

评价中药体外抑菌法的研究进展

张学沛¹, 朱盛山¹, 刘 静¹, 彭 亮¹, 黄娟萍², 蔡延渠^{1*}

1. 广东药学院中药开发研究所, 广东 广州 510006

2. 广州普平生物科技有限公司, 广东 广州 510663

摘 要: 综合评述常用中药体外抑菌评价方法及存在问题, 发现评价标准未能统一, 结果受主观因素影响大、体外与体内抑菌效果存在一定差异性, 未能结合中药特点选择合适的方法。不同抑菌方法对评价中药对细菌的抑制能力(抑菌环、MIC)、杀灭能力(MBC), 细菌对药物的耐药率等影响较大。中药体外抑菌作用虽然研究方法较多, 应根据研究对象、实验目的、具体条件等选择合适的方法, 以便更加准确地评价中药的抗菌作用。

关键词: 中药; 体外抑菌; 评价方法

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)02-0188-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.021

Research progress in evaluation on Chinese materia medica *in vitro* bacteriostasis methods

ZHANG Xue-pei¹, ZHU Sheng-shan¹, LIU Jing¹, PENG Liang¹, HUANG Juan-ping², CAI Yan-qu¹

1. Research and Development Institute of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangzhou PuPing Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China

Abstract: After the common evaluation methods of *in vitro* bacteriostasis by Chinese materia medica (CMM) and the existing problems were comprehensively reviewed, we found that the evaluation criterion was not unified. The results were affected by subjective factors, there were some differences in the antibacterial effect between *in vitro* and *in vivo*, and the appropriate method was chosen without combining with the characteristics of CMM. Different bacteriostatic methods had a greater influence on the evaluation of CMM inhibition of bacteria (bacteriostasis circle, MIC), ability to kill (MBC), and the resistance of bacteria to drugs, etc. There are many research methods on the bacteriostasis experiment *in vitro* of CMM. Therefore, suitable methods should be chosen according to the conditions, aims, and requirements, so as to evaluate the antibacterial effect of CMM more accurately.

Key words: Chinese materia medica; *in vitro* bacteriostasis; evaluation methods

在抗感染治疗中, 细菌的耐药性和抗生素的副作用严重困扰着医药学界, 单靠化学药治疗已无法解决这一难题。经研究发现, 天然来源的中草药不仅具有较强的抗菌作用, 还具备不易产生耐药、经济等优点, 已成为国内外研究热点^[1]。

体外抑菌研究方法是抗感染药研究过程中的一个重要环节, 广泛应用于药物筛选、活性物质追踪、抗菌谱效价测定及临床上药敏试验等工作中, 是直接评价药物抗菌效能的经典实验方法。由于过去对这方面的认知不足和研究方法单一, 严重影响了中药的开发和运用。随着越来越多具有抗菌作用的天

然植物药被国内外学者发现报道, 医药界越来越重视从天然产物中寻找抗菌药物资源, 而经历几千年临床验证的中草药重新回归到人们的研究视野。研究者不断地将国际公认的西药抗生素敏感实验方法(扫描电镜^[2]、琼脂稀释法^[3]等)引入到中药的抑菌作用研究中, 并根据其自身特点不断地进行改良, 逐渐趋于更科学、合理、准确、可靠。但由于种种原因, 缺乏对中草药抑菌方法的深入研究, 以致目前尚无完善的、能体现中药自身特色的体外抑菌评价方法。这不仅给研究者带来困扰, 还严重影响了抗感染中药的发展。本文就目前所采用的中药体外

收稿日期: 2013-12-16

作者简介: 张学沛(1990—), 女, 壮族, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研究。Tel: (020)39352540 E-mail: zhangxuepei90@163.com

