoacidici**

• **Nell'aglio fresco:** prolina; valina; isoleucina; leucina; asparagina; acido aspartico; glutamina; lisina; acido glutammico; fenilalanina; arginina; acido amino butirrico; acido 2-amino-4-cianobutanoico; acido pipercolico; S-allilglutazione (166); glutamilfenilalanina (171); il triptofano è presente solo nell'aglio fresco. (189)

• **Nell'aglio invecchiato:** prolina; valina; isoleucina; leucina; asparagina; acido aspartico; glutamina; lisina; acido glutammico; fenilalanina; arginina; acido aminobutirrico; acido 2-amino-4-cianobutanoico; acido pipercolico; citrullina; acido arginico; N-glutamil-metil-L-arginina; acido isomugineico; S-N-idrossi-N-metilcarbamoilglutazione; tiramina; ossoprolina; N-γ-glutamil-metionina; N-trans-coumaroiltiramina (157); N-trans-feruloiltiramina (156); S-allilglutazione (166); glutamil-fenilalanina (171); alanina, 4-idrossiglutammato; 4-idrossi-2,3,4,5-tetraidrodipicolinato sono presenti solo nell'aglio invecchiato.(189)

○ **Composti derivanti dalla reazione di Maillard nell'aglio invecchiato:**

• Derivati a nucleo pirrolico: α-[(2-formil-5-idrossimetil)pirrol-1-il]arginina (123); acido α-[(2-formil-5-idrossimetil)-pirrol-1-il]-aspartico (124); 1-[5-(1,2-diidrossietil)-2-ossootetraidrofuran-3-il]-5-(idrossimetil)-1H-pirrolo-2-carbaldeide (125); acido α-[(2-formil-5-idrossimetil)pirrol-

- 1-il] glutammico (**126**); 5-idrossimetil-1H-pirrolo-2-carbaldeide (**127**); acido 2-formil-5-(idrossimetil)-pirrolo-1-acetico (**128**); α -[(2-formil-5-idrossimetil)pirrol-1-il]alanina (**129**).
- Derivati a nucleo pirazinico: 4-[7-idrossi-6-(idrossimetil)-7,8-diidro-6H-pirano-[2,3-b]pirazin-3-il]butano-1,2,3-triolo (**130**); 4-[6-(1,2-diidrossietil)-6,7-diidro-furo[2,3-b]pirazin-3-il]-butano-1,2,3-triolo (**131**); 4-(6-etil-2-pirazinil)-1,2,3-butanotriolo (**132**); (*E*)-4-(6-metilpirazin-2-il)but-3-ene-1,2-diolo (**133**); (*E*)-4-(5-metilpirazin-2-il)but-3-ene-7,2-diolo (**134**); 1,2,3-butanotriolo-4-(6-metil-2-pirazinil) (**135**); 1,2,3-butanotriolo,4,4'-(2,5-pirazinadiil)bis (**136**); 1,2,3-butanotriolo,4,4'-(2,6-pirazinadil)bis (**137**).
 - Derivati a nucleo pirrolidinico: acido (*S*)-1-[(5-idrossimetil)furan-2-il]metil]-5-oxopirrolidin-2-carbossilico (**138**); acido 3-idrossi-1H-[(5-(idrossimetil)furan-2-il)metil]-2,5-diosso-3-pirrolidinacetico (**139**); acido (*2S*)-1-[2-(furan-2-il)-2-ossoetil]-5-ossoopirrolidin-2-carbossilico (**140**).
 - Altri derivati: acido 4-acetil-6-(idrossimetil)picolinico (**141**); 2,3-diidro-3,5-diidrossi-6-metil-4H-piran-4-one (**142**); acido 5-idrossimetil-2-furan-carbossilico (**143**); idrossimetilfufurale (**144**); timidina (**145**); 5-idrossi-3,4-dimetil-2(*5H*)-furanone (**146**); 5-idrossimaltolo (**147**); cordirrolo A (**148**).

3.2 Risultati delle analisi in GC/MS

Il campionamento effettuato nel giugno del 2020, a causa delle condizioni di pandemia, è purtroppo risultato molto esiguo. Di conseguenza i risultati riportati di seguito, sia per le analisi GC/MS sia per quelle in LC/MS sono da considerarsi assolutamente iniziali.

I risultati delle analisi in GC/MS sono riportati in Fig. 28

	2,4-dimetil-1,4-pentadiene	Sulfuroso acid, octyl 2-pentyl ester	3,5-dimetilottano	2-metildecano	4-metildecano	Decano	2,6-dimetil-ottano	Farnesano	Cyclobutanone ethylene dithioetetal	Undecano	Diallilsolfuro	3,7,11-trimetil-1-dodecano lo	2-vinil-1,3-ditiano	3-etil-1,4-esadiene	5-metil-1,2,3-tiadiazolo	Diallilsolfuro	3-vinil-1,2-ditiacloes-4-ene	Dodecano
VM_1	0	0	0,613525781	0	0	0	0,187019	0	0,561580582	12,48558471	0	0	0,5813282	0	0	17,30472103	2,145439227	
VM_2	0	0	0,514484233	0	0	0	0	0	0	19,11446563	0	0	0,4485563	0	0	16,73364557	0,930814532	
VM_3	0	0	0,825557846	0	0	0,374372	0,349693	0	0	3,383751443	0	0	0	0	2,440194	25,49292722	1,025809119	
VG_1	0	0	0,186702418	0	0	0	0	0	0	2,9149182	0	0	0,7867989	1,14184	0	24,915914587	0,484782796	
VG_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,4590648	0	0	0,6428269	1,242992	0	26,40941557	0,382579672	
VG_3	0	0	0,121707887	0	0	0	0,0413006	0	0,479690546	3,363975321	0	0	0,5129559	1,953595	0	22,6856887	0	
V_1	0	0,398193294	0,606089249	0	0	0	0	0	0	8,503508226	0	0	0	3,596956	0	26,05047909	0,784745138	
V_2	0,42272043	0,334673135	0,455901621	0	0	0	0	0,405582208	0	23,95077647	0	0	0	0,911944	0	19,92238087	0	
V_3	0,790193403	0,608050583	0,479003771	0	0	0	0	0,872189424	0	28,42575422	0	0	0	1,732284	0	18,76317785	0	
M1_1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,629325068	0	0	0,3696814	1,430444	0	25,64023764	0,149740209	
M1_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,610630281	2,89532832	0	0	0,9908179	2,435955	0	22,86406073	0,141651225
M1_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,491093394	0	0	0,566778	1,801174	0	25,1901893	0,199365116	
M2_1	0	0,513007178	0,667805659	0	0	0	0	0	0	8,563831617	0,762044	1,755413	0	0	0	24,97210967	0,850960795	
M2_2	0	0,587536417	0,777294043	0	0	0	0	0	0	25,90006369	0	0	0	0	0	19,83913663	1,41681842	
M2_3	0	0,271029278	0,252336416	0	0	0	0	0	0	26,13790434	0	0	0	0	0	21,30178748	1,115933056	
M3_1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,130739508	0	0	0,6725525	2,050713	0	24,19382639	0,333846034	
M3_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,712767091	0	0	0,781478	1,590207	0	23,02948556	0,237414547	
M3_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,557670944	0	0	0,24527598	1,674556	0	26,31323853	0	
M4_1	0	0	0,393181115	0	0	0	0	0	0	2,106955206	0,433976	0	0,2865995	0,526504747	0	26,02589287	0,976369993	
M4_2	0	1,448265075	1,477847534	0	0	0	0	0	0	41,57438961	0	0	0	0	0	13,54881143	0,902995527	
M4_3	0	0,961107794	0	0	0	0,985233	0	0	0	42,28087957	0	0	0	0	0	15,70282554	1,185973673	
C_1	3,058813531	1,31192E-19	0	0	2,936836048	1,34E-19	0	0	0	29,36881833	0	0	0	0	0	14,37084136	1,61886E-19	
C_2	4,1753E-19	1,324185787	1,341090707	0	4,0088E-19	1,84E-38	0	0	0	29,74450639	0	0	0	0	0	17,94308417	2,00071609	
C_3	5,69931E-38	1,117471698	1,044040617	0	5,47204E-38	2,51E-57	0	0	0	28,27422257	0	0	0	0	0	20,37260647	1,677895024	

	3-vinil-1,2-ditiacloes-5-ene	1,3-diterbutilbenzene	2-esil-1-decano	2-butil-1-ottano	Diallilsolfuro	2-buti-1-ottano	3-vinil-3,6-diidro-1,2-ditino	Allilsolfuro	2,6-dimetilundecano	O-decildrossilamina	Tetradecano	Somma di altri	
VM_1	47,09133032	3,633189894	0	0	3,664694449	0	0	1,0871107	0	0	2,784514592	7,859961498	
VM_2	44,21491659	1,862878878	0	0	4,433391153	0	0	1,1039286	0	0	1,521250435	9,121668007	
VM_3	54,81444178	2,06531247	0	0	0	0	0	1,2323005	0	0	1,404694179	6,590946494	
VG_1	58,12532665	1,583415384	0	0	0,622332264	0	0,773369515	1,5069379	0	0	0,781834625	6,172595808	
VG_2	56,52971787	1,184730595	0	0	0,514893666	0	1,190532478	1,1591793	0	0	0,625006051	5,659061113	
VG_3	60,0176325	0,944427468	0	0	0,511924685	0	0,992782857	0,9887027	0	0	0,363163295	7,022452994	
V_1	54,02713639	1,620664926	0	0	0	0,807224313	1,378895488	0	0	0,374120121	0	2,856270224	
V_2	47,89620627	0,914282105	0	0	0,795462482	0,395174615	0	0	0	0	0	3,594895723	
V_3	42,09068606	1,298193024	0	0	1,203061117	0,556523554	0	0	0	0	0	3,180882829	
M1_1	61,73692963	0,581296235	0	0	0,383953006	0	0,910689527	1,0386731	0	0	0,281464141	4,847565587	
M1_2	60,44504628	0,781835489	0	0	0,73914836	0	0,699092001	1,0031758	0	0	0,260692477	6,132571269	
M1_3	60,43909977	0,83724844	0	0	0	0	0,844583956	0,8742946	0	0	0,390854296	6,3653193	
M2_1	53,98992605	1,721158169	1,324918	0,927783	0	0	0	0	0,488617892	0	0	3,462424362	
M2_2	43,49682851	1,500210259	0	1,305753	1,305752575	0,701134221	0	0	0	0	0	4,475225244	
M2_3	44,43823594	1,028214834	0	0	0,904669621	0,526608146	0	0	0	0	0	4,023260895	
M3_1	56,51671468	1,418314797	0	0	0,565025148	0	0,963347759	1,4682419	0	0	0,613339493	7,073338613	
M3_2	58,22929869	1,29728029	0	0	0,688799101	0	0,926287538	1,2138356	0	0	0,427364501	7,865781864	
M3_3	58,75598013	0,880270588	0	0	0,354604686	0	0,882961606	1,1328502	0	0	0,388075862	6,607031583	
M4_1	61,54488373	1,176002444	0	0	0	0,472028741	0	0	0	0	0	3,478609667	
M4_2	28,89892307	3,747210768	0	0	0	0,2635497791	1,806610627	0	0	0	0	3,961443566	
M4_3	29,30993121	3,044848434	0	0	1,896901706	1,159631563	0	0	0	0	0	3,472669197	
C_1	29,41001325	7,134861225	3,085002	3,563879	2,58928E-19	1,5829E-19	0	0	0	0	0	3,299487211	3,771444857
C_2	36,87194201	2,878038839	1,600801	1,771111	3,53439E-38	2,16067E-38	0	0	0	0	0	4,50382E-19	5,24523771
C_3	35,35677174	3,308136463	2,063563	1,713659	4,82446E-57	2,94933E-57	0	0	0	0	0	5,071632453	

Figura 28. Risultati delle analisi GC/MS, campagna raccolta aglio giugno 2020

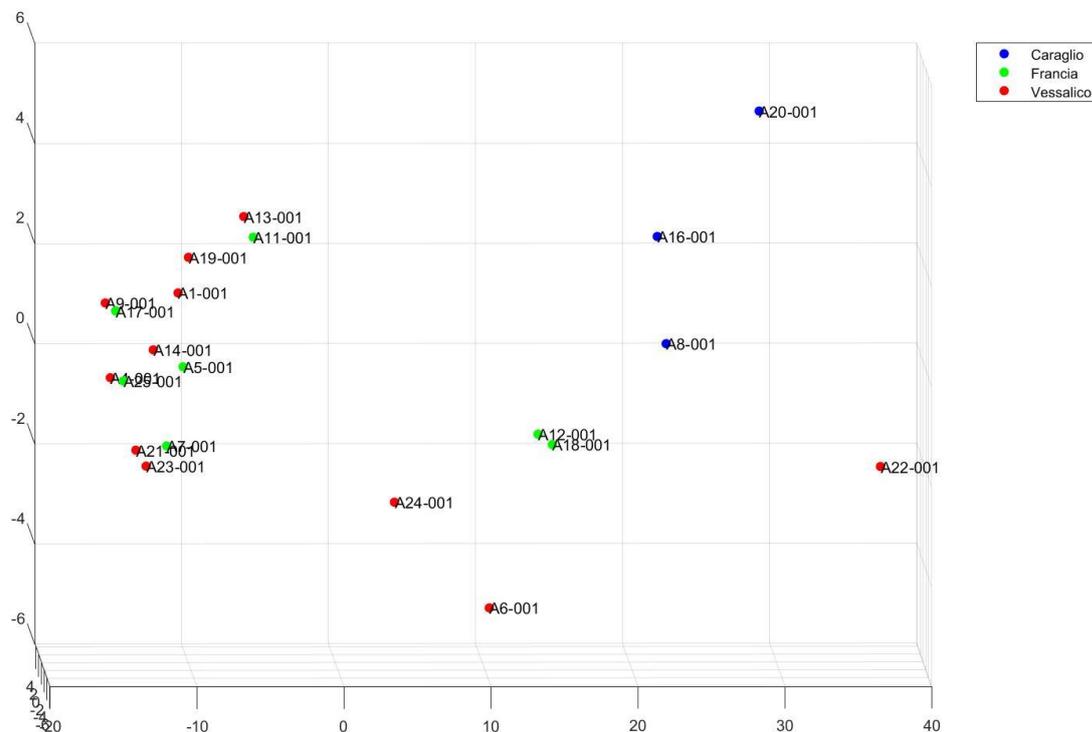


Figura 29 Analisi delle componenti principali sui dati ottenuti dalle analisi GC/MS

L'analisi delle componenti principali evidenzia una separazione tra Vessalico Messidrome azienda ZZZ (A 22-001), Caraglio (A 20-001, A 16-001 e A8-001), due campioni di Messidor francesi (A12-001 e A18-001) e due Vessalico azienda XXX (A 24-001 e A6-001) dal resto dei campioni analizzati. (Fig. 29).

