

## ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ РАЗРАБОТКИ ГАЛЕНОВОГО ПРЕПАРАТА С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ БУТОНОВ ГВОЗДИКИ

### Н.Н. Бойко

к.фарм.н., мл. науч. сотрудник, лаборатория технологии лекарств, доцент кафедры фармацевтической технологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет (г. Белгород)  
E-mail: boykoniknik@gmail.com

### Д.И. Писарев

д.фарм.н., профессор кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет (г. Белгород)

### Е.Т. Жилиякова

д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической технологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет (г. Белгород)

### А.Ю. Малютина

к.фарм.н., доцент кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет (г. Белгород)

### О.О. Новиков

д.фарм.н., профессор, директор центра коллективного пользования (научно-образовательный центр) «Центр контроля качества лекарств», Российский университет дружбы народов (Москва)

### Т.П. Осолодченко

к.б.н., ст. науч. сотрудник, зав. лабораторией биохимии и биотехнологии, ГУ ИМИ им. И.И. Мечникова НАМН Украины (г. Харьков, Украина)

### М.С. Газарян

магистрант, Институт Фармации, Ереванский государственный университет (г. Ереван, Армения)

Цель исследований – разработка галенового препарата с антимикробной активностью из бутонов гвоздики. Материалом служили измельченные бутоны гвоздики с фракцией частиц менее 0,5 мм. В качестве экстрагента использовали этиловый спирт различной концентрации 26, 43, 56, 72, 82, 97±1 % об. Методы экстракции: простая мацерация и фильтрационная экстракция. Методы анализа: ОФ ВЭЖХ, гравиметрия. Вещество-стандарт – эвгенол, галловая кислота. Применение метода ОФ ВЭЖХ анализа показало присутствие в спиртоводных извлечениях из бутонов гвоздики девяти основных веществ, среди которых были идентифицированы: эвгенол, ацетилэвгенол, галловая кислота, флавоноиды и два не идентифицированных соединения. Стандартизацию суммарных препаратов предложено проводить по эвгенолу. Для экстракта (1:1 м/о) рекомендован нижний предел концентрации эвгенола 13,0% м/о, для настойки (1:10 м/о) рекомендован нижний предел концентрации эвгенола 1,3% м/о. Изучена антимикробная активность спиртоводных растворов на основе экстракта (1:1 м/о), выявлена наименьшая концентрация эвгенола 0,44% м/о в спиртоводных растворах, которая эквивалентна препарату сравнения – 0,05%-ного водного раствора хлоргексидина биглюконата.

**Ключевые слова:** ОФ ВЭЖХ анализ, антимикробная активность, эвгенол, галловая кислота, бутоны гвоздики, настойка, экстракт, фильтрационный метод экстракции.

**Для цитирования:** Бойко Н.Н., Писарев Д.И., Жилиякова Е.Т., Малютина А.Ю., Новиков О.О., Осолодченко Т.П., Газарян М.С. Исследования в области разработки галенового препарата с антимикробной активностью из бутонов гвоздики. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(9):3–11. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-09-01>

Согласно исследованиям отечественных авторов, стоматологические заболевания у людей в Российской Федерации широко распространены. При этом хронические воспалительные заболевания пародонта у взрослого населения РФ достигают 98%, что в итоге приводит к потере зубов [1].

Одним из важных пусковых механизмов развития гингивита, пародонтита, стоматита и ряда других заболеваний полости рта считается микробиологический фактор [2]. Поэтому противомикробные препараты часто используются для лечения заболеваний пародонта [3]. Однако вследствие ограни-

ченного ассортимента синтетических противомикробных активных фармацевтических ингредиентов и их широкой доступности существует определенная опасность развития резистентности у микроорганизмов к ним [4]. Одним из альтернативных путей решения данной проблемы является использование действующих веществ растительного происхождения, а также их комбинирование с синтетическими активными фармацевтическими ингредиентами [5–7].

Гвоздичное дерево (гвоздика душистая), лат. *Caryophyllus aromaticus* L., или *Syzygium aromaticum* L., – многолетнее дерево семейства миртовые (Myrtaceae). Это растение используется как в медицинских, так и в пищевых целях. Сырьем являются бутоны гвоздики, из которых выделяют эфирное масло и эвгенол. Данные субстанции широко используются в стоматологической практике как антисептик и составная часть зубных пломб [8–10].

В состав бутонов входит эфирное масло – до 20% (при этом в нем доминируют эвгенол 70–85%, кариофиллен 5–12% и ацетилэвгенол 3%), обнаружены гидролизуемые дубильные вещества – до 2%, галловая кислота – менее 1%, флавоноиды (кемпферол, кверцетин, рамнетин, мирицетин и др.), тритерпеновые сапонины, фитостерины и др. [11]. Данные вещества проявляют различные ценные фармакологические свойства: антимикробные, обезболивающие, противораковые, антиоксидантные, противовоспалительные и др. [12, 13].

Таким образом, разработка галенового препарата из бутонов гвоздики для лечения и профилактики различных стоматологических заболеваний инфекционного характера является перспективной и актуальной задачей для стоматологической практики.

