

**КОМПОНЕНТЫ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ЭКСТРАКТОВ
ЧЕСНОКА И СИНТЕТИЧЕСКИЕ НЕСИММЕТРИЧНЫЕ
АЛЛИЛДИСУЛЬФИДЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ
АНТИМИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ**

**¹Д. Ю. Залепугин*, ¹Н. А. Тилькунова, ¹И. В. Чернышова,
¹М. И. Власов, ²А. Л. Мулюкин**

¹ФГУП Государственный завод медицинских препаратов (ГосЗМП), Москва, Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

*zaledmit@gmail.com

Поступила в редакцию 18.10.2013 г.

Методом сверхкритической экстракции диоксидом углерода получены экстракты чеснока (*Allium sativum* L.), которые разделены на индивидуальные вещества с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. Синтезирован ряд несимметричных аллилдисульфидов с различными заместителями. Выделенные из сверхкритического экстракта чеснока вещества и синтетические несимметричные аллилдисульфиды (СНА) испытаны в качестве потенциальных антимикробных препаратов на ряде тест-объектов: *Candida utilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aurantiaca* и *Escherichia coli*. Показано, что СНА проявляют высокую антимикробную активность, значительно превышающую действие индивидуальных компонентов чеснока, и в ряде случаев не уступают по эффективности широко используемым в клинической практике антибиотикам флоксацинового ряда. Полученные данные предполагают возможность использования СНА в качестве антимикробных агентов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сверхкритическая экстракция, диоксид углерода, чеснок, экстракт, аллилдисульфиды, биоциды.

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробное действие чеснока известно с древнейших времен. В последнее время проводятся широкие исследования, посвященные изучению свойств чеснока как потенциального природного антибиотика для применения в клинической практике. В частности, в опытах на мышах установлено, что употребление чеснока в пищу повышает устойчивость к инфекциям выделительного тракта (*Pseudomonas aeruginosa*) [1]. В большинстве работ в этой области объектами исследований являются водные экстракты чеснока, чесночное масло и некоторые индивидуальные компоненты экстрактов. Так, в последнем обзоре по использованию фитопрепаратов для терапии дентальных инфекций отмечается высокая эффективность водных экстрактов чеснока в отношении грамотрицательных патогенов в диапазоне концентраций 1,1—17,4 мг/мл, а также против грамположительных штаммов в диапазоне концентраций 35,7—142,7 мг/мл [2]. Исследования по поиску средств для профилактики кариеса показали, что водный экстракт чеснока обладает не меньшей эффективностью, чем применяю-

щийся в настоящее время хлоргексидин [3]. Отмечена эффективность водного экстракта чеснока в отношении грамотрицательного штамма *Aeromonas hydrophila* [4]. Этанольный экстракт чеснока показал высокую эффективность в отношении микобактерий туберкулеза, резистентных к используемым противотуберкулезным препаратам, что позволяет рассматривать его как альтернативное противотуберкулезное средство [5]. Успешно проводятся испытания промышленных продуктов на основе чеснока PROALLIUM-S-DMC и PROALLIUM-SO-DMC (DMC Research Center, Испания) в качестве альтернативы антибиотикам в животноводстве [6]. Отмечается высокая активность китайского препарата Allitridi по отношению к *Helicobacter pylori* [7]. Важно отметить, что водный экстракт чеснока не только эффективен против резистентных к стрептомицину штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, но в комбинации со стрептомицином способствует преодолению резистентности последнего, и даже усиливает его действие [8]. Отмечается также антимикробный эффект чесночного масла [9], в частности, для хранения овощей [10, 11].

Источником всех серусодержащих веществ, входящих в состав природного сырья на основе чеснока, является аминокислота аллилцистеин-S-оксид (аллиин), содержащийся в вакуолях растительной клетки. В цитозоле содержится фермент аллииназа, которая при разрушении клеток (измельчении долек чеснока) быстро превращает аллиин в диаллилтиосульфид (аллицин) [12], который в свою очередь претерпевает ряд превращений с образованием сульфидов, дисульфидов, трисульфидов, дитионов и аджоенов [13].

