

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1728.032

网络出版时间:2012-02-23 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1728.032.html>

纳他霉素纳米乳的制备及其体外抑菌效果研究

芮 弦, 欧阳五庆, 吴敬超, 宋 冰, 刘梅雪, 董 睿

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】制备纳他霉素纳米乳(NATA-NE),测定其对白色念珠菌(*Candida albicans*)、青霉菌(*Penicillium*)和酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MFC),以指导临床合理用药。**【方法】**综合纳米乳和纳他霉素的优势,将纳他霉素制成水包油型 NATA-NE,以酮康唑和特比萘芬作为阳性药物对照,根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)制定的真菌体外药敏试验方法 M-27A 和 M-38P,测定药物对 3 种受试菌株的 MIC,并研究了 NATA-NE 的杀菌效果。**【结果】**NATA-NE 对青霉菌、白色念珠菌和酿酒酵母菌的 MIC 值为 1,0.5,0.5 $\mu\text{g/mL}$;NATA 原料药、酮康唑和特比萘芬对上述 3 种菌的 MIC 值分别为 2,1,1 $\mu\text{g/mL}$;4,8,8 $\mu\text{g/mL}$ 和 1,8,16 $\mu\text{g/mL}$,NATA-NE 的 MIC 值均小于或等于其他 3 种药物。3 种菌在 2 $\mu\text{g/mL}$ NATA-NE 的作用下 1.5 h 后,均未见生长;NATA 原料药则需要 4 $\mu\text{g/mL}$ 、2 h 才能达到同样效果,而酮康唑和特比萘芬分别需要 16 $\mu\text{g/mL}$ 、4 h 和 32 $\mu\text{g/mL}$ 、4 h 才能达到同样效果。**【结论】**临床使用 NATA-NE 治疗动物真菌病时,可适当降低给药剂量和用药次数,以降低成本和对动物不可预期的副作用。

【关键词】 纳他霉素纳米乳;最小抑菌浓度;最小杀菌浓度;白色念珠菌;青霉菌;酿酒酵母菌

【中图分类号】 S859.79⁺6;R961

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)03-0023-06

Preparation of natamycin nanoemulsion and its antifungal effect *in vitro*

RUI Xian, OUYANG Wu-qing, WU Jing-chao, SONG Bing, LIU Mei-xue, DONG Rui

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 Natamycin nanoemulsion was prepared, and clinical therapy was investigated by natamycin nanoemulsion(NATA-NE) on *Candida albicans*, *Penicillium* and *Saccharomyces cerevisiae* the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) determination. **【Method】** Taking advantages of nanoemulsion and natamycin, which was made of the oil-in-water nanoemulsion natamycin, with ketoconazole and terbinafine as a positive drug control, three kinds of strains were measured by Fungi *in vitro* susceptibility with testing method M-27A, M-38P. According to the clinical laboratory standards (NCCLS) established by national committee, NATA-NE fungicide performance was investigated. **【Result】** The MIC values of NATA-NE for *Penicillium*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* were 1, 0.5, 0.5 $\mu\text{g/mL}$; natamycin API, ketoconazole and terbinafine, respectively, for the MIC value of the three fungi were 2, 1, 1 $\mu\text{g/mL}$, 4, 8, 8 $\mu\text{g/mL}$ and 1, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$. NATA-NE of the MIC values were less than or equal to the other three drugs. Three kinds of fungi in 2 $\mu\text{g/mL}$ NATA-NE for more than 1.5 h showed no growth. Natamycin solution needed 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 h in order to achieve the same effect. The ketoconazole and terbinafine, respectively, needed 16 $\mu\text{g/mL}$, 4 h and 32 $\mu\text{g/mL}$, 4 h. **【Conclusion】** In clinical treatment of an-

* [收稿日期] 2011-09-05

[基金项目] 陕西省重大科技创新专项(K332020916)

[作者简介] 芮 弦(1986—),男,江苏溧阳人,在读硕士,主要从事纳米乳新剂型研究。E-mail: ruix10@126.com

[通信作者] 欧阳五庆(1960—),男,陕西凤翔人,教授,博士生导师,主要从事纳米药物的开发与应用研究。

E-mail: oywq506@sina.com

imal mycosis with NATA-NE, it is appropriate to reduce the dosage so as to reduce costs and unanticipated side effects on animals.

