



ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 615.246.2, 615.322, 615.453.21

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВИРОВАННОГО ПОРОШКА ЧАГИ И АНАЛИЗ ЕГО СОРБЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ

Е.С. КОХ¹
А.С. ГАВРИЛОВ¹
А.А. ТУМАШОВ²
Л.П. ЛАРИОНОВ¹

¹⁾ *Уральский государственный
медицинский университет,
г. Екатеринбург*

²⁾ *Институт Органического
Синтеза, Уральское отделение
Российской Академии Наук,
г. Екатеринбург*

e-mail: lenakokh@gmail.com

Разработан способ получения порошка чаги (*Inonotus Obliquus*), освобожденного от балластных веществ (активированного). Выбраны оптимальные условия для получения порошка, обладающего удовлетворительными технологическими параметрами и высокой сорбционной активностью. В условиях *in vitro* и *in vivo* проведены исследования сорбционной способности получаемого порошка. Установлено, что активированный порошок чаги обладает повышенной сорбционной активностью в сравнении с измельченным сырьем чаги, не подвергшимся удалению балластных веществ. Показано, что сорбционная активность получаемого порошка не уступает данному показателю растительных энтеросорбентов на основе лигнина.

Ключевые слова: чага, порошок, энтеросорбент, сорбционная активность, активация.

Введение. В настоящее время в медицине широко применяются сорбенты органического и неорганического происхождения. По химической природе энтеросорбенты можно разделить на несколько групп: 1) углеродные, получаемые методом пиролиза натурального сырья, например, фруктовой косточки, скорлупы кокосового ореха, древесины в виде активированных углей с различными связующими; 2) на основе природных и синтетических смол; 3) кремнийсодержащие, включающие аэросилы и глины; 4) природные органические на основе пищевых волокон и гидролизатов – лигнин, хитин, пектин, альгинаты, микрокристаллическая целлюлоза; 5) комбинированные [1].

Согласно данным литературы сорбенты, четвертой группы имеют ряд преимуществ перед углеродными и кремнийсодержащими. В частности, отмечено общее положительное влияние пищевых волокон на функции желудочно-кишечного тракта. Показано, что дефицит этого компонента диеты, в среднем составляет 15-20 г/сутки. Имеются данные, что эффективность сорбции токсинов, холестерина лигнином находится на уровне активированного угля [2]. Кроме упомянутых выше положительных влияний пищевых волокон на функции ЖКТ, следует отметить связывание (возможно, с частичным сохранением активности) панкреатических ферментов, снижение содержания глюкозы и уплощение гликемических кривых, благоприятные изменения в спектре липидов крови, поглощение желчных кислот и компенсаторное увеличение их синтеза в печени, связывание пестицидов и некоторых канцерогенов [1]. Эти обстоятельства открывают перспективы для использования пищевых волокон в качестве добавок как в обычных пищевых продуктах, так и отдельно, т. е. в составе энтеросорбентов. Кроме того, по мнению большинства врачей энтеросорбенты являются средством с многогранной эффективностью, определяемой не только их патогенетическим (дезинтоксикационным, антидиарейным и др.), но и этиотропным действием как в отношении патогенных бактерий, так и вирусов» [3].

Березовый гриб Чага (*Inonotus Obliquus*) издавна используется для лечения заболеваний ЖКТ. Чаще всего чага используется в качестве обезболивающего и противовоспалительного средства,

например, при гастритах [4]. Однако использование чаги в качестве энтеросорбента до сих пор не распространено. Известны способы получения порошка размолотого нативного сырья чаги, а также способ получения порошка чаги, включающий сушку сырья и последующий криопомол, то есть измельчение чаги в кавитационном диспергаторе в среде охлаждающего реагента. В данной статье предложен способ получения порошка чаги с дополнительным удалением балластных веществ (активирование) с целью улучшения показателей сорбционной активности. Также проведен сравнительный анализ сорбционной активности полученного порошка с некоторыми энтеросорбентами.

Материалы. «Чага» ГФ Х1 вып.2, с 342, ОАО «Красногорсклекарства» РН[№]ЛСР-002138/08. Метиленовый синий ТУ 2463-044-0501520. Свинец (II) уксуснокислый 3-водный (свинца ацетат) ГОСТ 1027-67. Уголь активированный (ЛСР-006128/08). Энтеросорбент на основе диоксида кремния (ТУ У 15.8-33082808-001: 2008). Энтеросорбент на основе лигнина (ЛСР-009125/10). Рибофлавин (ГФ Х, ст. 585). Раствор йода (0,1 н), раствор натрия тиосульфата (0,1 н), раствор кислоты соляной (0,1 н), раствор щелочи (0,1 н), раствор фенолфталеина, раствор крахмала.

