僵蚕抑菌活性成分的提取及其对大肠杆菌的抑制作用

项林平,柴卫利,王 珏,郑雅雯,唐光辉,吕 林,王 敦
(西北农林科技大学 植物保护学院,植保资源与利用教育部重点实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】探讨僵蚕抑菌活性成分的提取方法,比较所得提取物对大肠杆菌的抑制作用,为解析和深入研究僵蚕的抑菌药理机制提供参考。【方法】以僵蚕为材料,以体积分数 95%乙醇为提取溶剂,对中药僵蚕的 4 种提取方法(超声波法、微波法、煎煮法、冷浸法)进行平行比较研究;采用超声波提取法,探讨了石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、体积分数 95%乙醇、甲醇和水 7 种提取溶剂的提取效果,采用比色法、纸片扩散试验和肉汤倍比稀释法研究所得僵蚕活性提取物对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的抑菌活性。【结果】以体积分数 95%乙醇作为提取溶剂,4 种提取方法中,以超声波法提取时的浸膏得率最高。采用超声波提取法时,7 种提取溶剂中,以体积分数 95%乙醇提取浸膏的得率最高。研究结果显示,不同提取方法得到的提取物对大肠杆菌均有明显的抑菌作用,其中采用超声波提取法,以体积分数 95%乙醇为提取溶剂时,所得提取物的抑菌活性最高,其对大肠杆菌的最低抑菌浓度(MIC)为0.625 mg/mL。【结论】不同提取方法得到的僵蚕提取物对大肠杆菌均具有明显的抑菌活性,僵蚕的抗炎作用与其抑菌活性相关。

[关键词] 僵蚕;活性成分提取;抑菌作用;大肠杆菌
[中图分类号] R284.3;S886.9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2010)03-0150-05

Analysis on antibacterial components from *Bombyx batryticatus* and its antibacterial activity against *Escherichia coli*

XIANG Lin-ping, CHAI Wei-li, WANG Jue, ZHENG Ya-wen,
TANG Guang-hui, LÜ Lin, WANG Dun
(*Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: 【Objective】 In this study, the methods of extracting the antibacterial component *Bombyx batryticatus* were tested, and the antibacterial effects of *Bombyx batryticatus* on *Escherichia coli* were determined in bioassay. 【Method】 With *Bombyx batryticatus* as the material, the volume fraction of 95% ethanol as extraction solvent, parallel and comparative study was done on four kinds of extraction methods (ultrasonic, microwave method, boiling method, the cold soak method) of the traditional Chinese medicine *Bombyx batryticatus*. And the ultrasonic extraction method was taken to discuss extraction of seven kinds of extraction solvents, such as aether petroleum, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, the volume fraction of 95% ethanol, methanol and water. Colorimetry, disk diffusion test and broth dilution were used to study the antibacterial activity of the obtained extracts of *Escherichia coli*. 【Result】 With the volume fraction of 95% ethanol as extraction solvent among the four kinds of extraction methods, the ultrasonic ex-

* [收稿日期] 2009-09-25
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30500391,30872033)
[作者简介] 项林平(1984-),男,河南三门峡人,在读硕士,主要从事昆虫生理生化研究。E-mail:xianglei1127@163.com
[通信作者] 王 敦(1973-),男,青海西宁人,副教授,博士,主要从事昆虫生化与分子生物学研究。
E-mail:wanghandecn@yahoo.com.cn

traction was the highest rate. Ultrasonic extraction method showed among the seven kinds of solvent extractions, the volume fraction of 95% ethanol extract had the highest rate of extraction. The results showed that different extractions had significant inhibitory effects on *E. coli*, and the extraction of using ultrasonic extraction method and the volume fraction of 95% ethanol showed the highest antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) on *Escherichia coli* was 0.625 mg/mL.【Conclusion】Different extractions of *Bombyx batryticatus* all had significant antibacterial activity on *E. coli*, indicating that the anti-inflammatory effect of *Bombyx batryticatus* was related to its antibacterial activity.