*通信作者 蔡延渠, 主要从事中药新药研究和中药新剂型、新技术研究。Tel: (020)39352540 E-mail: ayu19860524@163.com

抑菌研究方法及存在的问题进行评述, 力图为新药开发提供借鉴和参考, 以期建立既能体现中药自身特色, 又能表现出准确性高、重现性好的标准化评价方法。

1 定性测定的琼脂扩散法

琼脂扩散法主要包括滤纸片扩散法、牛津杯法、挖沟法、打洞(孔)法等。琼脂扩散法具有方法简便, 易掌握的优点, 但精确度不高, 一般用于定性或初步判断其作用的强弱。

1.1 滤纸片扩散法(K-B法)及改良纸片法

滤纸片法是抑菌实验中最常用的方法, 通过量取抑菌圈直径来判断试验药物抑菌作用的强弱。该法的特点是精确度虽不高、药物在滤纸片上的装载量小, 但可以在同一平皿上观察一种细菌对多种中药成分的敏感度或耐药性, 结果直观, 易于判断、比较。

杨钧等^[4]采用纸片扩散法观察中药复方清热颗粒剂以10倍临床剂量(22 g/(kg·d)) ig给药对细菌耐药性的影响, 结果末次给药60 min后含药血清抑菌环直径达10 mm。付婷婷等^[5]通过纸片法初筛出金黄色葡萄球菌对苦参醇提物非常敏感, 而黄柏等提取液抑菌活性一般。认为使用纸片扩散法可以观察一种细菌对多种中药成分的敏感度, 可筛选对病原微生物活性高、特异性高、对环境稳定的中药。

但常规纸片法不够准确, 尤其是在做中药抑菌试验时, 中药提取液普遍为悬浊液, 成分复杂, 部分抑菌活性成分具有挥发性, 对热敏感, 纸片浸泡时间以及在其干燥过程中所导致的药物挥发、纸片装载量有限等因素往往会影响到试验结果的准确性。基于扩散法与稀释法的原理和特点的E实验(E-test)弥补了常规纸片法的一些不足, 可以像稀释法一样直接定量测出抗菌药物对受试菌的最小抑菌浓度(MIC), 且结果准确、重复性好。但是目前E实验较多应用于抗生素研究, 由于中药与抗生素相比, 其抗菌活性较低, 需要用较大的药量才能达到相同的效果, 要在塑料薄条背面固定一系列预先制备的干燥而稳定的连续指数浓度梯度的抑菌中药有难度, 因此E实验在中药抑菌应用方面还处于起步阶段^[6-7]。

1.2 牛津杯法

牛津杯法(管碟法、杯碟法)是国内外常用的检测法, 此法检测药物抑菌作用, 具有直观、载药

量多、重复性好等优点; 但需要特制的牛津杯, 操作需非常小心, 否则易造成牛津杯在琼脂平板表面滑动, 药物向菌层中渗透扩散不均匀, 得到的抑菌圈不规则。

陈志蓉等^[8]采用牛津杯抑菌圈法定性检测10种常见中药大黄、艾叶、丁香、黄柏、苦参、蒲公英、蛇床子、仙鹤草、茵陈、姜黄提取液1 g/mL对痤疮致病菌的抑菌活性。结果所选10种中草药提取液对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌呈现部分抑制作用。表明采用牛津杯法可以在较短的时间内完成大量中草药的筛选。李国利等^[9]用牛津杯法测研究荷叶铁线蕨提取液1 g/mL的抑菌作用, 其对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌抑菌圈直径分别为12 mm和21 mm, 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌无抑菌作用。牛津杯法的结果主要取决于琼脂培养基内的药物扩散性和抗菌有效成分的溶解性, 是初步筛选抗菌植物药的有效途径, 可作为一种定性的研究方法。

1.3 挖沟法

挖沟法可在一个平板上试验一种药物对几种不同试验菌的抗菌作用, 适用于不易溶解的中药或外科敷用中药粉末等, 刘佩沂等^[10]采用挖沟法比较肺热清解口服液与处方中总黄酮的抗菌效果。总黄酮在高浓度(原药材4 g/mL)时, 对肺炎杆菌、金黄色葡萄球菌等抑菌效果均优于肺热清解口服液, 但在低浓度(原药材1 g/mL)时抑菌效果弱于肺热清解口服液。采用挖沟法克服了不溶性药物难以观察结果的难题, 但对操作技术有要求, 操作不当药液易渗出。

