

均匀设计法优化葛根素白蛋白微球处方工艺

周 婷¹, 余彩英¹, 吴 卫^{1,*}, 奉建芳^{1,2}

(1. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541004;

2. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530200)

摘 要:为优化葛根素白蛋白微球处方工艺。以牛血清白蛋白为载体,采用乳化热固化法制备葛根素白蛋白微球。以包封率和载药量为综合评价指标,以牛血清白蛋白用量、葛根素用量、司盘 80 用量为考察因素,在单因素实验的基础上,利用均匀设计法优化葛根素白蛋白微球的处方工艺。葛根素白蛋白微球最优处方为:牛血清白蛋白 0.20 g,葛根素 30.00 mg,司盘 80 为 0.80 mL,验证处方的包封率为 $76.75\% \pm 2.09\%$,载药量为 $9.81\% \pm 0.14\%$ 。采用均匀设计优化法制备的葛根素白蛋白微球综合评分高,模型预测性良好。

关键词:葛根素,白蛋白微球,处方优化,均匀设计

Optimised Formulation of Puerarin Albumin Microsphere by Uniform Design

ZHOU Ting¹, YU Cai-ying¹, WU Wei^{1,*}, FENG Jian-fang^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract: To optimize the formulation of puerarin albumin microspheres. The microspheres were prepared by emulsion - heat stabilization techniques using albumin as carrier. The encapsulation efficiency and drug loading rate of the puerarin albumin microspheres were selected as comprehensive evaluation indexes. The amount of bovine serum albumin, the amount of puerarin and the amount of span - 80 were selected as factors. Uniform design method were used to optimize the formulation process of puerarin albumin microspheres. Optimum formulation of puerarin albumin microspheres was as follows: Bovine serum albumin was 0.20 g, puerarin was 30.00 mg, span - 80 was 0.80 mL. The entrapment efficiency of optimum formulation was $76.75\% \pm 2.09\%$ and the drug loading was $9.81\% \pm 0.14\%$. The formulation process of the puerarin albumin microspheres optimized by uniform design method was effective and feasible with a good prediction, and the results showed a high comprehensive score.

Key words: puerarin; albumin microspheres; prescription optimization; uniform design

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)04-0141-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.04.023

引文格式:周婷,余彩英,吴卫,等.均匀设计法优化葛根素白蛋白微球处方工艺[J].食品工业科技,2019,40(4): 141-145.

葛根是我国一种较为常见的中药,其提取物中含有淀粉、纤维素、异黄酮类成分^[1-3],具有较高的药用价值,葛根也可以作为一种常用的食品,具有一定的保健作用^[3-4]。葛根素为异黄酮类化合物,是中药材葛根提取物中的主要活性成分^[5],具有增加冠状动脉血流量、保护心肌缺血细胞、改善微循环,抗血小板聚集,降低心肌耗氧量等多种药理作用^[6-7],被广泛应用于心脑血管疾病和免疫系统疾病的临床治疗之中^[1,8]。但其水溶性差、半衰期短、口服生物利用度低^[8-10],达不到很好的治疗效果,严重限制了葛根素的临床应用,因此,开发一种具有高效生物利用度的葛根素新剂型具有重要的现实意义。

牛血清白蛋白是一种天然的高分子材料,其化学性质稳定、无毒、可生物降解^[11],作为药物载体受到广泛关注,常应用于微球、纳米粒等剂型的制备。牛血清白蛋白微球是以牛血清白蛋白作为载体而制得的一种微米级制剂,可将药物包裹于白蛋白的网状空隙中^[12],利用白蛋白将难溶性药物制备成微球,不仅可以使药物的溶解度增加,还可以保护药物不受外界环境影响,从而提高药物的生物利用度^[13-14]。白蛋白微球是近年来靶向剂型的研究热点,作为控制药物释放的新型载体给药系统,还具有缓释性、靶向性,可减少给药次数,降低病患痛苦,使药物在病变组织释药,提高药物有效浓度,减少对人体组织器

