

以甘肃省食用油为油相的呋塞米微乳制备·优化和体外释放

刘惠娟¹, 张敏¹, 豆金彦² (1. 甘肃医学院药学院, 甘肃平凉 744000; 2. 甘肃省中医院药学部, 甘肃兰州 730050)

摘要 [目的]以甘肃生产的食用植物油作为油相制备呋塞米微乳,进行处方优化,了解体外释放行为。[方法]选取对呋塞米溶解度最大的食用油、表面活性剂和助表面活性剂,利用单因素试验进行空白微乳处方筛选,以电导率、浊度、载药量作为响应值,利用 Box-Behnken Design 响应面法建立多元回归模型,绘制响应面图,考察油相用量、混合表面活性剂(S_{mix})与水质量比、乳化时间的影响,利用透析法测定微乳和片剂的体外累积释放度,确定释放特性。[结果]微乳处方确定为杏仁油 240 μL ,表面活性剂为 OP-10,助表面活性剂为 PEG400,二者质量比为 1:1, S_{mix} 与水的质量比为 2.78,乳化时间为 2 min。 S_{mix} 与水的质量比是影响微乳质量的显著因素,优化处方实际值与预测值相对误差较小,得到的微乳澄清透明,为水包油型,粒径小、稳定性好、载药量较高,体外释放缓慢且完全,能够持续释放 72 h。[结论]成功将食用油作为油相制备了呋塞米微乳,方法简单,获得的微乳均一透明、载药量高,具有明显的缓释性能。

关键词 呋塞米;食用油;微乳;Box-Behnken Design;制备;优化;体外释放

中图分类号 R 943

文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)08-0147-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.08.041

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Preparation, Optimization and Release *in vitro* of Furosemide Microemulsion with Edible Oil from Gansu Province as Oil Phase

LIU Hui-juan¹, ZHANG Min¹, DOU Jin-yan² (1. Department of Pharmacy, Gansu Medical College, Pingliang, Gansu 744000; 2. Department of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730050)

Abstract [Objective] To prepare furosemide microemulsion with edible vegetable oil produced in Gansu Province as oil phase, optimize the prescription and to know the release behavior *in vitro*. [Method] Edible oil, surfactant, co-surfactant which dissolved the most furosemide were selected. Single factor test was used to screen blank microemulsion formulations. Taking conductivity, turbidity, and drug loading as the response values, the Box-Behnken Design response surface method was used to establish a multiple regression model, and the response surface map was drawn to investigate the effect of dosage of oil phase, the mass ratio of mixed surfactant (S_{mix}) and water, and the emulsifying time. The cumulative release of microemulsion and tablets *in vitro* were determined by dialysis method in order to determine release characteristics. [Result] The microemulsion was composed of almond oil 240 μL , the mass ratio of emulsifier OP-10 (surfactant) to PEG400 (co-surfactant) was 1:1, the mass ratio of mixed surfactant to water was 2.78, and the emulsifying time was 2 min. The mass ratio of mixed surfactant to water was a significant factor affecting the quality of the microemulsion. The relative error between the actual and predicted values of the optimized formula was relatively small. The microemulsion was clear and transparent, oil in water, small particle size, good stability and high drug loading. The release *in vitro* could last 72 h slowly and completely. [Conclusion] Furosemide microemulsion was successfully prepared by using edible oil as oil phase. The preparation method is simple. The microemulsion obtained is uniform, transparent, and the drug loading is high, the performance of slow release is obvious.

Key words Furosemide; Edible oil; Microemulsion; Box-Behnken Design; Preparation; Optimization; Release *in vitro*

呋塞米又名速尿、呋喃苯胺酸,是高效能利尿药,临床广泛用于急慢性心力衰竭和肾疾病引起的水肿,能够降低血压,并治疗慢性肾衰竭和肝硬化;其溶解性和渗透性差,属于生物药剂学分类系统 IV 类药物,生物利用度波动较大(10%~90%),需要个体化给药,针对呋塞米的研究主要涉及环糊精包合、制备微球、微乳等方法^[1]。微乳由油、水、表面活性剂、助表面活性剂组成,是均匀透明的单相热力学稳定体系,能够提高药物经皮肤渗透能力和生物利用度,增强药物稳定性^[2-5]。植物油能够补充人体的必需脂肪酸,含有丰富的维生素和微量元素,笔者选取甘肃产可食用油作为油相开发口服的呋塞米微乳,以增强药物渗透性,降低细胞毒性和刺激性,提高生物利用度,同时拓宽食用油的应用领域,探索其作为药用辅料的潜力。