Key words: *Bombyx batryticatus*; antibacterial component extract; antibacterial activity; *Escherichia coli*

僵蚕(*Bombyx batryticatus*)是蚕蛾科(Bombycidae)昆虫家蚕(*Bombyx. mori*)的幼虫感染白僵菌(*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.)而僵死后的干燥全虫，始载于《神农本草经》，并将其列为中品，具有退热、止咳、化痰、镇静、镇惊、消肿等功效，常用于治疗癫痫、高热惊厥、流行性腮腺炎、上呼吸道感染、遗尿等症[1-2]。

现代药理研究发现，僵蚕具有抗惊厥、抗感染、抑瘤、降血糖和降血脂等[3-5]作用，但目前关于其抑菌作用尚缺乏系统的试验数据，如抑菌成分的组成、有效浓度及持续时间等。为此，本研究采用不同的提取方法对僵蚕的抑菌成分进行初步分离，并研究其对大肠杆菌的抑制作用，以期获得僵蚕抑菌成分的有效浓度、持续时间等试验数据，为解析和深入研究僵蚕的抑菌药理机制提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　材　料

僵蚕(产地：江苏)，购自西安药材公司。将僵蚕拣选除杂后，置于 60 ℃干燥箱中恒温干燥 8 h，取出粉碎过 250 μm 筛，混和均匀，称量，备用。

牛肉膏，北京奥特星生物技术有限责任公司；蛋白胨、OXOID；酵母抽提物，OXOXID；琼脂粉，润德生物；1 mol/L NaOH、1 mol/L HCl、丙酮，西安三浦精细化工厂；NaCl、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$，分析纯，西安试剂六厂；菌种 *Escherichia coli* TG1，由西北农林科技大学植保资源与利用教育部重点实验室提供。

1.2　僵蚕活性成分的提取

采用超声波提取法[6]、煎煮提取法[7]、冷浸提取法[7]进行僵蚕活性成分提取时，在常温常压条件下，取粉碎后的僵蚕 25 g 与 250 mL 体积分数 95%乙醇混合提取 1 h，滤纸过滤；取滤渣与 250 mL 体积分数 95%乙醇混合提取 0.5 h，滤纸过滤；再取滤渣与 250 mL 体积分数 95%乙醇混合提取 0.5 h，滤纸过滤。将 3 次滤液合并，蒸干浓缩制得浸膏，称其质量，计算得率。采用微波法[8-9]提取僵蚕活性成分时，取粉碎的僵蚕 25 g，与 250 mL 体积分数 95%乙醇混合，于 20%(720 W)的火力提取 1 min，滤纸过滤，取滤渣和 250 mL 体积分数 95%乙醇混合提取 1 min，滤纸过滤；再取滤渣与 250 mL 体积分数 95%乙醇混合提取 1 min，滤纸过滤。将 3 次滤液合并，蒸干浓缩制得浸膏，称其质量，计算得率。取 1 g 浸膏干样，用丙酮定容为 1 g/mL，然后在超净工作台上用一次性针头和无菌滤头将定容好的供试液无菌过滤，按需要稀释后，于 2 ℃保存备用[10-12]。

1.3　提取溶剂的选择

分别以石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、体积分数 95%乙醇、甲醇、水作为溶剂，用超声波提取法按照 1.2 的方法进行提取，分析比较各种溶剂的提取效果。每组试验平行进行 3 次，结果取平均值。

1.4　僵蚕活性成分的检测

1.4.1　比色法[13]　按照如下配方配制供试比色溶液。①CK：LB 5mL＋*E. coli* 50 μL＋无菌水 25 μL；②J1：LB 5 mL＋*E. coli* 50 μL＋超声波提取供试液 25 μL(10 mg/mL 浸膏计)；③J2：LB 5 mL＋*E. coli* 50 μL＋微波提取供试液 25 μL(10 mg/mL 浸膏计)；④J3：LB 5 mL＋*E. coli* 50 μL＋煎煮提取供试液 25 μL(10 mg/mL 浸膏计)；⑤J4：LB 5 mL＋*E. coli* 50 μL＋冷浸提取供试液 25 μL(10 mg/mL 浸膏计)；⑥溶剂对照：LB 5 mL＋*E. coli* 50 μL＋丙酮 25 μL。每种供试液无菌操作重复 3 次。

将上述配制好的供试液于 37 ℃恒温摇床培养，每隔 0.5 h 分别取 6 种供试液，用 UV-2550 型紫外可见分光光度计在 λ_{max}＝375 nm 下比色，连续测 8 次，分别取 3 个平行试验的平均值，以测得的数据绘制曲线。

