

# Experimental Study on Toxicity of Traditional Chinese Traditional Medicine Products Fermented by the New Type of *Astragalus membranaceus* Lactic Acid Probiotics

Ruili Yao

Zhongtai Rich Nations (Tianjin) Biotechnology Co., Ltd., Tianjin  
Email: [ycbysl@163.com](mailto:ycbysl@163.com)

Received: Apr. 27<sup>th</sup>, 2015; accepted: May 15<sup>th</sup>, 2015; published: May 18<sup>th</sup>, 2015

Copyright © 2015 by author and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

Probiotics is the preparation which uses the methods such as the biological fermentation to biologically transform Chinese medicine ingredients and release the Chinese medicine ingredients. The experiment studies the toxicology security of traditional Chinese medicine products which are used to body nutrition enhancers and additives Fermented by *Astragalus membranaceus* Lactic Acid Probiotics. The toxicology research is characterized by the acute toxicity test and subacute toxicity test in mice. The acute toxicity test shows that the maximum tolerated dose (MTD) of traditional Chinese medicine products fermented by *astragalus membranaceus* lactic acid probiotics on male and female mice (MTD) is greater than 35 g/kg·bw. According to the standard of acute toxicity test, the products are nontoxic substances. The subacute toxicity test indicates that when the dose is 5 g/kg·bw, 10 g/kg·bw, and 15 g/kg·bw, there are no significant adverse effects on animal health, growth and development of internal organs, blood biochemical parameters and blood. Traditional Chinese medicine products fermented by *astragalus membranaceus* lactic acid probiotics are non-toxic, green, safe and natural products, and can be used to body nutrition enhancers and additives.

## Keywords

Radix Astragalus, Lactic Acid Bacteria, Probiotics, Toxicity Test

---

# 新型黄芪乳酸益生菌发酵中药产物的毒性试验研究

要瑞丽

中泰财邦(天津)生物技术有限公司, 天津

Email: [ybyrl@163.com](mailto:ybyrl@163.com)

收稿日期: 2015年4月27日; 录用日期: 2015年5月15日; 发布日期: 2015年5月18日

## 摘要

微生态制剂是利用生物发酵等方式将中药有效成分进行生物学转化并释放出来, 该试验研究黄芪乳酸益生菌发酵中药产物作为机体营养增强剂和添加剂的毒理安全性。利用小鼠急性毒性试验、小鼠亚急性毒性试验进行毒理学研究。急性毒性试验表明黄芪乳酸益生菌发酵中药产物对雌雄小鼠的最大耐受量(MTD)均大于35 g/kg·bw。根据急性毒性试验标准, 说明受试动物属于实际无毒级物质。亚急性毒性试验表明5 g/kg·bw、10 g/kg·bw、15 g/kg·bw剂量时, 对动物身体、内脏的生长发育、血液生化指标、血常规等均无明显不良影响。黄芪乳酸益生菌发酵中药产物为无毒、绿色、安全、天然产品, 可放心的应用于机体营养增强剂及添加剂中。

## 关键词

黄芪, 乳酸益生菌, 微生态制剂, 毒性试验

## 1. 引言

微生态制剂应用广泛, 兼有养生和保护功能, 能起到“已病辅治、未病防病、无病保健”的重要作用。发酵中药是将中药饮片粉末或中药提取液添加优选的肠道益生菌菌群或菌种, 利用微生物降解、生物发酵、消化分解等方式, 对中药有效成分进行生物学转化, 将中草药中的有效成分和活性物质最大限度地释放出来, 将机体难以消化吸收的中药大分子物质经微生物转化和修饰成为能够被机体肠道直接吸收的小分子成分, 还可产生各种不同的酶, 从而补充调整或维持机体肠道内微生态平衡, 增强药效和降低用药成本, 达到防病、治病的目的。通过对黄芪乳酸益生菌发酵中药产物进行的急性和亚急性毒性试验研究表明, 黄芪乳酸益生菌发酵中药产物为绿色、安全、天然、无毒的营养物, 我国微生态制剂的研究起源于20世纪70年代末至80年代初, 90年代以后进入产业化研制、开发及大规模生产期, 近年来微生态制剂得到了空前广泛发展, 国外已有多个国家在研。