Цель исследования – разработка галенового препарата с антимикробной активностью из бутонов гвоздики.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Растительное сырье.** Для исследований использовали лекарственное растительное сырье (ЛРС) – бутоны гвоздики, приобретенное в фирме «Лечец» (г. Харьков, Украина), от 08/2018. Непосредственно перед исследованиями необходимое количество растительного сырья измельчали до фракции частиц менее 0,5 мм с помощью высокоскоростного измельчителя HC-500Y (Китай). От-

деление нужной фракции частиц растительного сырья производили с помощью лабораторного сита с размером ячеек 0,5 мм.

**Методы экстракции. Простая мацерация:** 1,0 г измельченного растительного сырья (точная навеска), помещали во флакон и заливали 10,0 мл экстрагента, взвешивали для большей точности; далее флакон герметично закрывали, настаивали при  $24 \pm 1$  °С в течение 24 ч.

После настаивания извлечение сливали и центрифугировали в течение 5 мин, при 13 000 об/мин на центрифуге Eppendorf AG 22331. Количественный анализ галловой кислоты и эвгенола в лекарственном растительном сырье и извлечениях проводили с помощью обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).

**Фильтрационный метод:** 10,0 г измельченного растительного сырья (точная навеска), помещали в перколятор (насыпной объем сырья составлял  $20,0 \pm 0,5$  мл), который устанавливали в водяной термостат с температурой  $25,0 \pm 0,2$  °С.

Объемный расход экстрагента, составляющий  $0,041 \pm 0,002$  мл/(г·мин), задавали с помощью шприцевого насоса UN 2/50. Извлечения собирали в мерные колбы по 10,0 мл (соотношение ЛРС : извлечение – 1:1 м/о), взвешивали и анализировали на сухой остаток, плотность, галловую кислоту и эвгенол.

**Методы анализа. Метод ОФ ВЭЖХ.** Количественный анализ эвгенола в извлечениях проводили методом ОФ ВЭЖХ с использованием оборудования Agilent Technologies, серия Agilent 1200 Infinity (США) при следующих условиях: подвижная фаза (А) – 1%-ный водный раствор муравьиной кислоты, (Б) – этиловый спирт 96% об. в режиме элюирования с линейным градиентом; хроматографическая колонка Supelco Ascentis express C18, длина – 100 мм, внутренний диаметр – 4,6 мм, размер частиц – 2,7 мкм; скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин; температура хроматографической колонки – 35 °С; объем образца – 1 мкл. Условия анализа ОФ ВЭЖХ были такими же, как в работе Жиликовой и др. [14]. Аналитические длины волн: 370, 282, 270 нм.

Основные параметры валидации метода анализа и пригодности ОФ ВЭЖХ системы для определения галловой кислоты и эвгенола представлены в табл. 1.

**Таблица 1. Основные параметры валидации метода анализа и пригодности ОФ ВЭЖХ системы для определения галловой кислоты и эвгенола**

Параметр	Фармакопейное ограничение [15]	Галловая кислота*	Эвгенол*
Время удерживания, мин	–	3,8±0,2	30,0±1,0
Фактор асимметрии	0,8–1,5	0,87	0,84
Разрешение между пиками	≥1,5	1,5	23,9
Относительное стандартное отклонение, RSD, %	≤2,0	1,8	1,6
LOD, г/мл	–	1,0·10 <sup>-5</sup>	7,8·10 <sup>-5</sup>
LOQ, г/мл	–	3,0·10 <sup>-5</sup>	2,4·10 <sup>-4</sup>
Коэффициент детерминации, r <sup>2</sup>	≥0,98	0,9999	0,9999
Линейное регрессионное уравнение, C(г/мл)=f(S(mAU·c))	–	C=(2,39±0,02)·10 <sup>-7</sup> ·S	C=(6,42±0,10)·10 <sup>-7</sup> ·S

Примечание: \* – среднее значение и его ошибку ( $X \pm \Delta X$ ) вычисляли при числе повторов  $n = 3$  и уровне значимости  $p = 0,95$ .

Плотность и сухой остаток определяли гравиметрическим методом, согласно общим фармакопейным статьям ОФС.1.2.1.0014.15 и ОФС.1.4.1.0021.15 [15]. Содержание экстрактивных веществ, эвгенола и галловой кислоты в растительном сырье проводили по методу 1 общей фармакопейной статьи ОФС.1.5.3.0006.15. Выход экстрактивных веществ, эвгенола и галловой кислоты, рассчитывали по формуле

$$\varphi(\%) = \frac{C \cdot V}{m \cdot Y} \cdot 100,$$

где  $\varphi$  – выход веществ, %;  $C$  – концентрация вещества в извлечении, г/мл;  $V$  – объем извлечения (экстрагента), мл;  $m$  – навеска ЛРС, г;  $Y$  – массовая доля вещества в ЛРС, г/г.

**Реактивы и растворители.** В качестве экстрагентов использовали этиловый спирт различной концентрации: 26, 43, 56, 72, 82, 97±1% об. Этиловый спирт 97% об., серия 221117, годен до 11.2022 г. (ЗАО РФК, с. Верхняя Любовша, Орловская обл, Россия). В качестве стандартных веществ использовали: эвгенол («Sigma-Aldrich», Германия), содержание ≥99,0%, CAS 97-53-0, и фармакопейный стандартный образец галловой кислоты (Государственная фармакопея Украины), содержание ≥98,0%.