3.3 Risultati delle analisi in LC/MS

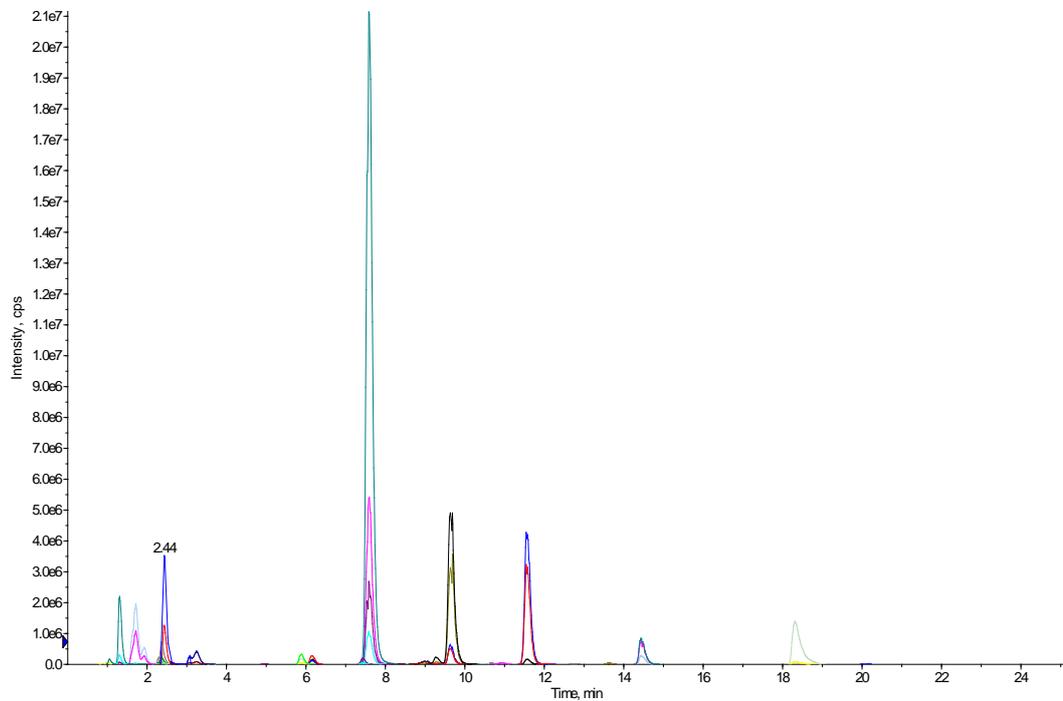


Figura 30. Esempio di un cromatogramma MRM dell'estratto idroalcolico

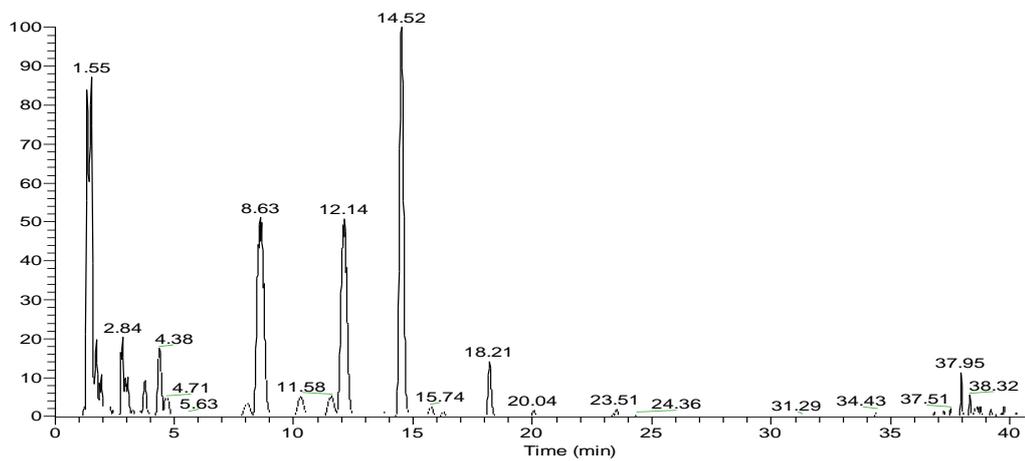


Figura 31. Esempio di un cromatogramma TIC dell'estratto idroalcolico

Nelle analisi LC/MS (Figg. 30 e 31) è stato impiegato un approccio di tipo targeted con standard in parte acquistati dal commercio ed in parte riconosciuti dalla libreria interna dello strumento. La PCA (Figg. 32 e 33) evidenzia una separazione in gruppi che sembra definire l'aglio di Vessalico con caratteristiche intermedie tra i gruppi francesi Messidor e Messidrome. L'aglio di Caraglio appare abbastanza separato rispetto a Vessalico, mentre i prodotti Messidor e Messidrome dell'azienda XXX di Vessalico (campioni A4-003, A4-004, e A9-003, A9-004, rispettivamente) mostrano caratteristiche chimiche diverse.

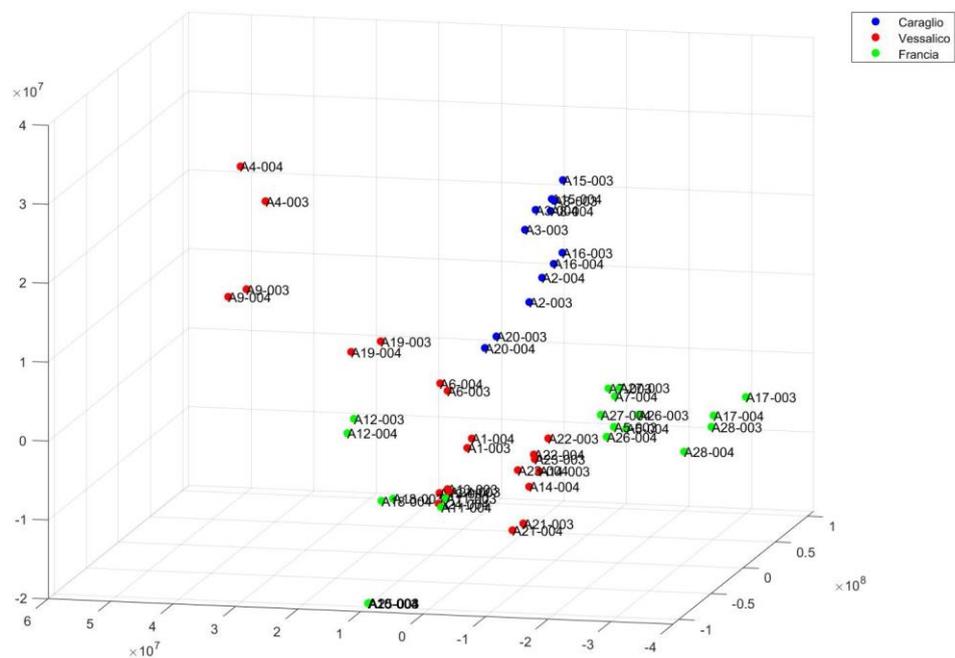


Figura 32. Principal Component Analysis dei risultati delle analisi LC/MS

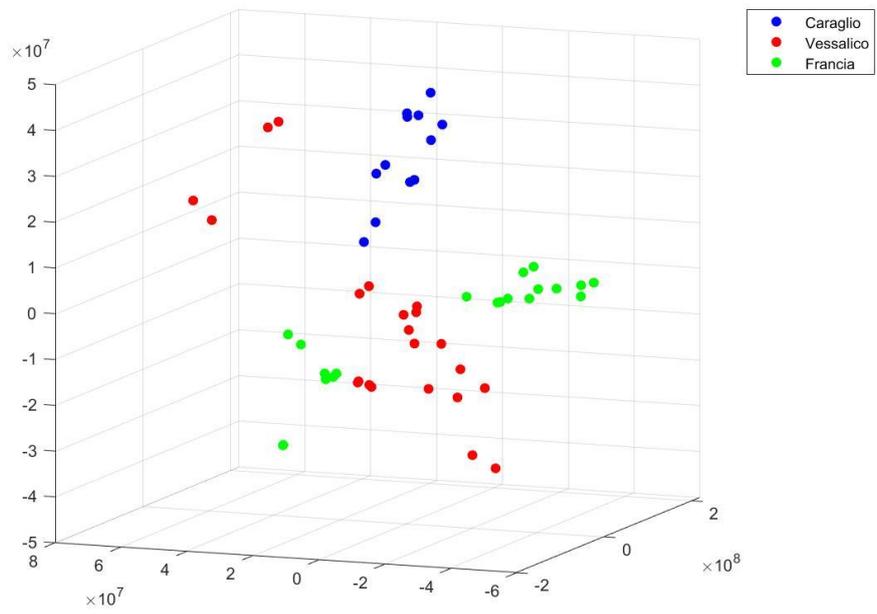
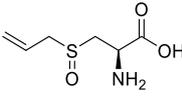
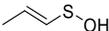
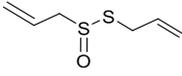
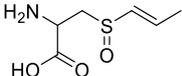
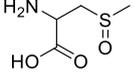
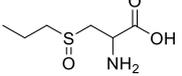
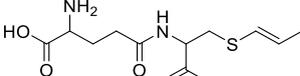
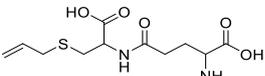
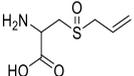
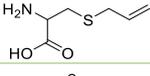
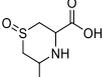


Figura 33. Principal Component Analysis dei risultati delle analisi LC/MS

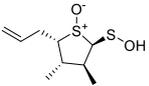
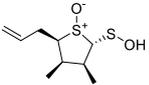
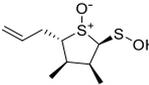
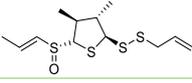
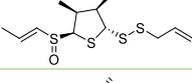
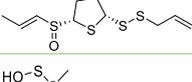
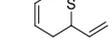
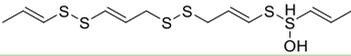
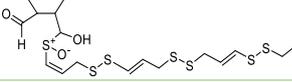
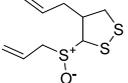
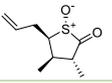
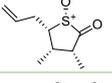
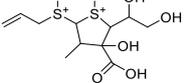
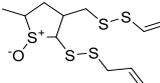
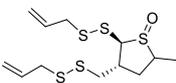
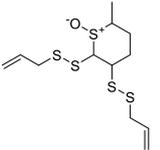
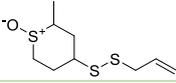
TABELLA COMPOSTI

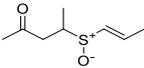
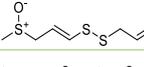
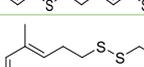
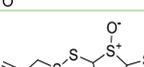
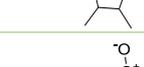
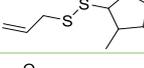
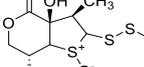
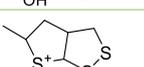
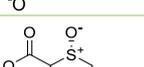
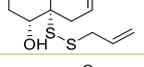
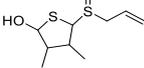
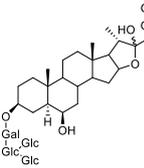
C.N.	Nome IUPAC o Trivial name	Struttura	Riferimento Bibliografico
1	alliina - (+)- <i>S</i> -allil-L-cisteina solfossido		(17, 19, 82, 83, 107, 108, 117, 144, 148, 153, 154, 158, 179, 209, 246, 248-259)
2	acido 2-propenesulfenico		(20)
3	allicina		(20, 36, 53, 98, 99, 106, 107, 121, 122, 127, 128, 164, 208, 209, 222, 231, 239, 244, 246, 249, 251, 254, 256, 257, 260-270)
4	isoalliina - (+)- <i>S</i> -(<i>E</i>)-1-propenil-L-cisteina-solfossido		(20, 21, 28, 82, 83, 117, 249, 253, 255, 257, 258)
5	metiina - (+)- <i>S</i> -metil-L-cisteina-solfossido		(20, 21, 82, 83, 108, 117, 222, 249, 253, 255, 258, 259)
6	propiina - (+)- <i>S</i> -propil-L-cisteina-solfossido		(20, 21, 108, 117, 222)
7	<i>N</i> -(γ -glutamil)- <i>S</i> -(<i>E</i>)-1-propenil-L-cisteina		(20-22, 82, 83, 253, 254, 257, 271)
8	<i>N</i> -(γ -glutamil)- <i>S</i> -(allil)-L-cisteina		(20, 82, 257)
9	allo alliina - (-)- <i>S</i> -(2-propenil)-L-cisteina solfossido (3-(<i>R</i>)-2-propenilsulfinil-L-alanina)		(22, 255)
10	deossialliina (<i>S</i> -(2-propenil)-L-cisteina)		(22)
11	cicloalliina (acido 5-metiltiomorfolin-3-carbossilico solfossido)		(22, 82, 83, 222, 249, 252, 253)

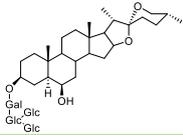
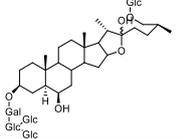
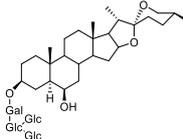
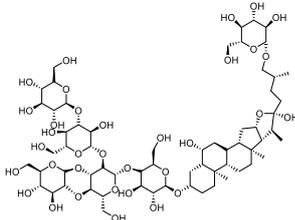
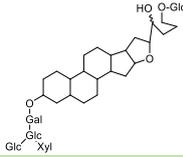
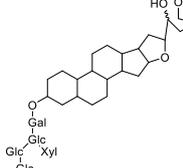
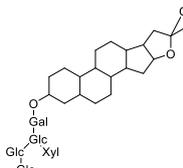
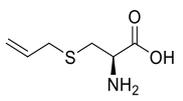
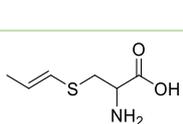
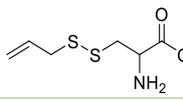
12	<i>N</i> -(γ -glutamil)- <i>S</i> -(metil)- <i>L</i> -cisteina		(16, 21, 22, 64, 82, 83, 222, 249, 253)
13	<i>N</i> -(γ -glutamil)- <i>S</i> -(allil)- <i>L</i> -cisteina solfossido		(22, 189)
14	<i>N</i> -(γ -glutamil)- <i>S</i> -(<i>E</i>)-1-propenil- <i>L</i> -cisteina solfossido		(22, 222)
15	3,5-dimetil-1,2,4-tritiolano		(272)
16	diallildisolfuro (di-2-propenil-disolfuro)		(31, 40, 94, 96, 98, 99, 101, 102, 105, 123, 130, 133-135, 137, 166, 177, 183, 187, 189, 231, 245, 248, 249, 260, 272-281)
17	dialliltrisolfuro (alliltrisolfuro) (di-2-propenil-trisolfuro)		(31, 40, 94, 96-99, 101, 102, 105, 123, 130, 133-135, 137, 166, 177, 183, 187, 189, 231, 245, 248, 249, 260, 272, 274, 276, 277, 282, 283)
18	diallilsolfuro (1-propene-3,3-tiobis)		(31, 94, 96-99, 101, 102, 105, 130, 133-135, 137, 166, 183, 187, 189, 248, 249, 260, 272, 274, 275, 277-279, 281, 282)
19	dialliltetrasolfuro		(96, 105, 133, 166, 189, 231, 245, 260, 274, 281, 282)
20	allilmetilsolfuro (metil-propenil-solfuro)		(31, 94, 96, 97, 101, 102, 105, 130, 133, 135, 137, 166, 183, 189, 249, 272, 273, 275, 277, 281, 282)
21	allilmetildisolfuro (metil-2-propenil-disolfuro)		(31, 94, 97, 101, 102, 105, 130, 133-135, 137, 183, 187, 245, 249, 260, 272, 274-282)
22	allilmetiltrisolfuro (metil-2-propenil-trisolfuro)		(31, 94, 97, 101, 102, 105, 130, 133-135, 137,

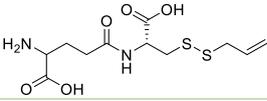
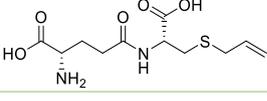
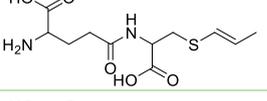
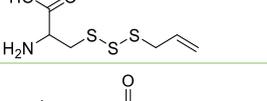
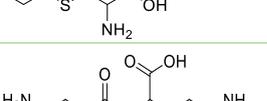
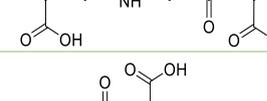
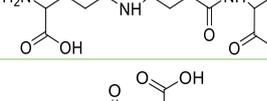
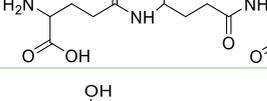
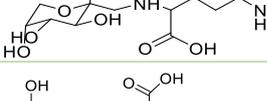
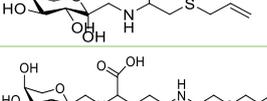
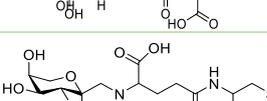
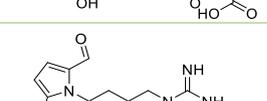
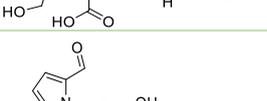
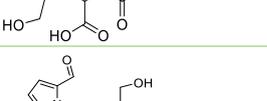
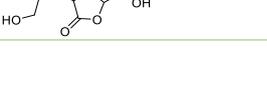
			166, 183, 187, 189, 245, 249, 260, 274, 275, 277, 282)
23	dimetilsolfuro		(97, 133, 137, 189, 249, 273, 277, 282)
24	dimetildisolfuro		(31, 94, 96, 101, 102, 105, 130, 133, 134, 137, 183, 187, 189, 260, 273-275, 277, 281, 282)
25	dimetiltrisolfuro		(31, 97, 101, 102, 105, 123, 130, 133, 134, 137, 166, 183, 187, 189, 231, 245, 249, 260, 281, 282)
26	dimetiltetrasolfuro		(133, 137, 183, 274)
27	allilpropilsolfuro		(102, 183, 260, 272, 277)
28	allilpropildisolfuro		(31, 97, 102, 133, 187, 275)
29	allil-1-propenil solfuro		(189, 277)
30	allil-1-propenil-disolfuro		(97, 101, 183, 189, 260, 277, 280)
31	allil-1-propenil trisolfuro		(183, 260)
32	allil-2,3-epossipropilsolfuro		(274)
33	metil-1-propenil trisolfuro		(183)
34	metilpropiltrisolfuro		(183)
35	metilpropildisolfuro		(31, 96, 101, 102, 133, 137, 273-275, 282)
36	metilbutiltrisolfuro		(274)
37	metil-2-propinilsolfuro		(96)
38	metil-1-propenil-disolfuro		(31, 97, 102, 137, 183, 189, 231, 249, 260, 275, 277)
39	dipropildisolfuro		(130, 183)
40	dipropiltrisolfuro		(183)
41	di-1-propenilsolfuro (1-propene-1,1-tiobis)		(102, 189, 231, 277, 281)
42	di(1-propenil)-disolfuro		(189, 277)