黄芪(*Astragali Radix*), 别名绵芪、棉芪、黄耆、独椹、蜀脂、百本、百药棉、黄参、血参, 为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。春、秋二季采挖, 除去须根及根头, 晒干。收载于《中国药典》2010年版一部[1], 主产于山西、甘肃、辽宁、吉林、黑龙江、内蒙古、河北、天津等地, 是重要的益气中药。黄芪性甘味微温, 归肺、脾经, 具有补气升阳, 固表止汗, 利水消肿, 生津养血, 行滞通痹, 托毒排脓, 敛疮生肌的作用, 用于气虚乏力, 食少便溏, 中气下陷, 久泻脱肛, 便血崩漏, 表虚自汗, 气虚水肿,

内热消渴，血虚痿黄，半身不遂、痹痛麻木，痈疽难溃，久溃不敛等症。黄芪中主要成分为黄酮、皂甙、黄芪多糖类成分，因此黄芪应置通风干燥处，防潮，防蛀保存。黄芪的药用迄今已有 2000 多年的历史，由于长期大量采挖，近几年来野生黄芪的数量急剧减少，有趋于绝灭的危险，为此确定该植物为渐危种，国家列为黄芪为三级保护植物。黄芪的广泛应用使我国以黄芪为原材料的中成药制品众多，生产厂家遍布全国，在中药提取后产生大量的黄芪药渣，如果丢弃不仅是对生态环境的污染与破坏，尤其是对生物资源的浪费。因为残渣中含有大量的粗纤维、粗脂肪、淀粉、多糖、微量元素等有效成分[2]。

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的细菌的通称。在自然界分布广泛，具有多样性，不仅是研究分类、生化、遗传、分子生物学和基因工程的理想材料，在理论上具有重要的学术价值，而且在工业、农牧业、食品和医药等与人类生活密切相关的重要领域应用价值也极高。乳酸菌目前可分为 18 个属，共有 200 多种，除极少数外，绝大部分都是机体内必不可少的且具有重要生理功能的菌群，乳酸菌广泛存在于人体和畜禽的肠道中。目前已被国内外生物学家所证实，肠内乳酸菌与健康长寿有着非常密切的关系。大量研究表明，乳酸菌能够调节机体胃肠道正常菌群、保持微生态平衡，提高食物消化率和生物价，降低血清胆固醇，控制内毒素，抑制肠道内腐败菌生长繁殖和腐败产物的产生，制造营养物质，刺激组织发育，从而对机体的营养状态、生理功能、细胞感染、药物效应、毒性反应、免疫反应、肿瘤发生、衰老过程和突然的应急反应等产生作用。由此可见，乳酸菌的生理功能与机体的生命活动息息相关。可以说，如果乳酸菌停止生长，人和动物就很难健康生存。也正因为如此，乳酸菌被广泛用于轻工业、食品、医药及饲料工业等许多行业上[3]。由于广谱和强力的抗菌素的广泛应用，使人体肠道内以乳酸菌为主的益生菌遭受到严重破坏，抵抗力逐步下降，导致疾病越治越多，健康受到极大的威胁。所以，有意增加人体肠道内乳酸菌的数量就显得非常重要。国际上公认的乳酸菌，被认为是最安全的菌种，也是最具代表性的肠内益生菌，人体肠道内以乳酸菌为代表的益生菌数量越多越好。也完全符合诺贝尔得奖者生物学家梅契尼柯夫“长寿学说”里所得出的结论，乳酸菌=益生菌=长寿菌。面对抗生素的日渐无能为力的现状，正在不断寻求新的更加有效的生物抗菌产品，世界发达国家首先认识并开创了以使用乳酸菌为代表的免疫疗法革命。瑞典科学家研究发布的结果是，治疗胃和大肠炎症时直接喝乳酸菌比用抗生素更好，危险性几乎为零。