**Метод антимикробной активности.** Изучение антимикробной активности вытяжек проводили методом диффузии в агар «колодцами». В исследованиях использовали шесть тест-штаммов

микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований изучали состав и выход биологически активных веществ (БАВ) в этиловый спирт с различной концентрацией при помощи ОФ ВЭЖХ анализа. На рис. 1, представлена типичная хроматограмма извлечения из бутонов гвоздики на основе этилового спирта 82% об. при длине волны 255 нм. Хроматограмма при этой длине волны дает возможность увидеть все основные вещества (флавоноиды, галловая кислота, эвгенол, ацетилэвгенол), которые могут быть обнаружены с помощью диодно-матричного детектора.

Как видно из рис. 1, в результате ОФ ВЭЖХ анализа извлечения на этиловом спирте 82% об., обнаружено девять основных веществ. Спектры данных веществ представлены на рис. 2.

Среди обнаруженных веществ доминировали вещества с временами выхода: 3,8 мин (галловая кислота), 6,9 и 7,9 мин (группа не идентифицированных веществ), 18,2 мин (не идентифицированный флавоноид), 31,2 мин (эвгенол) и 34,5 мин (ацетилэвгенол). Поэтому для оптимального выбора экстрагента мы ориентировались на выход данных веществ.

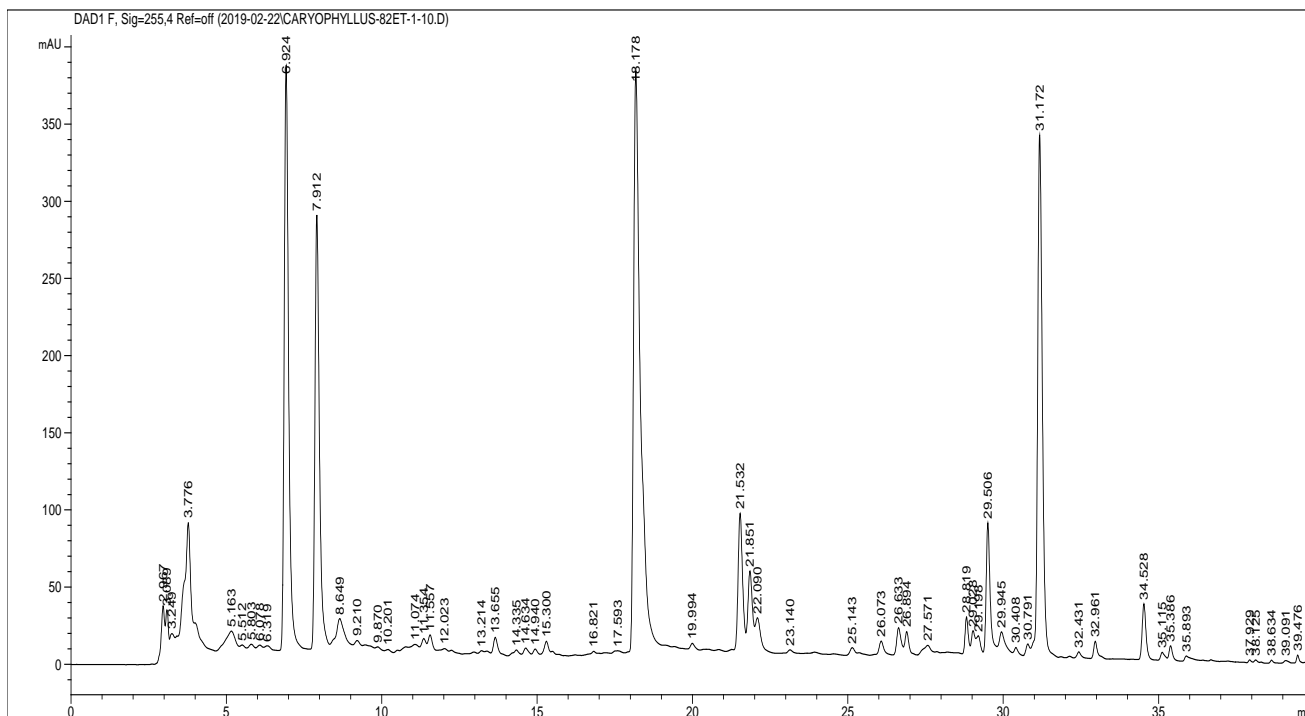


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из бутонов гвоздики (длина волны 255 нм)

