



УДК 577.115

## (2E)-4-ГИДРОКСИ-2-НОНЕНАЛЬ – АКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТ НОВОГО ПРИРОДНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА

© 1999 г. В. Г. Рыбин<sup>#</sup>, Д. В. Куклев, Т. М. Бывальцева, Ю. Г. Блинов, В. Н. АкулинТихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,  
690600, Владивосток, тупик Шевченко, 4

Поступила в редакцию 25.01.99 г. Принята к печати 10.03.99 г.

В обладающей антимикробной активностью смеси водорастворимых продуктов окисления жира сардины *Sardinops melanosticta* обнаружен (2E)-4-гидрокси-2-ноненаль, который выделен сочетанием колоночной хроматографии на силикагеле и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Его структура подтверждена физико-химическими методами. Активность (2E)-4-гидрокси-2-ноненала, продемонстрированная на тест-культурах микроорганизмов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, составила ~20% антимикробной активности препарата.

*Ключевые слова:* (2E)-4-гидрокси-2-ноненаль; антимикробная активность.

Изучение соединений липидной природы, проявляющих антимикробную активность, начато довольно давно. Еще в 1899 г. Кларк [1] сообщил о бактерицидных свойствах солей жирных кислот, входящих в состав различных видов и сортов мыла. Такие исследования затрагивают множество природных объектов – источников липидов, среди которых растительные масла, липидные экстракты различных растений и животных [2–8]. Достаточно широко изучена антимикробная активность отдельных классов липидов – жирных кислот и их эфиров [9–11], продуктов липоксигеназного окисления полиненасыщенных жирных кислот [12], моноглицеридов [13] и т.д. Исследовалось также антимикробное действие частично окисленных растительных масел. Последние, как известно, содержат значительное количество ПНЖК, что и обуславливает их способность к легкому автоокислению (например при хранении [14]), когда ПНЖК с двумя и тремя двойными связями, окисляясь, образуют как гидропероксиды, так и продукты их превращений: спирты, альдегиды и т.д. Горгиев [15] обнаружил антимикробный эффект у окисленных рыбных жиров, которые им же были использованы для приготовления аутовакцин [16].

В 1995 г. Блинов и соавт. [17] обнаружили, что в процессе автоокисления водных эмульсий рыбных жиров при невысоких температурах (25–45°C) происходит образование сложной смеси водорастворимых продуктов окисления, обладающей вы-

раженной антимикробной активностью. Полученный ими окислением жира сардины *Sardinops melanosticta* “антимикробный препарат” (АП) представлял собой водный раствор большого числа разнообразных окисленных производных ПНЖК.

Цель данной работы – исследование структуры компонентов АП и определение их вклада в общую антимикробную активность препарата. Процесс выделения и идентификации соединений, входящих в состав АП и проявляющих антимикробную активность, состоял из ряда последовательных операций. После экстракции окисленных производных ПНЖК из водного раствора хлороформом (после экстракции водный слой не проявлял антимикробной активности) было проведено их хроматографическое разделение. Большое число продуктов окисления жира (рис. 1) не давало возможности, применяя только метод ВЭЖХ, добиться полного разделения смеси на отдельные компоненты.

Сравнивая спектральные характеристики компонентов смеси (рис. 1), а также их хроматографические подвижности, мы сделали предположение о наличии среди них короткоцепочечных продуктов окисления жира с сопряженными триеновыми фрагментами в их структуре (максимумы поглощения в области 270–280 нм для пиков 3–8 на рис. 1). Антимикробная активность такого класса соединений была обнаружена и исследована Бернартом и соавт. [18]. Однако из-за лабильности и малого количества этих компонентов нам не удалось выделить их в чистом виде для установления структуры.

Применяя метод колоночной хроматографии на силикагеле для предварительного разделения

Сокращения: АП – антимикробный препарат; 4-HNE – (2E)-4-гидрокси-2-ноненаль; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: root@tinro.marine.su; факс: (4232) 25-77-83; тел.: (4232) 25-78-05).