收稿日期:2018-06-08

作者简介:周婷(1994-),女,硕士研究生,研究方向:药物研发与转化,E-mail:18276359871@163.com。

* 通讯作者:吴卫(1982-),男,博士,研究员,研究方向:药物研发与转化,E-mail:wuwei_2007@126.com。

基金项目:国家自然科学基金项目(81760704,81573623);广西自然科学基金项目(2016GXNSFAA380081)。

官的损害和不良反应的发生^[15]。

由于药物性质的差异性,制备白蛋白微球的方法也有所不同,如三七总皂苷白蛋白微球采用加热固化法进行制备,而多西他赛白蛋白微球则采用乳化-化学交联法^[16-17]。本实验以葛根素为模型药物,牛血清白蛋白微球为载体,采用乳化热固化法制备葛根素白蛋白微球,并通过均匀设计试验对微球制备工艺进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葛根素对照品 纯度 95.5%,中国食品药品检定研究院;牛血清白蛋白 纯度>98%,北京索莱宝生物科技有限公司;75% 葛根素 康元医药科技有限公司;司盘 80 麦克林;液体石蜡、乙醚 西陇科学股份有限公司。

UV-2550 紫外分光光度计 日本岛津公司;DF-101S磁力搅拌器 邦西仪器科技有限公司;CX22RFS1 光学显微镜 奥林巴斯;SCIENTZ-IIID 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司;P60H 超声波清洗器 德国 elma 公司;HC-3618R 高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 葛根素白蛋白微球的制备 精密称取一定量的葛根素、牛血清白蛋白溶于 3 mL 水溶液中,超声(37 kHz,5 min)溶解。将上述混匀的混合溶液全部吸入注射器内,缓慢注入 60 ℃、5 mL 液体石蜡与一定量的司盘 80 混合,置磁力搅拌器 1000 r/min 高速搅拌 10 min,形成初乳;另取 15 mL 液体石蜡,油浴加热至 120 ℃,将上述初乳在搅拌下缓缓加入,恒温搅拌固化 30 min 后,冷却至室温,3000 r/min 离心 10 min,倾去上清液分离微球,沉淀物用乙醚洗涤 3~4 次,静置挥发乙醚,冷冻干燥得载药微球^[18]。

1.2.2 单因素试验 考察牛血清白蛋白、葛根素及乳化剂司盘 80 添加量对微球包封率和载药量的影响。

1.2.2.1 牛血清白蛋白用量的考察 固定葛根素加入量为 20 mg,乳化剂司盘 80 为 0.5 mL,牛血清白蛋白分别取 0.1、0.2、0.3、0.4 g,制备微球;

1.2.2.2 葛根素用量的考察 固定牛血清白蛋白用量为 0.2 g,乳化剂司盘 80 为 0.5 mL,葛根素分别取 10、20、30、40 mg,制备微球;

1.2.2.3 乳化剂司盘 80 用量的考察 固定葛根素加入量为 20 mg,牛血清白蛋白用量 0.2 g,乳化剂司盘 80 分别取 0.2、0.3、0.5、0.8 mL,制备微球。

1.2.3 均匀设计试验 以牛血清白蛋白用量、葛根素加入量、司盘 80 用量为考察因素,见表 1。通过 $U_9(9^6)$ 均匀设计试验优选最佳处方工艺,在 Design-Expert 软件中选择设计类型(Design type)为历史数据(Historical data),对数据进行二次曲面方程响应面分析^[19]。

1.2.4 指标的测定

1.2.4.1 葛根素标准曲线的绘制 根据葛根素甲醇

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	X_1 牛血清白蛋白 用量(g)	X_2 葛根素 用量(mg)	X_3 司盘 80 用量 (mL)
1	0.2	10	0.3
2	0.3	20	0.5
3	0.4	30	0.8