Антимикробные свойства индивидуальных компонентов чеснока изучены недостаточно полно. Так, отмечено, что аллицин проявляет фунгицидное [14, 15], антигельминтное [16] и противомаларийное [17] действие. Важно отметить, что в отношении некоторых штаммов семейства *Candida* аллицин проявляет значительный синергетический эффект с препаратами азольного ряда — флуконазолом и кетоконазолом [18]. Так, аллицин эффективно ингибирует рост *Candida albicans*, причем по активности не уступает сильнодействующему противогрибковому препарату флуконазолу [19]. Установлено, что аллицин проявляет противоаденовирусную активность [20]. Представляет интерес публикация о влиянии аллицина и экстрактов чеснока на гемолитическую активность стрептолизина О [21]. Эти данные свидетельствуют о том, что аллицин можно рассматривать как потенциальный препарат для лечения стрептококковых инфекций. Недавно опубликованы работы, посвященные активности аллицина и водных экстрактов чеснока в отношении резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* [22, 23]. Следует отметить, что способность эффективно подавлять рост бактериальных штаммов, резистентных к традиционным препаратам, является важным свойством экстрактов чеснока [24]. Так, смеси водных экстрактов чеснока и лука (1:1), чеснока и имбиря (1:1) и лайма/чеснока/имбиря (1:1:1) проявляют высокую активность в отношении резистентных линий штамма *Escherichia coli* [25]. Известен патент, посвященный созданию антибактериальных композиций на основе экстрактов чеснока для лечения дентальных инфекций [26]. Так как экстракты чеснока представляют собой многокомпонентные смеси, существенным недостатком антибактериальных препаратов на их основе является переменный состав, затрудняющий их валидацию. Что касается индивидуальных компонентов чеснока как потенциальных антибактериальных препаратов, их практическое использование затруднено вследствие их термической и химической нестабильности. Так, наиболее эффективный тиосульфид чеснока аллицин при комнатной температуре полностью разлагается в

течение нескольких минут, а в водном растворе — на 50 % в течение 4 суток [27]. При повышенных температурах (~80 °С) аллицин практически полностью разлагается в течение 25 минут [28]. Значительно более устойчивы индивидуальные компоненты чеснока — дисульфиды (например, диаллилдисульфид), однако их антибактериальная активность невысока.

Вследствие того, что антибактериальное действие дисульфидов чеснока обусловлено их взаимодействием с тиольными группами различных ферментов [29], а также способностью проникать через фосфолипидные мембраны [30], дисульфидный фрагмент является важным фармакофором для сохранения антимикробной активности. Известен способ получения S,S-гетерозамещенных дисульфидов, проявляющих активность *in vitro* в отношении ряда бактериальных штаммов, включая *Staphylococcus aureus* и *Francisella tularensis* [31]. Опубликован способ применения в качестве противоопухолевых препаратов несимметричных дисульфидов, содержащих алкильные и гетероароматические заместители, предпочтительно метилпропил-(имидазолил)-дисульфида [32]. В качестве антимикробных агентов предложены несимметричные дисульфиды, содержащие 1-оксо-2-пиридильный заместитель [33]. Однако лекарственные препараты на основе несимметричных дисульфидов до настоящего времени не созданы.

По мнению исследователей, наличие в структуре аллильных групп в ряде случаев обуславливает антимикробную активность веществ. Так, в частности, антимикробная активность серусодержащих компонентов чеснока, содержащих аллильный фрагмент, существенно выше аналогов, его не содержащих [34].

Как было указано выше, фактором, сдерживающим разработку фармпрепаратов на основе активных компонентов чеснока, является их нестабильность. Поэтому нами были синтезированы новые вещества, сохраняющие один из фрагментов компонентов чеснока и несущие иные заместители (сульфоксиды — аналоги аллицина и аджоена и различные несимметричные дисульфиды). Синтезированные несимметричные дисульфиды сохраняют аллильный заместитель, присущий компонентам чеснока. Введение электроноакцепторного пентафторфенильного фрагмента, по нашему мнению, должно привести к поляризации дисульфидной связи, подобно распределению электронной плотности в тиосульфидатах, тем самым способствуя тиоаллилированию цистеиновых остатков бактериальных белков. Предполагается, что именно такой механизм лежит в основе антимикробного действия тиосульфидатов и диаллилполисульфидов [35].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракция гомогената чеснока сверхкритическим диоксидом углерода и выделение индивидуальных компонентов экстрактов

Экстракцию сверхкритическим (СК) диоксидом углерода проводили на установке, подробно описанной в работе [36], по следующей методике. Измельченный гомогенат чеснока (20 г) предварительно выдерживали на воздухе при 20 °С для ферментации. Назначение процесса ферментации заключается в превращении содержащейся в исходном чесноке аминокислоты аллиина под действием фермента аллииназы в аллицин.