1.4 打孔法

打孔(洞)法药物的装载量较大, 某些中药由于在琼脂内扩散慢, 对某些快速或蔓延生长的病原菌进行抑菌活性测定时, 扩散效果不容易控制, 常在抑菌环内生成薄的菌苔或不生成抑菌环, 使得现象不明显, 判断错误, 且打孔时琼脂易破裂要求熟练掌握打洞技术。

苟占平等^[11]利用平板打孔法探讨川产金银花品种细毡毛忍冬、淡红忍冬、红腺忍冬、峨眉忍冬抗菌作用, 发现川产习用金银花在体外对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、福氏志贺菌、卡他球菌抑菌环直径 ≥ 10 mm, 通过打孔扩散法可以在同一平皿上观察一种细菌对多种金银花品种的敏感度或耐药性, 结果直观, 易于判断、比较。

2 定量测定的稀释法

稀释法可定量测定中药对细菌、真菌的 MIC、最小杀菌浓度 (MBC), 测出抗菌中药的最基本的药效学数据, 用以评价该药的抑菌性能。

2.1 固体培养基稀释法

固体培养基稀释法包括平板法和斜面法, 通常做梯度稀释, 计数的线性范围大, 能较好地反映菌落的疏密程度。通常采用平板菌落计数, 易发现污染菌和耐药变株, 具有在一个平板上同时作多种菌 MIC 测定, 也可用于含血培养基, 克服了美蓝还原酶实验法不能定量检查以及微生物显微镜直接计数法对菌体数量计数繁琐的困难。

温井奎等^[12]采用琼脂稀释法测出黄连、黄芩、黄柏、金银花、夏枯草、当归、川芎、苦参、地肤子单味中药颗粒剂对糖尿病足常见致病细菌具有不同程度的抗菌作用, 其中黄连颗粒对金黄色葡萄球菌抑菌效果最优, 15.63 mg/mL 时无菌生长, 对鲍曼不动杆菌抑菌效果次之, 此法只需几个稀释度含药平板, 一个稀释度可同时检测对多种细菌抑菌效果。叶惠芬等^[13]采用琼脂稀释法研究黄连等 5 种中药水煎液抑菌活性, 发现此法敏感性高, 检测出黄连水煎剂对肺炎链球菌半数有效浓度 (MIC₅₀) 为 2 g/mL, 90% 抑菌浓度 (MIC₉₀) 为 4 g/mL。该实验结果判定简单, 易于发现污染或耐药突变菌, 避免了影响结果判断的主客观因素。

琼脂稀释法存在不成熟的地方, 需进一步完善。如琼脂稀释法检测药物抑菌作用时不能无限提高中药浓度, 高浓度中药提取液易产生沉淀, 导致药物与琼脂未充分混匀, 细菌与不同浓度的药物平板仅表层接触, 不能与药物有效成分充分进行相互作用。

2.2 液体稀释法

液体稀释法可分为常量稀释法和微量稀释法。在测定中药抑菌作用时, 由于有些煎剂颜色较深, 肉眼不易分辨是否有效, 可取出转种适当的琼脂平板, 培养后观察有无细菌生长加以区别。

采用微量肉汤稀释法能定量测出中药抑菌作用, 王磊等^[14]采用微量稀释法筛选出对解脲支原体和白色念珠菌体外有明显抑制作用的抗 HIV 中药有效成分, 三七总皂苷对解脲支原体的抑制作用最强, MIC₅₀ 为 8 μg/mL, MIC₉₀ 为 16 μg/mL。谭蔚锋等^[15]采用常量肉汤稀释法检测奇蒿对多种致病菌抑菌作用, 结果奇蒿 80% 乙醇粗提取物对痢疾志贺菌的 MBC 为 25 mg/mL。表明稀释法没有中间载体,

直接在液体中反应, 不存在吸收和挥发的问题, 因而能比较正确地反映样品实际的使用效果。此外, 有文献报道采用液体稀释法检测田基黄提取物 (生药 30 g/g)^[16]、柴胡水煎剂 (1 g/mL)^[17]、黄柏煎剂及酊剂^[18]等体外抗菌活性时, 也发现应用液体稀释法可筛选具有抗菌活性的中药及测定不同中药制剂和联合用药的抗菌活性。