溶液紫外扫描图谱,选定 248 nm 为检测波长。精密称取葛根素对照品 5 mg 于 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得含量为 0.1 mg/mL 的葛根素对照品溶液。分别精密吸取不同量的对照品溶液稀释成浓度分别为 3.0、4.5、6.0、7.5、9.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。以甲醇溶液作为空白对照,用紫外分光光度计在 248 nm 处测定其吸光值 Y,再以溶液浓度 X 为横坐标,吸光值 Y 为纵坐标,绘制出标准曲线。根据葛根素标准曲线测定结果,得到其线性回归方程: $Y = 0.0836X + 0.0106$, 决定系数 $R^2 = 0.9993$ 。实验结果表明,葛根素的浓度在 3.0~9.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与吸光值呈现良好线性关系。

1.2.4.2 包封率和载药量的测定 精密称取微球粉末 10.00 mg 于研钵中,加入甲醇研磨,研磨至在显微镜观察到微球结构被破坏即可,于超声波细胞粉碎机中 50 ℃、150 W 超声处理 5 min,冷却至室温,微孔滤膜过滤,将滤液转移到 50 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,在 248 nm 下用紫外分光光度计测其吸光值,根据标准曲线计算微球中葛根素含量,按下列公式计算载药量和包封率^[20-21]。

载药量(%) = (微球中的葛根素质量/微球粉末质量) × 100

包封率(%) = (微球中的葛根素质量/投药量) × 100

投药量 = 葛根素用量 × 葛根素的纯度

1.2.4.3 综合评分的确定 以微球的载药量、包封率为指标进行综合评分。评分方法:各指标均以最大值作为参照,所得数据经归一化处理后结合权重系数计算综合分值^[17],综合评分 = (包封率/包封率的最大值 × 0.5 + 载药量/载药量的最大值 × 0.5)。

1.2.5 微球形态观察 将少量微球粉末置于载玻片上并用适量纯净水稀释分散,在光学显微镜下观察所制微球的形态^[16]。

1.3 数据处理

实验数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,采用实验设计软件 Design-Expert 8.0.6 进行方差分析,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 牛血清白蛋白用量对包封率与载药量的影响 牛血清白蛋白用量对葛根素白蛋白微球包封率与载药量的影响如图 1 所示,随着牛血清白蛋白用量的增加,包封率与载药量先上升后下降,说明牛血清白蛋白用量在一定范围内能够提高微球的包封率与载药量,当使用量为 0.2 g 时,包封率与载药量最

大,分别为 67.36%、6.92%,但是当使用量超过 0.2 g 时,包封率与载药量均呈下降趋势,这是由于牛血清白蛋白具有表面活性剂的作用,如果表面活性剂的浓度过大,在微球形成过程中会过早的吸附在微球表面,导致包封率与载药量降低^[14],所以选择牛血清白蛋白用量在 0.1~0.3 g 范围内。

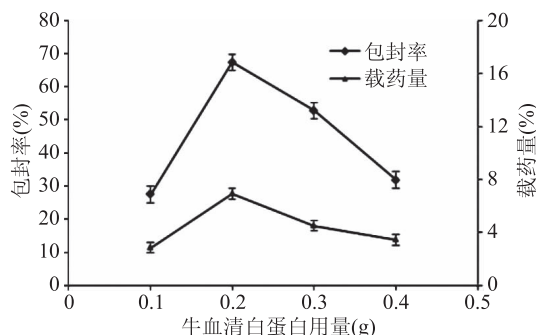


图1 牛血清白蛋白用量对包封率与载药量的影响

Fig.1 Effect of Bovine Serum Albumin dosage on entrapment efficiency and drug loading

2.1.2 葛根素用量对包封率与载药量的影响 如图2所示,葛根素小于 30 mg 时,随着用量的增加,包封率与载药量逐渐提高;当使用量为 30 mg 时,包封率与载药量最大,分别为 74.12%、7.89%,当使用量超过 30 mg 时,包封率与载药量均下降,且微球成型性变差,葛根素用量在 10~30 mg 范围内较合适。