Условия экстракции: давление 250 атм, температура 90 °С, время экстракции 120 мин, скорость подачи СК-СО₂ 2 мл/мин. Качественный анализ полученных экстрактов осуществляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР), а

количественный — методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ); выделение индивидуальных компонентов экстрактов осуществляли методом препаративной ВЭЖХ. Условия анализа и выделения подробно описаны в [36].

Синтез аналогов индивидуальных компонентов чеснока

4-фенокси-(2,3,5,6-тетрафторбензил)-метилсульфоксид (1)

Раствор, содержащий 0,043 моля метилсульфинилметилата натрия в 100 мл безводного тетрагидрофурана, по каплям добавляли к 0,043 моля гексафторбензола при охлаждении до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь выдерживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5 часов, разбавляли холодной водой и доводили до комнатной температуры. Реакционную смесь экстрагировали эфиром, экстракты сушили сульфатом магния и растворитель удаляли. Перекристаллизацией остатка из эфира получили (2,3,4,5,6-пентафторбензил)-метилсульфоксид (т. пл. $96\text{--}97\text{ }^{\circ}\text{C}$; выход 37 %).

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ): 4,02, 1H ($\text{H}_A\text{—C—S=O}$); 4,10, 1H ($\text{H}_B\text{—C—S=O}$); $J_{AB} = 11,99$ Гц; 2,60 с, 3H (CH_3).

ЯМР ^{19}F (CDCl_3 ; CFCl_3 , δ): 140,5 дм, 2F (2,6-F); 152,74 т, 1F (4-F); 161,33, 2F (3,5-F).

Далее раствор триметилсилилфенилового эфира (0,01 моля) в 5 мл ацетонитрила по каплям в атмосфере инертного газа добавляли к смеси 0,01 моля (2,3,4,5,6-пентафторбензил)-метилсульфоксида и 3 г фторида цезия и нагревали при перемешивании до $80\text{ }^{\circ}\text{C}$; при этом наблюдалось выделение газа (триметилсилилфторида). По окончании реакции (прекращение выделения газа) реакционную смесь охлаждали, фильтровали, растворитель удаляли, остаток экстрагировали эфиром. Экстракт промывали водой и сушили над сульфатом магния. После упаривания и перекристаллизации остатка получили 4-фенокси-(2,3,5,6-тетрафторбензилметил)-сульфоксид (выход 30 %).

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ): 7,32—6,97 м, 5H (C_6H_5); 4,08, 1H ($\text{H}_A\text{—C—S=O}$); 4,15, 1H ($\text{H}_B\text{—C—S=O}$); $J_{AB} = 13,99$ Гц; 2,52 с, 3H (CH_3).

ЯМР ^{19}F (CDCl_3 ; CFCl_3 , δ): 139,72 дм, 2F (2,6-F); 152,21 м, 2F (3,5-F).

4-(3'-диэтиламинофенокси)-(2,3,5,6-тетрафторбензил)-метилсульфоксид (2)

Раствор 0,012 моля триметилсилилового эфира 3-диметиламинофенола в 5 мл ацетонитрила по каплям в атмосфере инертного газа добавляли к смеси 0,012 моля (2,3,4,5,6)-пентафторбензил)-метилсульфоксида и 3,5 г фторида цезия и нагревали при перемешивании до $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. По окончании выделения газа реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и профильтровывали, фильтрат упаривали и экстрагировали эфиром. Эфирный экстракт промывали водой и сушили над сульфатом магния. После упаривания и перекристаллизации получили 4-(3'-диэтиламинофенокси)-(2,3,5,6-тетрафторбензил)-метилсульфоксид (выход 25 %).

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ): 7,1—6,0, 4H (C_6H_4); 4,07, 1H ($\text{H}_A\text{—C—S=O}$); 4,15, 1H ($\text{H}_B\text{—C—S=O}$); $J_{AB} = 11,99$ Гц; 3,30 кв, 4H ($\text{—CH}_2\text{—N}$); 2,63 с, 3H ($\text{CH}_3\text{—S=O}$); 1,1 п, 6H ($\text{CH}_3\text{—C}$).

ЯМР ^{19}F (CDCl_3 ; CFCl_3 , δ): 139,6 дм, 2F (2,6-F); 151,57 м, 2F (3,5-F).