43	propil-1-propenil- solfuro		(96)
44	butil-1-propenil-solfuro		(137)
45	di-2-propenil-trisolfuro		(32, 33, 40, 279, 281)
46	bis-2-propenil-tetrasolfuro		(32, 33, 245)
47	bis-2-propenil-pentasolfuro		(32, 33)
48	2-propenil 2-propenetiosolfonato (pseudoallicina)		(20, 32, 33)
49	metanotiosolfonato		(20)
50	3-vinil-4H-1,2-ditiino (3,4-diidro-3-vinil-1,2-ditiino)		(31, 37, 38, 40, 94, 96-98, 101, 102, 130, 133, 134, 137, 183, 189, 245, 249, 260, 274, 275, 282, 284, 285)
51	2-vinil-4H-1,3-ditiino		(31, 35-38, 40, 96-98, 101, 102, 130, 133, 134, 183, 187, 245, 249, 260, 271, 272, 274, 275, 282, 285)
52	(Z)-ajoene		(128) (34-38, 98, 99, 133, 248, 285)
53	(E)-ajoene		(98, 99, 128) (34-38, 98, 99, 133, 248, 285)
54	Z-4,5,9-tritriadeca-1,6-diene-9-ossido (Z-10-devinilajoene)		(37)
55	E-4,5,9-tritriadeca-1,7-diene-9-ossido (iso-E-10-devinilajoene)		(37)
56	tioacroleina		(3)
57	acido 2-propenesulfonico		(3)
58	acido 2-propene-1-sulfenotioico		(3, 285)
59	2-propene tiolo		(3, 97)
60	garlicnina A		(41, 50)
61	garlicnina B1		(42)

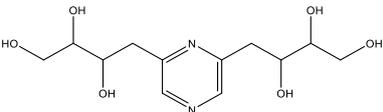
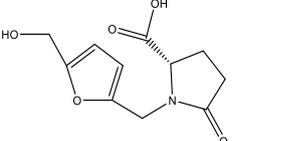
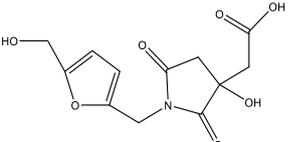
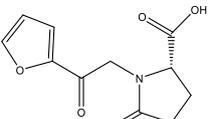
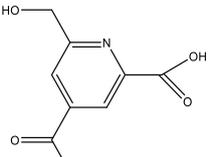
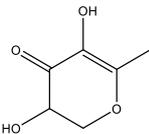
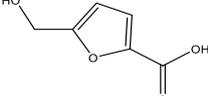
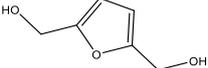
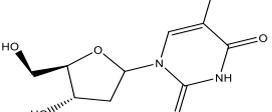
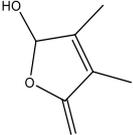
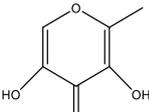
62	garlicnina B2		(43)
63	garlicnina B3		(43)
64	garlicnina B4		(43)
65	garlicnina C1		(42)
66	garlicnina C2		(43)
67	garlicnina C3		(43)
68	garlicnina D (2(E)-3-(metilsulfinil)-2-propenil disolfuro)	2-propenil 	(42, 50)
69	garlicnina E		(44)
70	garlicnina F		(44)
71	garlicnina G		(45)
72	garlicnina K1		(46)
73	garlicnina K2		(46)
74	garlicnina H1		(46)
75	garlicnina I1		(45)
76	garlicnina I2		(47)
77	garlicnina J1		(45)
78	garlicnina J2		(48)

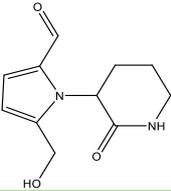
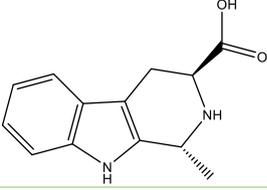
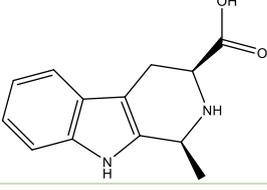
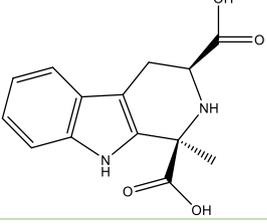
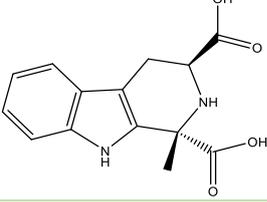
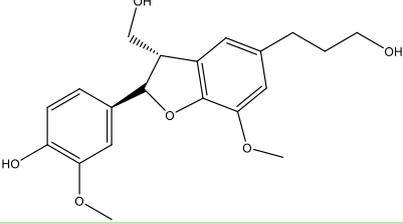
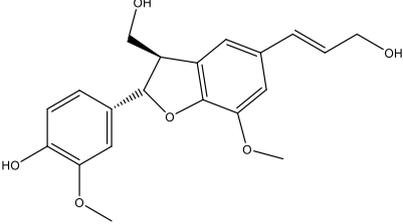
79	garlicnina L1		(44)
80	garlicnina L2		(44)
81	garlicnina L3		(44)
82	garlicnina L4		(44)
83	garlicnina M		(47)
84	garlicnina N		(47)
85	garlicnina O		(47)
86	garlicnina P		(48)
87	garlicnina Q		(48)
88	ajotiolano (5-(allilsulfinil)-3,4-dimetiltiolano-2-olo)		(50)
89	metilisoajoene ((2E)-3-(metilsulfinil)-2-propenil 2-propenil disolfuro)		(50)
90	dimetil selenide	(MeSeMe)	(13, 51-53, 188)
91	acido metansolfenoselenoico metil estere	(MeSeSMe)	(13, 51-53, 188)
92	dimetil diselenide	MeSeSeMe	(13, 51, 53)
93	bis(metiltio)selenide	(MeS)2Se	(13, 51, 53)
94	allil metil selenide	MeSeAll	(13, 51-53, 188)
95	acido 2-propenesulfenoselenoico metilestere	MeSeSAll	(13, 51, 53)
96	(allitio) (metiltio)seleniuro	MeSSeSAll	(13, 51-53)
97	selenocisteina	Se-(Cys)2	(51, 53, 54)
98	selenometilselenocisteina	Se-MeSeCys	(51, 53, 54)
99	selenometionina	Se-Met	(51, 53, 54)
100	proto-eruboside B		(55, 57)

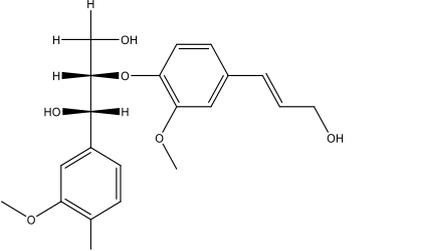
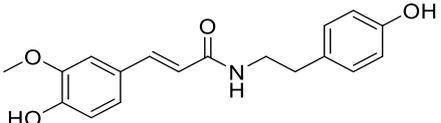
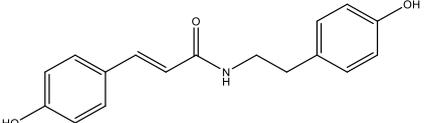
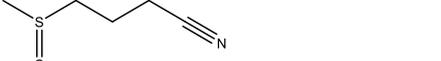
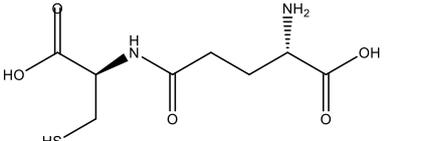
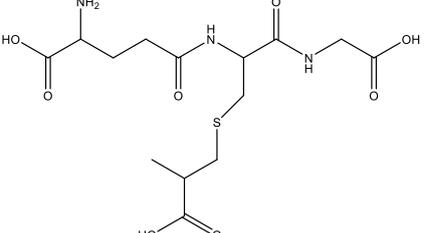
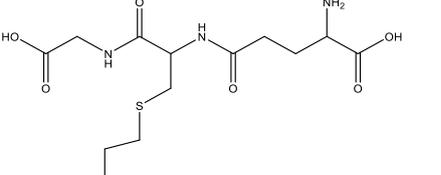
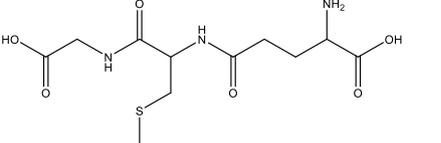
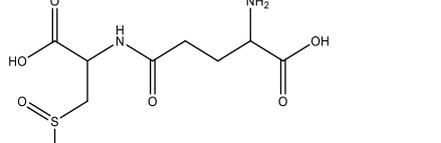
101	eruboside B		(55, 57)
102	proto-iso-eruboside B		(18, 58)
103	iso-eruboside-B		(18, 58)
104	sativoside B1		(55, 59)
105	proto-desgalactotigonina		(Matsuura et al,1989)
106	sativoside R1		(59)
107	sativoside R2		(59)
108	S-allilcisteina		(16, 64, 65, 72, 74, 82, 83, 97, 180, 222, 246, 248, 249, 252, 254, 270)
109	S-1-propenilcisteina		(16, 64, 74, 82)
110	S-allilmercaptocisteina		(74, 76, 222, 286)

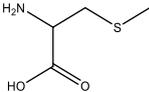
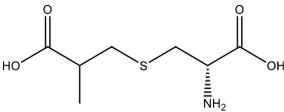
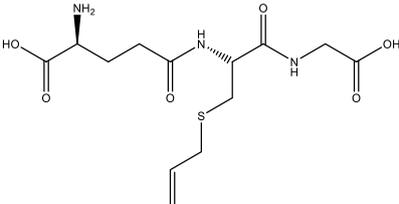
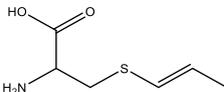
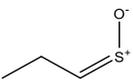
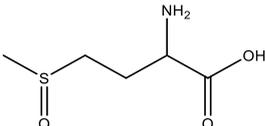
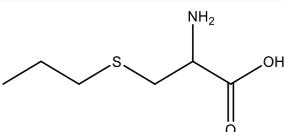
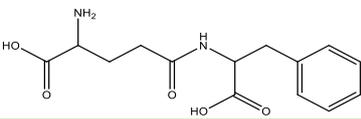
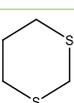
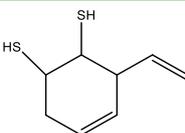
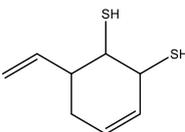
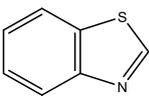
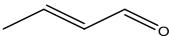
111	γ -glutamyl-S-allilmercaptocisteina		(74, 75, 222)
112	γ -glutamyl-S-allilcisteina		(65, 74, 75, 83, 222, 246, 249, 254, 271)
113	γ -glutamyl-S-1-propenilcisteina		(65, 222, 249)
114	3-alliltrisulfanil-alanina		(74)
115	cis-S-1-propenilcisteina		(12, 76)
116	γ -glutamyl- γ -glutamyl-S-allilcisteina		(12, 74, 287)
117	γ -glutamyl- γ -glutamyl- cis/trans-S-1-propenilcisteina		(12, 74, 287)
118	γ -glutamyl- γ -glutamyl-S-metilcisteina		(12, 74, 287)
119	Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-L-arginina		(77)
120	Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-S-allilcisteina		(65)
121	Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)- γ -glutamyl-S-allilcisteina		(65)
122	Na-(1-deossi-D-fruttos-1-il)- γ -glutamyl-S-1-propenil-cisteina		(65)
123	α -[(2-formil-5-idrossimetil) pirrol-1-il] arginina		(78)
124	acido α -[(2-formil-5-idrossimetil)-pirrol-1-il]-aspartico		(Wakamatsu et al., 2019)
125	1-[5-(1,2-diidrossietil)-2-oxotetraidrofuran-3-il]-5-(idrossimetil)-1H-pirrol-2-carbaldeide		(78)

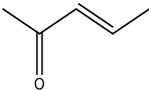
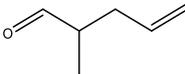
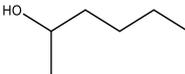
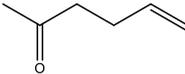
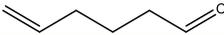
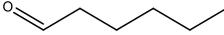
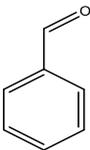
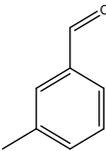
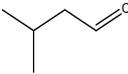
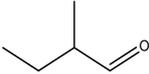
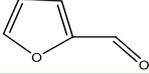
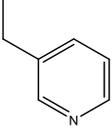
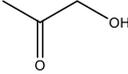
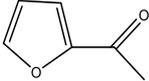
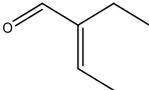
126	acido α -[(2-formil-5-idrossimetil)pirrol-1-il] glutammico		(78)
127	5-idrossimetil-1H-pirrolo-2-carbaldeide		(78)
128	acido 2-formil-5-(idrossimetil)-pirrolo-1-acetico		(78)
129	α -[(2-formil-5-idrossimetil)pirrol-1-il]alanina		(78)
130	4-[7-idrossi-6-(idrossimetil)-7,8-diidro-6H-pirano-[2,3-b]pirazin-3-il]butano-1,2,3-triolo		(78)
131	4-[6-(1,2-diidrossietil)-6,7-diidro-furo[2,3-b]pirazin-3-il]-butano-1,2,3-triolo		(78)
132	4-(6-etil-2-pirazinil)-1,2,3-butanotriolo		(78)
133	(E)-4-(6-metilpirazin-2-il)but-3-ene-1,2-diolo		(78)
134	(E)-4-(5-metilpirazin-2-il)but-3-ene-7,2-diolo		(78)
135	1,2,3-butanotriolo-4-(6-metil-2-pirazinil)		(78)
136	1,2,3-butanotriolo,4,4'-(2,5-pirazinadiil)bis-		(78)

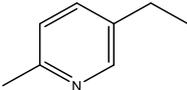
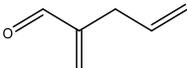
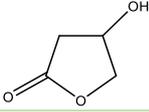
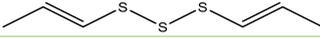
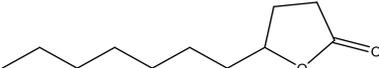
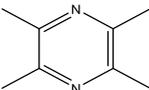
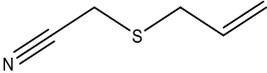
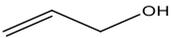
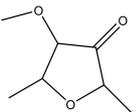
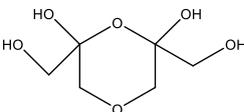
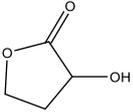
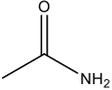
137	1,2,3-butanotriolo,4,4'-(2,6-pirazinadiil)bis-		(78)
138	acido (S)-1-[(5-idrossimetil)furan-2-il]metil]-5-oxopirrolidin-2-carbossilico		(78)
139	acido 3-idrossi-1H-[(5-(idrossimetil)furan-2-il)metil]-2,5-dioxo-3-pirrolidinacetico		(78)
140	acido (2S)-1-[2-(furan-2-il)-2-oxoetil]-5-oxopirrolidin-2-carbossilico		(78)
141	acido 4-acetil-6-(idrossimetil)picolinico		(78)
142	2,3-diidro-3,5-diidrossi-6-metil-4H-piran-4-one		(78, 187)
143	acido 5-idrossimetil-2-furan-carbossilico		(78)
144	idrossimetilfurfurale		(78)
145	timidina		(78)
146	5-idrossi-3,4-dimetil-2(5H)-furanone		(78)
147	5-idrossimaltolo		(78)