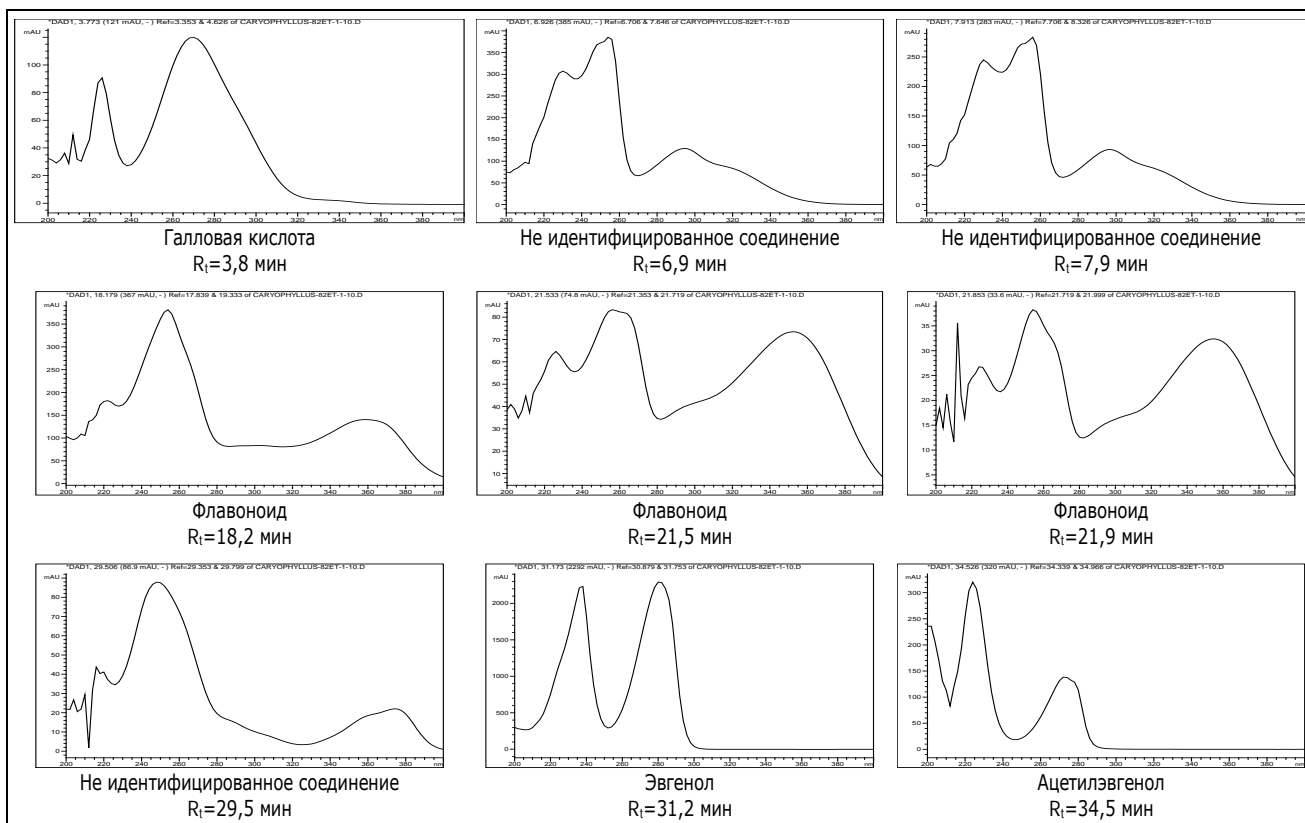


Рис. 2. УФ-спектры и времена удерживания основных БАВ, обнаруженных в извлечениях с помощью метода ОФ ВЭЖХ

Результаты ОФ ВЭЖХ анализа вытяжек на основе этилового спирта с различной концентрацией представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, наибольшие значения концентрации галловой кислоты и эвгенола наблюдаются для этилового спирта 82% об. На рис. 3, представлены эмпирические графики зависимости выхода БАВ из ЛРС от концентрации этилового спирта в условиях метода простой мацерации.

Как видно из графиков (рис. 3), максимальный выход (более 80%) для большинства веществ (кроме ацетилэвгенола) из бутонов гвоздики наблюдается для этилового спирта с концентрацией 82% об. При этом выход эвгенола и не идентифицированного соединения (время выхода 6,9 мин) в этиловый спирт данной концентрации достигал предельной величины 100±5%. Выход для галловой кислоты и не идентифицированного флавоноида (время выхода 18,2 мин) был несколько

ниже и соответственно составлял 86±4 и 77±4%. Наименьший выход наблюдался для ацетилэвгенола – 47±2%.

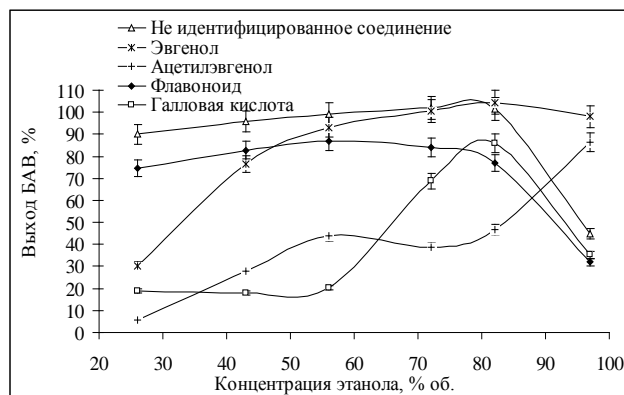


Рис. 3. Эмпирические графики зависимости выхода БАВ из бутонов гвоздики в этиловый спирт различной концентрации. Соотношение ЛРС : экстрагент 1:10 м/о, температура 24±1 °С, время настаивания 24 ч (число повторов n=3, уровень значимости p=0,95)

Таблица 2. Значения площади пика и концентрации для основных БАВ в извлечениях из бутонов гвоздики, полученных с помощью ОФ ВЭЖХ анализа в этиловом спирте различной концентрации