Key words: natamycin nanoemulsion; minimum inhibitory concentration; minimum fungicidal concentration; *Candida albicans*; *Penicillium*; *Saccharomyces cerevisiae*

动物真菌病是由有毒真菌引起的传染性疾病,其在世界各地及各种动物上均有发生,所致发病率和死亡率都较高。目前,在我国各地畜禽饲料中的真菌污染及真菌在动物机体中的寄生现象相当普遍,同时,抗生素、皮质激素和免疫抑制剂等药物的滥用,放射医学的迅速发展,都为致病真菌在动物体内的生长繁殖提供了机会,导致近年来我国动物真菌病的发病率急剧升高,已引起了人们的高度重视^[1]。

纳他霉素(Natamycin, NATA)是纳塔尔链霉菌(*Streptomyces natalensis*)发酵后产生的一种多烯大环内酯类物质,其能有效地抑制和杀死霉菌、酵母菌,是一种广谱抗霉菌、酵母菌、某些原生动物和藻类的抗生素^[2]。研究表明,纳他霉素能有效抑制和杀死霉菌、酵母菌和丝状真菌,与化学合成抑菌剂相比,其不易被动物体吸收,无任何潜在过敏性,其抑菌效果比常用的山梨酸高 50~300 倍^[3]。多数霉菌能被 1.0~6.0 mg/L 的纳他霉素抑制,个别霉菌在 10~25 mg/L 纳他霉素作用下可被抑制,多数酵母菌在纳他霉素质量浓度为 1.0~5.0 mg/L 时被抑制^[4]。

目前,由于纳他霉素的溶解性不佳、高温和紫外线下不稳定等缺点,其主要用于食品防腐,而未广泛用于临床治疗。为了增加纳他霉素的溶解度、提高药物稳定性,本研究综合纳米乳和纳他霉素的优势,将纳他霉素制成水包油型纳他霉素纳米乳(以下简称 NATA-NE),并根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)制定的真菌体外药敏试验方法 M-27A 和 M-38P,对 NATA-NE 的抑菌效果进行测试,以期拓宽这种具有良好灭菌特性的天然生物防腐剂的应用领域,使其能够用于人或动物真菌病的防治。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品与试剂 纳他霉素(NATA)原料药,批号:110406-0,北京东方瑞德生物技术有限公司,纯度 97%;酮康唑,湖北恒硕化工有限公司,纯度 99%;特比萘芬,大连美仑生物技术有限公司,纯度

98%;Tween80,天津恒兴化学试剂制造有限公司;油酸乙酯,上海飞祥化工厂;冰醋酸,广东光华化学厂有限公司;蛋白胨,北京拜尔迪生物技术公司;葡萄糖,天津市北方天医化学试剂厂;琼脂,北京索莱宝科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO),天津市天力化学试剂有限公司;三氮吗啡啉丙磺酸(MOPS),西安沃尔森生物技术有限公司;RPMI-1640 培养基,美国 Invitrogen 生命技术公司。

1.1.2 菌株 白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231(质控菌)和 AS 2.2086(分离自临床致病菌株),购自北京北纳创联生物技术研究院;酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*),由西北农林科技大学葡萄酒学院陕西省葡萄与葡萄酒工程研究中心惠赠;青霉菌(*Penicillium*),由西北农林科技大学食品科学与工程学院微生物实验室惠赠。

1.2 NATA-NE 的制备

根据预试验结果,以冰醋酸为助溶剂,Tween80 为表面活性剂,油酸乙酯为油相,并参考文献[5-6],确定 NATA-NE 的制备配方为:冰醋酸 15.00%, Tween80 32.11%,油酸乙酯 5.67%,NATA 原料药 1.50%,蒸馏水 45.72%(各组分含量均为质量分数)。室温(25℃)下,按配方量将 NATA 原料药完全溶于冰醋酸,加入 Tween80 和油酸乙酯后混匀,最后边搅拌边逐滴加入蒸馏水,制备成 NATA-NE。通过离心法和染色法^[7]鉴别纳米乳的类型,利用透射电镜观察其形态,用 Zetasizer Nano ZS 分析仪测定其粒径大小、多分散系数(PDI)、强度分布和 Zeta 电位。