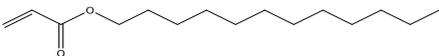
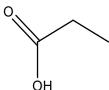
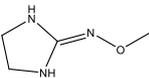
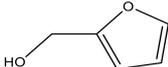
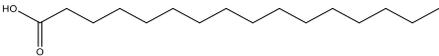
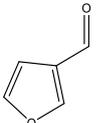
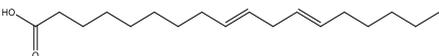
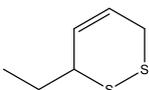
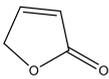
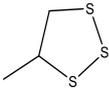
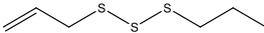
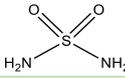
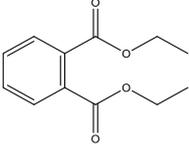
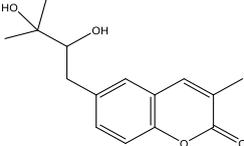
148	cordirrola A		(78)
149	acido (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina-3-carbossilico		(79, 81, 288)
150	acido (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina-3-carbossilico		(79, 81, 288)
151	acido (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina-1,3-dicarbossilico		(79, 81, 288)
152	acido (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-metil-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolina-1,3-dicarbossilico		(79, 81, 288)
153	alcol (-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-diidrodeidrodiconiferilico		(65)
154	alcol (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-deidrodiconiferilico		(65)

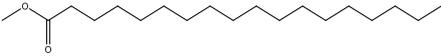
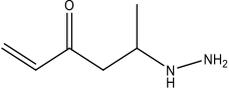
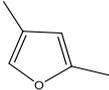
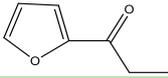
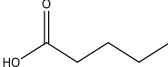
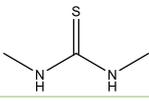
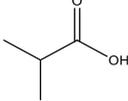
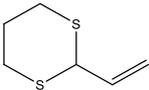
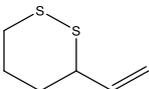
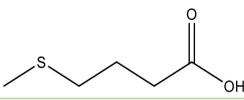
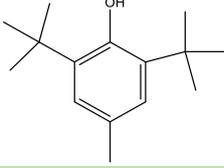
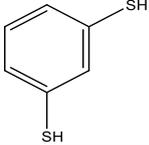
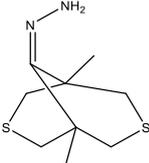
155	treo-guaiacilglicerol- β -O-4'-coniferil etere		(65)
156	<i>N</i> - <i>trans</i> -feruloiltiramina		(65, 283)
157	<i>N</i> - <i>trans</i> -coumaroiltiramina		(65)
158	4-(metilsulfinil)butanonitrile		(166)
159	γ -glutamil cisteina		(20, 222)
160	γ -glutamil- <i>S</i> -(β -carbossipropil) cisteinilglicina		(222)
161	γ -glutamil- <i>S</i> -(1-propenil) cisteinilglicina		(222)
162	γ -glutamil- <i>S</i> -metil-cisteinilglicina		(222)
163	<i>N</i> - γ -glutamil- <i>S</i> -metil-L-cisteina-solfossido		(222)

164	S-metilcisteina		(82, 222, 231, 252, 259)
165	S-2-carbossipropilcisteina		(222)
166	S-allilglutatione		(222)
167	<i>trans</i> -S-(1-propenil)-L-cisteina		(222, 249, 252)
168	acido S-allilsulfenico		(222)
169	metionina solfossido		(222)
170	S-propilcisteina		(222)
171	glutamilfenilalanina		(82, 254, 271) (Oh et al.,2011)
172	allilmercaptano		(94, 249, 277, 279)
173	1,3-ditiano		(31, 94, 96, 101, 105, 189, 275, 277, 281)
174	3-vinil-1,2-ditiacicloes-4-ene		(94, 137, 187, 189, 231, 277, 281)
175	3-vinil-1,2-ditiacicloes-5-ene		(94, 166, 231, 277, 279-281)
176	benzotiazolo		(277)
177	2-butenale		(137, 189, 249, 277)

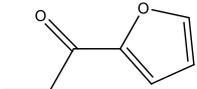
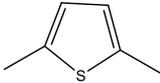
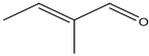
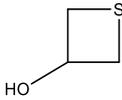
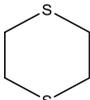
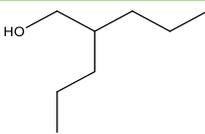
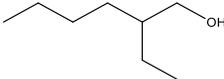
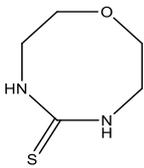
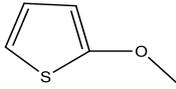
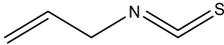
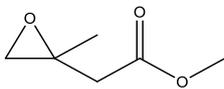
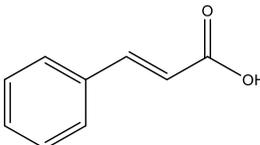
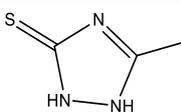
178	3-penten-2-one		(189, 277)
179	2-metil-4-pentenale		(137, 189, 260, 277)
180	2-esanolo		(189, 277)
181	5-esen-2-one		(189, 277)
182	5-esenale		(189, 277)
183	esanale		(189, 260, 277, 281)
184	4-eptenale		(96, 101, 102, 189, 272, 277)
185	2,4-esadienale		(137, 189, 277)
186	benzaldeide		(277)
187	3-metil-benzaldeide		(277)
188	3-metilbutanale		(189, 277)
189	2-metilbutanale		(277)
190	2-pentenale		(137, 277)
191	furfurale		(187, 277)
192	3-etilpiridina		(277)
193	1-idrossi-2-propanone		(277)
194	2-acetilfurano		(277)
195	2-etil-2-butenale		(189, 277)

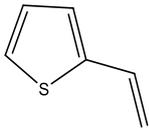
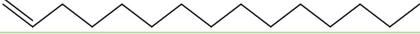
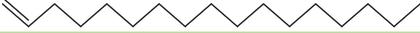
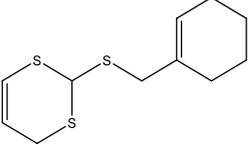
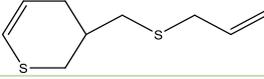
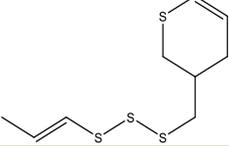
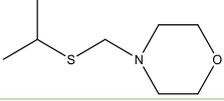
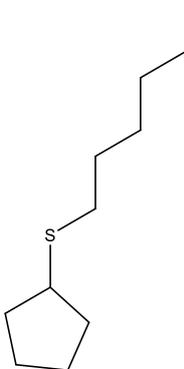
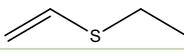
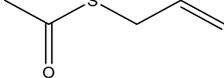
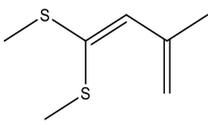
196	5-etil-2-metilpiridina		(277)
197	acetone (2-propanone)		(189, 277, 283)
198	2-propen-1-olo		(94, 97, 231, 249, 277)
199	2-metilene-4-pentenale		(137, 189, 277)
200	1,2-ditiolano		(96, 102, 260, 274, 278)
201	diidro-4-idrossi-2-3H-furanone		(187)
202	di-(1-propenil)-trisolfuro		(277)
203	5-eptildiidro-2-3H-furanone		(187)
204	tetrametilpirazina		(166)
205	2-propeniltioacetoneitrile		(166)
206	alcol allilico		(31, 101, 102, 189, 275)
207	4-metossi-2,5-dimetil-3-2H-furanone		(187)
208	1,3- diidrossiacetone dimero		(283)
209	2-idrossi-gamma-butilrolattone		(283)
210	acetaldeide		(101, 102, 249, 283)
211	acetamide		(283)
212	acido acetico		(187, 281, 283)

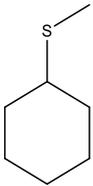
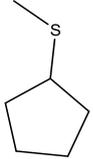
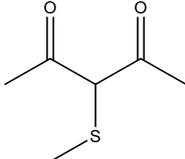
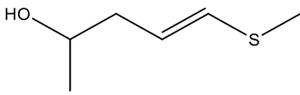
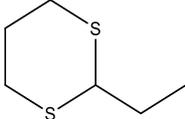
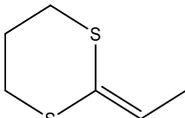
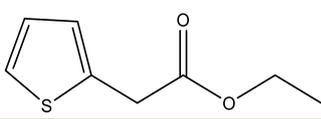
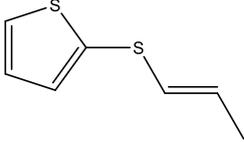
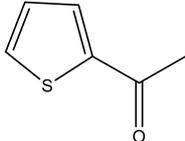
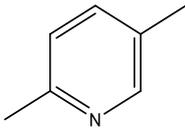
213	dodecilacrilato		(283)
214	acido propanoico		(283)
215	2-metossiimino-imidazolidine		(283)
216	2-furanil-metanolo		(187)
217	eptadecano		(283)
218	acido esadecanoico (acido palmitico)		(283)
219	3-furan-carbossaldeide		(283)
220	acido 9,12-ottadecadienoico		(283)
221	3-metil-tiofene		(260)
222	3-Ethenyl-1,2-dithi-4-ene		(166)
223	3,4-dimetiltiofene		(187, 260, 281)
224	2-5H-furanone		(187)
225	4-metil-1,2,3-tritiolano		(101, 260)
226	allilpropiltrisolfuro		(187, 260)
227	sulfamide		(175)
228	dietilftalato		(175)
229	6-(2,3-diidrossi-3-metil-butil)-metil-benzopiranone		(175)

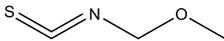
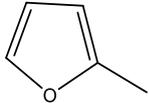
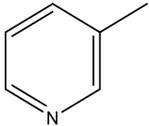
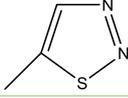
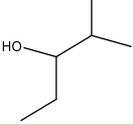
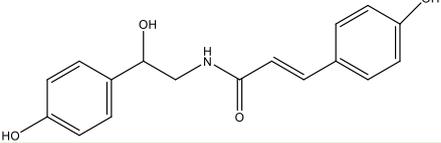
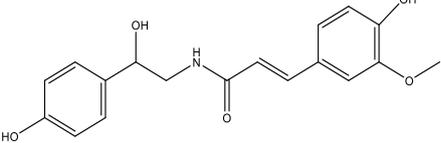
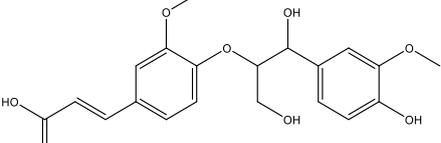
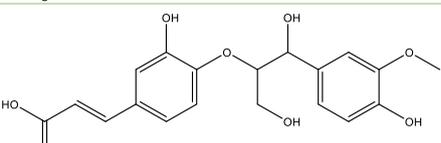
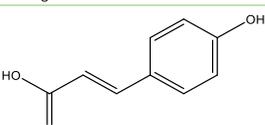
230	metil-stearato		(175)
231	1-metil-(1-pent-4-enoil)-idrazina		(175)
232	propene		(31, 101, 249)
233	2,4-dimetilfurano		(31, 249, 275)
234	2-propionil-furano		(187)
235	acido pentanoico		(279)
236	<i>N,N'</i> dimetil-tio-urea		(279)
237	acido 2-metil-propanoico (acido isobutirrico)		(187)
238	2-vinil-1,3-ditiano		(101, 137, 245, 279)
239	3-vinil-1,2-ditiano		(245)
240	acido-4-metiltio-butirrico		(279)
241	2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenolo		(279)
242	1,3 benzen-ditiolo		(279)
243	1,5-dimetil-3,7-ditiabicciclo nonan-9-idrazone [3.3.1]		(279)

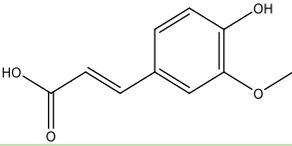
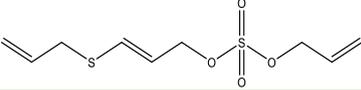
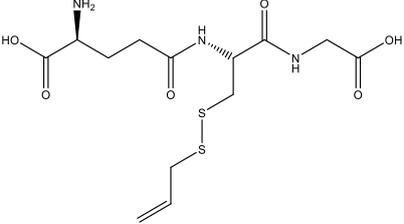
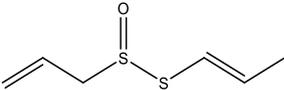
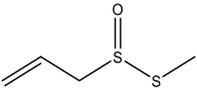
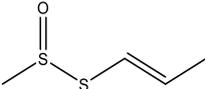
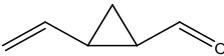
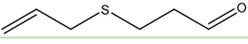
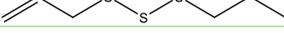
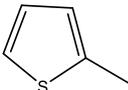
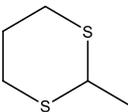
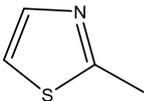
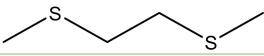
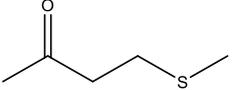
244	5,7-dimetil-2-metiltio-1-azaciclo [3.2.2] azine		(279)
245	2,4-dimetil-tiofene		(105, 279)
246	N-caffeoiltiramina		(65, 289)
247	2-metil-3,4-dididrido-2H-tiopirano		(94)
248	5-metil-1,2,3,4-tetratia-cicloesano		(94)
249	1,3,5-tritiano		(94, 137)
250	diossido di zolfo		(94)
251	1-idrossi-4-metil-2,6-di-tert-butilbenzene		(94)
252	1-metil-3-pirrolin-2-one		(94)
253	feniletilbutirrato		(94)
254	acido-3-(alliltrisulfanil)-2-amminopropanoico		(290)
255	dimetil-solfossido		(187)
256	3,5-dietil-1,2,4-tritiolano		(183, 245)

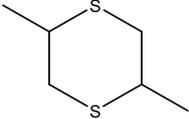
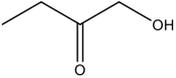
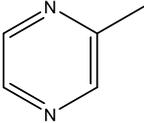
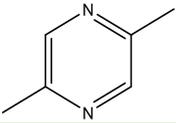
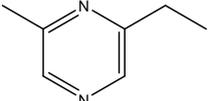
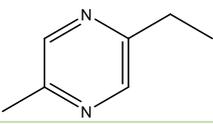
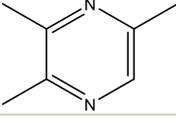
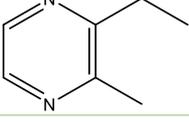
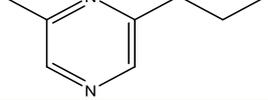
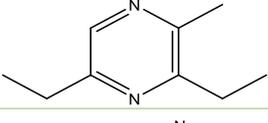
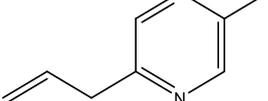
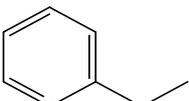
257	1-(2-furanil)-1-propanone		(187)
258	2,5-dimetil-tiofene		(101, 281)
259	2,3-diidrofurano		(281)
260	2-metil-2-butenale		(102, 137, 281)
261	tiaciclobutan-3-olo		(281)
262	2,5-diidrofurano		(281)
263	1,4 ditiano		(281)
264	2-propil-1-pentanolo		(281)
265	2-etil-1-esanolo		(281)
266	1-ossa-4,6-diazacicloottano-5-tione		(281)
267	2-metossi-tiofene		(281)
268	allilisotiocianato		(281)
269	acido-(2-metil-ossiran)-metil-estere-acetico		(281)
270	acido-3-fenil-2-propenoico		(281)
271	1,2-diidro-5-metil-3H-1,2,4-triazol-3-tione		(281)