在研究中发现稀释法也有其局限性, 如仅能预示所测中药是否含某些直接抗菌的有效成分或含该抗菌成分的多少及其抗菌活性的大小。由于中药抗感染是利用中药的多种复杂有效成分调节机体平衡、提高机体免疫力, 而不是所有成分直接作用于病原菌达到治愈疾病的目的, 故中药的 MIC 值往往比西药的 MIC 值大, 甚至一些中药的抗菌有效成分在体外抑菌试验中抗菌作用较弱或测不出, 但在体内却有较好的抑菌效果。

3 其他方法

3.1 流式细胞术

流式细胞术 (FCM) 是一种新的药敏监测方法, 采用流式细胞仪对单个细胞或其他生物微粒进行快速定性、定量分析与分选的一门技术。FCM 体外药物药敏试验的主要机制是利用某些荧光素染料的化学特性, 通过 FCM 检测染料与菌体结合后发出的不同荧光强度, 间接反映菌体的活性或功能状态, 进而帮助判断菌体对药物的反应性, 根据所检测到的荧光强度变化来判断真菌或细菌经药物处理后的存活状态, 进而推断 MIC。

李大宁等^[19]用 FCM 测定中药有效成分丁香酚等作用白色念珠菌后其 DNA 合成周期和荧光强度的变化, 发现随着药物浓度的增高, 白色念珠菌处于分裂期的细胞比率减少。由于 FCM 法可对细胞进行逐个检测, 能更快速、准确及多参数检测微生物的药敏试验, 大大缩短了检测时间, 因此 FCM 已逐渐成为白色念珠菌、结核杆菌、金黄色葡萄球菌等微生物的药物敏感性的快速检测方法之一。吴建华等^[20]应用流式细胞仪可以检测出抗真菌中药有效成分小檗碱等对白色念珠菌细胞生长周期有不同程度的影响, 随着药物浓度的增高, 细胞分裂受抑制越明显。本结果显示 FCM 能够提供抗真菌药物的敏感性测定结果, 自动化程度高, 方法简单, 结果客观, 避免了人为因素的误差。

3.2 营养物质消耗法

细菌的生长与繁殖离不开营养物质, 可以通过

测定细菌生长过程中营养物质的消耗来判断抑菌效果。利用细菌被抗菌药物抑制时,其摄取营养成分,如葡萄糖的能力下降,培养基中剩余的葡萄糖浓度高的原理制备测试组和对照组,对照组细菌生长摄取葡萄糖多,培养基中剩余的葡萄糖浓度低。通过比较各药物浓度组的葡萄糖的变化,求得 MIC 值。以葡萄糖氧化酶法准确测定葡萄糖消耗量,或用 3,5-二硝基水杨酸比色法定糖法定量剩余葡萄糖,该法具有较高的准确性和重复性^[21-22]。

3.3 自动药敏法

自动药敏法目前有 Biomerieux Vitek 系统、MicroScan 系统、BDPhoenix 等,该法是模拟微量稀释法,基本原理是将药物微量稀释微条孔或条板,加入菌悬液后放入仪器中孵育,通过测定细菌生长的浊度、培养基中荧光指示剂的强度或荧光原性物质的水解,观察细菌的生长情况,从而判读结果。全自动药敏仪是专业设计用于微生物实验室进行快速细菌鉴定及药物敏感试验的全自动设备。仪器自动化程度高,工作流程简便,维护简单,主要应用于大型医院的临床检测^[23]。

4 讨论

中药体外抑菌试验方法主要分为两大方面:定性鉴别的抑菌环实验、定量测定的稀释法,二者构成完整的体外评价。其中抑菌环实验操作简便,但不够准确,一般用于药物初期的活性筛选;而稀释法虽操作较为复杂,能精确定量,可用于药物抗菌效价的评定。中药的抑菌研究确实可以借鉴现代医学的研究方法,但更应该突出中药的特色,不能脱离中医理论的指导和传统应用的实践去搞中药抑菌的体内、外筛选,还要充分认识到中药抗菌的特殊性,合理选择试验方法,针对目前仍存在的问题进行不断修正和改善。