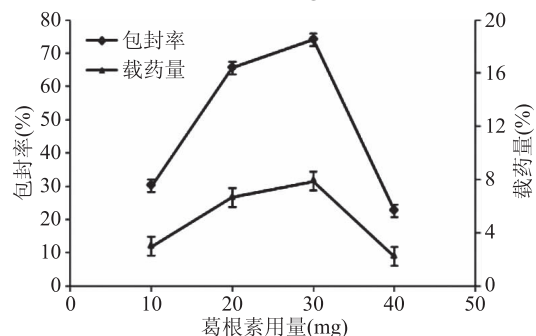


图2 葛根素用量对包封率与载药量的影响

Fig.2 Effect of puerarin dosage

on entrapment efficiency and drug loading

2.1.3 乳化剂司盘 80 用量对包封率与载药量的影响 由图3可知,随着司盘 80 用量的增加,包封率与载药量呈现出先增加后减少的趋势,当司盘 80 用量为 0.3 mL 时,包封率与载药量最大,分别为 72.49%、7.54%,说明司盘 80 用量在一定范围内能够提高葛根素白蛋白微球的包封率与载药量,所以选择司盘 80 用量在 0.3~0.8 mL 范围内。

2.2 均匀设计法试验

均匀设计结果见表 2、表 3。得到回归方程 $Y = 86.01 - 24.26X_1 + 38.78X_2 - 2.95X_3 - 20.15X_1X_2 - 5.61X_1X_3 + 7.25X_2X_3$, $p = 0.0017 < 0.05$,说明线性关系可信, $R^2 = 0.9994$, $R^2_{Adj} = 0.9978$ 均较高,说明二次多项式回归效果好,其 RSD 为 1.64%,表明该方法切实可靠。各因素中 X_1 、 X_2 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 对综合评分影响显著 ($p < 0.05$),影响大小依次为葛根素用量

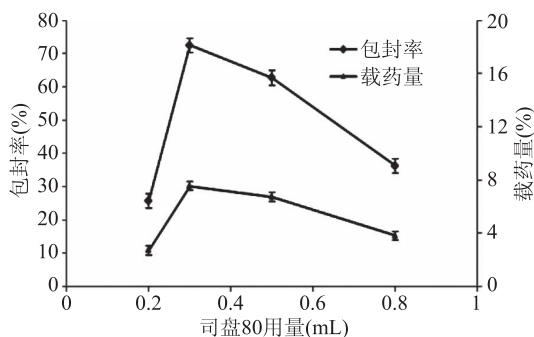


图3 司盘 80 用量对包封率与载药量的影响

Fig.3 Effect of span-80 dosage

on entrapment efficiency and drug loading

> 牛血清白蛋白用量 > 乳化剂用量。通过 Design-Expert 8.0.6 软件分析,得到葛根素白蛋白微球的最佳处方工艺为:牛血清白蛋白 0.20 g、葛根素 30.00 mg、乳化剂 0.80 mL。按照优化后的处方制备 5 批葛根素白蛋白微球,结果表明,在优化工艺条件下,制得的葛根素白蛋白微球平均载药量为 $9.81\% \pm 0.14\%$,包封率为 $76.75\% \pm 2.09\%$,综合评分为 $98.08\% \pm 1.61\%$,载药量与包封率均有所提高,表明均匀设计优化具有一定的指导意义。

2.3 微球的形态

取优化处方工艺制得的微球粉末适量,置于显微镜下观察其形态(见图4),可见微球外观圆整,大小均匀,无黏连。

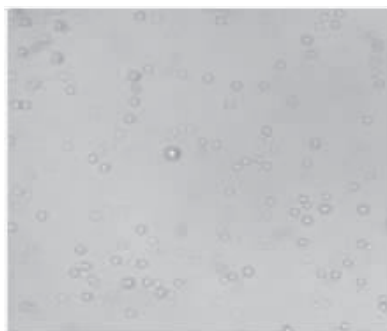


图4 葛根素白蛋白微球光学显微镜照片(40×)

Fig.4 Light micrograph of puerarin albumin microspheres(40×)