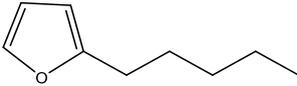
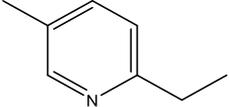
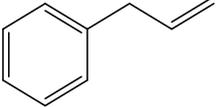
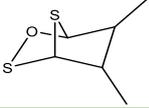
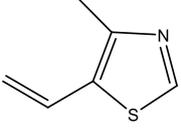
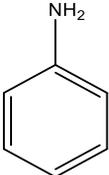
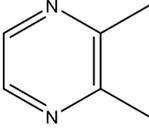
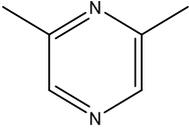
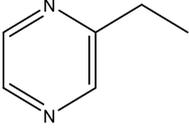
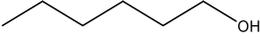
272	2-viniltiofene		(101, 102, 245)
273	3-metiltioopropanale		(97, 274)
274	pentadecene		(274)
275	eptadecene		(274)
276	2-(1-tia-2-cicloesen-6-il)-1,3-ditiazicicloes-5-ene		(274)
277	3-(2-tia-4-pentenil)-1-tiacicloes-5-ene		(274)
278	3-(2,3,4-tritia-5-eptenil)-1-tia-cicloes-5-ene		(274)
279	N-morfolinometil isopropil solfuro		(137)
280	ciclopentilesilsolfuro		(137)
281	etilvinilsolfuro		(274)
282	metilallitioacetato		(137)
283	3-metil-1,1-bis(metiltio)-1,3-butadiene		(137)

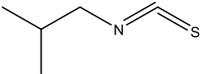
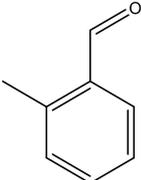
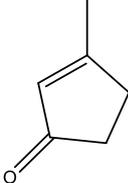
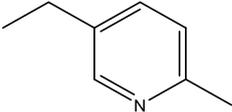
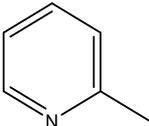
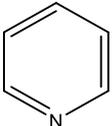
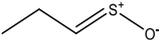
284	metiltiocicloesano		(137)
285	metiltiociclopentano		(137)
286	3-(metiltio)penta-2,4-dione		(137)
287	5-(metiltio)-4-penten-2-olo		(137)
288	2-etil-1,3-ditiano		(101, 137)
289	2-etilidene-1,3-ditiano		(137)
290	etil-2-tiofeneacetato		(137)
291	2-(1-propentio)tiofene		(137)
292	tiazolo		(137)
293	2-tiofenecarbossialdeide		(137)
294	2,5-dimetilpiridina		(137)

295	metossimetilisotiocianato		(137)
296	2-metilfurano		(137)
297	3-metilpiridina		(137)
298	1,3-ditiolano		(96)
299	5-metil-1,2,3-tiadiazolo		(96)
300	propilene solfuro		(31, 96)
301	tiirano		(96)
302	2-metil-3-pentanololo		(96)
303	<i>N</i> -trans-cumaroiloctopamina		(291)
304	<i>N</i> -trans-feruloiloctopamina		(291)
305	acido etere-guacilglicerol-β-ferulico		(291)
306	acido etere-guacilglicerol-β-caffeico		(291)
307	acido-trans-cumarinico		(291)

308	acido-trans-ferulico		(291)
309	trans-acido solforico allil estere 3-allilsolfonil-allil estere		(32, 33)
310	S-allilmercapto-glutatione		(286)
311	acido S-(Z,E)-1-propenilestere-2-propene-1-solfinoioico		(38, 285)
312	acido S-metilestere-2-propenesolfinoioico		(38, 285)
313	acido S (Z,E)-1-propenilestere-metanosolfinoioico		(38, 285)
314	2-vinil-ciclopropanale		(97)
315	3H-1,2-ditolo (1,2-ditiole) (1,2-ditiaciclopenten-3-ene)		(25, 97, 101, 187, 260)
316	allitiopropanale		(97)
317	allilpropiltrisolfuro		(97)
318	metiltiirano		(101, 187)
319	2-metiltiofene		(101)
320	2-metil-1,3-ditiano		(187)
321	2-metiltiazolo		(101)
322	2,5-ditia-esano		(101)
323	3-(metiltio)-propion-aldeide		(187)

324	1,4 ditiaciclopt-5-ene		(101)
325	3,6-dimetil-1,4-ditiano		(101)
326	1-idrossi-2-butanone		(187)
327	metilpirazina		(101)
328	2,5-dimetilpirazina		(101, 102)
329	2-etil-6-metilpirazina		(101)
330	2-etil-5-metilpirazina		(101)
331	trimetilpirazina		(101, 102)
332	2-etil-3-metilpirazina		(101)
333	metilpropilpirazina		(101)
334	3,5-dietil-2-metilpirazina		(101)
335	metilallilpirazina		(101)
336	2-etilpiridina		(101)

337	2-pentil-furano		(101)
338	metiletilpiridina		(101)
339	fenilacetaldeide		(101)
340	5,6-dimetil-2-oxa-3,7-ditiabicyclo[2.2.1]eptano		(50)
341	4-metil-5-viniltiazolo		(31, 275)
342	tetraidro-2,5-dimetiltiofene		(31, 275)
343	anilina		(31, 275)
344	2,3-dimetilpirazina		(102)
345	2,6-dimetilpirazina		(102, 187)
346	etilpirazina		(102)
347	1-esanolo		(31)

348	isobutilisotiocianato		(31, 275)
349	2-metilbenzaldeide		(31, 275)
350	3-metil-2-ciclopentene-1-tione		(31, 102, 275)
351	2-metil-5-etilpiridina		(102)
352	2-metilpiridina		(102)
353	piridina		(102)
354	(Z)-propaniale S-ossido		(24)

Nomenclatura (20)

R-SH tiolo

R-SOH acido solfenico (sulfenic acid)

R-SO-OH acido solfinico (sulfinic acid)

R-SO₂-OH acido solfonico (sulfonic acid)

Sulfini (tiocarbonil S-ossidi)

Indice delle Figure

<i>Figura 1. Allium sativum L. (2)</i>	9
<i>Figura 2. Composizione dei bulbi di aglio (16)</i>	22
<i>Figura 3. Strutture dei sette precursori del sapore nelle specie di Allium (3)</i>	23
<i>Figura 4. γ-glutamyl-S-alch(en)il-L-cisteine isolate dall'aglio (3)</i>	24
<i>Figura 5. Vie biosintetiche dei tiosulfinati nell'aglio (18)</i>	27
<i>Figura 6. Principali composti solforati dell'aglio (16)</i>	30
<i>Figura 7. Decomposizione dell'allicina (3)</i>	32
<i>Figura 8. Formazione di ajoene da allicina (3)</i>	33
<i>Figura 9. Formazione delle garlicnine (49)</i>	35
<i>Figura 10. Meccanismo proposto per la trasformazione dei seleniati del suolo in composti organo selenio dell'aglio (13, 51)</i>	37
<i>Figura 11. Rappresentazione schematica dei diversi tipi di composti associati ai metodi di trattamento dell'aglio (20)</i>	40
<i>Figura 12. Principali prodotti dell'aglio presenti sul mercato (63)</i>	41
<i>Figura 13. Strutture dei principali composti solforati trovati (a) in spicchi d'aglio interi e (b) dopo la frantumazione degli spicchi e (c) dopo la trasformazione in oli o per invecchiamento. Le quantità tipiche sono indicate in mg/g di spicchi di aglio. (16)</i>	50
<i>Figura 14. Panoramica della biosintesi dal solfato dei precursori amminoacidici dei composti dell'aglio. (17, 20)</i>	54

<i>Figura 15. Procedura per la separazione e l'isolamento dei componenti degli estratti di aglio. (50)</i>	62
<i>Figura 16 Meccanismo proposto per la formazione di 3H-1,2-ditiolo (315) da allicina (3) (3)</i>	76
<i>Figura 17 Contenuto di elementi in campioni di aglio provenienti dalla Corea del sud e dalla Cina (236)</i>	92
<i>Figura 18 – Elenco campioni utilizzati per le analisi</i>	99
<i>Figura 19. Elenco analiti considerati nelle analisi LC/MS</i>	100
<i>Figura 20. Parametri della spettrometria di massa.</i>	101
<i>Figura 21– Numero di pubblicazioni inerenti analisi di campioni di aglio mediante GC/MS dal 1980 al 2020.</i>	102
<i>Figura 22. Origine geografica dei campioni di aglio oggetto delle pubblicazioni in esame.</i>	103
<i>Figura 23. Numero di pubblicazioni inerenti analisi di campioni di aglio mediante LC/MS dal 1986 al 2020 e relativo grafico della serie temporale (Mann-Kendall test, $p < 0.05$).</i>	113
<i>Figura 24. Origine geografica dei campioni di aglio oggetto delle pubblicazioni in esame.</i>	114
<i>Figura 25. Relazione tra solvente di estrazione e decade della pubblicazione.</i>	115
<i>Figura 26. Relazione tra lunghezza (corta = 1-10 cm; media = 11-29 cm; lunga = 30 cm e oltre) e granulometria della colonna (inferiore a 3 μm; tra 3.1 e 5 μm; > 5 μm).</i>	117
<i>Figura 27. Relazione tra diametro ($x_s = 0.20-0.29$ cm; $s = 0.30-0.39$ cm; $m = 0.40-0.49$ cm; $l = 0.78-1.9$ cm; $x_l = 2.00-3.30$ cm) e granulometria della colonna (inferiore a 3 μm; tra 3.1 e 5 μm; > 5 μm).</i>	118
<i>Figura 28. Risultati delle analisi GC/MS, campagna raccolta aglio giugno 2020.</i>	125
<i>Figura 29 Analisi delle componenti principali sui dati ottenuti dalle analisi GC/MS.</i>	126
<i>Figura 30. Esempio di un cromatogramma MRM dell'estratto idroalcolico</i>	127
<i>Figura 31. Esempio di un cromatogramma TIC dell'estratto idroalcolico</i>	127
<i>Figura 32. Principal Component Analysis dei risultati delle analisi LC/MS.</i>	128
<i>Figura 33. Principal Component Analysis dei risultati delle analisi LC/MS.</i>	129

BIBLIOGRAFIA

- 1) Pignatti, S., *La Flora d'Italia*. Vol. III. 2002: Edagricole.
- 2) Sanjay, S.S., et al., *Phytochemicals and Potential Biological Activities of Allium sativum Linn.* Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2019. **8**: p. 662-670.
- 3) Block, E., *Garlic and Other Alliums - The Lore and the Science*. 2010, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.
- 4) Fritsch, R.N. and N. Friesen, *Evolution, Domestication and Taxonomy*, in *Allium Crop Science: Recent Advances*, H.D. Rabinowitch and R. Currah, Editors. 2002, CABI Publishing: Wallingford Oxon OX10 8DE, UK. p. 5-30.
- 5) Dufoo-Hurtado, M.D., et al., *Low temperature conditioning of garlic (Allium sativum L.) "seed" cloves induces alterations in sprouts proteome*. Frontiers in Plant Science, 2015. **6**(332).
- 6) FAO. FAOSTAT. 2021 Jan. 2021]; Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data>.
- 7) Rivlin, R.S., *Historical perspective on the use of garlic*. J Nutr, 2001. **131**(3s): p. 951s-4s.
- 8) Galmarini, C.R., *Economic and Academic Importance*, in *The Allium Genomes*, M. Shigyo, A. Khar, and M. Abdelrahman, Editors. 2018, Springer Nature Switzerland: Cham, Switzerland. p. 1-10.
- 9) Suleimon, B., M. Yaqoob, and O.A. Jimoh, *Antioxidant activity and phytochemical analysis of aqueous garlic extracts*. The bioscan, 2016. **11**: p. 2197-2199.
- 10) Sharifi-Rad, J., et al., *Plants of the genus Allium as antibacterial agents: From tradition to pharmacy*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016. **62**(9): p. 57-68.
- 11) Amarakoon, S. and D. Jayasekara, *A review on garlic (Allium sativum L.) as a functional food*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2017. **6**: p. 1777-1780.
- 12) Kodera, Y., et al., *Chemistry of aged garlic: Diversity of constituents in aged garlic extract and their production mechanisms via the combination of chemical and enzymatic reactions (Review)*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020. **19**(2): p. 1574-1584.
- 13) Block, E., *Garlic as a Functional Food: A Status Report*, in *Functional Foods for Disease Prevention II*. 1998, American Chemical Society. p. 125-143.
- 14) Miean, K.H. and S. Mohamed, *Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(6): p. 3106-12.
- 15) Kim, M.-Y., Y.-C. Kim, and S.-K. Chung, *Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(4): p. 633-640.
- 16) Lawson, L.D., *Garlic: A Review of Its Medicinal Effects and Indicated Active Compounds*, in *Phytomedicines of Europe*. 1998, American Chemical Society. p. 176-209.
- 17) Sendl, A., *Allium sativum and Allium ursinum: Part 1 Chemistry, analysis, history, botany*. Phytomedicine, 1995. **1**(4): p. 323-339.
- 18) Lanzotti, V., *The analysis of onion and garlic*. Journal of Chromatography A, 2006. **1112**(1-2): p. 3-22.
- 19) Yoshimoto, N. and K. Saito, *S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus Allium: proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities*. J Exp Bot, 2019. **70**(16): p. 4123-4137.

- 20) Block, E., *The Organosulfur Chemistry of the Genus Allium Implications for the Organic Chemistry of Sulfur*. Angewandte Chemie, 1992. **31**: p. 1135-1178.
- 21) Lancaster, J.E. and M.L. Shaw, *γ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-l-cysteine sulphoxides (flavour precursors) in Allium*. Phytochemistry, 1989. **28**(2): p. 455-460.
- 22) Yamazaki, Y., T. Tokunaga, and T. Okuno, *Quantitative Determination of Eleven Flavor Precursors (S-alk(en)yl cysteine derivatives) in Garlic with an HPLC Method*. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2005. **52**(4): p. 160-166.
- 23) Krest, I. and M. Keusgen, *Quality of Herbal Remedies from Allium sativum: Differences between Alliinase from Garlic Powder and Fresh Garlic*. Planta Medica, 1999. **65**(2): p. 139-143.
- 24) Imai, S., et al., *An onion enzyme that makes the eyes water*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 685-685.
- 25) Block, E., et al., *Allium Chemistry: Use of New Instrumental Techniques to "see" Reactive Organosulfur Species Formed upon Crushing Garlic and Onion*. Pure and Applied Chemistry, 2010. **82**: p. 535-539.
- 26) Marchese, A., et al., *Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **52**: p. 49-56.
- 27) Kubec, R., et al., *Allium Discoloration: Precursors Involved in Onion Pinking and Garlic Greening*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(16): p. 5089-5094.
- 28) De Iseppi, A., et al., *Garlic greening: Pigments' biosynthesis and control strategies*. Italian Journal of Food Science, 2021. **33**(1): p. 73-83.
- 29) Freeman, F. and Y. Kodera, *Garlic Chemistry: Stability of S-(2-Propenyl)-2-Propene-1-sulfinothioate (Allicin) in Blood, Solvents, and Simulated Physiological Fluids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(9): p. 2332-2338.
- 30) Abe, K., Y. Hori, and T. Myoda, *Volatile compounds of fresh and processed garlic*. Experimental and therapeutic medicine, 2020. **19**(2): p. 1585-1593.
- 31) Yu, T.H., C.M. Wu, and Y.C. Liou, *Volatile compounds from garlic*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989. **37**(3): p. 725-730.
- 32) Hu, Q., et al., *Isolation and Identification of Organosulfur Compounds Oxidizing Canine Erythrocytes from Garlic (Allium sativum)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(5): p. 1059-1062.
- 33) Yang, Q., et al., *Organosulfur Compounds from Garlic (Allium sativum) Oxidizing Canine Erythrocytes*. Zeitschrift für Naturforschung C, 2003. **58**(5-6): p. 408-412.
- 34) Apitz-Castro, R., et al., *Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure*. Thrombosis Research, 1983. **32**(2): p. 155-169.
- 35) Block, E., et al., *The chemistry of alkyl thiosulfate esters. 8. (E,Z)-Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic*. Journal of the American Chemical Society, 1984. **106**(26): p. 8295-8296.
- 36) Block, E., et al., *The chemistry of alkyl thiosulfinate esters. 9. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic, and synthetic studies*. Journal of the American Chemical Society, 1986. **108**(22): p. 7045-7055.
- 37) Yoshida, H., et al., *Antimicrobial activity of a compound isolated from an oil-macerated garlic extract*. Biosci Biotechnol Biochem, 1998. **62**(5): p. 1014-7.