本试验以中药黄芪提取后的药渣作为乳酸菌固态发酵的基质，获得了富含粗多糖、粗蛋白、乳酸菌等功能性成分的黄芪乳酸发酵产物。为进一步将发酵产物开发为可应用于机体疾病预防和辅助治疗的营养素等产品，以小鼠为试验对象，对黄芪乳酸益生菌发酵中药产物进行急性和亚急性毒性试验研究[4] [5]。

## 2. 材料与方 法

### 2.1. 仪器与试剂

BC-3000 全自动三分群血细胞分析仪，武汉赛尔利斯科技贸易有限公司；synergy2 型多功能酶标仪：美国 Biotek 公司；HM550 型冷冻切片机：上海中威医疗设备技术服务有限公司；激光共聚焦显微镜：北京美亚先科技有限公司；试剂盒：谷丙转氨酶(ALT/GPT)、谷草转氨酶(AST/GOT)、白蛋白(溴甲酚绿比色法)、蛋白定量(双缩脲法)、总胆固醇、肌酐、尿素氮(BUN)、血糖(葡萄糖)、甘油三酯：南京建成试剂盒。

### 2.2. 动物

选于北京华阜康生物科技股份有限公司的 SPF 级 ICR 小鼠，动物合格证编号：scxk(京)2009-0004，根据试验需要选择相应性别和体重的动物，动物室内温度为  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 45%~65%。

### 2.3. 样品的制备

黄芪乳酸益生菌发酵中药产物为本实验室利用黄芪提取后的药渣经乳酸菌进行固态发酵制得，发酵

物经烘干、粉碎所得的超微粉，采用混饲的方法对动物进行给药。

## 2.4. 试验方法

### 2.4.1. 急性毒性试验[6]

ICR 小鼠 40 只，养一周后体重在 19.3~22.8 g，按照体重正态分布分为空白组和试验组，每组各 20 只，雌雄各半，试验前禁食 16 小时，不禁水。根据试验采用混饲的方法对动物进行给药，按最大耐受量 (MTD) 法设计试验组给药量为 35 g/kg·bw，空白对照给予等量的全价饲料，给料后半小时内采食完，连续 7 天，每天上午观察记录小鼠的体重变化、饮食、外观、分泌物、排泄物及死亡状况，7 天后对未死亡小鼠进行大体解剖观察。

试验结束时，将小鼠称重、摘除眼球放血处死，将小鼠浸泡在 75% 乙醇溶液中 3 分钟，消毒后解剖。用肉眼观察其有无病变，摘取心、肝、脾、肺、肾称重，按照公式[脏器系数 = (脏器重/体重) × 1000] 计算脏器系数。

### 2.4.2. 亚急性毒性试验

ICR 小鼠 40 只，养一周后体重在 19.3~22.8 g，按照体重正态分布分为 1 个空白组和 3 个试验组，试验组分为低剂量组、中剂量组和高剂量组，每组各 10 只，雌雄各半，低、中、高试验组剂量分别为 5 g/kg·bw、10 g/kg·bw、15 g/kg·bw，按照采食量与体重关系混饲给药，空白组给予对应的全价饲料，连续给药 35 天，小鼠自由采食和饮水，每天观察记录小鼠的一般情况。测量计算小鼠的平均增重、平均日食量、饲料利用率。试验结束时摘眼球取血，测定小鼠的血常规、生化指标、主要脏器的大体解剖及组织病理学检查。

#### 1) 小鼠饲料利用率的测定

每天记录小鼠的采食量，每周末称量各组小鼠体重，通过饲料利用率公式[饲料利用率 = 平均日增重/平均日食量]，计算小鼠饲料利用率。

#### 2) 小鼠血常规的测定

试验结束时摘眼球取血，将血液滴入装有 EDTAK2 抗凝剂的真空采血管中，取约 100 ul，使用 BC-3000 全自动三分群血细胞分析仪进行血常规分析检测。

#### 3) 小鼠血清生化指标的测定

试验结束时摘眼球取血，将血液滴入离心管中，静置，待血清析出后，离心，取血清，按照试剂盒使用说明书分别测定血清中谷丙转氨酶(ALT/GPT)、谷草转氨酶(AST/GOT)、白蛋白、蛋白定量、总胆固醇、肌酐、尿素氮(BUN)、血糖、甘油三酯各生化指标含量。