Методы:

Получение активированного порошка чаги. Способ получения активированного порошка чаги включает предварительное измельчение плодового тела гриба чаги, активирование водой, отделение полученного осадка, его промывку, сушку и повторное измельчение. Предварительное измельчение плодового тела гриба проводили до размера частиц не более 0,63 мм, активирование проводили водой при соотношении 1:20-1:50 (масс./об.), температуре 90-100°C в течение 1,0-2,0 часов, отделение осадка осуществляли путем фильтрования, промывку производили водой до прозрачного или слегка желтоватого цвета промывных вод, сушку вели при температуре 100-105°C до влажности 2 – 10%, повторное измельчение проводили до размера частиц не более 0,2 мм.

Измерение сорбционной активности по метиленовому синему. Сорбционную активность опытных и контрольных образцов по метиленовому синему определяли по модифицированной методике ГФ Х стр. 161 «Уголь активированный» с учетом оптической плотности получаемого фильтрата с дополнительным осаждением хромогенного комплекса чаги свинца ацетатом [5]. Навеску 0,30 г активированного порошка чаги или энтеросорбента, используемого в качестве контроля, помещали во флакон вместимостью 50 мл, добавляли 35 мл 0,15% раствора метиленового синего, закрывали пробкой и непрерывно встряхивали в течение 30 минут; фильтровали в коническую колбу, вместимостью 50 мл через бумажный складчатый фильтр; первые порции фильтрата отбрасывали. К фильтрату добавляли 0,2 г ацетата свинца и перемешивали в течение 10 минут, после чего фильтровали через бумажный складчатый фильтр (синяя лента). Первые порции фильтрата отбрасывали. Фильтрат помещали в кювету с толщиной слоя 10,0 мм, измеряли оптическую плотность при 663 нм. Измерения проводили с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ Спектр). Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора метиленового синего 0,0003 г/100 мл. Сорбционную активность вычисляли по формуле (1):

$$m = \frac{V}{100\%} \times \left(150 - \frac{D \times C_0}{D_0} \right) \div n \quad (1)$$

где:

m – масса поглощенного метиленового синего (мг), V – объем 0,15% раствора метиленового синего, взятый для анализа, D – оптическая плотность при длине волны 663 нм раствора метиленового синего после обработки сорбентом, D₀ – оптическая плотность стандартного раствора метиленового синего (0,3 мг/100 мл) при длине волны 663 нм, 150 – концентрация раствора метиленового синего, взятого для анализа мг/100 мл; C₀ – концентрация стандартного раствора сравнения (0,3 мг/100 мл), n – масса измельченного активированного порошка чаги.

Измерение сорбционной активности по рибофлавиону. Сорбционную активность по рибофлавиону определяли по методике, аналогичной метиленовому синему, за исключением того, что в качестве испытуемого использован раствор рибофлавина 0,02%, РСО 0,0002%, а измерение вели при длине волны 444 нм.

Измерение активности по йоду. Сорбционную активность по йоду определяли в полном соответствии с методикой, приведенной в ГОСТ 6217-74 «Уголь активный древесный дробленый. Технические условия».

Измерение сорбционной активности по кислоте и по щелочи проводили в полном соответствии с методами, приведенными в [6].

Оценка свойств поверхности частиц активированного порошка чаги. Свойства поверхности частиц активированного порошка чаги и пористость материала оценивались с помощью сканирующей микроскопии. Оценивали размер пор частиц порошка.

Оценка удельной поверхности порошка чаги. Оценку удельной поверхности активированного порошка чаги проводили методом равновесной интервальной сорбции с помощью автоматизированного анализатора TriStar 3000 (Micromeritics). Результаты оценивали в сравнении с измерением удельной поверхности угля активированного. Определить удельную поверхность позволяет раз-



ница давлений инертного газа в коллекторе и адсорбере, которая измеряется в процессе сорбции (нагнетания инертного газа из коллектора в адсорбер с навеской исследуемого вещества) и десорбции («сбрасывание» давления из адсорбера с навеской в вакуумированный коллектор).

Определение сыпучести порошка чаги. Использовали стандартную методику определения сыпучести через вибрирующую воронку (ВП-12А) с отверстием 10 мм [7].

Насыпную плотность определяли с помощью прибора 545Р-АК-3 по стандартной методике [7]. Микробиологическую чистоту определяли в соответствии с методикой, приведенной в ГФ XI изд., вып.2, стр.193 с изм. Хромогенный комплекс определяли по методике ГФ XI, вып. 2, стр. 342. Влажность порошков оценивали по ГФ XI, вып. 1, стр. 176.