- 38) Yoshida, H., et al., *An organosulfur compound isolated from oil-macerated garlic extract, and its antimicrobial effect*. Biosci Biotechnol Biochem, 1999. **63**(3): p. 588-90.
- 39) Yu, T.-H. and C.-M. Wu, *Stability of Allicin in Garlic Juice*. Journal of Food Science, 1989. **54**(4): p. 977-981.
- 40) Abu-Lafi, S., et al., *The use of the 'Cryogenic' GC/MS and on-column injection for study of organosulfur compounds of the Allium sativum*. Journal of Food Composition and Analysis, 2004. **17**(2): p. 235-245.
- 41) El-Aasr, M., et al., *Garlicnin A from the Fraction Regulating Macrophage Activation of Allium sativum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2011. **59**(11): p. 1340-1343.
- 42) Nohara, T., et al., *Garlicnins B(1), C(1), and D, from the fraction regulating macrophage activation of Allium sativum*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2012. **60**(6): p. 747-51.
- 43) Nohara, T., et al., *Cyclic sulfoxides garlicnins B2, B3, B4, C2, and C3 from Allium sativum*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2013. **61**(7): p. 695-9.
- 44) Nohara, T., et al., *Acyclic sulfides, garlicnins L-1-L-4, E, and F, from Allium sativum*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2014. **62**(5): p. 477-82.
- 45) Ono, M., et al., *Atypical Cyclic Sulfides, Garlicnins G, I, and J, Extracted from Allium sativum*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2017. **65**(1): p. 102-106.
- 46) Nohara, T., et al., *Cyclic sulfoxides-garlicnins K1, K2, and H1-extracted from Allium sativum*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2015. **63**(2): p. 117-21.
- 47) Nohara, T., et al., *New cyclic sulfides, garlicnins I(2), M, N, and O, from Allium sativum*. J Nat Med, 2018. **72**(1): p. 326-331.
- 48) Nohara, T., et al., *New cyclic sulfides extracted from Allium sativum: garlicnins P, J(2), and Q*. J Nat Med, 2018. **72**(1): p. 335-341.
- 49) Nohara, T., et al., *Antitumor Allium Sulfides*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2017. **65**(3): p. 209-217.
- 50) Block, E., et al., *Ajothiolanes: 3,4-Dimethylthiolane Natural Products from Garlic (Allium sativum)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018. **66**(39): p. 10193-10204.
- 51) Block, E. *Organoselenium and Organosulfur Phytochemicals from Genus Allium Plants (Onion, Garlic): Relevance for Cancer Protection*. in *Food Factors for Cancer Prevention*. 1997. Tokyo: Springer Japan.
- 52) Cai, X.-J., et al., *Allium Chemistry: Identification of Natural Abundance Organoselenium Compounds in Human Breath after Ingestion of Garlic Using Gas Chromatography with Atomic Emission Detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(7): p. 1751-1753.
- 53) Block, E., et al., *Allium chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath*. Pure and Applied Chemistry, 1996. **68**(4): p. 937-944.
- 54) Dumont, E., et al., *Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS): a powerful combination for selenium speciation in garlic (Allium sativum)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **384**(5): p. 1196.
- 55) Matsuura, H., *Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease*. J Nutr, 2001. **131**(3s): p. 1000s-5s.
- 56) Sobolewska, D., et al., *Steroid saponins from the genus Allium*. Phytochemistry Reviews, 2016. **15**(1): p. 1-35.

- 57) Matsuura, H., et al., *A Furostanol Glycoside from Garlic, Bulbs of Allium sativum L.* CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1988. **36**(9): p. 3659-3663.
- 58) Peng, J.P., et al., *[Two new steroidal saponins from Allium sativum and their inhibitory effects on blood coagulability]*. Yao Xue Xue Bao, 1996. **31**(8): p. 607-12.
- 59) Matsuura, H., et al., *Further Studies on Steroidal Glycosides from Bulbs, Roots and Leaves of Allium sativum L.* CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1989. **37**(10): p. 2741-2743.
- 60) Ma, Q., J. Luo, and L. Kong, *PREPARATIVE ISOLATION OF STEROIDAL SAPONINS FROM GARLIC (ALLIUM SATIVUM L.) USING HIGH-SPEED COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETECTION*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2011. **34**(17): p. 1997-2007.
- 61) Brodnitz, M.H., J.V. Pascale, and L. Van Derslice, *Flavor components of garlic extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1971. **19**(2): p. 273-275.
- 62) Whitaker, J.R., *Development of Flavor, Odor, and Pungency in Onion and Garlic*, in *Advances in Food Research*, C.O. Chichester, E.M. Mrak, and G.F. Stewart, Editors. 1976, Academic Press. p. 73-133.
- 63) Amagase, H., *Clarifying the real bioactive constituents of garlic*. J Nutr, 2006. **136**(3 Suppl): p. 716s-725s.
- 64) Lawson, L.D., *Bioactive Organosulfur Compounds of Garlic and Garlic Products*, in *Human Medicinal Agents from Plants*. 1993, American Chemical Society. p. 306-330.
- 65) Matsutomo, T., T.D. Stark, and T. Hofmann, *Targeted screening and quantitative analyses of antioxidant compounds in aged-garlic extract*. European Food Research and Technology, 2018. **244**(10): p. 1803-1814.
- 66) Kang, O.J., *Physicochemical Characteristics of Black Garlic after Different Thermal Processing Steps*. Preventive Nutrition Food Science, 2016. **21**(4): p. 348-354.
- 67) Ryu, J.H. and D. Kang, *Physicochemical Properties, Biological Activity, Health Benefits, and General Limitations of Aged Black Garlic: A Review*. Molecules, 2017. **22**(6).
- 68) Ide, N., H. Matsuura, and Y. Itakura, *Scavenging Effect of Aged Garlic Extract and its Constituents on Active Oxygen Species*. Phytotherapy Research, 1996. **10**(4): p. 340-341.
- 69) Botas, J., et al., *A Comparative Study of Black and White Allium sativum L.: Nutritional Composition and Bioactive Properties*. Molecules, 2019. **24**(11).
- 70) Kimura, S., et al., *Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application*. J Food Drug Anal, 2017. **25**(1): p. 62-70.
- 71) Jang, H.J., et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents*. Food Sci Biotechnol, 2018. **27**(1): p. 219-225.
- 72) Kodera, Y., et al., *Physical, chemical, and biological properties of s-allylcysteine, an amino acid derived from garlic*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(3): p. 622-32.
- 73) Lu, X., et al., *Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract*. Journal of Food and Drug Analysis, 2017. **25**(2): p. 340-349.
- 74) Kurita, M., T. Matsutomo, and Y. Kodera, *3-Allyltrisulfanyl-alanine Formation during the Preparation of Aged Garlic Extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020. **68**(49): p. 14577-14583.
- 75) Fujii, T., T. Matsutomo, and Y. Kodera, *Changes of S-Allylmercaptocysteine and γ -Glutamyl-S-allylmercaptocysteine Contents and Their Putative Production Mechanisms in Garlic*

- Extract during the Aging Process*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018. **66**(40): p. 10506-10512.
- 76) Matsutomo, T. and Y. Kodera, *Development of an Analytic Method for Sulfur Compounds in Aged Garlic Extract with the Use of a Postcolumn High Performance Liquid Chromatography Method with Sulfur-Specific Detection*. J Nutr, 2016. **146**(2): p. 450s-455s.
 - 77) Ryu, K., et al., *N alpha-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-arginine, an antioxidant compound identified in aged garlic extract*. The Journal of Nutrition, 2001. **131**(3s): p. 972s-976s.
 - 78) Wakamatsu, J., T.D. Stark, and T. Hofmann, *Antioxidative Maillard Reaction Products Generated in Processed Aged Garlic Extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019. **67**(8): p. 2190-2200.
 - 79) Ichikawa, M., et al., *Tetrahydro-beta-carboline derivatives in aged garlic extract show antioxidant properties*. J Nutr, 2006. **136**(3 Suppl): p. 726s-731s.
 - 80) Ide, N., et al., *Antioxidants in Processed Garlic: Tetrahydro- β -carboline Derivatives in Aged Garlic Extract*, in *Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention*. 2003, American Chemical Society. p. 250-263.
 - 81) Ichikawa, M., et al., *Antioxidant effects of tetrahydro-beta-carboline derivatives identified in aged garlic extract*. Biofactors, 2002. **16**(3-4): p. 57-72.
 - 82) Kim, S., et al., *UPLC/ESI-MS/MS analysis of compositional changes for organosulfur compounds in garlic (*Allium sativum* L.) during fermentation*. Food Chem, 2016. **211**: p. 555-9.
 - 83) Beato, V.M., et al., *Effect of Processing and Storage Time on the Contents of Organosulfur Compounds in Pickled Blanched Garlic*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(13): p. 3485-3491.
 - 84) Montaño, A., et al., *Vitamin content and amino acid composition of pickled garlic processed with and without fermentation*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(24): p. 7324-30.
 - 85) Constenla, D.T. and J.E. Lozano, *Effect of pretreatments and processing conditions on the chemical, physical, microbiological and sensory characteristics of garlic paste*. Journal of Food Process Engineering, 2005. **28**(3): p. 313-329.
 - 86) Borlinghaus, J., et al. *Allicin: Chemistry and Biological Properties* Molecules, 2014. **19** 12591-12618 DOI: 10.3390/molecules190812591.
 - 87) Ramirez, D.A., et al., *Analytical methods for bioactive sulfur compounds in Allium: An integrated review and future directions*. Journal of Food Composition and Analysis, 2017. **61**: p. 4-19.
 - 88) Matsuura, H., et al., *Changes in contents of gamma-glutamyl peptides and fructan during growth of Allium sativum*. Planta Med, 1996. **62**(1): p. 70-1.
 - 89) Ichikawa, M., et al., *Determination of Seven Organosulfur Compounds in Garlic by High-Performance Liquid Chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(5): p. 1535-1540.
 - 90) McGorin, R.J., *The Significance of Volatile Sulfur Compounds in Food Flavors*, in *Volatile Sulfur Compounds < break > < / break > in Food*. 2011, American Chemical Society. p. 3-31.
 - 91) Block, E., et al., *Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(12): p. 2418-2430.

- 92) Block, E., D. Putman, and S.H. Zhao, *Allium chemistry: GC-MS analysis of thiosulfinates and related compounds from onion, leek, scallion, shallot, chive, and Chinese chive*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(12): p. 2431-2438.
- 93) Cavallito, C.J. and J.H. Bailey, *Allicin, the Antibacterial Principle of Allium sativum. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action*. Journal of the American Chemical Society, 1944. **66**(11): p. 1950-1951.
- 94) Kim, N.Y., et al., *Volatile distribution in garlic (Allium sativum L.) by solid phase microextraction (SPME) with different processing conditions*. Food Science and Biotechnology, 2011. **20**(3): p. 775-782.
- 95) Kimbaris, A.C., et al., *Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (Allium sativum)*. Ultrason Sonochem, 2006. **13**(1): p. 54-60.
- 96) Lee, S.N., N.S. Kim, and D.S. Lee, *Comparative study of extraction techniques for determination of garlic flavor components by gas chromatography-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**(4): p. 749-756.
- 97) Kim, S.M., et al., *Effect of Soybean Oil on Garlic Volatile Compounds Isolated by Distillation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(2): p. 449-452.
- 98) Locatelli, D.A., et al., *Home-cooked garlic remains a healthy food*. Journal of Functional Foods, 2015. **16**: p. 1-8.
- 99) Locatelli, D.A., et al., *Solid phase microextraction coupled to liquid chromatography. Analysis of organosulphur compounds avoiding artifacts formation*. Food Chemistry, 2014. **157**: p. 199-204.
- 100) Yoo, S.K. and L.M. Pike, *Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-l-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in Allium species*. Scientia Horticulturae, 1998. **75**(1): p. 1-10.
- 101) Yu, T.-H., L.-Y. Lin, and C.-T. Ho, *Volatile Compounds of Blanched, Fried Blanched, and Baked Blanched Garlic Slices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(6): p. 1342-1347.
- 102) Yu, T.H., C.M. Wu, and C.T. Ho, *Volatile compounds of deep-oil fried, microwave-heated and oven-baked garlic slices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. **41**(5): p. 800-805.
- 103) Locatelli, D.A., et al., *Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition*. Food Chemistry, 2017. **220**: p. 219-224.
- 104) Iranshahi, M., *A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods*. Journal of Essential Oil Research, 2012. **24**(4): p. 393-434.
- 105) Boubechiche, Z., et al., *Comparison of Volatile Compounds Profile and Antioxydant Activity of Allium sativum Essential Oils Extracted using Hydrodistillation, Ultrasound-Assisted and Sono-Hydrodistillation Processes*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2017. **51**: p. s281-s285.
- 106) Mathialagan, R., et al., *Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) of Allicin from Garlic (Allium sativum L.)* Chemical Engineering Transactions, 2017. **56**: p. 1747-1752.
- 107) Mochizuki, E., et al., *Simultaneous Determination of Alliin and Allicin in Allium Plants and Their Products by Liquid Chromatography*. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 1997. **80**(5): p. 1052-1056.

- 108) Ziegler, S.J. and O. Sticher, *HPLC of S-Alk(en)yl-L-cysteine Derivatives in Garlic including Quantitative Determination of (+)-S-Allyl-L-cysteine Sulfoxide (Alliin)*. *Planta Med*, 1989. **55**(4): p. 372-8.
- 109) Arnault, I., et al., *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. **991**(1): p. 69-75.
- 110) Yoo, M., et al., *Validation of high performance liquid chromatography methods for determination of bioactive sulfur compounds in garlic bulbs*. *Food Science and Biotechnology*, 2010. **19**(6): p. 1619-1626.
- 111) Thomas, D.J. and K.L. Parkin, *Quantification of Alk(en)yl-L-cysteine Sulfoxides and Related Amino Acids in Alliums by High-Performance Liquid Chromatography*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. **42**(8): p. 1632-1638.
- 112) Tsuge, K., M. Kataoka, and Y. Seto, *Determination of S-Methyl-, S-Propyl-, and S-Propenyl-L-Cysteine Sulfoxides by Gas Chromatography–Mass Spectrometry after tert-Butyldimethylsilylation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**(16): p. 4445-4451.
- 113) Kubec, R., M. Svobodová, and J. Velíšek, *Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides*. *Journal of chromatography. A*, 1999. **862**(1): p. 85-94.
- 114) Edwards, S.J., et al., *The analysis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavour precursors) from species of Allium by high performance liquid chromatography*. *Phytochemical Analysis*, 1994. **5**(1): p. 4-9.
- 115) Doran, J.A., et al., *S-Alk(en)yl- l-cysteine Sulfoxides and Relative Pungency Measurements of Photosynthetic and Nonphotosynthetic Tissues of Allium porrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(20): p. 8243-8250.
- 116) Iberl, B., et al., *Quantitative Determination of Allicin and Alliin from Garlic by HPLC**. *Planta Med*, 1990. **56**(03): p. 320-326.
- 117) Krest, I., J. Glodek, and M. Keusgen, *Cysteine Sulfoxides and Alliinase Activity of Some Allium Species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000. **48**(8): p. 3753-3760.
- 118) Mütsch-Eckner, M., O. Sticher, and B. Meier, *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of S-alk(en)yl-l-cysteine derivatives in Allium sativum including the determination of (+)-S-allyl-l-cystein sulphoxide, γ -l-glutamyl-S-allyl-l-cysteine and γ -l-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-l-cysteine*. *Journal of Chromatography A*, 1992. **625**(2): p. 183-190.
- 119) Auger, J., et al., *Analysis of Allium sulfur amino acids by HPLC after derivatization*. *Chromatographia*, 1993. **36**(1): p. 347-350.
- 120) Randle, W.M., et al., *Quantifying Onion Flavor Compounds Responding to Sulfur Fertility-Sulfur Increases Levels of Alk(en)yl Cysteine Sulfoxides and Biosynthetic Intermediates*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1995. **120**(6): p. 1075-1081.
- 121) Al-Dulimy, E.M.K., F.M. Abid, and M.J.A. Al-Gani, *Determination of Active Ingredients (Alliin & Allicin) in Different species of Garlic Extracts By Using High Performance Liquid Chromatography*. *Diyala Journal For Pure Science*, 2013. **9**(2): p. 70-81.
- 122) Jansen, H., B. Müller, and K. Knobloch, *Allicin Characterization and its Determination by HPLC*. *Planta Medica*, 1987. **53**(6): p. 559-562.
- 123) Zhou, C., et al., *Quantitation of Allicin in Garlic-based Products: Comparisons among Spectrophotometry, GC and HPLC*. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2015. **4**: p. 269-277.