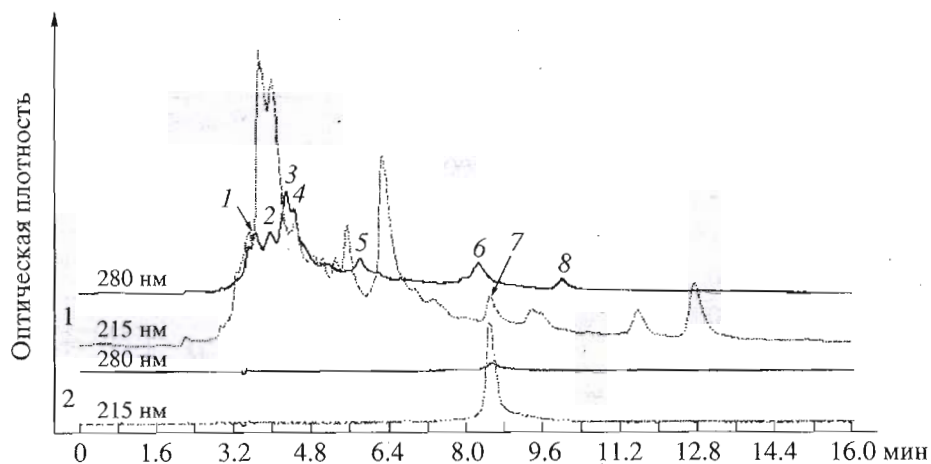


Рис. 1. ВЭЖХ смеси водорастворимых продуктов окисления жира сардины *S. melanosticta* (1) и 4-HNE (2) на колонке Zorbax ODS (4.6 × 250 мм, 5 мкм).

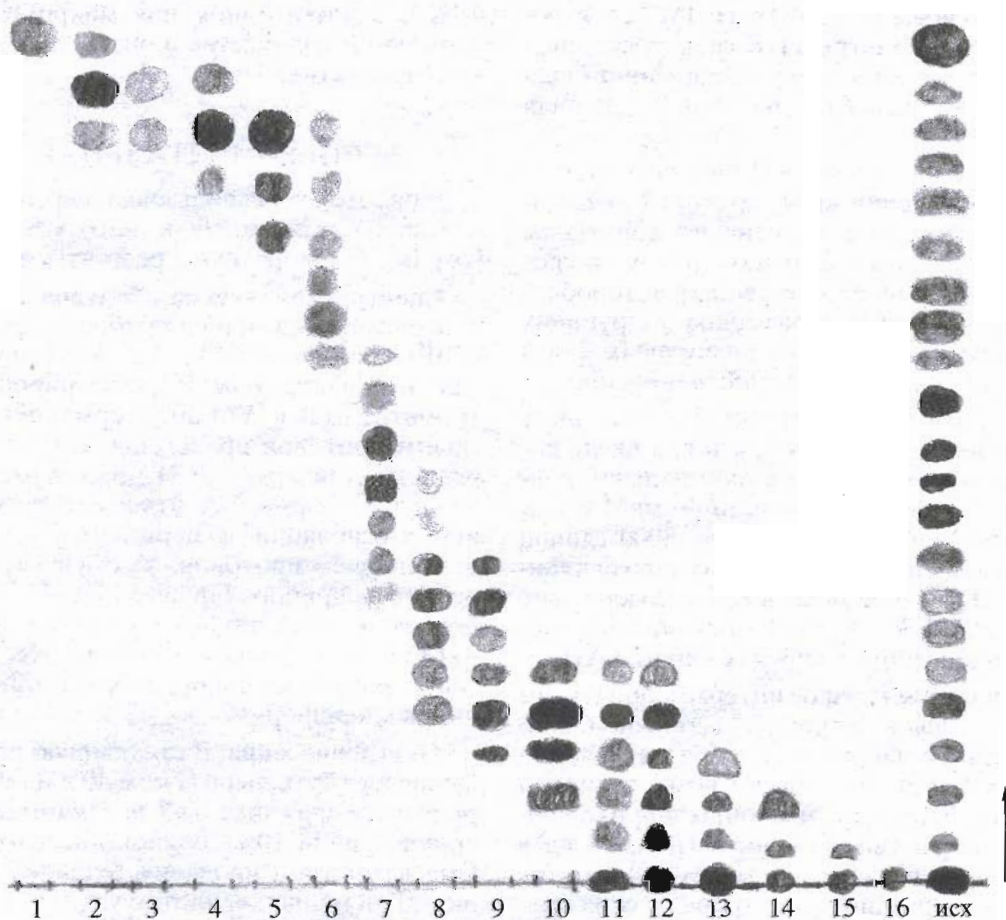


Рис. 2. ТСХ-анализ фракций, полученных после разделения смеси окисленных производных ПНЖК методом колоночной хроматографии на силикагеле.