#### 4) 组织病理学观察

试验结束时将小鼠摘眼球处死，进行大体解剖检查，观察组织器官有无明显的病理变化。同时取心、肝、脾、肺、肾、睾丸或卵巢组织，使用 HM550 型冷冻切片机、HE 染色，激光共聚焦显微镜对切片观察并照相，进行组织切片病理组织学形态研究。

## 2.5. TSS 统计学分析

数据采用  $X \pm S$  表示，应用软件对数据进行方差统计分析。

## 3. 试验结果

### 3.1. 急性毒性试验

#### 3.1.1. 小鼠日常表现

一次给药后，每天上午观察记录小鼠的日常表现。试验组小鼠皮毛顺滑亮泽、活动兴奋、排泄物和

分泌物无异常，未发现死亡小鼠，与空白对照组相比较无异常，试验组小鼠无中毒症状。

### 3.1.2. 大体解剖试验数据

试验结束后将小鼠摘眼球处死进行大体解剖，对小鼠主要脏器器官用肉眼观察有无病理异常。结果未发现任何病理性变化。

### 3.1.3. 急性毒性试验小鼠脏器系数

急性毒性试验小鼠脏器系数由表 1 可以看出，试验组与空白组没有明显差异，表明黄芪乳酸益生菌发酵中药产物为实际无毒物质。根据毒理学评价标准， $LD_{50} > 35 \text{ g/kg}\cdot\text{bw}$ ，可不必测半数致死量( $LD_{50}$ )，雌、雄试验组小鼠的脏器系数与空白组比较，均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 3.2. 亚急性毒性试验

### 3.2.1. 小鼠饲料利用率的测定

亚急性毒性试验由表 2 可以看出，各剂量试验组与空白组小鼠平均日采食量相当，平均日增重中试验组明显高于空白组，饲料利用率中试验组也明显高于空白组。

### 3.2.2. 小鼠血常规的测定数据与分析

小鼠血常规的测定结果表 3 可见亚急性毒性试验中，各剂量试验组雌雄小鼠的血常规数据指标与空白组比较，均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 3.2.3. 小鼠血清生化指标数据与分析

小鼠血清生化指标结果表 4 可见亚急性毒性试验中，各剂量试验组雌雄小鼠的血清生化指标与空白组比较，均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

Table 1. The acute toxicity test in mice viscera coefficient

表 1. 急性毒性试验小鼠脏器系数

性别	组别	动物数量(只)	剂量(g/kg)	心	肝	脾	肺	肾
雌	试验组	10	35	5.24 ± 0.89	52.74 ± 6.36	5.03 ± 0.89	8.89 ± 2.27	11.99 ± 1.22
	空白组	10	0	5.40 ± 0.88	53.22 ± 2.77	5.26 ± 0.77	8.33 ± 1.77	12.34 ± 0.78
雄	试验组	10	35	4.76 ± 0.57	54.47 ± 7.34	4.59 ± 1.34	6.66 ± 1.59	15.66 ± 1.10
	空白组	10	0	4.77 ± 0.43	52.78 ± 4.66	4.12 ± 1.22	6.74 ± 1.35	15.88 ± 1.79

Table 2. Astragalus membranaceus lactic acid probiotic fermented TCM products to the effect of feed utilization rate in mice

表 2. 黄芪乳酸益生菌发酵中药产物对小鼠饲料利用率的影响

性别	组别	剂量(g/kg)	平均日增重/g	平均日采食量/g	饲料利用率%
雌	高剂量组	15	0.33	4.96	6.65
	中剂量组	10	0.31	4.83	6.42
	低剂量组	5	0.30	4.85	6.19
	空白组	0	0.16	4.51	3.55
雄	高剂量组	15	0.45	5.97	7.54
	中剂量组	10	0.44	5.89	7.47
	低剂量组	5	0.39	5.43	7.18
	空白组	0	0.21	5.46	3.85