若供试管的吸光度小于对照管，表明供试液有抑菌活性；若吸光度大于或等于对照管，则表示该供试

液无抑菌活性。吸光度越大,表明其抑菌活性越小。

1.4.2 纸片扩散[14-15]试验 药敏纸片的制备参考文献[16]的方法。将不同提取方法和不同提取溶剂提取所得的僵蚕活性提取物分别配成 10 mg/mL的供试液,取制备好的滤纸片(直径 6 mm)放入供试液中浸泡 24 h,用无菌镊子夹取滤纸片,稍风干后备用;将菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL[17]的大肠杆菌用无菌刮铲均匀涂抹在平板上。将制备好的药敏纸片分别贴在培养基的 1,2,3 号位点,然后置 37 ℃恒温培养箱中培养 18～24 h,分别测定各自的抑菌圈直径。每处理重复 3 次,结果取 3 个重复的平均值。

1.4.3 肉汤倍比稀释法 参考文献[16,18]的方法,先取 13 支灭菌试管,向 1 号管中加入肉汤培养基 9.95 mL,2～12 号管每管各加肉汤培养基 5 mL,再向 1 号试管中加入 50 μL 供试液(分别为不同提取方法和不同提取溶剂提取所得的僵蚕活性成分样品),然后吸取 5 mL 至 2 号管,混匀后再吸取 5 mL 至 3 号管,如此连续倍比稀释至 11 号管,并从 11 号管中吸取 5 mL 弃去,则 1～11 号管的供试液质量浓度(以提取浸膏计)依次为 5,2.5,1.25,0.625,0.313,0.156,0.078,0.039,0.020,0.010 和 0.005 mg/mL。向 1～11 号管中依次加入浓度为 1×10^8 CFU/mL 的大肠杆菌菌液 50 μL,其中以 11 号管为阴性对照。然后向 12 号管中再加入 50 μL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的大肠杆菌液作为空白对照;向 13 号管中加入 4.975 mL 肉汤培养基、0.025 mL 丙酮和 50 μL 大肠杆菌菌液作为溶剂对照。将 13 支试管置于恒温培养箱,于 37 ℃培养 18～24 h,然后对各管的浑浊度进行比较,以确定最低抑菌浓度(MIC)。若供试管的浑浊度小于阴性对照管,表明其有抑菌活性;浑浊度与阴性对照管相同则表示无抑菌活性;浑浊度越大表明抑菌活性越小。试验以 3 个重复的平均值作为最终结果。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对僵蚕提取浸膏得率的影响

由表 1 可见,以体积分数 95%乙醇作为提取溶剂时,不同提取方法提取的僵蚕活性物质的浸膏得率大小依次为:超声波法>微波法>煎煮法>冷浸法。由此说明,超声波法提取浸膏的得率最高,故选择超声波法提取僵蚕活性物质。

2.2 不同提取溶剂对僵蚕提取浸膏得率的影响

由表 2 可见,采用超声波法提取时,不同提取溶剂提取僵蚕活性物质的浸膏得率的大小顺序为体积分数 95%乙醇>甲醇>水>乙酸乙脂>石油醚>丙酮>二氯甲烷,说明体积分数 95%乙醇提取浸膏的得率最高,故选择 95%乙醇作为僵蚕活性物质的提取溶剂。

表 1 不同提取方法对僵蚕提取浸膏得率的影响

Table 1 Effect on extraction rate of *Bombyx batryticatus* by different extraction methods

提取方法 Extraction method	浸膏得率/% Extraction rate
超声波 Ultrasonic	22.88
微波 Microwave	20.64
煎煮 Decocting	14.56
冷浸 Cold-soak	7.36

注:表中样品均为以体积分数 95%乙醇为提取剂所得的提取物,所有数据均为 3 次试验的平均值。

Note: Samples were extracted by 95% ethanol. All data in the table were the mean of three replicates.