Соединение (аналитическая длина волны λ, нм)	Время удерживания, мин	Площадь пика соединения, mAU·s					
		Этиловый спирт, % об.					
		26	43	56	72	82	97
Галловая кислота (270)	3,8±0,2	388±19	370±19	422±21	1453±73	1779±89	730±37
Концентрация галловой кислоты, мг/мл		0,093±0,005	0,088±0,004	0,101±0,005	0,35±0,02	0,43±0,02	0,17±0,01
Эвгенол (282)	31,2±1,0	6994±350	17550±878	21520±1076	23560±1178	24000±1200	22576±1129
Концентрация эвгенола, мг/мл		4,5±0,2	11,3±0,6	13,8±0,7	15,1±0,8	15,4±0,8	14,5±0,7
Не идентифицированное соединение (290)	6,9±0,3	1077±54	1139±57	1184±59	1240±62	1210±61	534±27
(370)	18,2±0,9	2015±101	2230±112	2346±117	2311±116	2073±104	864±43
Ацетилэвгенол (270)	34,5±1,2	138±7	679±34	1069±54	967±48	1139±57	2113±106

Примечание: среднее значение и его ошибку ( $X \pm \Delta X$ ) вычисляли при числе повторов  $n = 3$  и уровне значимости  $p = 0,95$ .

Таким образом, наиболее оптимальным экстрагентом для получения суммарного препарата в виде настойки или экстракта можно считать этиловый спирт с концентрацией 80±5 % об., поскольку в этиловом спирте данной концентрации будет наблюдаться максимальный выход у большинства БАВ.

Получены следующие экспериментальные данные по определению некоторых численных показателей ЛРС в виде содержания эвгенола, галло-

вой кислоты, сухого остатка, которые переходят в этиловый спирт 82% об. (число повторов  $n=3$ , уровень значимости  $p=0,95$ ), % масс.:

Содержание эвгенола ..... 14,7±0,7  
 Содержание галловой кислоты ..... 0,49±0,03  
 Содержание сухого остатка ..... 34,7±1,7

На втором этапе исследований изучали выход сухого остатка, галловой кислоты и эвгенола из ЛРС в условиях применения фильтрационного метода экстракции (температура – 25,0±0,2 °С,

экстрагент – этиловый спирт  $82 \pm 1\%$  об.). Полученные результаты представлены на рис. 4.

Как видно из графиков (рис. 4), выход эвгенола из ЛРС в первом извлечении (соотношение ЛРС : извлечение 1:1 м/о, время извлечения 56 мин) достигает величины  $93 \pm 5\%$ . Выход сухого остатка и галловой кислоты значительно меньше и составляет  $65 \pm 3$  и  $44 \pm 2\%$  соответственно.

К пятому извлечению (соотношение ЛРС : извлечение 1:5 м/о, время извлечения 154 мин)

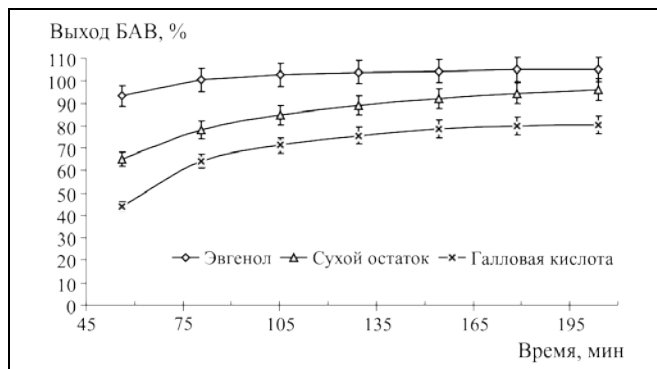


Рис. 4. Зависимость выхода БАВ из ЛРС от времени экстракции. Фильтрационный метод экстракции (число повторов  $n=3$  и уровень значимости  $p=0,95$ )

Так, в первом извлечении (1:1 м/о) наблюдается наибольшая концентрация веществ, причем концентрация эвгенола и сухого остатка достигает весьма значительной величины  $13,8 \pm 0,7\%$  м/о и  $22,7 \pm 1,1\%$  м/о, что характерно для жидких экстрактов. Получить экстракт с аналогичными параметрами, возможно в рамках реперколяции или с применением дополнительной стадии упаривания.

Результаты исследования говорят о целесообразности применения фильтрационного метода, как для получения жидкого экстракта (1:1 м/о), так и настойки (1:5 м/о) из бутонов гвоздики на основе этилового спирта с концентрацией 82% об. При этом выход эвгенола из ЛРС в случае получения жидкого экстракта достигает величины 93%, а его концентрация –  $13,8 \pm 0,7\%$  м/о всего за один час процесса экстракции. В случае получения настойки (1:5 м/о), выход эвгенола достигает 100%, а его концентрация в настойке равна  $3,0 \pm 0,2\%$  м/о за время экстракции 154 мин.

Полученный экстракт (1:1 м/о), является удобным полупродуктом для разработки на его основе мягких лекарственных форм, например, мазей и гелей для местного применения в стоматологии, что будет задачей в дальнейших исследованиях.

выход из ЛРС эвгенола, галловой кислоты и сухого остатка достигает величины  $104 \pm 5$ ,  $79 \pm 4$ ,  $92 \pm 5\%$  соответственно. Интересно отметить полученное завышенное значение выхода эвгенола, которое, вероятно, получилось вследствие неравномерности содержания эвгенола в сырье.

На рис. 5 отображены зависимости относительной концентрации галловой кислоты, эвгенола и сухого остатка БАВ в извлечениях от времени экстракции.