1.3 药敏试验

1.3.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)的制备 取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加水 1 000 mL 煮沸 20 min,滤去马铃薯块,将滤液补足至 1 000 mL,加葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,溶化后分装,于 0.103 MPa、121℃下高压蒸汽灭菌 15 min,备用。

1.3.2 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)的制备 将蛋白胨 10 g 和葡萄糖 40 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,调整 pH 值为 5.5~6.5,加入琼脂 20 g,于 0.075 MPa、115℃下灭菌 15 min,备用。

1.3.3 RPMI-1640 液体培养基的制备 于 25℃

条件下,根据 NCCLS 方案^[8]配制:将 RPMI-1640 粉末 10.4 g 和碳酸氢钠粉末 2.0 g 溶于 900 mL 蒸馏水中,再加入 MOPS 粉末 34.53 g,振荡直至完全溶解;同时用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调整 pH 至 7.0,定容至 1 L 后,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。RPMI-1640 液体培养基在室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 时配制^[9]。

1.3.4 菌悬液的制备 将青霉菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上于 35 $^{\circ}\text{C}$ 活化 7 d 后,加入含有质量分数 0.5% Tween20 的生理盐水溶液 2 mL,制备青霉菌菌悬液,静置后,取上层均质液体至无菌试管,在振荡器上振荡 15 s,调整其浓度为 $(0.4\sim5)\times 10^7$ CFU/mL。

将白色念珠菌和酿酒酵母菌在沙氏葡萄糖琼脂培养基上传代 2 次,以保证其纯度及生长力。将活化的菌株划线接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上,35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,挑取 5 个直径 ≥ 1 mm 的菌落,用生理盐水制成 5 mL 菌悬液。将菌悬液在振荡器上振荡 15 s,使之充分混匀,调整其浓度至 $(1\sim5)\times 10^6$ CFU/mL。

1.3.5 抗真菌药物储备液的制备 将 NATA 原料药、酮康唑、特比萘芬溶解于 DMSO 中,配成质量浓度为 12 800 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,期间剧烈振动,直至完全溶解;再用 RPMI-1640 液体培养基将其稀释 10 倍,即药物储备液的质量浓度为 1 280 $\mu\text{g/mL}$ (NCCLS 方案规定,用 DMSO 配制的抗真菌药物储备液经 RPMI-1640 液体培养基稀释成终质量浓度后,DMSO 的终体积分数应不超过 1%);将 NATA-NE 直接稀释到 1 280 $\mu\text{g/mL}$ 。配制过程中保证无菌,储备液分装于 2 mL 无菌离心管后,封闭储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下环境。使用时,将 NATA 原料药、酮康唑、特比萘芬和 NATA-NE 的药物储备液均按 4, 25, 35 $^{\circ}\text{C}$ 依次各溶化 1 h 后,用 RPMI-1640 液体培养基首先在 96 孔微量培养板的第 2 孔稀释 10 倍(第 2 孔加 20 μL 药物储备液和 180 μL RPMI-1640 液体培养基,3~12 孔每孔加 100 μL RPMI-1640 液体培养基),然后再对 2~11 孔进行 10 级倍比稀释,使药物终质量浓度为 128~0.25 $\mu\text{g/mL}$,并且每孔的药量均为 100 μL 。

1.3.6 接种和培养(此试验过程先后重复 3 次) 试验所用 96 孔微量培养板的规格为 8 行 $\times$ 12 列。将 8 行分为上下 2 区,每区 4 行,分别对应 4 种药物;将第 1 列和第 12 列分别设为阴性对照和阳性对照,第 2~11 列的孔为试验孔。每块 96 孔微量培养