表 2 不同提取溶剂对僵蚕提取浸膏得率的影响

Table 2 Effects of different extraction solvents on the extraction rate of *Bombyx batryticatus*

提取溶剂 Extraction solvent	浸膏得率/% Extraction rate
石油醚 Aether petrolei	3.74
二氯甲烷 Dichloromethane	2.48
乙酸乙脂 Acetic ether	5.83
丙酮 Acetone	2.77
体积分数 95%乙醇 95% Ethanol	22.32
甲醇 Carbinol	13.63
水 Water	6.00

2.3 僵蚕提取物的抑菌活性

2.3.1 比色法 由图 1 可知,不同提取方法得到的提取物对大肠杆菌均有明显的抑菌活性,其中以超声波法和煎煮法所得提取物的抑菌活性最高。

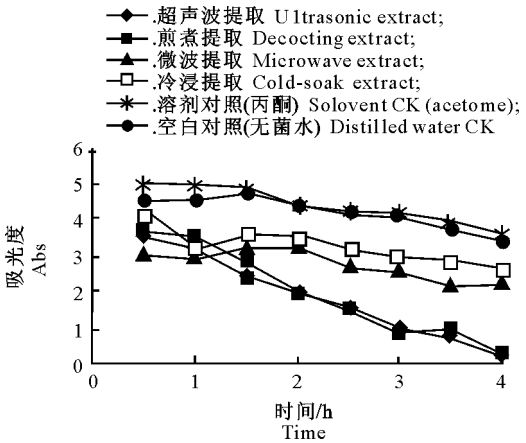

图 1 不同提取方法所得僵蚕提取物抑菌活性的比较

Fig. 1 Comparison of anti-bacteria activities on *E. coli* for different extracts of *Bombyx batryticatus* by different extraction methods

2.3.2　纸片扩散试验　由表 3 可见，以体积分数 95%乙醇作为提取溶剂，用不同提取方法提取的僵蚕活性物质的抑菌活性大小为：超声波法＞煎煮法＞微波法＞冷浸法。该结果说明，4 种提取方法提取的僵蚕活性物质均对大肠杆菌有抑制作用，但以超声波提取物的抑制作用最强，提示超声波法能够更有效地提取到僵蚕的活性物质。

由表 4 可以看出，采用超声波提取法时，不同提取溶剂提取的僵蚕活性物质的抑菌活性大小为：体积分数 95%乙醇＞甲醇＝水＞乙酸乙脂＞石油醚＞丙酮＝二氯甲烷，说明 7 种提取溶剂提取的僵蚕活性物质对 *E. coli* 均有抑制作用，但以体积分数 95%乙醇作为提取溶剂时的提取物的抑制作用最强，说明体积分数 95%乙醇能更有效地提取到僵蚕的活性物质。

表 3　不同提取方法所得僵蚕活性物质对大肠杆菌生长的影响

Table 3　Effects of activity substances of *Bombyx batryticatus* from different extraction methods to the growth of *E. coli*

提取方法 Extraction method	抑菌圈直径/mm Dia. of radial diffusion
超声波 Ultrasonic	7.8
煎煮 Decocting	6.7
微波 Microwave	6.4
冷浸 Cold-soak	6.3

表 4　不同提取溶剂所得僵蚕活性物质对大肠杆菌生长的影响

Table 4　Antibacterial activities of *Bombyx batryticatus* extracts by different extraction solvents against *E. coli*

提取溶剂 Extraction solvent	抑菌圈直径/mm Dia. of radial diffusion
石油醚 Aether petrolei	6.5
二氯甲烷 Dichloromethane	6.2
乙酸乙酯 Acetic ether	6.7
丙酮 Acetone	6.2
水 Water	6.8
甲醇 Carbinol	6.8
体积分数 95%乙醇 95% ethanol	16.0

注：表中样品均为超声波提取物，样品质量浓度为 10 mg/mL（以浸膏计），表中抑菌圈直径是 3 次试验的平均值。

Note: Samples above are all ultrasonic extraction. Concentration is 10 mg/mL(by extracts). All data in the table were the mean of three replicates.