1 材料与方

1.1 药品与试剂 杏仁油、橄榄油、菜籽油、亚麻籽油、紫苏油,购买于甘肃省平凉市,经冷榨法获得,符合食用油国家标准;辛基酚聚氧乙烯醚-10(乳化剂 OP-10,分析纯,天津市沃

船化学试剂科技有限公司);吐温 20(化学纯,天津市天力化学试剂有限公司);吐温 80(化学纯,天津市天力化学试剂有限公司);PEG400(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);甘油(分析纯,天津市百世化工有限公司);1,2-丙二醇(分析纯,天津市河东区红岩试剂厂);呋塞米原料药(武汉东康源科技有限公司,批号 20161015,纯度>99%);呋塞米片(江苏亚邦爱普森药业有限公司,批号 1301006);冰醋酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);无水乙醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);乙腈(色谱纯,天津市光复精细化工研究所)。

1.2 仪器设备 Agilent 1260 高效液相色谱(美国 Agilent 公司),配置 1260DAD 检测器,Agilent Zorbax 色谱柱;SP-756P 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);CT-3030 电导率仪(深圳市柯迪达电子有限公司);WQ770 浊度计(美国 Global Water 公司);H-1650R 台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.3 呋塞米微乳处方筛选及制备

1.3.1 油、表面活性剂、助表面活性剂溶解度试验。选取甘肃省生产的可食用油杏仁油、菜籽油、橄榄油、亚麻籽油和紫苏油作为备选油相,乳化剂 OP-10、吐温 80、吐温 20 作为表面活性剂,PEG400、1,2-丙二醇和甘油为助表面活性剂。油、表面活性剂和助表面活性剂各取 5 mL,分别加入过量呋

基金项目 甘肃省高等学校创新能力提升项目(2019A-162)。

作者简介 刘惠娟(1984—),女,山西原平人,讲师,硕士,从事药剂学教学及药物制剂研究。

收稿日期 2021-06-24

塞米,超声 5 min,于 37 ℃水浴中振荡,溶解达到平衡后离心 10 min,转速为 10 000 r/min,离心后的上清液用无水乙醇稀释 200 倍,利用紫外分光光度计测定 271 nm 处的吸光度,按照吸收系数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为 580 计算呋塞米溶解度,将溶解度较大的油相、表面活性剂、助表面活性剂纳入微乳处方^[6-7]。

1.3.2 单因素试验筛选空白微乳处方。将表面活性剂和助表面活性剂以质量比(K_m)为 1:1、1:2、2:1 制备混合表面活性剂(S_{mix}),使 S_{mix} 与纯化水的质量比(S_{mix} :水)分别为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8 和 1:9,将制备好的混合物搅拌均匀,滴入 150 μL 油相中,继续搅拌 1 min^[8-9],观察不同表面活性剂、助表面活性剂与 K_m 形成微乳的情况,记录体系浑浊程度、均一性,以及是否有油滴漂浮。

1.3.3 呋塞米微乳的制备。表面活性剂与助表面活性剂均匀混合得到混合表面活性剂,再将混合表面活性剂与纯化水混合均匀,取 10 mL 于 25 mL 烧杯中,加入呋塞米 300 mg,搅拌均匀后滴入一定量油相,继续搅拌一定时间。

1.4 响应面法优选呋塞米微乳处方

1.4.1 考察指标。

1.4.1.1 电导率、浊度。呋塞米纳米乳静置 10 min,使未包裹的呋塞米沉降,倾出上层微乳,用电导率仪和浊度计进行测定。

1.4.1.2 呋塞米含量测定。

(1) 色谱条件。Agilent Zorbax 色谱柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm);流动相为 0.2% 冰醋酸水溶液(A)、乙腈(B);梯度洗脱程序(0~4.5 min, 50%~50% B; 4.5~6.0 min, 50%~90% B; 6~20 min, 90%~90% B),流速 1.0 mL/min;检测波长 271 nm;温度为常温。