3 讨论与结论

白蛋白微球的制备方法主要有乳化固化法、去溶剂法、聚合法等,本文采用乳化热固化法制备微球,其中葛根素加入量对微球成型有较大影响,当葛根素用量达到一定程度时,制得的微球会出现明显的黏连现象,原因可能是载体牛血清白蛋白所能包裹的葛根素已经饱和,过量的葛根素使微球发生黏连^[22],与文献[18]报道的结果一致。在微球制备过程中,牛血清白蛋白浓度也会影响到葛根素的包封率与载药量,可能是随着牛血清白蛋白用量的增加,最初药物均能被有效包裹,所以包封率和载药量提高,但当其浓度达到一定值后,在微球形成过程中使其过早的吸附在微球表面,从而导致较低的包封率与载药量^[14]。实验曾尝试使用乳化化学固化法制备白蛋白微球,但其制得的微球成型性差,重现性差,且交联剂

表2 均匀设计表及处方测定结果

Table 2 Factors with coded values for uniform design and formulation measure results

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	载药量(%)	包封率(%)	综合评分
1	0.2(1)	10(1)	0.8(3)	3.31	34.53	47.32
2	0.2(1)	20(2)	0.5(2)	6.36	64.79	89.83
3	0.2(1)	20(2)	0.3(1)	6.25	66.96	90.60
4	0.3(2)	30(3)	0.3(1)	7.20	70.94	100.00
5	0.3(2)	10(1)	0.8(3)	2.28	29.37	36.53
6	0.3(2)	10(1)	0.5(2)	3.51	35.17	49.16
7	0.4(3)	20(2)	0.5(2)	3.94	43.97	58.35
8	0.4(3)	30(3)	0.3(1)	5.04	54.64	73.51
9	0.4(3)	30(3)	0.8(3)	5.13	37.20	61.84

表3 回归方程方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	3940.88	6	656.81	595.83	0.0017	*
X ₁	591.17	1	591.17	536.28	0.0019	*
X ₂	915.17	1	915.17	830.20	0.0012	*
X ₃	11.14	1	11.14	10.10	0.0864	
X ₁ X ₂	115.59	1	115.19	104.86	0.0094	*
X ₁ X ₃	26.08	1	26.08	23.65	0.0398	*
X ₂ X ₃	30.64	1	30.64	27.80	0.0341	*
残差	2.20	2	1.10			
合计	2652.24	8				
R ² = 0.9994				R ² _{Adj} = 0.9978		

注: * 表示显著性差异, $p < 0.05$ 。

戊二醛具有一定细胞毒性以及变应原性^[23]。

本研究在单因素及预实验的基础上,以包封率、载药量为指标,选取了影响较大的3个因素,牛血清白蛋白用量、药物葛根素用量与乳化剂司盘80用量进行3因素3水平的均匀设计试验,得最优处方:牛血清白蛋白为0.20 g,葛根素为30.00 mg,司盘80为0.80 mL,并根据最优处方验证了5批处方,载药量与包封率分别为 $9.81\% \pm 0.14\%$ 、 $76.75\% \pm 2.09\%$,与单因素试验相比,载药量与包封率均有所提高,以优化工艺制备的葛根素白蛋白微球外观为白色粉末,流动性良好。通过优化后的工艺,可获得较为理想的葛根素白蛋白微球。

参考文献

- [1] 曹毅.中药葛根的相关药理药效研究综述[J].中国处方药,2018,16(2):27-28.
- [2] 郭丽君,张静,肖冬,等.不同生长时期葛根光合特性及其与淀粉积累的关系[J].南方农业学报,2018,49(4):662-668.
- [3] 李远辉,刘佃飞,杨永福.葛根提取物的化学成分及其临床应用研究综述[J].中药与临床,2015,6(4):47-48.
- [4] 楚纪明,马树运,李海峰,等.葛根有效成分及其药理作用研究进展[J].食品与药品,2015,17(2):142-146.
- [5] 杨书山,刘莉,刘丽娜,等.葛根素微球的制备及其体外释放研究[J].中华高血压杂志,2015,3(23):357-358.
- [6] Liu X J, Zhao J, Gu X Y. The effects of genistein and puerarin on the activation of nuclear factor- κ B and the

production of tumor necrosis factor- α in asthma patients[J]. Pharmazie,2010,65(2):127-131.