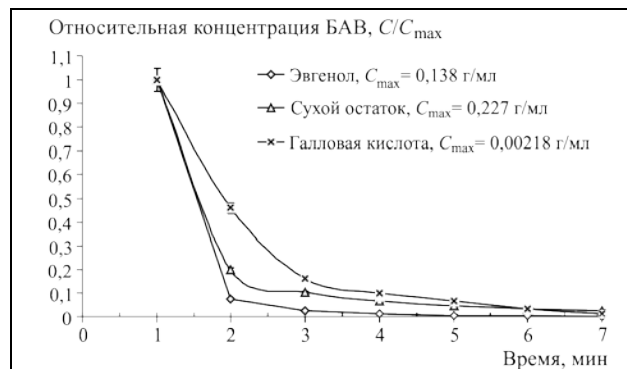


Рис. 5. Зависимость относительной концентрации БАВ в извлечениях от времени экстракции

Стандартизацию полученного экстракта предлагается проводить по доминирующему компоненту – эвгенолу, который обладает рядом полезных фармакологических эффектов (в частности, антимикробным, обезболивающим и противовоспалительным эффектами). При этом для обоснования его нижнего предела как в экстракте, так и в настойке необходимо проведение дополнительных исследований. Однако, используя полученные результаты выхода эвгенола из ЛРС (для экстракта – более 90%, для настойки – 100%) и требований к его содержанию в растительном сырье (не менее 150 мл/кг), согласно монографии «01/2008:0376, corrected 7.6, Clove», Европейской фармакопеи [16], можно рекомендовать нижний предел концентрации эвгенола для экстракта  $\geq 13,0\%$  м/о [ $13,5=15,0 \cdot 90 / (1 \cdot 100)$ ] и для настойки (1:5 м/о) – более  $\geq 2,5\%$  м/о [ $3,0=15,0 \cdot 100 / (5 \cdot 100)$ ].

На третьем этапе исследований изучали антимикробный эффект спиртовых растворов на основе жидкого экстракта (1:1 м/о), который был получен с помощью фильтрационного метода. Данные исследования позволят провести оценку биофармацевтической эквивалентности антимикробной активности разрабатываемой

настойки из бутонов гвоздики и препарата сравнения, в качестве которого был выбран 0,05%-ный водный раствор хлоргексидина биглюконата.

Данные *in vitro* анализа антимикробной активности спиртоводных растворов экстракта (1:1 м/о) на основе этилового спирта 82% об., которые были получены методом диффузии в агар «колод-

цами», а также 0,05%-ного водного раствора и этилового спирта 70% об. представлены в табл. 3.

Как видно из полученных данных, антимикробная активность спиртоводного раствора с наименьшей концентрацией эвгенола 0,44% м/о, практически эквивалентна 0,05%-ному водному раствору хлоргексидина биглюконата, за исключением тест-штамма *C. albicans* ATCC 885-653.

**Таблица 3. Противомикробная активность спиртоводных растворов жидкого экстракта (1:1 м/о) из бутонов гвоздики и препарата сравнения**

Вещество		Диаметр зоны задержки роста, мм (число повторов $n=3$ , $p=0,95$ )					
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
Эвгенол, концентрация в растворе, % м/о	2,6	25,7±2,5	22,0±2,5	22,0±2,5	21,7±2,5	26,0±2,5	20,3±2,5
	2,3	25,7±2,5	21,7±2,5	21,7±2,5	21,3±2,5	25,7±2,5	20,3±2,5
	1,3	25,0±2,5	22,0±2,5	20,7±2,5	20,7±2,5	25,0±2,5	19,7±2,5
	0,69	24,7±2,5	21,0±2,5	20,3±2,5	21,0±2,5	24,0±2,5	19,0±2,5
	0,44	23,3±2,5	21,3±2,5	20,3±2,5	21,3±2,5	23,7±2,5	18,7±2,5
Хлоргексидин биглюконат водный раствор 0,05%-ный		24,3±2,5	20,7±2,5	17,0±2,5	16,3±2,5	22,7±2,5	24,3±2,5
Этиловый спирт 70% об.		Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

Используя результаты антимикробной активности спиртоводных растворов (табл. 3), можно пересмотреть принятое выше значение нижнего предела концентрации эвгенола  $\geq 3,0\%$  м/о для настойки (1:5 м/о) в сторону его снижения до значения  $\geq 1,3\%$  м/о, которого можно ожидать для настойки (1:10 м/о).

Таким образом, проведенные исследования в области разработки галенового препарата из бутонов гвоздики позволили апробировать новую технологию получения экстракта (1:1 м/о) и настойки (1:5 м/о), выбрать концентрацию этилового спирта, в который перейдет большинство обнаруженных веществ, предложить минимальную концентрацию эвгенола для его стандартизации в экстракте и настойке, выявить уровень антимикробной активности спиртоводного извлечения, который эквивалентен препарату сравнения.

## Выводы

1. Апробирована простая технология получения жидкого экстракта и настойки из бутонов

гвоздики. Установлено, что среди идентифицированных веществ значительный выход наблюдается в этиловый спирт с концентрацией  $80\pm 5\%$  об. С помощью метода фильтрационной экстракции за один час процесса фильтрационной экстракции можно получить жидкий экстракт 1:1 м/о с концентрацией эвгенола 13,8% м/о и выходом эвгенола 93%, за два с половиной часа – настойку 1:5 м/о с концентрацией эвгенола 3,0% м/о и выходом эвгенола 100%.