板可用于检测 4 种药物对 2 株受试菌的敏感性。将配好的 3 份菌悬液用 RPMI-1640 液体培养基稀释 1 000 倍,使白色念珠菌和酿酒酵母菌菌悬液的浓度为 $(1\sim5)\times 10^3$ CFU/mL,青霉菌菌悬液的浓度为 $(0.4\sim5)\times 10^4$ CFU/mL。用微量移液器将每份菌悬液(100 μL)加入对应区的各试验孔中,将孔内液体充分混匀,此时各孔含液 200 μL ,白色念珠菌和酿酒酵母菌菌悬液终浓度为 $(0.5\sim2.5)\times 10^3$ CFU/mL,青霉菌的终浓度为 $(0.2\sim2.5)\times 10^4$ CFU/mL,药物质量浓度均为 64~0.125 $\mu\text{g/mL}$ 。阴性对照孔为 200 μL RPMI-1640 液体培养基,阳性对照孔为 100 μL 菌悬液和 100 μL RPMI-1640 液体培养基。将接种好的微量培养板置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 有氧环境中培养 46~50 h。

1.4 结果判定

本试验所用质控菌为白色念珠菌 ATCC 10231,其 NATA 的最小抑菌浓度(MIC)参考值为 1.50~2.00 $\mu\text{g/mL}$,只有当其 MIC 值位于该范围,同时阳性对照生长良好,才可接受试验结果,否则该批数据作废,找出原因后重复试验。当阴性对照孔无菌生长(培养基透亮、清晰),阳性对照孔菌生长良好(培养基明显浑浊),质控菌株符合质控标准,即可进行结果判定。肉眼观察各试验孔菌的生长量,将试验孔各孔的生长情况与阳性对照孔进行对比,按以下标准评分:0 为完全透明;1 为雾状浑浊(80%抑制);2 为浑浊度明显降低(50%抑制);3 为浑浊度轻度降低;4 为浑浊度未降低。由于酮康唑组、特比萘芬组的终点不十分明确,多见拖尾现象,因此按照国内外实验室常规判断点^[10],以评分 2 作为其 MIC。NATA 组和 NATA-NE 组终点则很容易判定,少见拖尾现象,因此以评分 0 作为 MIC。试验结果分别由 2 人判读,取平均值。

1.5 NATA-NE 的杀菌效果观察

根据菌株的 MIC 值,在 12 块细胞培养板上平行注入抑菌结果呈阴性的前 2 个药物浓度,按 1.3.6 菌悬液浓度接种试验菌株,并分别于药物作用 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8 h 后,将其各浓度的培养物接种于固体培养基上,分别观察不同时间段菌株的生长情况。

2 结果与分析

2.1 NATA-NE 的理化性质

制备的 NATA-NE 为黄色液体,澄清,透明均一,流动性好,可用蒸馏水无限稀释。透射电镜下观察发现,乳滴呈规则的球形,分布均匀(图 1);在 25

℃、pH 3.5 的条件下,NATA-NE 的平均粒径为 10.5 nm;多分散系数(PDI)为 0.154;粒径分布较

窄,约 97%的粒子粒径小于 16 nm(图 2);Zeta 电位为+13.0 mV,表明纳米乳较稳定,不容易团聚。

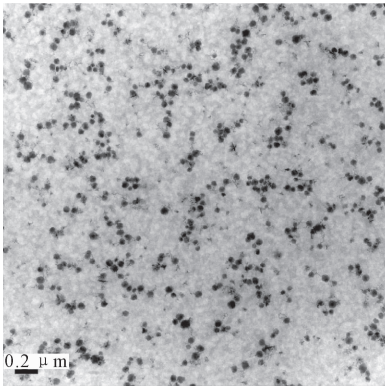


图 1 透射电镜下 NATA-NE 的形态

Fig.1 Transmission electron micrograph of NATA-NE

2.2 NATA-NE 的最小抑菌浓度

试验中质控菌株结果稳定,符合 M-27A 方案标准。NATA-NE、NATA 原料药、酮康唑、特比萘芬对 3 株真菌菌株的 MIC 见表 1。表 1 结果显示,NATA-NE 对青霉菌、白色念珠菌、酿酒酵母菌的 MIC 分别为 1,0.5,0.5 μg/mL;NATA 原料药对这 3 种菌的 MIC 分别为 2,1,1 μg/mL,这与文献[11]