(2) 标准曲线的绘制。精密量取呋塞米对照品 100 mg,加入混合溶剂[取冰醋酸 22 mL,加乙腈-水(1:1)至 1 000 mL,混匀]适量^[10],超声溶解后转移到 100 mL 容量瓶,稀释至刻度得呋塞米储备液;精密量取呋塞米储备液(1 mg/mL) 5、20、50、100、200、300 μL ,分别加入混合溶剂至 10 mL 容量瓶,配制浓度分别为 0.5、2.0、5.0、10.0、20.0、30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列呋塞米对照品,混合均匀,量取 20 μL 进入 HPLC 分析。以呋塞米对照品的峰面积(Y)对浓度(C)进行线性回归,得标准方程为 $Y=86\ 744C+28\ 903(R^2=0.999\ 7)$ 。结果表明,呋塞米对照品在 0.5~30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

(3) 含量测定。呋塞米微乳静置 4 h,精密量取 0.25 mL 至 10 mL 容量瓶,混合溶剂稀释至刻度;摇匀后精密量取 0.1 mL,稀释至 10 mL,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样 20 μL ,记录峰面积,计算呋塞米微乳载药量。

1.4.2 试验设计。以油相用量(X_1)、 S_{mix} 与水的质量比(X_2)、乳化时间(X_3)作为考察因素,每个因素取低、中、高 3 个水平,以电导率(Y_1)、浊度(Y_2)、载药量(Y_3)作为响应值,采用 Design Expert 8.0.6 软件,利用 Box-Behnken Design 响应面法设计试验^[11-14],按照“1.3.3”方法制备呋塞米微乳,对电导率、浊度和载药量分别进行多元二次回归,构建三维响应面图,并进行参数最优分析,按照最佳处方平行制备 3 批呋塞

米微乳,分别测定电导率、浊度和载药量,计算实际值与预测值之间的偏差,确定微乳制备工艺。

1.5 呋塞米微乳体外释放 呋塞米微乳和呋塞米混悬液(呋塞米片剂研细过 80 目筛,加入 0.5% 羧甲基纤维素钠,涡旋混匀)各 1 mL,分别置于活化后的透析袋中,放置于盛有 500 mL HCl(0.1 mol/L)的锥形瓶中,37 ℃水浴,350 r/min 搅拌,2 h 后将透析袋转移到同温的 500 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲液中。分别在 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h 吸取释放介质 1 mL^[15],按照“1.4.1.2”方法测定呋塞米含量并绘制释放曲线。

2 结果与分析

2.1 呋塞米微乳处方筛选 将溶解度最大的杏仁油、菜籽油作为油相,乳化剂 OP-10 和吐温 20 为表面活性剂,PEG400 和 1,2-丙二醇为助表面活性剂,各处方形成的微乳系统现象见表 1。选择形成稳定微乳时 S_{mix} :水范围较大的处方一(杏仁油、OP-10、PEG400、 K_m 1:1)为微乳处方。

2.2 响应面法优选呋塞米微乳处方 Box-Behnken Design 试验结果见表 2,电导率、浊度和载药量的多元二次回归模型均具有显著性(表 3),失拟项检验均大于 0.05,说明模型与实际情况吻合良好^[14],对真实情况的模拟准确;各模型信噪比均大于 4,分别为 80.03、25.54 和 16.06,说明该模型有足够的分辨力,能真实地反映试验结果^[13]。 S_{mix} 与水的质量比对呋塞米微乳浊度、电导率、载药量都具有显著影响,杏仁油用量对浊度和载药量有显著影响,3 因素之间不存在交互作用;图 1 显示, S_{mix} 与水的质量比增大时微乳浊度和电导率逐渐减小,载药量先增大后略减小;杏仁油用量增加时,载药量增大,浊度略增大。

对电导率、浊度和载药量所建模型进行参数最优分析,实际值与预测值偏差分别为 3.15%、1.39% 和 6.52%。最终确定微乳处方制备工艺为杏仁油 240 μL ,表面活性剂为 OP-10,助表面活性剂为 PEG400,二者质量比为 1:1, S_{mix} 与水的质量比为 2.78(g:g),乳化时间为 2 min。优化处方制得的呋塞米微乳为乳白色,均一透明,流动性良好。干燥以后在透射电子显微镜下观察,液滴均呈圆球形(图 2),分布相对均匀,平均粒径为 57 nm。呋塞米微乳用水稀释 100 倍,以水为空白,610 nm 测试透光率为 96.4%,10 000 r/min 离心 10 min,没有出现明显的油水分离^[16]。