Оценка сорбционной активности порошка чаги *in vivo*. Для оценки сорбционной активности были сформированы четыре группы по пять крыс (линия Wistar): 1-контрольная группа, 2-группа, получавшая в качестве энтеросорбента активированный порошок чаги, 3-группа получавшая порошок чаги (не активированный), 4-группа получавшая порошок измельченных таблеток энтеросорбента на основе лигнина. Крысы содержались в стандартных условиях вивария, но в течение 12 часов перед испытанием не получали корм (во избежание дополнительной сорбции пищевыми волокнами, содержащимися в корме). Крысам вводили раствор рибофлавина-моноклеотида (10 мг/мл) *per os* объемом 2 мл. Затем через 30 минут группе 2, 3, 4 вводили 2 мл 0,5% суспензии активированного порошка чаги, порошка чаги (не активированного) и порошка измельченных таблеток лигнин-содержащего сорбента соответственно. Оценка сорбции проводилась по остаточному содержанию рибофлавина-моноклеотида в моче крыс, собранной в течение суток после введения. Количественное содержание остаточного рибофлавина в моче определяли методом ВЭЖХ. Все образцы мочи перед анализом разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:5. Для определения степени сорбции проводили хроматографирование рабочих стандартных растворов анализируемых компонентов, затем исследовали испытываемые растворы. Остаточные количества рибофлавина в моче рассчитывали по формуле (2):

$$C_{\text{исп}} = \frac{S_{\text{исп}} \times C_{\text{ст}} \times B}{S_{\text{ст}}} \quad (2)$$

где:

$C_{\text{исп}}$ – концентрация определяемого вещества в исследуемом растворе; $S_{\text{исп}}$ – площадь пика определяемого вещества в исследуемом растворе; $C_{\text{ст}}$ – концентрация определяемого вещества в стандартном растворе; $S_{\text{ст}}$ – площадь пика определяемого вещества в стандартном растворе.

Приготовление фосфатного буферного раствора. На аналитических весах взвешивали 5,44 г дигидрофосфата калия, помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавляли 500 мл воды и перемешивали до полного растворения. Доводили объём раствора водой до 990 мл, pH раствора доводили *o*-фосфорной кислотой до значения 2,5, далее объём раствора доводили водой до метки, перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Подвижная фаза:

Фаза А: Смешивали 80 объёмов буферного раствора и 20 объёмов метанола. Полученный раствор перед применением перемешивали, отфильтровывали через тefлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм на установке для фильтрации и дегазации растворителей, оснащённой мембранным вакуумным насосом типа KNF-811 KN или аналогичным, и дегазировали.

Фаза Б: Смешивали 24 объёмов буферного раствора и 76 объёмов метанола. Полученный раствор перед применением перемешивали, отфильтровывали через тefлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм на установке для фильтрации и дегазации растворителей, оснащённой мембранным вакуумным насосом типа KNF-811 KN и дегазировали.

Стандартный раствор. 21,8 мг рибофлавина, взвешенного на аналитических весах, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 70 мл подвижной фазы А, растворяли, довели объём раствора до метки водой и перемешивали.

Условия хроматографирования. Хроматограф жидкостной аналитический “Agilent-1100” (США). Колонка: “Kromasil 100-5” С 18, размер 250×4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм; температура колонки: комнатная; скорость потока подвижной фазы: 0,8 мл/мин; объём вводимой пробы: 10 мкл; детектор: длина волны – 260 нм, щель 8 нм; реперная длина волны 730 нм, щель 100 нм.

Результаты и обсуждение.

Разработка технологии получения активированного порошка чаги. В таблице 1 представлено влияние параметров технологического процесса активирования (освобождения от балластных веществ) на свойства порошка чаги.