- 124) Bocchini, P., et al., *Determination of diallyl thiosulfinate (allicin) in garlic (Allium sativum L.) by high-performance liquid chromatography with a post-column photochemical reactor.* Analytica Chimica Acta, 2001. **441**(1): p. 37-43.
- 125) Calvey, E.M., et al., *Allium Chemistry: Supercritical Fluid Extraction and LC–APCI–MS of Thiosulfonates and Related Compounds from Homogenates of Garlic, Onion, and Ramp. Identification in Garlic and Ramp and Synthesis of 1-Propanesulfinothioic Acid S-Allyl Ester.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(11): p. 4406-4413.
- 126) Rybak, M.E., E.M. Calvey, and J.M. Harnly, *Quantitative Determination of Allicin in Garlic: Supercritical Fluid Extraction and Standard Addition of Alliin.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(4): p. 682-687.
- 127) del Valle, J.M., C. Mena, and M. Budinich, *Extraction of garlic with supercritical CO₂ and conventional organic solvents.* Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2008. **25**: p. 532-542.
- 128) Ramirez, D.A., et al., *Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples.* Food Chemistry, 2017. **215**: p. 493-500.
- 129) Yoo, M., et al., *Validated HPLC Method and Temperature Stabilities for Oil-Soluble Organosulfur Compounds in Garlic Macerated Oil.* Journal of Chromatographic Science, 2013. **52**(10): p. 1165-1172.
- 130) Martín-Lagos, R.A., M.F.O. Serrano, and M.D.R. Lopez, *Determination of organic sulphur compounds in garlic extracts by gas chromatography and mass spectrometry.* Food Chemistry, 1995. **53**(1): p. 91-93.
- 131) Martín-Lagos, R.A., M.F.O. Serrano, and M.D. Ruiz-López, *Comparative study by gas chromatography-mass spectrometry of methods for the extraction of sulfur compounds in Allium cepa L.* Food Chemistry, 1992. **44**(4): p. 305-308.
- 132) Yan, X., Z. Wang, and P. Barlow, *Quantitative estimation of garlic oil content in garlic oil based health products.* Food Chemistry, 1992. **45**(2): p. 135-139.
- 133) Lawson, L.D., Z.J. Wang, and B.G. Hughes, *Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfonates in commercial garlic products.* Planta Medica, 1991. **57**(4): p. 363-370.
- 134) Yan, X., Z. Wang, and P. Barlow, *Quantitative determination and profiling of total sulphur compounds in garlic health products using a simple GC procedure.* Food Chemistry, 1993. **47**(3): p. 289-294.
- 135) Weinberg, D.S., et al., *Identification and quantification of organosulfur compliance markers in a garlic extract.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. **41**(1): p. 37-41.
- 136) Mondy, N., et al., *Comparison of GC-MS and HPLC for the analysis of Allium volatiles.* Chromatographia, 2001. **53**(1): p. S356-S360.
- 137) Calvo-Gómez, O., J. Morales-López, and M.G. López, *Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation.* Journal of Chromatography A, 2004. **1036**(1): p. 91-93.
- 138) Ferary, S., E. Thibout, and J. Auger, *Direct Analysis of Odors Emitted by Freshly Cut Allium Using Combined High-performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1996. **10**(11): p. 1327-1332.
- 139) Kataoka, H., A. Ishizaki, and K. Saito, *Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications.* Analytical Methods, 2016. **8**(29): p. 5773-5788.

- 140) Merkle, S., K. Kleeberg, and J. Fritsche, *Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis—A Review*. Chromatography, 2015. **2**: p. 293-381.
- 141) Keusgen, M., *TLC analysis of Allium sativum constituents*. Planta Med, 1997. **63**(1): p. 93-4.
- 142) Muoio, R., P. Casoria, and B. Menale, *A comparative study of sulphur content of some Allium L. Species*. Economic Botany, 2004. **58**(2): p. 227-230.
- 143) Kanaki, N.S. and M. Rajani, *Development and Validation of a Thin-Layer Chromatography-Densitometric Method for the Quantitation of Alliin from Garlic (Allium sativum) and Its Formulations*. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2005. **88**(5): p. 1568-1570.
- 144) Siddiqui, N., R. Mothana, and P. Alam, *Quantitative determination of alliin in dried garlic cloves and products by high-performance thin-layer chromatography*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2016. **15**: p. 1759-1759.
- 145) Chargaff, E., C. Levine, and C. Green, *TECHNIQUES FOR THE DEMONSTRATION BY CHROMATOGRAPHY OF NITROGENOUS LIPIDE CONSTITUENTS, SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS, AND REDUCING SUGARS*. Journal of Biological Chemistry, 1948. **175**(1): p. 67-71.
- 146) Matsukawa, T., S. Yurugi, and T. Toshiro Matsuoka, *Products of the Reaction between Thiamine and Ingredients of the Plants of Allium Genus: Detection of Allithiamine and Its Homologs*. Science, 1953. **118**: p. 325-327.
- 147) Fujiwara, M., M. Yoshimura, and S. Tsuno, " *Allithiamine* ", a newly found derivative of vitamin B1 III. *On the allicin homologues in the plants of the Allium species*. The Journal of Biochemistry (Tokyo), 1955. **42**(2): p. 591-601.
- 148) Bloem, E., S. Haneklaus, and E. Schnug, *Influence of Fertilizer Practices on S-Containing Metabolites in Garlic (Allium sativum L.) under Field Conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(19): p. 10690-10696.
- 149) Diriba-Shiferaw, G., et al., *Growth and Nutrients Content and Uptake of Garlic (Allium sativum L.) as Influenced by Different Types of Fertilizers and Soils*. Science, Technology and Arts Research Journal, 2013. **2**: p. 35.
- 150) Kubec, R., M. Svobodová, and J. Velíšek, *Distribution of S-Alk(en)ylcysteine Sulfoxides in Some Allium Species. Identification of a New Flavor Precursor: S-Ethylcysteine Sulfoxide (Ethiin)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(2): p. 428-433.
- 151) Keusgen, M., et al., *Development of a biosensor specific for cysteine sulfoxides*. Biosensors and Bioelectronics, 2003. **18**(5): p. 805-812.
- 152) Lundegårdh, B., et al., *Impact of Different Green Manures on the Content of S-Alk(en)yl-l-cysteine Sulfoxides and l-Ascorbic Acid in Leek (Allium porrum)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(6): p. 2102-2111.
- 153) Stoll, A. and E. Seebeck, *Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. 1. Mitteilung über Allium-Substanzen*. Helvetica Chimica Acta, 1948. **31**(1): p. 189-210.
- 154) Stoll, A. and E. Seebeck, *Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls*. Experientia, 1947. **3**(3): p. 114-115.
- 155) Freeman, G.G. and F. McBreen, *A Rapid Spectrophotometric Method of Determination of Thiolsulphinates in Onion (Allium cepa) and its Significance in Flavour Studies*. Biochemical Society Transactions, 1973. **1**(5): p. 1150-1152.

- 156) Miething, G., *Allicin und Öl in Knoblauchzwiebeln—HPLC-Gehaltsbestimmung*. Dtsch Apoth Ztg, 1984. **125**: p. 2049-2050.
- 157) Wang, H., et al., *Quantitative Determination of Allicin in Allium sativum L. Bulbs by UPLC*. Chromatographia, 2010. **71**(1): p. 159-161.
- 158) Sekar, N., et al., *Determination of allicin in Allium sativum using high performance liquid chromatography and study of genotoxic effect on human leukocytes*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2015. **8**(8): p. 153-156.
- 159) Lawson, L.D., S.G. Wood, and B.G. Hughes, *HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates*. Planta Medica, 1991. **57**(3): p. 263-70.
- 160) Bauer, R., et al., *Enantiomeric separation of racemic thiosulphinat esters by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1991. **541**: p. 464-468.
- 161) Biomed Res Int.
- 162) Calvey, E.M., et al., *Off-Line Supercritical Fluid Extraction of Thiosulfinates from Garlic and Onion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(6): p. 1335-1341.
- 163) Liu, J., et al., *Determination of garlic phenolic compounds using supercritical fluid extraction coupled to supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 2018. **159**: p. 513-523.
- 164) de Diego, M., et al., *Validated liquid chromatographic method for quantitative determination of allicin in garlic powder and tablets*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(16): p. 2703-2707.
- 165) Bayer, E., P. Gfrörer, and C. Rentel, *Coordination-Ionspray-MS (CIS-MS), a Universal Detection and Characterization Method for Direct Coupling with Separation Techniques*. Angewandte Chemie International Edition, 1999. **38**(7): p. 992-995.
- 166) Farag, M.A., et al., *Phytochemical Profiles and Antimicrobial Activities of Allium cepa Red cv. and A. sativum Subjected to Different Drying Methods: A Comparative MS-Based Metabolomics*. Molecules (Basel, Switzerland), 2017. **22**(5): p. 761.
- 167) Block, E., *Challenges and Artifact Concerns in Analysis of Volatile Sulfur Compounds*, in *Volatile Sulfur Compounds <break></break>in Food*. 2011, American Chemical Society. p. 35-63.
- 168) Block, E., A. Dane, and R. Cody, *Crushing Garlic and Slicing Onions: Detection of Sulfenic Acids and Other Reactive Organosulfur Intermediates from Garlic and Other Alliums using Direct Analysis in Real-Time Mass Spectrometry (DART-MS)*. Phosphorus Sulfur and Silicon and The Related Elements - PHOSPHOR SULFUR SILICON, 2011. **186**: p. 1085-1093.
- 169) Carson, J.F. and F.F. Wong, *Onion Flavor and Odor, The Volatile Flavor Components of Onions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1961. **9**(2): p. 140-143.
- 170) Bernhard, R.A., et al., *Isolation and identification of allyl monosulfide and allyl alcohol from Allium*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1964. **107**(1): p. 137-140.
- 171) Block, E., *Flavor artifacts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. **41**(4): p. 692-692.
- 172) Block, E. and E.M. Calvey, *Facts and Artifacts in <italic>Allium</italic> Chemistry*, in *Sulfur Compounds in Foods*. 1994, American Chemical Society. p. 63-79.
- 173) Auger, J., F.X. Lalau-Keraly, and C. Belinsky, *Thiosulfinates in vapor phase are stable and they can persist in the environment of Allium*. Chemosphere, 1990. **21**(7): p. 837-843.

- 174) Arnault, I., et al., *Possible interest of various sample transfer techniques for fast gas chromatography-mass spectrometric analysis of true onion volatiles*. J Chromatogr A, 2000. **896**(1-2): p. 117-24.
- 175) Bajpai, V.K., et al., *Chemical Composition, Antioxidant, Lipid Peroxidation Inhibition and Free Radical Scavenging Activities of Microwave Extracted Essential Oil from Allium sativum*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2015. **18**(2): p. 300-313.
- 176) Sinha, N.K., et al., *Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(5): p. 842-845.
- 177) Pellegrini, M., et al., *Characterization of Essential Oils Obtained from Abruzzo Autochthonous Plants: Antioxidant and Antimicrobial Activities Assessment for Food Application*. Foods, 2018. **7**(2).
- 178) Dziri, S., et al., *Composition of garlic essential oil (Allium sativum L.) as influenced by drying method*. Journal of Essential Oil Research, 2014. **26**(2): p. 91-96.
- 179) Saito, K., et al., *Gas Chromatographic Analysis of Alliin in Garlic Products*. Eisei kagaku, 1988. **34**(6): p. 536-541.
- 180) Hayashi, T., K. Sano, and C. Ohsumi, *Gas Chromatographic Analysis of Alliin in the Callus Tissues of Allium sativum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993. **57**(1): p. 162-163.
- 181) Kubec, R. and E. Dadáková, *Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives—A comparative study*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(41): p. 6957-6963.
- 182) Calvey, E.M., J.A. Roach, and E. Block, *Supercritical fluid chromatography of garlic (Allium sativum) extracts with mass spectrometric identification of allicin*. Journal of Chromatographic Science, 1994. **32**(3): p. 93-96.
- 183) Mochizuki, E., et al., *Identification of Allium Products Using Flame Photometric Detection Gas Chromatography and Distribution Patterns of Volatile Sulfur Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(12): p. 5170-5176.
- 184) Delahunty, C.M., G. Eyres, and J.P. Dufour, *Gas chromatography-olfactometry*. J Sep Sci, 2006. **29**(14): p. 2107-25.
- 185) Scheffler, L., et al., *Detection of Volatile Metabolites Derived from Garlic (Allium sativum) in Human Urine*. Metabolites, 2016. **6**(4): p. 43.
- 186) Cadwallader, K., et al., *Contribution of Volatile Sulfur Compounds to the Characteristic Aroma of Roasted Garlic*, in *Volatile Sulfur Compounds < break></break>in Food*. 2011, American Chemical Society. p. 137-151.
- 187) Yang, P., et al., *Characterization of Key Aroma-Active Compounds in Black Garlic by Sensory-Directed Flavor Analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019. **67**(28): p. 7926-7934.
- 188) Cai, X.-J., et al., *Allium chemistry: Identification of natural abundance organoselenium volatiles from garlic, elephant garlic, onion, and Chinese chive using headspace gas chromatography with atomic emission detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(10): p. 2081-2084.
- 189) Molina-Calle, M., et al., *Establishing compositional differences between fresh and black garlic by a metabolomics approach based on LC-QTOF MS/MS analysis*. Journal of Food Composition and Analysis, 2017. **62**: p. 155-163.

- 190) Trirongjitmoah, S., et al., *Classification of garlic cultivars using an electronic nose*. Computers and Electronics in Agriculture, 2015. **113**: p. 148-153.
- 191) Cody, R.B., J.A. Laramée, and H.D. Durst, *Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(8): p. 2297-2302.
- 192) Lu, H., et al., *Ambient mass spectrometry for food science and industry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018. **107**: p. 99-115.
- 193) Liu, J., et al., *Leaf Spray: Direct Chemical Analysis of Plant Material and Living Plants by Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(20): p. 7608-7613.
- 194) Zhang, H., et al., *Direct Assessment of Phytochemicals Inherent in Plant Tissues Using Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(45): p. 10691-10698.
- 195) Javanshad, R. and A.R. Venter, *Ambient ionization mass spectrometry: real-time, proximal sample processing and ionization*. Analytical Methods, 2017. **9**(34): p. 4896-4907.
- 196) Salter, T.L., et al., *Ambient Surface Mass Spectrometry Using Plasma-Assisted Desorption Ionization: Effects and Optimization of Analytical Parameters for Signal Intensities of Molecules and Polymers*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(3): p. 1675-1682.
- 197) Ratcliffe, L., et al., *Surface Analysis under Ambient Conditions Using Plasma-Assisted Desorption/Ionization Mass Spectrometry*. Analytical chemistry, 2007. **79**: p. 6094-101.
- 198) Zhou, J., et al., *Observation of allicin-cysteine complex by reactive desorption electrospray ionization mass spectrometry for garlic*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(20): p. 3334-3337.
- 199) Kubec, R., et al., *Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in Allium chemistry. (Z)-butanethial S-oxide and 1-butenyl thiosulfinates and their S-(E)-1-butenylcysteine S-oxide precursor from Allium siculum*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(2): p. 1121-8.
- 200) Bajpai, V., et al., *Application of DART-MS in Natural Phytochemical Research*, in *Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry*. 2018. p. 255-290.
- 201) Chen, H., et al., *Rapid in vivo fingerprinting of nonvolatile compounds in breath by extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(4): p. 580-3.
- 202) Zhang, H., et al., *Direct Characterization of Bulk Samples by Internal Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Scientific Reports, 2013. **3**(1): p. 2495.
- 203) Zhang, H., L. Zhu, and H.-W. Chen, *Direct Molecular Analysis of Garlic Using Internal Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014. **42**(11): p. 1634-1638.
- 204) Block, E., et al., *Allium Chemistry: Microwave Spectroscopic Identification, Mechanism of Formation, Synthesis, and Reactions of (E,Z)-Propanethial S-Oxide, the Lachrymatory Factor of the Onion (Allium cepa)*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(32): p. 7492-7501.
- 205) Penn, R.E., E. Block, and L.K. Revelle, *Flash vacuum pyrolysis studies. 5. Methanesulfenic acid*. Journal of the American Chemical Society, 1978. **100**(11): p. 3622-3623.
- 206) Horie, H. and K.-i. Yamashita, *Non-derivatized analysis of methiin and alliin in vegetables by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2006. **1132**(1): p. 337-339.