2.3 呋塞米微乳体外释放 释放曲线见图 3,微乳在 0.1 mol/L HCl 中释放较慢,在磷酸盐缓冲液中释放较快,能够持续释放 72 h,最大累积释放度为 98.2%,表现出缓释性能,片剂则在 2 h 内全部释放,累积释放度为 98.8%。

3 结论

微乳系统多采用油酸乙酯、乙酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、亚油酸-棕榈酸异丙酯、辛癸酸甘油三酯等有机物作为油相,人体的安全性较低。食用植物油具有较高的营养价值和药用价值,但应用于药物传递系统的报道较为少见。该研究采用甘肃省产的 5 种食用植物油作为备选,从中筛选对药物溶解度最大的作为油相,通过 Box-Behnken Design 响应面法对

表 1 不同处方微乳系统现象
Table 1 Phenomena of microemulsion system with different formula

处方 Formu- la	油 Oil	表面活 性剂 Surfactant	助表面 活性剂 Co-sur- factant	K_m	S_{mix} :水 S_{mix} :water(g:g)								
					9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9
1	杏仁油	OP-10	PEG400	1:1	+	++	++	+++	++++	不均一, 不稳定	有油滴	未形成 微乳	未形成微乳
				1:2	+	++	+++	++++	不均一, 不稳定	不均一, 不稳定	不均一, 不稳定	有油滴	未形成微乳
				2:1	++	+++	+++	++++	++++	++++	有油滴	有油滴	未形成微乳
2	菜籽油	OP-10	PEG400	1:1	+	++	++	+++	++++	不均一, 不稳定	不稳定, 有油滴	未形成 微乳	未形成微乳
				1:2	+	++	+++	++++	不均一, 不稳定	分层	分层	分层	未形成微乳
				2:1	++	+++	++++ 黏度大	++++	++++	++++	++++	有油滴	有油滴
3	杏仁油	吐温 20	PEG400	1:1	+++	++++	+++++	+++++	不均一, 不稳定	有油滴	不稳定, 有油滴	未形成 微乳	未形成微乳
				1:2	+++	++++	+++++	不均一, 不稳定	不均一, 不稳定	有油滴	未形成 微乳	未形成 微乳	未形成微乳
				2:1	+++	++++	+++++	+++++	不均一, 不稳定	不均一, 不稳定	有油滴	有油滴	未形成微乳
4	杏仁油	OP-10	1,2-丙二醇	1:1	+++	有油滴	有油滴	分层	不稳定, 有油滴	分层	分层	未形成 微乳	未形成微乳
				1:2	有油滴	不均一, 有油滴	分层	分层	分层	未形成 微乳	未形成 微乳	未形成 微乳	未形成微乳
				2:1	++	不均一, 有油滴	不均一, 有油滴	分层	分层	分层	分层	未形成 微乳	未形成微乳

注:+.澄清; ++.较为澄清; +++.略浑浊; ++++.较为浑浊; +++++.浑浊
Note:+.Clear; ++.Relatively clear; +++.Slightly turbidity; ++++.Relatively turbidity; +++++.Turbidity