Таблица. 1

Результаты экспериментов по разработке технологии получения активированного порошка чаги

Эксперимент №	1	2	3	4	5
Параметры ведения технологического процесса:					
а) предварительное измельчение плодового тела гриба чаги до размера частиц, мм	более 0,63	0,63-0,4	0,4-0,2	Не более 0,2	Не более 0,1
б) активирование	1:10	1:20	1:35	1:50	1:60
– соотношение сырье/экстрагент (вода)					
– длительность, минут	30	60	90	120	150
– температура, град. С	80	90	95	100	100
в) сушка					
– температура, град. С	80	95	105	130	150
– остаточная влажность, %	15,0	10,0	5,0	2,0	0,5
г) вторичное измельчение, до размера частиц, мм	более 0,2	не более 0,2	не более 0,2	не более 0,2	не более 0,1
Свойства полученного порошка чаги:					
Сыпучесть, г/сек	1,0±0,2	1,1±0,3	1,2±0,5	1,3±0,2	0,8±0,3
Насыпная плотность г/см ³	0,35±0,01	0,28±0,05	0,20±0,02	0,20±0,03	0,10±0,05
Микробиологическая чистота, КОЕ/г	менее 2000	менее 500	менее 500	менее 100	менее 10
Хромогенный комплекс, %	17,7±3,9	12,0±1,6	10,1±,5	14,3±1,9	11,4±2,1
Сорбционная активность:	26,0±3,3	130,5±5,0	150,0±8,4	146,0±4,3	150,0±5,5
– метиленовому синему, мг/г;	17,7±1,3	19,0±1,5	16,5±0,9	20,3±1,1	20,3±1,8
– йоду, %;	3,0±0,3	3,0±0,8	3,4±0,2	3,6±0,5	3,1±0,2
– щелочи, мг-экв/г;	2,6±0,2	2,8±0,2	2,6±0,2	2,6±0,2	2,5±0,2
– кислоте, мг-экв/г	6,0±0,5	8,5±0,2	9,9±0,2	10,0±0,3	10,0±0,1
– рибофлавину мг/г					

Из таблицы 1 видно, что процесс предварительного измельчения необходимо вести до размера частиц 0,2-0,63 мм. Выбор данного интервала основывается на том, что увеличение размера частиц более 0,63 мм (эксперимент № 1 табл. 1) приводит к снижению сорбционной активности в сравнении с препаратом, предварительно измельченным до размера частиц менее 0,63 мм (эксперименты №№ 2-5 табл. 1) со 130-150 мг/г метиленового синего до 26. По нашему мнению, это происходит за счет снижения эффективности экстракции балластных веществ хромогенного комплекса из структуры крупных частиц. Это так же подтверждается снижением хромогенного комплекса в активированном порошке чаги с 17,7 до 10,1%.

В ходе эксперимента установлено, что процесс активации возможно провести наиболее полно, используя в качестве экстрагента воду в соотношении 1:20-1:50 (масс./об.). Данное соотношение является оптимальным и позволяет наиболее полно экстрагировать хромогенный комплекс и достичь сорбционной активности 130-150 мг/г по метиленовому синему (табл. 1, эксперименты №№ 2-4). Изменение соотношения сырья к экстрагенту нецелесообразно так как в результате эксперимента 1 сорбционная активность составила всего 26 мг/г. Увеличение соотношения более чем 1:50 (табл. 1, эксперимент № 5) не приводит к дальнейшему улучшению сорбционной активности.

Активацию проводят при температуре 90 – 100°C в течение 1,0-2,0 часа. Показано, что снижение температуры в эксперименте 1 приводит к уменьшению сорбционной активности по сравнению с экспериментами №№ 2-4 с 130-150 мг/г до 26 мг/г (эксперимент №1) в связи с недостаточным извлечением балластных веществ хромогенного комплекса. Увеличение времени активирования является нерациональным, поскольку (эксперимент № 5) не приводит к значительному улучшению технологических свойств активированного порошка. Увеличение температуры выше 100°C также нецелесообразно, поскольку потребует затрат при организации производства по более сложной технологической схеме автоклавирования.

Сушку активированного порошка предложено вести при температуре 100-105°C. Эксперименты №№ 2-4 показывают, что данный режим сушки обеспечивает влажность 2-10% и, соответственно, удовлетворительную сыпучесть активированного порошка (1,1-1,3г/сек).

Из таблицы 1 также видно, что измельчение активированного порока чаги до размера частиц не более 0,2 мм позволяет достичь оптимальных показателей сорбционной активности (эксперименты №№ 2-4).



Сорбционная активность по кислоте и по щелочи для активированного порошка чаги сравнима данными показателями угля активированного, превышает сорбционную активность лигнин-содержащего энтеросорбента по кислоте в три, и по щелочи в два раза. Сорбция по кислоте и по щелочи так же более активная, по сравнению с энтеросорбентом на основе диоксида кремния.

Порошок чаги не активированный (образец № 5, табл. 2) уступает активированному порошку чаги, проявляя более низкую сорбционную активность по метиленовому синему, по йоду, по кислоте и по щелочи. Это подтверждает необходимость активации (экстракции балластных веществ хромогенного комплекса) для увеличения площади поверхности, доступной для сорбции.