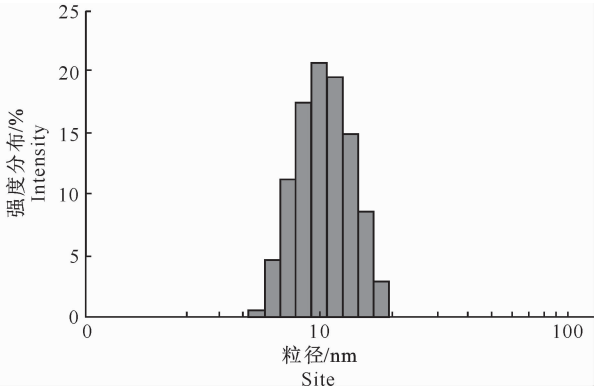


图 2 NATA-NE 的粒径分布

Fig.2 Droplet size distribution of NATA-NE

报道结果基本相近;可见 NATA-NE 对 3 种菌的抑菌效果都有所增强,说明药物经纳米化后药效有一定程度的增强。酮康唑和特比萘芬对这 3 种菌的 MIC 分别为 4,8,8 μg/mL 和 1,8,16 μg/mL,总体大于 NATA-NE,由此说明,NATA-NE 作为一种抑制真菌的抗生素新剂型,具有较大的优势。

表 1 NATA-NE、NATA 原料药、酮康唑和特比萘芬对青霉菌、白色念珠菌(AS 2.2086)和酿酒酵母菌的最小抑菌浓度(MIC)

Table 1 MIC of natamycin nanoemulsion,natamycin API,ketoconazole and terbinafine for *Penicillium*,*C. albicans*(AS2.2086),*S. cerevisiae*

药物质量浓度/ (μg·mL ⁻¹) Concentration	NETA-NE			NATA 原料药 Natamycin API			酮康唑 Ketoconazole			特比萘芬 Terbinafine		
	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S
64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
8	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+
4	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+
2	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+
1	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阴性对照 Negative control	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
阳性对照 Positive control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“—”表示真菌生长受到抑制,“+”表示真菌生长未受到抑制;“P”代表青霉菌,“C”代表白色念珠菌,“S”代表酿酒酵母菌。
Note:“—” stands for fungal growth was inhibited,“+” stands for fungal growth was not inhibited;“P” stands for *Penicillium*,“C” stands for *C. albicans*,“S” stands for *S. cerevisiae*.

2.3 NATA-NE 的杀菌效果

杀菌试验结果表明,青霉菌、白色念珠菌、酿酒酵母菌在 4 μg/mL NATA 原料药的作用下 2 h 后,均未见生长;在 2 μg/mL NATA-NE 的作用下 1.5 h 后,3 种菌均未见生长;在 16 μg/mL 酮康唑的作

用下 4 h 后,3 种菌均未见生长;在 32 μg/mL 特比萘芬的作用下 4 h 后,3 种菌均未见生长。

3 讨 论

NATA 是一种高效、广谱的真菌抑制剂,抗菌

机理在于它能与细胞膜上的甾醇化合物发生反应,由此引发细胞膜结构改变而破裂,导致细胞内容物渗漏,使细胞死亡。但细菌的细胞壁及细胞质膜上不存在这些类似固醇的化合物,所以 NATA 对细菌没有作用,而对几乎所有的霉菌和酵母菌均有抗性^[12]。毒性试验和致敏试验结果表明,NATA 安全无过敏反应^[13];真菌对 NATA 不产生抗性,使用大于 MIC 的 NATA 经人为诱导后,未发现真菌形成抗性^[14]。

纳米乳制剂可提高难溶性药物的溶解度,增强不稳定药物的稳定性,其黏度低、粒径小且均匀、缓释,可以促进药物在体内的吸收与分布,从而提高其生物利用度。进入 20 世纪 90 年代后,纳米乳作为一种新型载药系统,越来越受到人们的关注^[15-16]。研究发现,NATA 口服毒性最小,静脉注射毒性极大^[14]。综合上述特点,同时结合 NATA 与纳米乳的优点,将这种目前作为食品添加剂广泛使用的抗生素开发成一种口服或者透皮制剂,可用于防治人或动物真菌病,有望成为 NATA 新剂型。