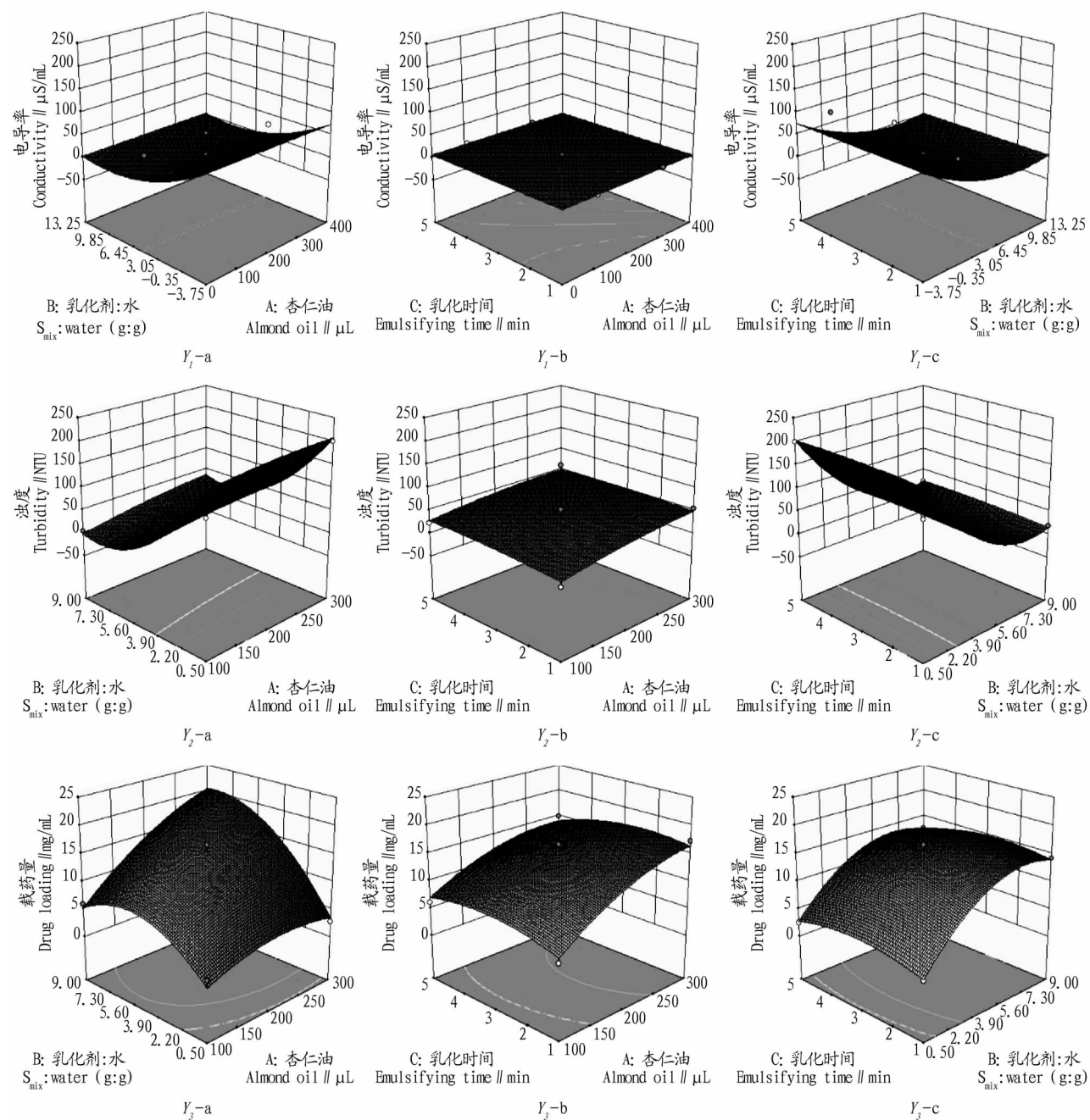
表 2 Box-Behnken Design 试验设计与结果
Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken Design

序号 No.	X_1 (油相 用量// μL)	X_2 (S_{mix} :水 S_{mix} :water)	X_3 (乳化时间 Emulsifying time//min)	Y_1 (电导率 Conductivity $\mu\text{S}/\text{mL}$)	Y_2 (浊度 Turbidity NTU)	Y_3 (载药量 Drug loading mg/mL)
1	300	9.00	3	4	28.5	19.287 1
2	200	4.75	3	4	44.0	14.562 2
3	200	0.50	5	77	200.0	2.456 5
4	100	9.00	3	4	5.5	5.966 7
5	200	4.75	3	7	53.0	14.488 4
6	300	4.75	1	7	55.0	17.278 9
7	200	9.00	1	4	18.5	14.221 5
8	200	4.75	3	7	47.5	12.300 2
9	100	0.50	3	78	200.0	2.360 1
10	300	0.50	3	74	200.0	2.731 4
11	200	9.00	5	3	22.5	12.631 3
12	200	0.50	1	78	200.0	2.260 9
13	200	4.75	3	7	44.0	16.643 4
14	300	4.75	5	5	61.0	14.988 7
15	200	4.75	3	7	33.5	15.046 9
16	100	4.75	5	6	23.0	6.086 6
17	100	4.75	1	7	4.5	5.007 2

表 3 电导率、浊度、载药量的二次回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of quadratic regression model for the conductivity, turbidity and drug loading