**Table 3. Astragalus membranaceus lactate probiotic fermented TCM products to the influence of routine blood of mice**  
**表 3. 黄芪乳酸益生菌发酵中药产物对小鼠血常规的影响**

性别	组别	剂量 g/kg	血红蛋白 Hgb (g/L)	红细胞计数 RBC (10 <sup>12</sup> 个/L)	白细胞计数 WBC (10 <sup>9</sup> 个/L)	中性粒细胞 NEUT %	淋巴细胞 LYM %	红细胞压积 HCT (L/L)
雌	高剂量组	15	116.4 ± 20.66	5.82 ± 0.64	3.67 ± 0.55	69.66 ± 8.66	27.44 ± 8.11	0.28 ± 0.09
	中剂量组	10	123.3 ± 7.77	5.97 ± 0.39	3.09 ± 0.72	68.37 ± 4.47	29.11 ± 4.19	0.28 ± 0.09
	低剂量组	5	121.3 ± 7.44	5.84 ± 0.15	3.46 ± 1.20	70.17 ± 3.67	27.53 ± 4.01	0.29 ± 0.05
	空白组	0	121.1 ± 8.62	5.86 ± 0.51	3.30 ± 0.70	67.04 ± 5.94	29.34 ± 6.19	0.29 ± 0.05
雄	高剂量组	15	118.9 ± 6.44	6.66 ± 0.03	2.70 ± 0.70	67.48 ± 5.16	29.40 ± 6.46	0.29 ± 0.07
	中剂量组	10	128.0 ± 6.10	6.28 ± 0.26	2.90 ± 0.27	68.34 ± 3.22	30.50 ± 4.11	0.30 ± 0.01
	低剂量组	5	117.2 ± 4.46	6.09 ± 0.09	2.50 ± 0.50	65.49 ± 3.08	32.40 ± 1.55	0.29 ± 0.03
	空白组	0	118.4 ± 6.56	6.08 ± 0.27	2.81 ± 0.60	66.12 ± 3.08	31.49 ± 4.79	0.30 ± 0.04

**Table 4. Astragalus membranaceus lactate probiotic fermented TCM products to the effect on serum biochemical index in mice**  
**表 4. 黄芪乳酸益生菌发酵中药产物对小鼠血清生化指标的影响**

性别	组别	剂量 g/kg	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	总胆固醇 CHO (mmol/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)	血糖 GLU (mmol/L)	总蛋白 TP (mg/ml)	白蛋白 ALB (g/L)
雌	高剂量组	15	21.32 ± 9.36	0.67 ± 0.20	60.31 ± 26.37	0.36 ± 0.21	0.35 ± 0.13	71.33 ± 8.41	36.47 ± 5.10
	中剂量组	10	26.39 ± 9.88	0.77 ± 0.20	62.31 ± 22.60	0.44 ± 0.21	0.38 ± 0.10	69.51 ± 6.60	38.45 ± 2.12
	低剂量组	5	23.49 ± 9.60	0.68 ± 0.17	63.82 ± 20.60	0.47 ± 0.12	0.40 ± 0.12	70.31 ± 5.01	39.43 ± 3.02
	空白组	0	27.15 ± 8.44	0.75 ± 0.16	60.32 ± 24.90	0.44 ± 0.06	0.30 ± 0.10	64.99 ± 9.46	36.24 ± 6.10
雄	高剂量组	15	30.35 ± 8.12	0.87 ± 0.19	73.22 ± 22.37	0.59 ± 0.08	0.50 ± 0.11	66.98 ± 3.07	36.22 ± 3.80
	中剂量组	10	28.88 ± 9.27	0.77 ± 0.33	59.41 ± 26.34	0.54 ± 0.01	0.44 ± 0.10	66.91 ± 4.12	34.24 ± 3.30
	低剂量组	5	26.46 ± 9.47	0.67 ± 0.08	49.26 ± 11.11	0.52 ± 0.06	0.46 ± 0.10	67.12 ± 3.00	35.15 ± 3.90
	空白组	0	30.19 ± 4.11	0.86 ± 0.10	66.32 ± 15.87	0.58 ± 0.06	0.48 ± 0.11	68.71 ± 3.29	36.19 ± 3.11