- 207) Kubec, R. and E. Dadáková, *Quantitative determination of S-alk(en)ylcysteine-S-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Journal of Chromatography A, 2008. **1212**(1): p. 154-157.
- 208) Miron, T., et al., *A Spectrophotometric Assay for Allicin and Alliinase (Alliin lyase) Activity: Reaction of 2-Nitro-5-thiobenzoate with Thiosulfinates*. Analytical Biochemistry, 1998. **265**(2): p. 317-325.
- 209) Miron, T., et al., *A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates*. Analytical Biochemistry, 2002. **307**(1): p. 76-83.
- 210) Olech, Z. and W. Zaborska, *A Spectrophotometric Assay for Total Garlic Thiosulfinates Content. Kinetic Aspects of Reaction with Chromogenic Thiols*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2012. **62**(1): p. 23-29.
- 211) Bozin, B., et al., *Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae)*. Food Chemistry, 2008. **111**(4): p. 925-929.
- 212) Bystricka, J., et al., *The content of polyphenols, antioxidant activity and macroelements in selected garlic varieties*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2018. **8**: p. 738-740.
- 213) Kanza, A.A., et al., *Investigating the Antioxidant Potential of Garlic (Allium sativum) Extracts Through Different Extraction Modes*. Current Bioactive Compounds, 2019. **15**(1): p. 45-50.
- 214) Khandagale, K., et al., *Omics approaches in Allium research: Progress and way ahead*. PeerJ, 2020. **8**: p. e9824.
- 215) Cevallos-Cevallos, J.M., et al., *Metabolomic analysis in food science: a review*. Trends in Food Science & Technology, 2009. **20**(11): p. 557-566.
- 216) Böttcher, C., et al., *Effect of Cultivar and Cultivation Year on the Metabolite Profile of Onion Bulbs (Allium cepa L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018. **66**(12): p. 3229-3238.
- 217) Nakabayashi, R., et al., *Chemical Assignment of Structural Isomers of Sulfur-Containing Metabolites in Garlic by Liquid Chromatography–Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance–Mass Spectrometry*. The Journal of Nutrition, 2016. **146**(2): p. 397S-402S.
- 218) Soininen, T.H., et al., *Quantitative metabolite profiling of edible onion species by NMR and HPLC–MS*. Food Chemistry, 2014. **165**: p. 499-505.
- 219) Soininen, T.H., et al., *The combined use of constrained total-line-shape 1H NMR and LC–MS/MS for quantitative analysis of bioactive components in yellow onion*. Journal of Food Composition and Analysis, 2012. **25**(2): p. 208-214.
- 220) Soininen, T.H., et al., *Metabolite Profiling of Leek (Allium porrum L) Cultivars by 1H NMR and HPLC–MS*. Phytochemical Analysis, 2014. **25**(3): p. 220-228.
- 221) Hrbek, V., et al., *Authenticity assessment of garlic using a metabolomic approach based on high resolution mass spectrometry*. Journal of Food Composition and Analysis, 2018. **67**: p. 19-28.
- 222) Moreno-Ortega, A., et al., *Bioaccessibility of Bioactive Compounds of 'Fresh Garlic' and 'Black Garlic' through In Vitro Gastrointestinal Digestion*. Foods, 2020. **9**(11): p. 1582.
- 223) Schmidt, J.S., N.T. Nyberg, and D. Staerk, *Assessment of constituents in Allium by multivariate data analysis, high-resolution α -glucosidase inhibition assay and HPLC–SPE–NMR*. Food Chemistry, 2014. **161**: p. 192-198.

- 224) Yoshimoto, N., et al., *Identification of a flavin-containing S-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic*. The Plant Journal, 2015. **83**(6): p. 941-951.
- 225) Kusano, M., et al., *Unbiased profiling of volatile organic compounds in the headspace of Allium plants using an in-tube extraction device*. BMC Research Notes, 2016. **9**(1): p. 133.
- 226) Corsaro, C., et al., *¹H HR-MAS NMR Spectroscopy and the Metabolite Determination of Typical Foods in Mediterranean Diet*. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2015. **2015**: p. 175696.
- 227) Ritota, M., et al., *Traceability of Italian garlic (Allium sativum L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate data analysis*. Food Chemistry, 2012. **135**(2): p. 684-693.
- 228) Maccelli, A., et al., *Metabolic profiling of different wild and cultivated Allium species based on high-resolution mass spectrometry, high-performance liquid chromatography-photodiode array detector, and color analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 2020. **55**(11): p. e4525.
- 229) Jo, S., et al., *Geographical discrimination of Allium species (garlic and onion) using ¹H NMR spectroscopy with multivariate analysis*. International Journal of Food Properties, 2020. **23**(1): p. 241-254.
- 230) Wong, A. and C. Lucas-Torres, *Simultaneous metabolic mapping of different anatomies by ¹H HR-MAS chemical shift imaging*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019. **411**(8): p. 1591-1599.
- 231) Liu, J., et al., *A new methodology for sensory quality assessment of garlic based on metabolomics and an artificial neural network*. RSC Advances, 2019. **9**(31): p. 17754-17765.
- 232) Liang, T., et al., *Comprehensive NMR Analysis of Compositional Changes of Black Garlic during Thermal Processing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(2): p. 683-691.
- 233) Lucas-Torres, C., et al., *HR- μ MAS NMR-Based Metabolomics: Localized Metabolic Profiling of a Garlic Clove with μ g Tissues*. Analytical Chemistry, 2018. **90**(22): p. 13736-13743.
- 234) Varhan Oral, E., et al., *Trace Elemental Analysis of Allium Species by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) with Multivariate Chemometrics*. Analytical Letters, 2019. **52**(2): p. 320-336.
- 235) Liu, T.S., J.N. Lin, and T.R. Peng, *Discrimination of Geographical Origin of Asian Garlic Using Isotopic and Chemical Datasets under Stepwise Principal Component Analysis*. J Forensic Sci, 2018. **63**(5): p. 1366-1373.
- 236) Ahn, S.-J., et al., *Comparison of Physicochemical Characteristics of Garlic Produced from South Korea and China*. Journal of Food Science, 2019. **84**(7): p. 1806-1811.
- 237) D'Archivio, A.A., et al., *Geographical discrimination of red garlic (Allium sativum L.) produced in Italy by means of multivariate statistical analysis of ICP-OES data*. Food Chem, 2019. **275**: p. 333-338.
- 238) Szychowski, K.A., et al., *Characterization of Active Compounds of Different Garlic (Allium sativum L.) Cultivars*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2018. **68**(1): p. 73-81.
- 239) Liaqat, A., et al., *Characterization and antimicrobial potential of bioactive components of sonicated extract from garlic (Allium sativum) against foodborne pathogens*. Journal of Food Processing and Preservation, 2019. **43**(5): p. e13936.

- 240) Bhusal, R., et al., *Diversity analysis and trait association study for antioxidants and quality traits in landraces, farmers' varieties and commercial varieties of Indian short day garlic (*Allium sativum* L.)*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2019. **66**(8): p. 1843-1859.
- 241) Micová, M., *The influence of variety on the content of bioactive compounds in Garlic (*Allium sativum* L.)*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2019. **8**: p. 1076.
- 242) Greenacre, M.J., *Theory and Applications of Correspondence Analysis*. 1984: Academic Press.
- 243) Kamanna, V.S. and N. Chandrasekhara, *Fatty acid composition of garlic (*Allium sativum* Linnaeus) lipids*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1980. **57**(6): p. 175.
- 244) Saito, K., et al., *Determination of Allicin in Garlic and Commercial Garlic Products by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection*. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 1989. **72**(6): p. 917-920.
- 245) Sowbhagya, H.B., et al., *Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 1234-1238.
- 246) Zhu, Q., et al., *An LC-MS/MS-SRM Method for Simultaneous Quantification of Four Representative Organosulfur Compounds in Garlic Products*. Food Analytical Methods, 2016. **9**(12): p. 3378-3384.
- 247) Wang, Y., et al., *Effects of garlic polysaccharide on alcoholic liver fibrosis and intestinal microflora in mice*. Pharm Biol, 2018. **56**(1): p. 325-332.
- 248) Shang, A., et al., *Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.)*. Foods, 2019. **8**(7).
- 249) Yoo, M., et al., *Composition of organosulfur compounds from cool- and warm-type garlic (*Allium sativum* L.) in Korea*. Food Science and Biotechnology, 2014. **23**: p. 337-344.
- 250) K., A.-D.E.M., F.M. Abid, and M.J.A. Al-Gani, *Determination of Active Ingredients (Alliin & Allicin) in Different species of Garlic Extracts By Using High Performance Liquid Chromatography*. Diyala Journal for Pure Sciences, 2013. **9**(9): p. 70-81.
- 251) Hadi Ai-Taai, I., D. Falih Al-Fekaiki, and M. Raheem Jamail, *Diagnosing the bioactive compounds in Iraqi garlic (*Allium sativum*) by GC-MS and HPLC*. Journal of Physics: Conference Series, 2019. **1294**: p. 062066.
- 252) Kopeć, A., et al., *Chemical Composition and Concentration of Bioactive Compounds in Garlic Cultivated from Air Bulbils*. Agriculture, 2020. **10**(2): p. 40.
- 253) Ichikawa, M., et al., *Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(5): p. 1535-40.
- 254) Arnault, I., et al., *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*. J Chromatogr A, 2003. **991**(1): p. 69-75.
- 255) Sun Yoo, K. and L.M. Pike, *Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-l-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species*. Scientia Horticulturae, 1998. **75**(1): p. 1-10.
- 256) Ghani, M., *Determination of Alliin and Allicin in different types Garlic using High Performance Liquid Chromatography*. Journal of university of Anbar for Pure science, 2010. **4**: p. 16-23.
- 257) Oh, T.-T. and K.H. Kyung, *Isolation and Purification of Garlic Specific Organic Compounds*. Korean Journal of Food Science and Technology, 2011. **43**(5): p. 553-557.

- 258) Mütsch-Eckner, M., et al., *A Novel Amino Acid Glycoside and Three Amino Acids from Allium sativum*. Journal of Natural Products, 1993. **56**(6): p. 864-869.
- 259) Hayashi, T., K. Sano, and C. Ohsumi, *Gas Chromatographic Analysis of Alliin in the Callus Tissues of Allium sativum*. Biosci Biotechnol Biochem, 1993. **57**(1): p. 162-3.
- 260) Satyal, P., et al., *The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (Allium sativum) and Wild Garlic (Allium vineale)*. Foods (Basel, Switzerland), 2017. **6**(8): p. 63.
- 261) Singh, S., et al., *Determination and estimation of allicin in Allium sativum*. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences, 2020. **9**(49): p. 3711-3715.
- 262) Bocchini, P., et al., *Determination of diallyl thiosulfinate (allicin) in garlic (Allium sativum L.) by high-performance liquid chromatography with a post-column photochemical reactor*. Analytica Chimica Acta, 2001. **441**: p. 37-43.
- 263) Chong, K., et al., *Investigation of Allicin Stability in Aqueous Garlic Extract by High Performance Liquid Chromatography Method* Journal of Scientific Research & Reports, 2015. **4**(7): p. 590-598.
- 264) Horita, C.N., et al., *The antimicrobial, antioxidant and sensory properties of garlic and its derivatives in Brazilian low-sodium frankfurters along shelf-life*. Food Research International, 2016. **84**: p. 1-8.
- 265) Bose, S., B. Laha, and S. Banerjee, *Quantification of allicin by high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis with effect of post-ultrasonic sound and microwave radiation on fresh garlic cloves*. Pharmacognosy magazine, 2014. **10**(Suppl 2): p. S288-S293.
- 266) González, R., A.B. Camargo, and J.L. Burba, *Obtención de un estándar secundario de cuantificación para la síntesis y purificación de allicina. - Obtention of a quantitative secondary standard for allicin synthesis and purification*. Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias, 2007.
- 267) Weber, N.D., et al., *In vitro virucidal effects of Allium sativum (garlic) extract and compounds*. Planta Med, 1992. **58**(5): p. 417-23.
- 268) Fujisawa, H., et al., *Biological and Chemical Stability of Garlic-Derived Allicin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(11): p. 4229-4235.
- 269) Rahman, M.S., *Allicin and Other Functional Active Components in Garlic: Health Benefits and Bioavailability*. International Journal of Food Properties, 2007. **10**(2): p. 245-268.
- 270) Rosen, R.T.T., et al., *The determination of metabolites of garlic preparations in breath and human plasma*. BioFactors, 2000. **13**(1-4): p. 241-249.
- 271) Wang, H. and D. Huang, *Dietary organosulfur compounds from garlic and cruciferous vegetables as potent hypochlorite scavengers*. Journal of Functional Foods, 2015. **18**: p. 986-993.
- 272) Kyung, K.H., et al., *Alliinase-independent Inhibition of Staphylococcus aureus B33 by Heated Garlic*. Journal of Food Science, 2002. **67**(2): p. 780-785.
- 273) Tamaki, K., et al., *Measurement of odour after in vitro or in vivo ingestion of raw or heated garlic, using electronic nose, gas chromatography and sensory analysis*. International Journal of Food Science & Technology, 2008. **43**(1): p. 130-139.
- 274) Kimbaris, A.C., et al., *Quantitative analysis of garlic (Allium sativum) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy*. Food Chemistry, 2006. **94**(2): p. 287-295.

- 275) Yu, T.H., C.M. Wu, and S.Y. Chen, *Effects of pH adjustment and heat treatment on the stability and the formation of volatile compounds of garlic*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989. **37**(3): p. 730-734.
- 276) Castada, H.Z., et al., *Deodorization of garlic odor by spearmint, peppermint, and chocolate mint leaves and rosmarinic acid*. LWT, 2017. **84**: p. 160-167.
- 277) Molina-Calle, M., F. Priego-Capote, and M.D. de Castro, *HS-GC/MS volatile profile of different varieties of garlic and their behavior under heating*. Anal Bioanal Chem, 2016. **408**(14): p. 3843-52.
- 278) Sommano, S., et al., *Chemical composition and comparison of genetic variation of commonly available Thai garlic used as food supplement*. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2016. **89**: p. 235-242.
- 279) Keleş, D., et al., *Comparative study on volatile aroma compounds of two different garlic types (Kastamonu and Chinese) using gas chromatography mass spectrometry (HS-GC/MS) technique*. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM, 2014. **11**(3): p. 217-220.
- 280) Roy, J., D. Shakleya, and P. Thomas, *Chemical constituents and Antimicrobial activity of A Traditional Herbal Medicine Containing Garlic and Black Cumin*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines (ISSN: 0189-6016) Vol 3 Num 2, 2006. **3**.
- 281) Ma, Y., et al., *Effect of ultrahigh pressure treatment on volatile compounds in garlic*. Journal of Food Process Engineering, 2011. **34**(6): p. 1915-1930.
- 282) Lemar, K.M., M.P. Turner, and D. Lloyd, *Garlic (Allium sativum) as an anti-Candida agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts*. J Appl Microbiol, 2002. **93**(3): p. 398-405.
- 283) Park, N.-H., et al., *GC/MS analysis, antimicrobial and Antioxidant Effect of Ethanol Garlic Extract*. 2017.
- 284) Abdelrahman, M., et al., *Widely targeted metabolome and transcriptome landscapes of Allium fistulosum–A. cepa chromosome addition lines revealed a flavonoid hot spot on chromosome 5A*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 3541.
- 285) Yoshida, H., et al., *Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract*. Biosci Biotechnol Biochem, 1999. **63**(3): p. 591-4.
- 286) Rabinkov, A., et al., *S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1499**(1-2): p. 144-153.
- 287) Nakamoto, M., et al., *Isolation and Identification of Three γ -Glutamyl Tripeptides and Their Putative Production Mechanism in Aged Garlic Extract*. J Agric Food Chem, 2018. **66**(11): p. 2891-2899.
- 288) Ichikawa, M., et al., *Tetrahydro- β -Carboline Derivatives in Aged Garlic Extract Show Antioxidant Properties*. The Journal of Nutrition, 2006. **136**(3): p. 726S-731S.
- 289) Park, J.B., *Effects of typheramide and alfrutamide found in Allium species on cyclooxygenases and lipoxygenases*. J Med Food, 2011. **14**(3): p. 226-31.
- 290) Kang, S.S., D.R. Lim, and K.H. Kyung, *3-(allyltrisulfanyl)-2-aminopropanoic acid, a novel nonvolatile water-soluble antimicrobial sulfur compound in heated garlic*. J Med Food, 2010. **13**(5): p. 1247-53.
- 291) Ichikawa, M., et al., *Identification of Six Phenylpropanoids from Garlic Skin as Major Antioxidants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(25): p. 7313-7317.