项目 Item	Y_1 (电导率 Conductivity)		Y_2 (浊度 Turbidity)		Y_3 (载药量 Drug loading)	
	F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	1 156.70	<0.000 1	85.54	<0.000 1	25.73	0.000 1
X_1 (杏仁油 Almond oil)	2.09	0.191 2	13.64	0.007 7	61.96	0.000 1
X_2 (S_{mix} : 水 S_{mix} : water)	7 139.33	<0.000 1	576.61	<0.000 1	91.19	<0.000 1
X_3 (乳化时间 Emulsifying time)	2.09	0.191 2	0.89	0.376 6	0.35	0.574 9
$X_1 X_2$	2.68	0.145 7	1.16	0.317 1	17.09	0.404 4
$X_1 X_3$	0.17	0.694 6	0.34	0.576 6	1.16	0.317 7
$X_2 X_3$	0.00	1.000 0	0.04	0.856 7	0.33	0.586 4

图 1 电导率(Y_1)、浊度(Y_2)和载药量(Y_3)的三维响应面图Fig.1 3D response surfaces plots for conductivity(Y_1), turbidity(Y_2), and drug loading(Y_3)

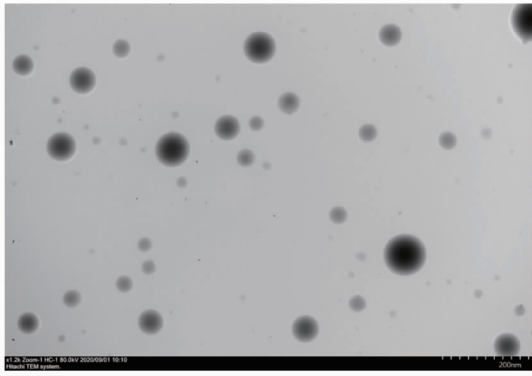


图2 呋塞米微乳透射电子显微镜照片

Fig.2 Electron microscope photograph of furosemide microemulsion

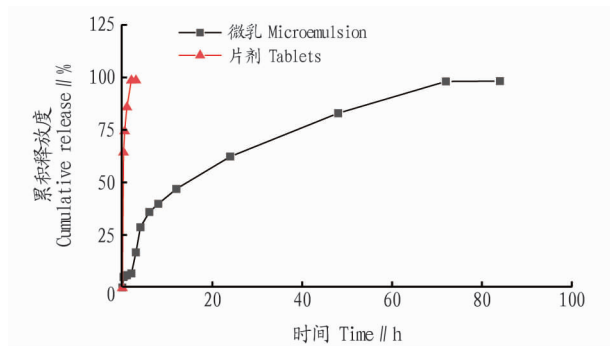


图3 呋塞米微乳与片剂体外累积释放曲线

Fig.3 Cumulative release curve of furosemide microemulsion and tablets in vitro

呋塞米处方中油相用量、 S_{mix} 与水的质量比、乳化时间 3 个因素建立多元回归模型,绘制效应面图,得到最佳处方,并通过了验证,最终得到均一透明、载药量高、粒径小、透光率好、稳定性高的水包油型呋塞米微乳,可直接用于小儿口服,减小给药频率,增加呋塞米的生物利用度,也可以将其制备成软