Оценка сорбционной активности порошка чаги in vivo. Было проанализировано остаточное содержание рибофлавин-моноклеотида в моче четырех групп крыс. 1-контрольная группа, 2-группа, получавшая в качестве энтеросорбента активированный порошок чаги, 3-группа получавшая порошок чаги (не активированный), 4-группа получавшая порошок измельченных таблеток энтеросорбента на основе лигнина.

В таблице 3 приведены результаты оценки количества остаточного рибофлавина в моче крыс.

Таблица 3

Результаты оценки количества остаточного рибофлавина в моче крыс

Группа крыс	1	2	3	4
Площадь пика В2	225,7±5,9	52,8±3,2	198,9±6,1	150,3 ± 5,4
Остаточная концентрация рибофлавина-моноклеотида в моче, мг %	0,341±0,007	0,071±0,004	0,262±0,008	0,194±0,007

Таблица 3 показывает, что остаточное количество рибофлавина в моче наименьшее в группе 2, то есть в группе крыс, получавшей активированный порошок чаги в качестве энтеросорбента.

Порошок чаги, не подвергшийся активации не показал значительной сорбционной активности in vivo. Полученные данные позволяют сделать вывод о необходимости процесса активации порошка чаги для улучшения его фармацевтической активности.

Выводы. Разработанная технология получения порошка чаги, позволяет освободить его от балластных веществ и тем самым значительно улучшить его сорбционную активность. Увеличение сорбционной активности подтверждено испытаниями в сравнении с не активированным порошком чаги. Кроме того, измерения сорбционной активности по метиленовому синему, йоду, кислоте, щелочи, рибофлавину in vitro свидетельствуют о том, что сорбционная способность активированного порошка чаги не уступает данному показателю природных энтеросорбентов на основе лигнина. Испытания in vivo подтвердили улучшение сорбционных свойств порошка чаги после проведения процесса активации. Полученные данные свидетельствуют о том, что активированный порошок чаги имеет перспективы использования не только в качестве источника пищевых волокон, но и как энтеросорбирующее средство и радиопротектор.

Литература

1. Николаев, В. Г. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия / В. Г. Николаев, С. В. Михаловский, Н. М. Гурина // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11. – № 4. – С. 3.
2. Effectiveness of non-starch polysaccharide crylan in experimental hyperlipidemia / O. V. Remezova [et al.] // Vopr Pitan. – 1995. – № 14. – P. 6.
3. Энтеросорбция — роль энтеросорбентов в комплексной терапии острой и хронической гастроэнтерологической патологии. Пособие для врачей. / В. Ф. Учайкин [и др.]. – М.: Медицина. – 2008. – С. 12.
4. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus* / Y. O Kim [et al.] // Life Sciences. – 2006. – № 79. – P. 72-80.
5. Кох, Е. С. Разработка методики анализа сорбционной активности активированного порошка чаги / Е. С. Кох, А. С. Гаврилов // Материалы конференции «Фармация и общественное здоровье», Екатеринбург. – 2014. – С. 421.
6. Гиндулин, И. К. Технический анализ нанопористых материалов / И. К. Гиндулин, Ю. Л. Юрьев // Екатеринбург: ФГБОУ ВПО Уральский Государственный Лесотехнический Университет/ – 2011. – С. 5-7.
7. Вальтер, М. Б. Постадийный контроль в производстве таблеток / М. Б. Вальтер, О. Л. Тютенков, П. А. Филиппин. – М.: Медицина, 1982. – 208 с.



DEVELOPMENT OF THE METHOD OF ACTIVATED CHAGA POWDER PRODUCING AND ANALYSIS OF ITS SORPTION ACTIVITY

E.S. KOKH¹
A.S. GAVRILOV¹
A.A. TUMASHOV²
L.P. LARIONOV¹

¹⁾ *Ural State Medical University,
Ekaterinburg*

²⁾ *Institute of Organic Synthesis
Ural branch of Russian Academy
of Sciences, Ekaterinburg*

e-mail: lenakokh@gmail.com

The method of chaga powder producing was developed. This method includes exemption of the powder from ballast substances (process of activation). Optimal conditions were chosen to obtain powder having satisfactory technological parameters and high sorption activity. Sorption activity of the activated chaga powder was studied in vivo and in vitro. It is found that activated chaga powder has higher sorption activity than milled chaga which wasn't undergone the removal of ballast substances. Sorption activity of activated chaga powder is shown to be not less than in lignin based natural enterosorbents.

Key words: chaga, powder, enterosorbent, sorption activity, activation.