исходной смеси окисленных производных ПНЖК, мы получили 16 фракций (рис. 2), представляющих собой смеси меньшего числа компонентов, чем исходная смесь. При этом только две

из полученных фракций (№ 5 и 10, рис. 2) обладали антимикробной активностью.

Выделив из этих фракций индивидуальные соединения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и



## Воздействие 4-HNE на тест-микроорганизмы

Концентрация в клетке 4-HNE, мкМ	Активность, ЕД/мл	Тест-микроорганизмы*		
		<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Bac. subtilis</i>
240	38000	100	100	100
120	33500	88	88	70
80	28500	75	68	20
60	24000	64	52	4
48	21000	56	54	0
40	8000	21	14	0

\* Отношение числа погибших клеток к общему числу клеток (в %).

протестировав их антимикробную активность, мы обнаружили, что вещество фракции № 10, соответствующее пику 7 рис. 1, обладает высокой активностью, составляющей до 20% от общей активности АП. На основании данных <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии и УФ-спектрофотометрии этому соединению была приписана структура (2E)-4-гидрокси-2-ноненаля (4-HNE).

Бактерицидный эффект АП (водного раствора продуктов окисления жира сардины *S. melanosticta*) и (2E)-4-гидрокси-2-ноненаля наблюдался нами в отношении вегетативных клеток микроорганизмов, в том числе патогенных энтеробактерий, мистерий, протеев, плазмокоагулирующих стафилококков и др., а также споровых форм бактерий, включая роды *Clostridium* и *Bacillus*.

Бактерицидная активность 4-HNE сохранялась в отношении неспорных клеток, в том числе кишечной и кокковой групп, при минимальной концентрации в инкубационной смеси 40 мкМ и при этой концентрации соответствовала 8000 единиц действия бензилпенициллина на 1 мл инкубационной смеси (ЕД/мл) (таблица). Общее содержание 4-HNE составило 1.8% сухого веса суммарных продуктов окисления жира, входящих в состав АП.

В последнее время возрос интерес к продуктам перекисного окисления липидов, особенно к альдегидам. Среди большого разнообразия соединений, образующихся при перекисном окислении клеточных мембран и проявляющих широкое цитотоксическое действие, именно 4-HNE, обладающая наибольшим токсическим действием [19], является стимулятором различных патологических процессов [20]. Присутствие 4-HNE в концентрации 40–60 мкМ вызывает фрагментацию ДНК, чем объясняют его генотоксический эффект [21, 22], а при концентрации 4-HNE более 100 мкМ происходит гибель клетки, обусловленная ингибированием гликолитических ферментов [23], дыхания митохондрий и синтеза белка и ДНК [24–26].

Несмотря на довольно широкое изучение цитотоксического действия 4-HNE, его антимик-

робные свойства до сих пор оставались неизвестными. Нам удалось в специфических условиях (мягкое окисление кислородом воздуха полиненасыщенного жира в водной эмульсии) получить 4-HNE в достаточном для микробиологических испытаний количестве и определить его антимикробную активность.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе был использован жир, полученный из сардины *S. melanosticta* по методу Блайя и Дайера [26]. Все растворители и реагенты марки "х. ч."

**Спектроскопическое оборудование.** УФ-спектры регистрировали на приборах Specord UV VIS (ГДР) и Perkin-Elmer 555 UV-VIS (Германия) в метаноле. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker WM-500 (Германия), химические сдвиги протонов приведены относительно внутреннего стандарта – (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si для раствора в дейтерохлороформе. Все отнесения сигналов сделаны на основании экспериментов с селективным подавлением протонов. Масс-спектры регистрировали на приборе Finnigan Mat 4615B (США) при ионизации электронным ударом (70 эВ) и прямым вводом пробы в источник. ИК-спектры регистрировали на приборе IR-420 (Shimadzu, Япония) в хлороформе.

**Окисление жира.** В стеклянную плотно закрывающуюся бутылку объемом 40 л помещали 2700 г рыбьего жира сардины *S. melanosticta* и 27 л воды, подкисленной 10% соляной кислотой до pH 4.6. Смесь гомогенизировали в течение 2 мин на механической мешалке, плотно укупоривали и выдерживали при температуре 37°C в течение 35 сут. По прошествии каждых полных суток реакционную смесь тщательно гомогенизировали до образования эмульсии. По истечении срока реакции водный слой отделяли, фильтровали, плотно укупоривали и хранили при 0°C.