纳米乳制备过程中最重要的是配方组分及其比例的确定^[17]。其中水、表面活性剂和油相是纳米乳形成所必须的配方组分,它们主要影响纳米乳体系的形成、稳定性和载药量。本试验选定配方所形成的纳米乳澄清透亮,可用蒸馏水无限稀释且保持透明态,这可能是由于在此质量比范围内,Tween80 能很好地与油酸乙酯作用,从而形成粒径较小、界面膜稳定的纳米乳体系。综合考虑纳米乳的易形成性、稳定性、载药量及尽可能降低表面活性剂含量等因素,本试验确定 Tween80 与油酸乙酯的质量比为 8.5 : 1.5。

本试验测定了 NATA-NE 对 3 种典型真菌的体外抑菌和杀菌效果,结果表明,NATA-NE 对 3 种真菌的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MFC)和杀菌时间,均优于或等于其对照药物酮康唑和特比萘芬;NATA-NE 的药效较其原料药也有所提高,只需使用微量即可抑制真菌的生长,并且杀菌时间短。其可能原因是,NATA-NE 粒径小,具有独特的小尺寸效应和一定的表面效应,易透过真菌的细胞膜,并与细胞膜上的甾醇化合物反应,从而增强抗菌效应;在 NATA-NE 中,NATA 处于内相,纳米乳基质对其有较好的保护作用,可提高被封包药物的稳定性;NATA-NE 在菌体内发挥了缓释药物的功能,延长了药物的半衰期,从而大大延长了药物的作用时间^[18]。

NATA-NE 对 3 种真菌的体外抗菌活性较强,因此在临床使用时,应将 MIC、MFC 和杀菌时间均考虑在内,制定合理的给药方案。对于动物消化道和皮肤表面的普通真菌病,可适当降低给药剂量和用药次数,以降低成本和对动物不可预期的副作用,从而提高生产效益。

[参考文献]

- [1] 李国勤,赵宝玉.我国动物真菌病研究进展[J].动物医学进展,1997(3):13-16.
Li G Q,Zhao B Y. Study of fungal disease in our country [J]. Progress in Veterinary Medicine,1997(3):13-16. (in Chinese)
- [2] 贺家亮,张敏,赵胜娟.纳他霉素的研究现状[J].中国食品添加剂,2005(3):30-32.
He J L,Zhang M,Zhao S J. Present research status of natamycin [J]. China Food Additives,2005(3):30-32. (in Chinese)
- [3] 黎婉园,夏枫耿,黄宜辉.纳他霉素的抑菌性实验[J].中国食品添加剂,2005(6):72-74.
Li W Y,Xia F G,Huang Y H. Studied on antibacterial properties of natamycin [J]. China Food Additives,2005(6):72-74. (in Chinese)
- [4] 阎永贞,周绪霞,李卫芬,等.纳他霉素抑菌机理及其在食品中的应用[J].食品工业科技,2010(4):365-367.
Yan Y Z,Zhou X X,Li W F, et al. Antimicrobial mechanism and the application of natamycin in food [J]. Science and Technology of Food Industry,2010(4):365-367. (in Chinese)
- [5] Shafiq S,Shakeel F,Talegaonkar S, et al. Development and bio-availability assessment of ramipril nanoemulsion formulation [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007,66(2):227-243.
- [6] 潘国梁,贾晓斌,魏惠华,等.药用微乳伪三元相图的几种制备方法比较研究[J].中国药房,2006(1):21-23.
Pan G L,Jia X B,Wei H H, et al. Comparison among several preparation methods for pseudo-ternary phase diagrams of pharmaceutical microemulsions [J]. China Pharmacy,2006(1): 21-23. (in Chinese)
- [7] 张旭,欧阳五庆,陈建民,等.复方蜂胶纳米乳的制备及其品质评价[J].西北农业学报,2010(5):24-27.
Zhang X,Ouyang W Q,Chen J M, et al. Preparation and quality evaluation of compound propolis nanoemulsion [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010(5):24-27. (in Chinese)
- [8] 龚晓霖,储怡星,范基农,等.真菌感染及药敏试验方法[J].检验医学,2005,20(1):81-83.
Gong X L,Zhu Y X,Fan J N, et al. Fungal infections and susceptibility test methods [J]. Laboratory Medicine, 2005, 20(1):81-83. (in Chinese)
- [9] 刘晓慧,张金廷,王军.3种抗真菌药物对口腔白念珠菌最小抑菌浓度的体外对比研究[J].河北医药,2010,32(21):3041-3043.
Liu X H,Zhang J T,Wang J. Three kinds of antifungal oral