4.1 现用中药药敏试验方法存在不足

现用中药药敏试验方法存在耗时长、操作繁琐、结果判读受主观因素影较大等诸多不足,评价标准未能统一。实验方法不同、细菌存在形式的多样性、接种密度不同,都可导致抑菌效果不同,且以活性为导向追踪抗菌物质是否合适等也有待研究。

4.2 各种体外抑菌试验方法具有一定的适用性

在采用滤纸片法研究植物多糖时,常用倒置培养,而多糖作为大分子扩散所需水分多,培养基表面水分较少,无法使多糖有效扩散,影响其对细菌生长的抑制作用^[24]。而采用用活菌计数法需在试验

前对试验菌在生理盐水中存活情况进行测定,对厌氧性的菌、营养要求高的菌如肺炎球菌、脑膜炎球菌等显然不能使用此法。故应根据中药有效物质、菌种的特点选择合适的方法进行准确评价。

4.3 影响各种体外抑菌试验结果判定的因素诸多

影响结果判定的因素有很多,如药物的浓度、药物对试验菌的敏感程度、培养时间、培养温度、菌种的生长活力、菌液浓度等。诸多因素中,菌种的影响是比较大的。而不同细菌培养物在 18~24 h 后大多进入稳定期或衰亡期,且细菌细胞代谢活性并不高,形态、生理特性不一致,不能真实反映活菌浓度,在进行药物检定法时会长出双圈或者抑菌圈的边缘不清晰。常采用绘制生长曲线,通过生长曲线可以清晰地显示细菌生长基本规律以及药物在不同浓度对菌落的影响情况^[25-26]。在研究中药制剂,尤其是中药复方制剂对细菌抑制作用时,能提示中药里的不同成分对细菌生长产生不同作用,可以帮助了解细胞的生长能力、筛选药物、确定药物的活性、制定合理的后续实验方案^[27]。

4.4 重视中药的特殊性

由于中药里的成分复杂,中药煎剂的色泽较深,混合后使培养基染色导致指示剂色泽变化难以判断;有些中药成分加入培养基后,出现沉淀和混浊,从而影响实验结果^[28]。因此,开展中药的抑菌评价时,对实验药品的有效组分与剂型应充分考虑。

4.5 体外抗菌试验不足以阐明药物对机体的作用

因为药物在有机体内受生理环境影响而发生复杂的变化。如研究苦豆子对幽门螺杆菌抑菌效果时发现,幽门螺杆菌适宜生长在特殊的高胃酸环境中,体外试验中药物能够在模拟的较适宜的 pH 值环境下发挥抑菌作用,但未能证明其在复杂的体内环境中也能起到抑菌效果^[29]。因此需加强对实验动物体内的相关研究,使药物能够更真实地接近于临床应用,更加有助于抗菌新药的研发。