2. Применение метода ОФ ВЭЖХ показало присутствие в спиртоводных извлечениях из бутонов гвоздики девяти основных веществ, среди которых обнаружены: эвгенол, ацетилэвгенол, галловая кислота, три флавоноида и три не идентифицированных соединения. Стандартизацию суммарных препаратов предложено проводить по эвгенолу. Для экстракта (1:1 м/о) рекомендован нижний предел концентрации эвгенола 13,0% м/о, для настойки (1:10 м/о) – 1,3% м/о.

3. Изучена антимикробная активность спиртовых растворов на основе экстракта (1:1 м/о), выявлена наименьшая концентрация эвгенола (0,44% м/о) в спиртовых растворах, которая по антимикробной активности эквивалентна препарату сравнения 0,05%-ному водному раствору хлоргексидина биглюконата.

**Авторы выражают свою искреннюю благодарность Николаю Евстахиевичу Блажеевскому, д.х.н., профессору кафедры физической и коллоидной химии Национального фармацевтического университета (г. Харьков, Украина) за предоставление стандартных веществ.**

*Результаты получены в рамках выполнения государственного задания № 12.6429.2017/БЧ «Комплексные исследования объектов растительного происхождения в процессе создания ряда целевых лекарственных форм для проктологии».*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Микляев С.В., Леонова О.М., Суценко А.В. Анализ распространенности хронических воспалительных заболеваний тканей пародонта // Современные проблемы науки и образования. 2018(2); URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27454> (дата обращения: 09.07.2019).
2. Лукичев М.М., Ермолаева Л.А. Современные представления о роли микрофлоры в патогенезе заболеваний пародонта // Институт Стоматологии. 2018; 1(78):92–94.
3. Wilder R.S., Ryan M.E. Chemotherapeutics in the treatment of periodontal disease // Decisions in Dentistry. 2018; 4(4):49–52.
4. Haque M., Sartelli M., Haque S.Z. Dental Infection and Resistance-Global Health Consequences. // Dent J (Basel). 2019; 7(1):22.
5. Ishnava K.B. Role of herbal medicine in dental health // J Environ Chem Toxicol. 2018; 2(1):28–29.
6. Saquib S.A., AlQahtani N.A., Ahmad I., Kader M.A., Al Shahrani S.S., Asiri E.A. Evaluation and comparison of antibacterial efficacy of herbal extracts in combination with antibiotics on periodontal pathobionts: an in vitro microbiological study // Antibiotics (Basel). 2019; 8(3):89–101.
7. Cheesman M.J., Ilanko A., Blonk B., Cock I.E. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? // Phcog Rev. 2017; 11:57–72.
8. Marchese A., Barbieri R., Coppo E., Orhan I.E., Daglia M., Nabavi S.F., Izadi M., Abdollahi M., Nabavi S.M., Ajami M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: a mechanistic viewpoint // Critical Reviews in Microbiology. 2017; 43(6):668–689.
9. Thosar N.R., Chandak M., Bhat M., Basak S. Evaluation of antimicrobial activity of two endodontic sealers: zinc oxide with thyme oil and zinc oxide eugenol against root canal microorganisms –an in vitro study // International journal of clinical pediatric dentistry. 2018; 11(2), 79–82.
10. Markowitz K., Moynihan M., Liu M., Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol // Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology. 1992; 73(6):729–737.
11. Попова Н.В., Литвиненко В.И., Куцанян А.С. Лекарственные растения мировой флоры: энциклопед. Справочник. Харьков: Діса плюс, 2016. 540 с.
12. Mittal M., Gupta N., Parashar P., Mehra V., Khatri M. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: a comprehensive review // Int J Pharm Pharm Sci. 2014; 6(8):67–72.
13. Lim T.K. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 8, Flowers. Springer Netherlands, 2014; P.460–482.
14. Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Pisarev D.I., Malyutina A.Y., Boyko N.N. Studying the polyphenolic structure of *Laurus Nobilis* L. leaves // Indo Am J Pharm Sc. 2017;4(09):3066–3074.
15. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I. Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018.
16. European Pharmacopoeia. 8<sup>th</sup> ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014.

**Поступила после доработки 10 июля 2019 г.**

## STUDIES RELATING TO THE DEVELOPMENT OF A GALENICAL DRUG WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM CLOVE BUDS

© Authors, 2019

#### N.N. Boyko

Ph.D. (Pharm.), Junior Research Scientist of Laboratory Technology of Drugs, Associate Professor of Pharmaceutical Technology Department, Belgorod National Research University (Belgorod, Russia)  
E-mail: boykoniknik@gmail.com

#### D.I. Pisarev

Dr.Sc. (Pharm.), Professor of General Chemistry Department, Belgorod National Research University (Belgorod, Russia)

#### E.T. Zhilyakova

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Head of Pharmaceutical Technology Department, Belgorod National Research University (Belgorod, Russia)



**A.Yu. Maljutina**

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor of General Chemistry Department,  
Belgorod National Research University (Belgorod, Russia)

**O.O. Novikov**

Dr.Sc. (Pharm.), Professor,  
Director of Shared Knowledge Center (Research and Educational Center) «Drugs Quality Control Center»,  
Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, Russia)

**T.P. Osolodchenko**

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Head of Laboratory of Biochemistry and Biotechnology,  
Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (Kharkov, Ukraina)

**M.S. Ghazaryan**

Magister of Institute of Pharmacy of Yerevan State University (Yerevan, Armenia)