Аллил-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-дисульфид (3)

Раствор диаллилтиосульфидата (аллицина) в хлористом метиле по каплям добавляли к эквимолярному количеству пентафторфенилмеркаптана, растворенного в этиловом спирте, добавляли равный объем холодной воды и экстрагировали хлористым метилом. Экстракт промывали раствором бикарбоната натрия, водой и сушили над цеолитом А. После удаления растворителя получили (2,3,4,5,6-пентафторфенил)-аллилдисульфид (выход 93 %).

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ): 5,85—5,70 м, 1H (CH=C); 5,25 дд, 1H (транс), $J_{\text{gem}} = 1,21$ Гц, $J_{\text{vic}} = 16,99$ Гц; 5,18 дм, 1H (цис), $J = \delta$: 9,92 Гц; 3,45 д, 2H ($-\text{CH}_2$), $J = 7,48$ Гц.

ЯМР ^{19}F (CDCl_3 ; CF_3COOH , δ): -130,7, 2F (2,6-F); -149,8 т, 1F (4-F), $J = 20,06$ Гц; -159,4, 2F (3,5-F).

Аллил-(2-тиацклопропил)-метилдисульфид (4)

50 мл водного раствора 2-пропенилтиолята калия, полученного из 0,023 М аллилмеркаптана и 0,023 М КОН, по каплям при перемешивании добавляли к раствору 2-тиацклопропилтиосульфата натрия, полученного из 0,023 моля 2-бром-метилтирирана и 0,023 моля $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 50 мл воды при $\text{pH} = 9,5$ (буферный раствор). После перемешивания в течение 0,5 часа реакционную смесь экстрагировали хлористым метилом, растворитель удаляли в вакууме и остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (элюент — гексан).

ЯМР ^1H , δ : 5,67—5,81 (м, 1H), 5,03—5,13 (м, 2H); 3,25 (м, 2H), 3,03—3,11 (м, 2H), 2,50—2,58 (м, 2H), 2,25 (м, 1H).

Аллил-(2-пиридинил)-дисульфид (5)

Получен аналогично веществу (4) из 2-пиридилмеркаптана и аллилпропен-2-илтиосульфата натрия.

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ): 8,45 (м, 1H); 7,63 (м, 2H); 7,26 (м, 1H) — 2-пиридил; 5,80 (м, 1H, CH=), 5,12 (м, 2H, CH_2 =); 3,58 (м, 2H, CH_2).

Аллил-(2-пиримидил)-дисульфид (6)

Получен аналогично веществу (4) из 2-пиримидилмеркаптана и аллилпропен-2-илтиосульфата натрия.

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ): 8,61 (д, 2H); 7,09 (т, 1H) — 2-пиримидил; 5,85 (м, 1H, CH=), 5,12 (м, 2H, CH_2 =); 3,50 (м, 2H, CH_2).

Определение антимикробной активности компонентов сверхкритических экстрактов чеснока и их синтетических аналогов

В работе исследовали грамположительные спорообразующие бактерии *Bacillus cereus* штамм В-504 (ВКМ), грамположительные неспорообразующие бактерии *Mycobacterium smegmatis* штамм mc2 155 (ATCC 700084) и *Micrococcus luteus* штамм NCIMB 13267, а также грамотрицательные неспорообразующие бактерии *Pseudomonas aurantiaca* штамм В-1558 (ВКМ).

Культивирование бактерий

Для получения спорового инокулята клетки *B. cereus* выращивали в 10-кратно разбавленной жидкой среде LB (питательном бульоне) в которую отдельно

(после стерилизации) вносили автоклавированные стерильные растворы следующих солей до конечной концентрации (г/л): CaCl_2 — 0,2, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,017 и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 (рН среды 7,0). Культуры выращивали аэробно в течение 10 дней при 28 °С на качалке (180 об/мин). Суспензии спор подвергали прогреванию при 95 °С (10 мин) для элиминации вегетативных клеток.

Инокулятом *M. smegmatis*, *M. luteus* и *P. aurantiaca* служили культуры стационарной фазы, выращенные на двукратно разбавленной среде LB в аэробных условиях в течение 3 сут., 2 сут. и 1 сут. (соответственно для вышеперечисленных бактерий) при 28 °С на качалке (180 об/мин). Для обеспечения гомогенного роста культур *M. smegmatis* в среду был добавлен 0,05 % об. детергента Tween-80.