2.4　僵蚕活性物质的最低抑菌浓度(MIC)

肉汤倍比稀释法研究表明，以体积分数 95%乙醇作为提取溶剂时，不同方法提取所得僵蚕活性物质的抑菌活性大小顺序为：超声波法＞微波法＞煎煮法＞冷浸法，对 *E. coli* 的最低抑菌浓度(MIC)依次为 0.625，1.25，2.5 和 5 mg/mL。

采用超声波提取法，不同提取溶剂所得僵蚕活性物质的抑菌活性大小顺序为：体积分数 95%乙醇＞甲醇＝水＞乙酸乙脂＞石油醚＞丙酮＝二氯甲烷，其对 *E. coli* 的最低抑菌浓度(MIC)依次为 0.625，1.25，1.25，2.5，5，5 和 5 mg/mL。

3　讨　论

近年来，对僵蚕的研究多集中在其抗惊厥、抑瘤、降血糖和降血脂等中药药效方面，而对其抑菌作用的研究较少，尚没有试验证实僵蚕经体积分数 95%乙醇、乙酸乙酯、石油醚、丙酮、二氯甲烷提取剂逐级提取的活性成分是否具有或具有何种程度的抑菌作用。本研究对不同提取方法获得的僵蚕活性物质，以及用不同提取溶剂以超声波法提取的僵蚕活性物质的抑菌活性进行了试验观察和比较，结果表明，采用超声波提取时，体积分数 95%乙醇提取物具有明显的抑菌作用。试验中曾以体积分数 95%乙醇作为阴性对照，观察其对大肠杆菌的作用，发现乙醇溶剂本身的抑菌作用很小，试验中未观察到抑菌圈的产生。目前，有关僵蚕抑菌作用的机制还不清楚，僵蚕不同溶剂提取物中哪种有效成分具有抑菌作用，抑或是哪几种成分协同抑菌，均还有待于进一步深入研究。

另外，僵蚕的生长地域、样品预处理方式等多因素，均会影响其抑菌活性物质的含量和活性大小，乙醇也并不一定是僵蚕所有目标活性成分的理想提取溶剂。因此还需要进一步研究僵蚕产地及提取方法等因素对其有效活性物质提取的影响，并应对抑菌效果较好的僵蚕提取物的有效成分进行分离鉴定，从而对其抗菌作用机理进行更深入系统的研究。

4　结　论

本研究发现，以体积分数 95%乙醇作为提取溶剂，用超声波法提取僵蚕时的浸膏得率最高，但在提取工艺优化方面还需要进一步深入研究，以摸索最佳的提取技术。不同提取方法及不同提取溶剂得到的僵蚕提取物对 *E. coli* 均表现出一定的抑菌作用，其中以体积分数 95%乙醇为提取溶剂，用超声波提取法所得提取物的抑菌活性最高，其对 *E. coli* 的最低抑菌浓度为 0.625 mg/mL。综合分析认为，作为治疗呼吸道感染的常规中药，僵蚕的抗炎作用与其抑菌活性有关。

[参考文献]

[1] 中国医学科学院,中国协和医科大学药用植物研究所,北京医科大学药学院,等.中药志(Ⅵ)[M].北京:人民卫生出版社,1998:284-287.
Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Peking Medical University, et al. Chinese Pharmacology(Ⅵ)[M]. Beijing: People's Medical publishing House, 1998:284-287. (in Chinese)

[2] 中国药科大学,中国医药科技出版社,中科院植物研究所.中药辞海Ⅰ[M].北京:中国医药科技出版社,1993:1758.
China Pharmaceutical University, Chinese Medical Science and Technology Press, Institute of Botany the Chinese Academy of Sciences. Traditional medicine encyclopedia: vol. Ⅰ[M]. Beijing: Medical Science and Technology Press, 1993: 1758. (in Chinese)

[3] 王居祥,朱超林,戴 虹.僵蚕及僵蛹的药理研究与临床应用[J].时珍国医国药,1999,10(8):637-639.
Wang J X, Zhu C L, Dai H. The pharmacological research and clinical application of Jiangchan and Jiangyong [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 1999, 10(8): 637-639. (in Chinese)

[4] 时连根.桑蚕病原微生物资源开发利用[J].桑蚕通报,1991,22(3):37-42.
Shi L G. Silkworm pathogenic microorganisms resources and utilization [J]. Bulletin of Sericulture, 1991, 22(3): 37-42. (in Chinese)

[5] 彭延古,李路丹,邓奕辉.僵蚕抗实验性静脉血栓及作用机理的研究[J].血栓与止血,2001,7(3):104-105.
Peng Y G, Li L D, Deng Y H. Effects of *Batryticated* silkworm on experimental venous thrombosis and its mechanism [J]. Chinese Journal of Thrombosis and Hemostasis, 2001, 7(3): 104-105. (in Chinese)