- [7] Gao L, Ji X, Song J, et al. Puerarin protects against ischemic brain injury in a rat model of transient focal ischemia [J]. Neurol Res,2009,31(4):402-406.
- [8] 尹乐斌,夏秋良,赵良忠,等.葛根药理作用研究进展[J].现代农业科技,2016,45(4):68-69.
- [9] 李宁,郝志梅,崔书霞,等.葛根素对心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中国中医基础医学杂志,2014,20(11):1501-1503.
- [10] 闫雪生,程立方.葛根素新型制剂的研究概况[J].中国医院药学杂志,2011,31(15):1294-1297.
- [11] 张智舟,姜守刚,祖元刚,等.多西紫杉醇白蛋白微球的制备及优化实验研究[J].植物研究,2011,31(3):381-384.
- [12] 王秋芳,杨且翟,胡晋,等.白蛋白微球剂的研究进展[J].沈阳药学院学报,1992,2(9):140-143.
- [13] Xue J L, Danineis F, Star Ra, et al. Incidence and mortality of acute renal failure in medicare beneficiaries, 1992 to 2001 [J]. Jam Soc Nephrol, 2006, 17(4): 1135-1142.
- [14] 殷悦,阎雪莹,马艳南,等.白蛋白微球的制备方法及其质量评价的研究进展[J].黑龙江医药,2015,28(1):43-46.
- [15] 周雪,贺智勇,薛雨晨,等.葛根素缓释微球的高分子材料考察及工艺优化[J].中国实验方剂杂志,2015,21(9):14-18.
- [16] 吴静澜,陈红汝,陈白霜,等.三七总皂苷白蛋白微球的制备工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):17-20.

- [17] 李岸,刘丹,周捷,等.多西他赛人血清白蛋白微球的制备及体外释药性质的评价[J].中国医院药学杂志,2017,37(12):1149-1152.
- [18] 陈锋,李春忠,抗癌丝裂霉素白蛋白微球的制备及体外释药性能[J].华东理工大学学报,2006,32(2):184-187,192.
- [19] 黄羲颖,庄启范,黄凤华,等.应用均匀设计法优化佛手蜜炙工艺的研究[J].海峡药学,2018,30(1):15-17.
- [20] 陈永顺,吴珍,董永成,等.沙美特罗白蛋白微球的制备

- 与体外释放度考察[J].中国药师,2011,14(11):1624-1626.
- [21] 陈永顺,吴珍,董永成,等.去甲斑蝥素白蛋白微球的制备[J].中国医院药学杂志,2011,31(14):1174-1177.
- [22] 樊继波,陈永斌,周洁.白蛋白微球的制备方法及质量评价的研究进展[J].天津药学,2009,23(3):58-61.
- [23] Li H F, Cheng C F, Liao W J, et al. ATF3 - mediated epigenetic regulation protects against acute kidney injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(6):1003-1013.

(上接第128页)