### 3.2.4. 小鼠组织病理学观察分析

试验结束时将小鼠进行大体解剖检查，未发现任何组织器官的病理异常变化。对高剂量组小鼠心、肝、脾、肺、肾、睾丸或卵巢组织进行组织切片观察，均未发现因食用受试物而引起的中毒性病变及变化。

## 4. 讨论

急性毒性试验是指一次或 24 小时每多次染毒的试验，是毒性研究的第一步，通常为小鼠或大鼠采用经口、吸入或经皮染毒途径，给予受试动物后在短时间内动物所产生的毒性反应。急性毒性试验主要测定半数致死量(LD50)，观察急性中毒表现，经皮肤吸收能力以及对皮肤、粘膜和眼有无局部刺激作用等，以提供受试物质的急性毒性资料，确定毒作用方式、中毒反应，并为亚急性毒性试验的观察指标及剂量分组。根据预定试验无法测定黄芪乳酸益生菌发酵中药产物的 LD50 值。本实验对雌雄小鼠进行最大耐

受量(MTD)实验,其最大耐受量(MTD)大于 35 g/kg·bw,结果表明小鼠对黄芪乳酸益生菌发酵中药产物不具有急性毒性。

根据小鼠亚急性毒性试验设计,对小鼠进行连续给药 35 天,小鼠自由采食和饮水,每天观察记录小鼠的一般情况,测量计算小鼠的平均增重、平均日食量、饲料利用率。试验结束时摘眼球取血,测定小鼠的血常规、生化指标、主要脏器的大体解剖及组织病理学检查,试验表明小鼠在 5 g/kg·bw、10 g/kg·bw、15 g/kg·bw 三个剂量时,对动物身体、内脏的生长发育、血液生化指标、血常规等均无明显不良影响。结果表明黄芪乳酸益生菌发酵中药产物不具有亚急性毒性。

综合上述试验数据和观察结果,黄芪乳酸益生菌发酵中药产物为无毒物质,可放心作为机体营养增强剂及添加剂应用。

微生态活菌中药发酵制剂作为公认的饲用抗生素最佳替代品,使人类食物回归生态化道路。乳酸菌作为机体肠道的原籍菌,几乎是所有微生态制剂中需求量最大,发挥作用最理想的菌种,美国科学家预言:“21 世纪将是乳酸菌的世纪”。活性乳酸菌发酵中药微生态制剂才是人类的根本保障。中药+活性乳酸菌,这一领先的保健理念改写了人类对抗生素和化学药物的依赖,以及滥用抗生素导致的病菌耐药、无药可用的局面。真正体现了预防为主、防大于治的正确养生观念。使全国首创的中药固体发酵制剂,再一次自我超越,必将引领微生态领域整体技术水平的提升。

## 参考文献 (References)

- [1] 《中国药典》2010 年版一部.
- [2] 尹小良 (2011) 中草药渣饲料添加剂开发利用研究进展. *现代农业科技*, **5**, 322-326.
- [3] 孙圉 (2008) 瑞士乳酸菌发酵剂制备及其发酵产物生物活性的评价. *天津科技大学*, **1**, 88-92.
- [4] 马逊风, 等 (2004) 中药药渣剩余成分分析及利用途径研究. *东北师范大学学报: 自然科学版*, **2**, 108-111.
- [5] 朱振元, 丁丽娜, 姚强, 等 (2012) 黄芪渣中国拟青霉固体培养及发酵产物分析. *食品研究与开发*, **2**, 171-173.
- [6] 中华人民共和国卫生部 GB15193-2003 (2004) 急性毒性试验. 中国标准出版社, 北京.