[6] 郭孝武.一种提取中草药化学成分的方法:超声提取法[J].天然产物研究与开发,1999,11(3):37-40.
Guo X W. A method to extract chemical components from Chinese herbal: Ultrasonic method [J]. Natural Product Research and Development, 1999, 11(3): 37-40. (in Chinese)

[7] 唐爱莲,刘笑甫,冯冬梅.用煎煮法和冷浸法对黄藤中巴马丁成分提取的比较研究[J].华夏医学,2003,1(3):170.
Tang A L, Liu X F, Feng D M. With the boiling method and the cold soak method palmatine yellow vine comparative study of extraction [J]. Acta Medicinae Sinica, 2003, 1(3): 170. (in Chinese)

[8] 侯团章.中草药提取物[M].北京:中国医药科技出版社,2004.
Hou T Z. Herbal extract [M]. Beijing: Medical Science and Technology Press, 2004. (in Chinese)

[9] 沈 岚,冯年平,韩朝阳,等.微波萃取对不同形态结构中药及含不同极性成分中药的选择性研究[J].中草药,2002,33(7):604-607.
Shen L, Feng N P, Han C Y, et al. Selectivity of microwave extraction on Chinese medicines in different morphological structure and different polar compositions [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(7): 604-607. (in Chinese)

[10] 王俊儒.天然产物提取分离与鉴定技术[M].陕西杨凌:西北农林科技大学出版社,2004.
Wang J R. Isolation and structure identification of natural products [M]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University Press, 2004. (in Chinese)

[11] 周德庆.微生物学实验教程[M].北京:高等教育出版社,2006.
Zhou D Q. Laboratory experiments in microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006. (in Chinese)

[12] 胡丰林,樊美珍,李增智.一种白僵菌代谢产物中生物活性物质的研究:Ⅰ.具有清除自由基的活性物质的分离和制备[J].菌物系统,2000,19(4):522-528.
Hu F L, Fan M Z, Li Z Z. Studies on bioactive compounds from beauveria SP: Ⅰ. Isolation of free radical scanvenging active compounds [J]. Mycosystema, 2000, 19(4): 522-528. (in Chinese)

[13] 张淑芳,野丽丽,白淑晶,等.噻唑蓝比色法测定药物最低抑菌浓度的初步研究[J].中国热带医学,2001,1(4):35.
Zhang S F, Ye L L, Bai S J, et al. Preliminary study on the detection of minimum bacterium-inhibition concentration of the drugs with Tetrozolium-based semiautomated colorimetric assay [J]. China Tropical Medicine, 2001, 1(4): 35. (in Chinese)

[14] 康文艺,王二辉.三种中草药挥发油抗菌活性研究[J].河南大学学报:医学版,2007,26(3):8-12.
Kang W Y, Wang E H. Antimicrobial activity of the essential oil of three Chinese Medical Herbs [J]. Journal of Henan University: Medical Science, 2007, 26(3): 8-12. (in Chinese)

[15] 毛宏德.白僵蛹中白僵菌素的分离和鉴定[J].中草药,1985,7(1):5-6.
Mao H D. Isolation and identification of beauvericin from muscardine pupae [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1985, 7(1): 5-6. (in Chinese)

[16] 李健强,李六金.兽医微生物学实验实习指导[M].西安:陕西科学技术出版社,1998.
Li J Q, Li L J. Pre-veterinary microbiology laboratory [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1998. (in Chinese)

[17] 王桂亭,王 皞,宋艳艳,等.无花果叶提取物抑菌作用的实验研究[J].中国消毒学杂志,2005,22(4):374-376.
Wang G T, Wang G, Song Y Y, et al. A study on the bacteriostatic activity of extracts of the fig leaf [J]. China Disinfection Journal, 2005, 22(4): 374-376. (in Chinese)

[18] 吴国娟,张中文,李焕荣,等.中草药对奶牛乳房炎6种致病菌的抑菌效果观察[J].北京农学院学报,2003,18(3):195-198.
Wu G J, Zhang Z W, Li H R, et al. Antibacterial Effects of Chinese herbal medicines on six pathogenic bacteria from dairy cows mastitis [J]. Journal of Beijing Agricultural College, 2003, 18(3): 195-198. (in Chinese)