定蒲公英脂溶性成分对人和动物安全性,为蒲公英资源利用和药物开发方面提供可靠理论依据。

参考文献

- [1] 韩晗,韦晓婷,魏映,等.沙门氏菌对食品的污染及其导致的食源性疾病[J].江苏农业科学,2016,44(5):15-20.
- [2] 杨怀珍,牟亚,罗薇.食源性沙门氏菌的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2016(4):69-71,75.
- [3] 刘艳红,李颖,吕淑霞.沙门氏菌和大肠杆菌耐药性的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2016(19):88-90.
- [4] 马婧嘉,施春雷,李可,等.沙门氏菌耐药谱及质粒耐药基因的筛查[J].中国食品学报,2014,14(4):184-190.
- [5] 马孟根,王红宁,余勇,等.猪源致病性沙门氏菌耐药基因的分析[J].畜牧兽医学报,2006,37(1):65-70.
- [6] 杨保伟,曲东,申进玲,等.陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J].微生物学报,2010,50(6):788-796.
- [7] Figueroa J, Sol O D, Vinokurovas L, et al. Prenatal flavor exposure through maternal diets influences flavor preference in piglets before and after weaning [J]. Animal Feed Science & Technology, 2013, 183(3-4):160-167.
- [8] 赵德建.中药组方对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌作用研究[D].泰安:山东农业大学,2013.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:化学工业出版社,2010:331-332.
- [10] 杜军英,姜东伯,狄柯坪,等.蒲公英抑菌抗炎作用的研究进展[J].白求恩医学院学报,2012,10(2):128-131.
- [11] Qian L, Zhou Y, Teng Z, et al. Preparation and antibacterial activity of oligosaccharides derived from dandelion [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64(2):392-394.
- [12] 吴小丽.蒲公英提取物抗肿瘤作用的初步研究[D].南京:南京医科大学,2005.
- [13] 王晓英.蒲公英总黄酮对假单胞菌抑菌机理的探讨[J].食品研究与开发,2012,33(11):18-21.
- [14] 莫延利,侯霞,李丽秋,等.蒲公英提取液调整小鼠肠道菌群并延长荷瘤生存时间的研究[J].中国微生态学杂志,2010,22(11):520-522.
- [15] 李雪石,张彦文.蒲公英水提取物对链脲佐菌素致糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制[J].中草药,2013,44(7):863-868.
- [16] 杨晓杰,陈静,程加春.蒲公英多糖的超滤分离及其清除自由基的作用研究[J].时珍国医国药,2009,13(11):58-60.

- [17] 唐美霞,王福宁,王涛.蒲公英利用现状及开发前景的探讨[J].青海草业,2015,24(1):39-44,47.
- [18] 宋晓勇,刘强,杨磊,等.蒲公英多糖提取工艺及其抗菌活性研究[J].中国药房,2010,21(47):4453-4455.
- [19] 刘丽娟,徐鸿雁,王宏伟.蒲公英有效成分抑菌实验研究[J].中草药,2013,25(10):180-181.
- [20] 李华峰.蒲公英花中黄酮类化合物的分离提取及其生物效应研究[D].太原:山西医科大学,2012,34-35.
- [21] 孟静思,袁进罡,马辉.中草药蒲公英的体外抑菌实验[J].河北化工,2009,16(3):17-19.
- [22] 段红波,官臣臣,梁引库,等.蒲公英叶脂溶性成分的GC-MS分析及活性探讨[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(1):60-66.
- [23] 梁引库.巨大型蒲公英根脂溶性成分的抗氧化活性及抑菌实验研究[J].食品工业科技,2013,34(12):153-156,160.
- [24] 段江莲,徐建国.桑椹红色素抑菌作用的研究[J].食品科学,2007,28(10):87-89.
- [25] 李传仁,严赞开.龙柏叶提取物对食品抑菌作用研究[J].安徽农业科学,2005,33(2):294-299.
- [26] Szczepaniak J, Cieslik W, Romanowicz A, et al. Blocking and dislocation of *Candida albicans* *Cdr1p* transporter by styrylquinolines [J]. Int J Antimicrob Ag, 2017, 50(2):171-176.
- [27] Ma Q, Zhongauthor Q. Antimicrobial activities of lauric arginate and cinnamon oil combination against foodborne pathogens: Improvement by ethylenediaminetetraacetate and possible mechanisms [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 72(10):9-18.
- [28] Memariani H, Shahbazzadeh D, Sabatier J M, et al. Mechanism of action and *in vitro* activity of short hybrid antimicrobial peptide PV3 against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 479(1):103-108.
- [29] 柴阿丽,韩云,武军,等.基于FDA-PI双荧光复染法的茄病镰刀菌孢子活性检测[J].中国农业科学,2015,48(14):2757-2766.
- [30] 姜伟.长白山杜香挥发油抑菌活性成分提取及抑菌机理研究[D].吉林:吉林大学,2012.
- [31] Moosavy M H, Basti A A, Misaghi A, et al. Effect of *Zataria multiflora* boiss essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes [J]. Food Research International, 2008, 41(10):1050-1057.