中药来源于天然产物,成分丰富,并存在多种抑菌成分,因此,从中药里开发抗菌药具有其独特的优越性。然而目前的体外抑菌评价方法还不够完善,制约了临床上的广发应用。为了更准确地评价中药的抗菌作用,通过综合总结已有研究方法的优缺点,结合中药有效物质的特点,建立一套适合中药研究的方法和标准,以更好地推动抗菌中药的发展,具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] 马建凤, 刘华钢, 朱 丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 42-45.
- [2] 李仲兴, 王秀华, 时东彦. 五倍子提取物对表皮葡萄球菌的抗菌作用及其扫描和透射电镜观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004 (10): 867-869.
- [3] 李仲兴, 王秀华, 赵建宏, 等. 应用 M-H 琼脂进行连翘体外抗菌实验的效果观察 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1101-1103.
- [4] 杨 钧, 张淑文, 阴 宏, 等. 复方清热颗粒剂含药血清对低浓度抗生素环境下细菌耐药性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(10): 24-27.
- [5] 付婷婷, 吴建元, 王 黎, 等. 从中药筛选治疗阴道炎的抗菌组方 [J]. 中药材, 2006, 29(9): 931-935.
- [6] 王华丽, 盛家琦, 黄文祥, 等. E-test 监护病房革兰阴性杆菌耐药性的 7 年动态研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(7): 431-437.
- [7] 吴本权, 唐英春, 张扣兴, 等. E-test 试条对异质性耐万古霉素葡萄球菌的检测 [J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(4): 249-251.
- [8] 陈志蓉, 董银卯, 孟 宏, 等. 10 种中草药提取物对痤疮致病菌的体外抑菌活性研究 [J]. 中医药学报, 2011 (6): 24-26.
- [9] 李国利, 陈洪源, 孙厚良, 等. 中药荷叶铁线蕨提取液体外抑菌活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2471-2472.
- [10] 刘佩沂, 邓秋狄, 田素英, 等. 肺热清解口服液及其总黄酮的抗菌、解热作用对比研究 [J]. 今日药学, 2012, 22(10): 588-591.
- [11] 苟占平, 万德光. 川产习用金银花的抑菌作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 724-725.
- [12] 温井奎, 徐丽梅, 吴 楠, 等. 中药对糖尿病足常见细菌敏感性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(2): 535-537.
- [13] 叶惠芬, 刘 平, 陈惠玲, 等. 中药对广州地区肺炎链球菌抑菌作用研究 [J]. 临床医药实践, 2006, 15(8): 566-568.
- [14] 王 磊, 赵声兰, 陈朝银, 等. 几种抗艾滋病中药有效成分对解脲支原体和白色念珠菌体外抑制作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 767-768.
- [15] 谭蔚锋, 王 靖, 邢 新, 等. 中药奇蒿提取物体外抗菌活性的实验研究 [J]. 药学实践杂志, 2010, 28(2): 101-104.
- [16] 虞金宝, 聂荣庆, 吴东风, 等. 中药田基黄抗幽门螺杆菌的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(6): 821-823.
- [17] 左 玲, 胡国华. 中药对乳酸杆菌与解脲支原体临床分离株的体外抑制实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2999-3000.
- [18] 周 汛, 李桂明. 10 种中药的不同制剂对常见致病菌体外抗菌活性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(2): 237-239.
- [19] 李大宁, 吴建华, 陈德利, 等. 流式细胞术测定 3 种中药提取物对白念珠菌胞核的影响 [J]. 临床皮肤科杂志, 2002, 31(5): 287-289.
- [20] 吴建华, 温 海, 梁晓博, 等. 用流式细胞术研究中药对白念珠菌的抗菌作用 [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2003, 2(3): 141-144.
- [21] Riesselman M H, Hazen K C, Cutler J E. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(1): 333-340.
- [22] Li R K, Elie C M, Clayton G E, *et al.* Comparison of a new colorimetric assay with the NCCLS broth microdilution method (M27-A) for antifungal drug MIC determination [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(6): 2334-2338.
- [23] Richter S S, Howard W J, Weinstein M P, *et al.* Multicenter evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus* species [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(9): 2863-2871.
- [24] 刘春兰, 杨 逸, 何 林, 等. 植物多糖抑菌作用研究方法进展 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1725-1727.
- [25] 冯志华, 孙启玲, 米 坤, 等. 中药红花与产纤溶酶菌株相互影响的研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2004, 41(2): 395-398.
- [26] 耿丽晶, 周 围, 张丽艳, 等. 苦瓜总皂甙最小抑菌浓度和最佳抑菌条件的研究 [J]. 食品工业科技, 2012 (11): 79-82.
- [27] 郭丽双, 葛立男, 宋宝辉, 等. 中药体外抑菌实验检测方法的比较 [J]. 中医学报, 2011, 10(26): 1207-1208.
- [28] 沈黎明, 喻林冲. 解脲支原体对中药有效部位的药敏试验研究 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(3): 294-295.
- [29] 高承霞, 严 祥, 韩 俭, 等. 苦豆子生物碱对幽门螺杆菌耐药株的体外抑菌研究 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(11): 1126-1127.