Общую численность клеток в 1 мл суспензий инокулята определяли по результатам прямых микроскопических подсчетов в 20 малых квадратах (25 мкм²) в камере Горяева. Микроскопические наблюдения проводили с использованием светооптического микроскопа Reichert («Zetopan», Австрия), снабженного фазово-контрастным устройством.

Исследование бактериостатического и бактерицидного действия

Аликвоты инокулята стерильно вносили в жидкую среду LB в объемных отношениях (от 0,1 : 500 до 1 : 5000), чтобы конечная концентрация клеток составляла 106 кл./мл. Свежесазеянную среду разливали в пластиковые 48-луночные плашки (объем среды 0,5 мл в каждой лунке) или серии стеклянных стерильных пробирок (объем среды 2 мл, 1/10 от вместимости пробирки). В лунки или пробирки сразу добавляли аликвоты растворов исследуемых веществ (в 70 % этаноле) в концентрациях от 4 до 256 мкг/мл; содержание спирта в суспензиях не превышало 3,5 % об. Плашки или пробирки с внесенными веществами или контрольными вариантами (с добавлением только соответствующего количества этанола) запечатывали пленкой для предотвращения испарения и инкубировали в течение 1—7 сут. при 28 °С в статических условиях (без перемешивания). Плашки и пробирки периодически просматривали, наличие роста клеток оценивали визуально по помутнению среды.

Статический эффект соединений, внесенных в различных концентрациях, проявлялся по задержке роста (по сравнению с контрольными вариантами) в течение 24 ч. Бицидный эффект фиксировали по отсутствию роста в течение 4 сут.; наличие стойкого бицидного действия констатировали по отсутствию роста в течение 7 сут. и более. Эксперименты ставили в 3-кратной повторности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было исследовано бактериостатическое и бактерицидное действие всех синтезированных веществ (1) — (6) в сравнении с компонентами СК экстрактов — диаллилдисульфидом (7) и диаллилтрисульфидом (8). Данные тестирования антимикробной активности приведены в таблице.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что все синтезированные несимметричные аллилдисульфиды проявляют статический/бицидный эффект уже в концентрациях 16 мкг/мл, что существенно превышает антимикробную активность компонентов СК экстракта чеснока диаллилдисульфида (7) и диаллилтрисульфида (8), а также алицина, антибактериальные свойства которого хорошо изуче-

Таблица

Влияние соединений (1)–(8) на подавление роста тест-микроорганизмов

Вещество	Конечная концентрация, мкг/мл	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Mycobacterium megmatitis</i>	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>
(1)	16	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	32	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	63	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	125	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	250	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
(2)	16	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	32	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	63	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	125	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	250	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
(3)	Указаны в столбцах мкг/мл	1 — стойкий БЭ** 3 — стойкий БЭ 5 — стойкий БЭ 10 — стойкий БЭ 20 — стойкий БЭ (8 сут.)	1 — СЭ* 2 — СЭ 4 — БЭ 8 — стойкий БЭ 16 — стойкий БЭ (8 сут.)	0,8 — нет эффекта 1,6 — нет эффекта 3,2 — БЭ 6 — БЭ 12 — стойкий БЭ (8 сут.)	0,8 — нет эффекта 1,6 — нет эффекта 3,2 — нет эффекта 6 — СЭ 12 — БЭ
	16	Стойкий БЭ	СЭ	СЭ	Нет эффекта
	32	Стойкий БЭ	СЭ	БЭ (4 сут.)	Нет эффекта
	63	Стойкий БЭ	СЭ	Стойкий БЭ	Нет эффекта
	125	Стойкий БЭ	СЭ	Стойкий БЭ	Нет эффекта
(4)	250	Стойкий БЭ (8 сут.)	СЭ	Стойкий БЭ (8 сут.)	Нет эффекта
	16	Стойкий БЭ	СЭ	Нет эффекта	Нет эффекта
	32	Стойкий БЭ	СЭ	СЭ	Нет эффекта
	63	Стойкий БЭ	БЭ (4 сут.)	БЭ	Нет эффекта
	125	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	СЭ
(5)	250	Стойкий БЭ (8 сут.)	Стойкий БЭ (8 сут.)	Стойкий БЭ (8 сут.)	БЭ (2 сут.)
	16	Стойкий БЭ	СЭ	Нет эффекта	Нет эффекта
	32	Стойкий БЭ	СЭ	СЭ	Нет эффекта
	63	Стойкий БЭ	БЭ (4 сут.)	БЭ	Нет эффекта
	125	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	СЭ
(6)	250	Стойкий БЭ (8 сут.)	Стойкий БЭ (8 сут.)	Стойкий БЭ (8 сут.)	БЭ (2 сут.)
	16	СЭ	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	32	Стойкий БЭ	СЭ	Нет эффекта	Нет эффекта
	63	Стойкий БЭ	БЭ (4 сут.)	СЭ	Нет эффекта
	125	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	СЭ (1 сут.)