胶囊、凝胶、滴丸等剂型,以满足不同的临床用药需求。

参考文献

- [1] VLACHOU M, GERANIOU E, SIAMIDI A. Modified release of furosemide from Eudragits® and poly(ethylene oxide)-based matrices and dry-coated tablets[J]. *Acta Pharm*, 2020, 70(1): 49-61.
- [2] THAPLIYAL A, KHAR R K, CHANDRA A. AgNPs loaded microemulsion using gallic acid inhibits MCF-7 breast cancer cell line and solid ehrlich carcinoma[J]. *Int J Polym Mater Polym Biomater*, 2020, 69(5): 292-316.
- [3] OKUR M E, AYL A S, YOZGATLI V, et al. Evaluation of burn wound healing activity of novel fusidic acid loaded microemulsion based gel in male Wistar albino rats[J]. *Saudi Pharm J*, 2020, 28(3): 338-348.
- [4] NAYAK K, MISRA M. Triamcinolone acetate-loaded PEGylated microemulsion for the posterior segment of eye[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(14): 7928-7939.
- [5] ABU-AZZAM O, NASR M. *In vitro* anti-inflammatory potential of phloretin microemulsion as a new formulation for prospective treatment of vaginitis[J]. *Pharm Dev Technol*, 2020, 25(8): 930-935.
- [6] 赵颖, 宋婷, 屈梦华, 等. 松萝酸自微乳的处方优化及质量评价[J]. *中国药房*, 2018, 29(3): 312-317.
- [7] ZHAO L L, WANG Y, ZHAI Y J, et al. Ropivacaine loaded microemulsion and microemulsion-based gel for transdermal delivery: Preparation, optimization, and evaluation[J]. *Int J Pharm*, 2014, 477(1/2): 47-56.
- [8] 胡佳慧. 五味子木脂素自微乳滴丸的制备及其在大鼠体内的药理学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [9] PATEL H K, BAROT B S, PAREJIYA P B, et al. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: *Ex vivo* permeation and skin irritation studies[J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2013, 102: 86-94.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 466.
- [11] 陈伶俐, 晏亦林, 罗燕娜, 等. Box-Behnken 实验设计法优化岩白菜素自微乳剂处方的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(4): 528-533.
- [12] 徐翔英, 谢秋情, 郑冬梅, 等. 星点设计-响应面法优选细梗香草皂苷自微乳处方[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(22): 2012-2017.
- [13] 张菁楠, 胡艳秋, 张军威, 等. Box-Behnken 响应面法优化交泰丸有效部位口服自微乳的制备方法[J]. *华西药学杂志*, 2018, 33(4): 359-363.
- [14] 龙凯花, 王春柳, 李晔, 等. Box-Behnken 响应面法优化穿心莲内酯自微乳的制备工艺[J]. *中国药房*, 2018, 29(24): 3372-3375.
- [15] 钟琳琳, 田湾湾, 刘彩凤, 等. 川芎嗪微乳的制备及不同粒径微乳体外释放对比研究[J]. *中草药*, 2019, 50(21): 5231-5238.
- [16] ZHAO Z Y, LIAN Y F, ZHU Y H, et al. Depot lidocaine-loaded microemulsion for prolonged local anesthesia: Different efficacy model studies[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2020, 55: 2021-01-17. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101404>.

(上接第 131 页)

参考文献

- [1] 田淑慧, 张启林, 杜宜新, 等. 拮抗立枯丝核菌的木霉菌株筛选[J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2006, 19(1): 14-17.
- [2] 王迪轩. 大棚蔬菜苗期立枯病的防治[J]. *湖南农业*, 2004(3): 13.
- [3] 曹春梅, 李文刚, 张建平, 等. 马铃薯黑痣病的研究现状[J]. *中国马铃薯*, 2009, 23(3): 171-173.
- [4] 嵇豪, 蒋冬花, 杨叶, 等. 响应面法优化超声波辅助提取红曲米中水溶性色素[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 34(1): 91-96.
- [5] 张华东. 立枯丝核菌毒素的产生及与致病力的关系[D]. 扬州: 扬州大学, 2003.
- [6] 张艳军. 番茄早疫病病菌拮抗菌发酵液稳定性分析[J]. *生物技术*, 2012, 22(6): 74-77.
- [7] VISAGIE C M, HOUBRAKEN J, FRISVAD J C, et al. Identification and no-

menclature of the genus *Penicillium*[J]. *Studies in mycology*, 2014, 78: 343-371.

- [8] 彭振红. 马铃薯黑痣病生防菌的筛选及抑菌机理的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [9] 杨利珍, 周乐, 徐虹, 等. 一株青霉菌的分离鉴定及抑菌活性成分研究[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(4): 98-102.
- [10] 辛志宏, 方玉春, 朱天骄, 等. 海绵来源真菌黄灰青霉 Sp-19 中的抗肿瘤活性成分研究[J]. *中国海洋药物*, 2006, 25(6): 1-6.
- [11] GE H M, SHEN Y, ZHU C H, et al. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp.[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(2): 571-576.
- [12] REN H, GU Q Q, CUI C B. Anthraquinone derivatives produced by marine-derived *Penicillium flavidorsum* SHK1-27 and their antitumor activities[J]. *Chinese journal of medicinal chemistry*, 2007, 17(3): 148-154.