The article presents the results of studies on the development of a galenical drug with antimicrobial activity from clove buds. For studies, we used grinded clove buds with particles fraction less than 0.5 mm. As an extractant, we used ethanol with different concentration 26, 43, 56, 72, 82,  $97 \pm 1\%$  v/v. Methods of extraction: simple maceration and filtration extraction. Methods of analyses: RP HPLC and gravimetry. Standard substances were eugenol and gallic acid. Analytical wave lengths were 370, 282, and 270 nm. For the antibacterial study of extracts, we used the agar well diffusion method. In our research, we used six test-strain microorganisms: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653, and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Ethanol concentration, which extracts most of the substances was found; minimal eugenol concentration in the extract and tincture for their standardizations was suggested; the level of antimicrobial activity of ethanol-water extracts equivalent to a reference drug was determined. It was found that the major yield among the substances determined is observed with an ethanol concentration of  $80 \pm 5\%$  v/v. It was found that using filtration extraction method for one hour of the extraction process, we could obtain the liquid extract 1:1 m/v with eugenol concentration of 13.8% m/v and its yield 93%. In two and a half hours of the extraction process, we could obtain the tincture 1:5 m/v with eugenol concentration of 3.0% m/v and its yield 100%. RP HPLC method of analysis determined the presence of the following nine main substances: eugenol, acetyl eugenol, gallic acid, three flavonoids, and three non-identified substances in ethanol-water extracts from clove buds. It was suggested to carry out standardization of the resulting galenical drugs by eugenol. For the extract (1:1 m/v), low limit of eugenol concentration 13.0% m/v was suggested, and for the tincture (1:10 m/v), low limit of eugenol concentration 1.3% m/v was suggested. Antimicrobial activity of ethanol-water solutions of the extract (1:1 m/v) was studied; the lowest eugenol concentration of 0.44% m/v in ethanol-water solutions equivalent in terms of its antimicrobial activity to the reference drug 0.05% chlorhexidine digluconate water solution.

**Key words:** RP HPLC analysis, antimicrobial activity, eugenol, gallic acid, clove buds, tincture, extract, filtration extraction method.

**For citation:** Boyko N.N., Pisarev D.I., Zhilyakova E.T., Maljutina A.Yu., Novikov O.O., Osolodchenko T.P., Ghazaryan M.S. Studies relating to the development of a galenical drug with antimicrobial activity from clove buds. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(9):3-11. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-09-01>

**REFERENCES**

- Miklyaev S.V., Leonova O.M., Sushchenko A.V. Analiz rasprostranennosti hronicheskikh vospalitel'nykh zabolevanij tkanej parodonta // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2018(2); URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27454> (data obrashcheniya: 09.07.2019).
- Lukichev M.M., Ermolaeva L.A. Sovremennye predstavleniya o roli mikroflory v patogeneze zabolevanij parodonta // Institut Stomatologii. 2018; 1(78):92-94.
- Wilder R.S., Ryan M.E. Chemotherapeutics in the treatment of periodontal disease // Decisions in Dentistry. 2018; 4(4):49-52.
- Haque M., Sartelli M., Haque S.Z. Dental Infection and Resistance-Global Health Consequences. // Dent J (Basel). 2019; 7(1):22.
- Ishnava K.B. Role of herbal medicine in dental health // J Environ Chem Toxicol. 2018; 2(1):28-29.
- Saquib S.A., AlQahtani N.A., Ahmad I., Kader M.A., Al Shahrani S.S., Asiri E.A. Evaluation and comparison of antibacterial efficacy of herbal extracts in combination with antibiotics on periodontal pathobionts: an in vitro microbiological study // Antibiotics (Basel). 2019; 8(3):89-101.
- Cheesman M.J., Ilanko A., Blonk B., Cock I.E. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? // Phcog Rev. 2017; 11:57-72.
- Marchese A., Barbieri R., Coppo E., Orhan I.E., Daglia M., Nabavi S.F., Izadi M., Abdollahi M., Nabavi S.M., Ajami M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: a mechanistic viewpoint // Critical Reviews in Microbiology. 2017; 43(6):668-689.
- Thosar N.R., Chandak M., Bhat M., Basak S. Evaluation of antimicrobial activity of two endodontic sealers: zinc oxide with thyme oil and zinc oxide eugenol against root canal microorganisms –an in vitro study // International journal of clinical pediatric dentistry. 2018; 11(2), 79-82.
- Markowitz K., Moynihan M., Liu M., Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol // Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology. 1992; 73(6):729-737.
- Popova N.V., Litvinenko V.I., Kucanyan A.S. Lekarstvennye rasteniya mirovoj flory: encikloped. Spravochnik. Har'kov: Disa plus, 2016. 540 s.
- Mittal M., Gupta N., Parashar P., Mehra V., Khatri M. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of Syzygium aromaticum: a comprehensive review // Int J Pharm Pharm Sci. 2014; 6(8):67-72.
- Lim T.K. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 8, Flowers. Springer Netherlands, 2014; P.460-482.
- Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Pisarev D.I., Malyutina A.Y., Boyko N.N. Studying the polyphenolic structure of Laurus Nobilis L. leaves // Indo Am J Pharm Sc. 2017; 4(09):3066-3074.
- Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. XIV izdanie. Tom I. Moskva: Ministerstvo zdavoohraneniya Rossijskoj Federacii, 2018.
- European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014.