Окончание таблицы

Вещество	Конечная концентрация, мкг/мл	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Mycobacterium megmatitis</i>	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>
(7)	4	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	8	СЭ	Нет эффекта	СЭ	Нет эффекта
	16	СЭ	СЭ	СЭ	Нет эффекта
	32	СЭ	СЭ	СЭ	Нет эффекта
	64	БЭ	БЭ	СЭ	СЭ
	128	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	БЭ	СЭ
	256	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ
(8)	4	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	8	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	16	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта	Нет эффекта
	32	Нет эффекта	Нет эффекта	СЭ	Нет эффекта
	64	СЭ	СЭ	СЭ	Нет эффекта
	128	Статический эффект	Стойкий БЭ	СЭ	СЭ
	256	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ	Стойкий БЭ

*СЭ — статический эффект;

**БЭ — биоцидный эффект.

ны [36]. Следует отметить, что аллил-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-дисульфид (3) проявляет стойкий биоцидный эффект на *B. cereus* в очень низкой концентрации (~1 мкг/мл). Выявленный диапазон действующих концентраций для данной группы веществ сопоставим (и даже в некоторых случаях превышает) МИК (минимальную ингибирующую концентрацию) широко используемых антибиотиков (например, флоксаинового ряда) [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что синтетические несимметричные аллилдисульфиды, аналоги компонентов сверхкритического экстракта чеснока, проявляют высокую антимикробную активность в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактериальных штаммов, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных фармакологических антибактериальных препаратов. Ввиду того, что высокая антибактериальная активность данных веществ, ранее неизвестных, выявлена авторами впервые, полученные результаты защищены заявкой на патент РФ (регистрационный номер 2013140001).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 11-03-12024-офм-2011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Harjai K., Kumar R., Singh S.* FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010. Vol. 58. No. 2. P. 161.
2. *Palombo E.A.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 2011. Article ID 680354.
3. *Chavah S.D., Shetty N.L., Kanuri M.* Oral. Health Rev. Dent. 2010. Vol. 8. No. 4. P. 369.
4. *Nya E.J., Austin B. J.* Fish Dis. 2009. Vol. 32. No. 11. P. 9635.
5. *Hannan A., Ikram Ullah M., Usman M., Hussian S., Absar M., Javed K.* Pak. J. Pharm. Sci. 2011. Vol. 24. No. 1. P. 81.
6. *Ruiz R., Garcia M.P., Lara A., Rubio L.A.* Vet. Microbiol. 2010. Vol. 144. No. 1–2. P. 110.
7. *Liu S., Sun Y., Li W., Yu H., Li X. et al.* FEMS Microbiol. Lett. 2010. Vol. 303. No. 2. P. 183.
8. *Palaksha M.N., Ahmed M., Das S. J.* of Nat. Sci., Biology and Medicine. 2010. Vol. 1. No. 1. P. 12.
9. *Goncagul G., Ayaz E.* Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 2010. Vol. 5. No. 1. P. 91.
10. *Ayala-Zavala J.F., Gonzalez-Agular G.A.* J. Food Sci. 2010. Vol. 75. No. 7. P. M398.
11. *Ayala-Zavala J.F., Gonzalez-Agular G.A., del-Toro Sanchez L. J.* Food Sci. 2009. Vol. 74. No. 7. P. R84.
12. *Stoll A., Seebeck E.* Adv. Enzymol. 1951. Vol. 11. P. 377.
13. *Block E., Ahmad S., Catalfamo J.L., Jain M.K., Apiz-Castro R. J.* Am. Chem. Soc. 1986. Vol. 108. P. 7045.
14. *Borjihan H., Ogita A., Fujita K., Hirasawa E., Tanaka T. J.* Antibiot (Tokyo). 2009. Vol. 62. No. 12. P. 691.