- Candida albicans in vitro* minimum inhibitory concentration comparative study [J]. Hebei Medical Journal, 2010, 32(21): 3041-3043. (in Chinese)
- [10] 吴绍熙. 现代医学真菌检验手册 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2005: 331-334.
Wu S X. Modern laboratory medicine manual of fungus [M]. Beijing: The United Publishing Company of Peking Union Medical College, 2005: 331-334. (in Chinese)
- [11] 李 东, 杜连祥, 路福平, 等. 纳他霉素的抑菌谱及最小抑菌浓度 [J]. 食品工业科技, 2004(7): 143-144.
Li D, Du L X, Lu F P, et al. Natamycin antibacterial spectrum and the minimum inhibitory concentration [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004(7): 143-144. (in Chinese)
- [12] 胡海洋, 乔春明, 葛菁萍, 等. 纳他霉素的特性和生产研究状况 [J]. 中国现代药物应用, 2009(2): 200-201.
Hu H Y, Qiao C M, Ge J P, et al. The characteristic and production research condition of a new polyene macrolide antirnycotics-natamycin [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2009(2): 200-201. (in Chinese)
- [13] 陈冠群, 季 波. 纳他霉素的特性及应用 [J]. 中国乳品工业, 2002(4): 26-28.
Chen G Q, Ji B. Characterization and application of natamycin [J]. China Dairy Industry, 2002(4): 26-28. (in Chinese)
- [14] 岳昊博, 岳喜庆, 李 靖, 等. 纳他霉素(Natamycin)的特性、应用及生产和研究状况 [J]. 食品科技, 2007(3): 162-166.
Yue H B, Yue X Q, Li J, et al. The properities and application of natamycin and its production and advanced research [J]. Food Science and Technology, 2007(3): 162-166. (in Chinese)
- [15] Lawrence M J, Rees G D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, 45(1): 89-121.
- [16] Tenjarla S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications [J]. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1999, 16(5): 461.
- [17] 于 力, 张钧寿, 周建平. 纳米乳的研究及其在制剂学领域的应用 [J]. 药学进展, 2006, 30(11): 491-497.
Yu L, Zhang J S, Zhou J P. Research of nano-emulsions and their application in pharmaceutics [J]. Progress in Pharmaceutical Science, 2006, 30(11): 491-497. (in Chinese)
- [18] Merodio M, Arnedo A, Renedo M J, et al. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: Characterization and *in vitro* release [J]. Eur J Pharm Sci, 2001(12): 251-259.

(上接第 22 页)

- [12] Boga J A, Casais R, Marin M S, et al. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus(Spanish isolate AST/89) [J]. J Gen Virol, 1994, 75: 2409-2413.
- [13] 王永山, 陆承平, 周宗安, 等. 原核表达的兔出血症病毒衣壳蛋白对兔的免疫保护效果 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1677-1681.
Wang Y S, Lu C P, Zhou Z A, et al. Protection of rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the recombinant capsid protein expressed in *E. coli* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(11): 1677-1681. (in Chinese)
- [14] 李传山. 兔病毒性出血症病毒 YL 株 VP60 基因的克隆与生物信息分析及原核表达与转化串叶松香草研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
Li C S. Cloning and sequence analyzing for VP60 gene of rabbit hemorrhagic disease virus YL strain and its expression in *E. coli* and transformation to perfoliate rosinweed [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)
- [15] Chasey D, Lucas M, Westcott D, et al. European brown bare syndrome in the U K: A calicivirus related to but distinct from that of viral haemorrhagic disease in rabbits [J]. Arch Virol, 1992, 124: 363-370.