**Экстракция хлороформом.** К водорастворимым продуктам окисления жира добавляли хлороформ в соотношении 1 : 10 и непрерывно пере-



мешивали при 25°C в течение 30 мин. После отделения хлороформного слоя процедуру повторяли. Хлороформные фракции объединяли, сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в бензоле в соотношении 1 : 1 по весу и хранили при 0°C. Из 27 л исходного водного раствора получали 5.8 г водорастворимых продуктов окисления жира.

**Хроматографию** в тонком слое проводили на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, ЧСФР) с применением системы гексан–диэтиловый эфир, 2 : 3. Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали 5% раствор серной кислоты в метаноле либо 10% раствор фосфорномолибденовой кислоты в этаноле.

**Колоночную хроматографию** осуществляли на силикагеле L Chemapol (ЧСФР) (40–100 мкм, 40 г). На колонку наносили 2.5 г сухой смеси продуктов окисления жира и элюировали в следующей последовательности: гексаном (200 мл), бензолом (800 мл) и далее смесью бензол–этилацетат (1 : 1, 600 мл). Элюат собирали в пробирки по 10–30 мл. Фракции, содержащие близкие по составу смеси (данные ТСХ), объединяли (рис. 2), упаривали, высушивали в вакууме и тестировали на антимикробную активность. Из фракции 10 получали 250 мг сырого 4-HNE.

**Аналитическую ВЭЖХ** осуществляли на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-6A (Япония) с использованием колонок Zorbax ODS (4.6 × 250 мм, 5 мкм, DuPont, США) или Separon SGX C18 (4.6 × 250 мм, 4 мкм “Tessek”, ЧСФР). В качестве детекторов использовали рефрактометр RID-6A и УФ-детектор с диодной матрицей SPD-M6A (оба – Shimadzu, Япония). С помощью препаративной ВЭЖХ на колонке Zorbax ODS (9.4 × 250 мм, 5 мкм), используя в качестве элюента смесь метанол–вода–уксусная кислота (60 : 40 : 0.05) из 500 мг сырого 4-HNE (фракция 10) получили 20 мг хроматографически однородного (рис. 1) продукта, RT 8.45 мин, R<sub>f</sub> 0.17. УФ-спектр: λ<sub>max</sub> 225 нм, ε 11000. ИК-спектр (ν, см<sup>-1</sup>): 650 (транс- >C=C<), 1200–1240 (C-O), 1380 (CH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-), 1440 (>CH=), 1620 (O=CH-CH=C<), 1690 (O=C<), 2900, 2915 (CH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-), 3400 (-OH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (δ, м.д., J, Гц): 0.91 (3H, т, J<sub>9,8</sub> 7, 9-H<sub>3</sub>); 1.25 (6H, м, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>); 1.62 (2H, м, 5-H<sub>2</sub>); 4.40 (1H, ддт, J<sub>4,2</sub> 1.5, J<sub>4,3</sub> 6, J<sub>4,5</sub> 7, 4-H); 6.28 (1H, ддт, J<sub>2,1</sub> 7, J<sub>2,3</sub> 16, J<sub>2,4</sub> 1.5, 2-H); 6.78 (1H, дд, J<sub>3,2</sub> 16, J<sub>3,4</sub> 6, 3-H); 9.56 (1H, д, J<sub>1,2</sub> 7, 1-H). EI-MS триметилсилилпроизводного метоксима 4-HNE, m/z: 257 [M]<sup>+</sup>, 242 [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 228 [M - CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 214 [M - CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 200 [M - CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 186 [M - CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 173 [M - CH=CHCH=NOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 89 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiO]<sup>+</sup>.

**Определение антимикробной активности.** Раствор 30 мкг сухого образца окисленных липидов в 300 мкл 0.1 М водного раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, делили