15. *Borjihan H., Ogita A., Fujita K., Doe M., Tanaka T.* Planta Med. 2010. Vol. 76. No. 16. P. 1864.
16. *Velkers F.C., Dieho K., Pecher F.W., Vernooij J.C., van Eck J.H., Landman W.J.* Poult Sci. 2011. Vol. 90. No. 2. P. 364.
17. *Coppi A., Cabinian M., Mirelman D., Sinnis P.* Vet. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006. P. 1737.
18. *Alam M., Dwivwdi V., Khan A.A., Mohammad O.* Nanomedicine (Lond). 2009. Vol. 4. No. 7. P. 713.
19. *Khodavandi A., Harmal N.S. et al.* Phytomedicine. 2011. Vol. 19. No. 1. P. 56.
20. *Chen C.-H., Chou T.-W., Cheng L.-H., Ho C.-W. J.* of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2011. Vol. 42. No. 2. P. 228.
21. *Arzanlou M., Bohlooli S. J.* Med. Microbiology. 2010. Vol. 59. P. 1044.
22. *Dini C., Fabbri A., Geraci A.* Ann. Ist. Super. Sanita. 2011. Vol. 47. No. 4. P. 465.
23. *Gupta R., Thakur B., Singh P. et al.* Indian J. Med. Res. 2010. Vol. 131. P. 809.
24. *Gull I., Saeed M., Shaukat H., Aslam S.M., Samra Z., Athar A.* Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2012. Vol. 11:8.
25. *Rahman S., Parves A.K., Islam R., Khan M.H.* Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2011. Vol. 10:10.
26. Патент США 20120189710.
27. *Calvey E.M., Matusik J.E., White K.D., DeOrazio R., Sha D., Block E. J.* Agric. Food Chem. 1997. Vol. 45. P. 4406.
28. *Ilic D.P., Nikolic V.D., Nikolic L.B., Stankovic M.Z., Stanojevic L.P.* Hem. Ind. 2010. Vol. 64. No. 2. P. 85.
29. *Culter R.R., Wilson P.* British J. Biomed. Sci. 2004. Vol. 61. P. 71.
30. *Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Wilchek M., Weiner L.* Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1463. No. 1. P. 20.
31. Патент США 20100204337.
32. Патент США 2004022280.
33. Патент США 4049665.
34. *Casella S., Leonardi M., Melai B., Fratini F., Pistelli L.* Phytother. Res. 2013. Vol. 27. No. 3. P. 380.
35. *Kyung K.H.* Curr. Opin. Biotechnol. 2012. Vol. 23. No. 2. P. 142-7.
36. *Залепугин Д.Ю., Тилькунова Н.А., Яшин Ю.С., Чернышова И.В., Мишин В.С., Мулюкин А.Л.* СКФ-ТП. 2010. Т. 5. № 1. С. 88.
37. *Spangler S.K., Visalli M.A., Jacobs M.R., Appelbaum P.C.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1996. Vol. 40. P. 772.

**COMPONENTS OF SUPERCRITICAL GARLIC EXTRACTS
AND SYNTHETIC UNSYMMETRICAL ALLYL DISULFIDES
AS PROSPECTIVE ANTIMICROBIAL AGENTS**

**¹D. Yu. Zalepugin, ¹N. A. Tilkunova, ¹I. V. Chernyshova, ¹M. I. Vlasov,
²A. L. Mulyukin**

¹*Federal State Unitary Enterprise "State Plant of Medicinal Drugs", Moscow, Russia*
²*Vinogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow, Russia*

Garlic (*Allium sativum* L.) extracts, obtained by supercritical CO₂ extraction, are fractionated into individual components using preparative High Performance Liquid Chromatography/Gas Chromatography. Several new unsymmetrical allyl disulfides are synthesized. All obtained synthetic substances and garlic individual components were tested as potential antimicrobial agents using the following test systems: *Candida utilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aurantiaca* and *Escherichia coli*. Synthetic unsymmetrical allyl disulfides (SUAD) are shown to reveal antimicrobial activity compared to individual garlic components. Moreover, in some cases they are more effective than widely used floxacillin antibiotics. These results give evidence to consider SUAD as prospective antibacterial pharmaceutical agents.

Key words: supercritical extraction, carbon dioxide, garlic, extract, allyl disulfides, biocides.