на 6 равных частей, 5 из которых разбавляли 0.9% водным раствором NaCl в объемных соотношениях 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 и 1 : 5. В качестве контрольной пробы использовали 1 мл 0.9% раствора NaCl в воде. К каждой пробе прибавляли по 1 млрд. клеток тест-культуры *Escherichia coli* M-17, смесь выдерживали 24 ч при температуре 25°C, после чего в каждый образец прибавляли 5 объемов мясopептонного бульона с глюкозой. Далее смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Активность определяли по методу [28], используя кривые биологического действия бензилпенициллина. В случае обнаружения антимикробной активности при разведении 1 : 5, процедуру повторяли при больших разведениях образцов до исчезновения активности. Аналогичные процедуры проводили с культурами *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark J.R. // Bot. Gaz. 1899. V. 28. P. 289–314.
2. Moleyar V., Narasimham P. // Int. J. Food Microb. 1992. V. 16. P. 337–342.
3. Lemos T.L.G., Matos F.J.A., Alencar J.W., Craveiro A.A., Clark A.M., Mcchesney J.D. // Phytother. Res. 1990. V. 4. P. 82–84.
4. Crespo M.E., Jimenez J., Gomis E., Navarro C. // Microbios. 1990. V. 61. P. 181–184.
5. Villar A., Recio M.C., Rios J.L., Zafrapolo M.C. // Pharmazie. 1986. V. 41. P. 298–299.
6. Barel S., Segal R., Yashphe J. // J. Ethnopharm. 1991. V. 33. P. 187–191.
7. Kurita N., Koike S. // Agric. Biol. Chem. 1982. V. 46. P. 159–165.
8. Deans S.G., Ritchie G. // Int. J. Food Microb. 1987. V. 5. P. 165–180.
9. Kabara J.J., Vrable R., Lie Ken Jie M. // Lipids. 1977. V. 9. P. 753–755.
10. Ahmed S.M., Ahmad F., Osman S.M. // J. Am. Oil Chem. Soc. 1985. V. 62. P. 1578–1580.
11. Kabara J.J. // J. Am. Oil Chem. Soc. 1984. V. 61. P. 397–403.
12. Rosahl S. // Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. J. Biosciences. 1996. B. 51. S. 123–138.
13. Akeda Y., Shibata K., Ping X., Tanaka T., Taniguchi M. // J. Antibiot. 1995. V. 48. P. 363–368.
14. Orafidiya L.O. // Phytother. Res. 1993. V. 7. P. 269–271.
15. Горгуев Т.Б. Термические и практические вопросы иммунологии. Киев: Здоровье, 1958. С. 309.
16. Горгуев Т.Б. // Лаб. дело. 1960. № 1. С. 43–44.
17. Блинов Ю.Г., Шульгина Л.В., Горшкова М.М., Акулин В.Н., Бывальцева Т.М., Давлетшина Т.А. Пат. 2043725. РФ. 1995.
18. Bernart M.W., Whatley G.G., Gerwick W.H. // J. Natural Products. 1993. V. 56. P. 245–249.
19. Benedetti A., Comporti M., Esterbauer H. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 620. P. 281–296.

20. Коган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. // Биофизика. 1986. Т. 18. С. 1–137.
21. Brambilla G., Sciaba L., Faggin P., Maura A., Marinari U.M., Ferro M., Esterbauer H. // *Mutat. Res.* 1986. V. 171. P. 169–176.
22. Eckl P., Esterbauer H. // *Adv. Biosci.* 1989. V. 76. P. 141–157.
23. Schauer R.J., Zollner H., Esterbauer H. // *Membrane Lipid Peroxidation* / Ed. Vigo-Pelfrey C., Boca Raton: CRC Press, 1990. V. 111. P. 141–163.
24. Poli G., Chirpotto E., Biasi F., Pavia R., Albano E., Dianzani U. // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1982. V. 38. P. 71–76.
25. Hauptlorenz S., Esterbauer H., Moll W., Pumpel R., Schauenstein E., Puschendorf B. // *Biochem. Pharmacol.* 1985. V. 34. P. 3803–3809.
26. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. // *Free Rad. Biol. Med.* 1991. V. 11. P. 81–128.
27. Bligh E.G., Dyer W.J. // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. P. 911–917.
28. Bliss C.F. // *Assay of Penicillin Science.* 1944. V. 100. P. 577–578.

## (2E)-4-Hydroxy-2-nonenal, Active Component of a New Natural Antimicrobial Preparation

V. G. Rybin<sup>#</sup>, D. V. Kuklev, T. M. Byval'tseva, Yu. G. Blinov, and V. N. Akulin

*Pacific Research Fishery Center, tupik Shevchenko 4, Vladivostok, 690600 Russia*

A mixture of water-soluble oxidation products of *Sardinops melanosticta* sardine oil was found to contain (2E)-4-hydroxy-2-nonenal. This was isolated by column chromatography on silica gel and reversed-phase HPLC. Its structure was elucidated by physicochemical methods. The activity of (2E)-4-hydroxy-2-nonenal against test cultures of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* was about 20% of the total antimicrobial activity of the preparation.

*Key words:* (2E)-4-hydroxy-2-nonenal, antimicrobial activity

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 25-7805; fax: +7 (4232) 25-7783; e-mail: root@tinro.marine.su.