

# 红豆杉纯露的抑菌性能研究

张瑜<sup>1\*</sup>, 陈诗雨<sup>1</sup>, 夏明<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup>浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州

<sup>2</sup>浙江省红豆杉开发应用协会, 浙江 杭州

Email: 2925596387@qq.com, #Xia1ming2@126.com

收稿日期: 2021年5月15日; 录用日期: 2021年6月1日; 发布日期: 2021年6月18日

## 摘要

通过水蒸气蒸馏, 从新鲜红豆杉枝叶中按一定比例提取纯露, 并以纯露为原料制备空气清新剂喷雾。采用白色念珠菌(真菌)、金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)、大肠杆菌(革兰氏阴性菌)作为实验的指示菌, 研究了红豆杉喷雾的体外抑菌作用, 评估其抑菌性能。结果表明红豆杉喷雾对真菌与细菌均有一定的抑菌作用, 纯露的短期杀菌效能低于75%酒精, 但长效抑菌效能优于75%酒精。上述结果, 为开发红豆杉消毒产品以及进一步探索其在空气清新剂上的应用价值提供依据。

## 关键词

红豆杉, 纯露, 抑菌性能

# Study on Bacteriostatic Properties of Pure Dew of *Taxus chinensis*

Yu Zhang<sup>1\*</sup>, Shiyu Chen<sup>1</sup>, Ming Xia<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang

<sup>2</sup>Zhejiang Taxus Chinensis Development and Application Association, Hangzhou Zhejiang

Email: 2925596387@qq.com, #Xia1ming2@126.com

Received: May 15<sup>th</sup>, 2021; accepted: Jun. 1<sup>st</sup>, 2021; published: Jun. 18<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

Using steam distillation, pure dew was extracted from fresh *Taxus chinensis* branches and leaves, and an air freshener was prepared by pure dew. *Candida albicans* (fungi), *Staphylococcus aureus*

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 张瑜, 陈诗雨, 夏明. 红豆杉纯露的抑菌性能研究[J]. 微生物前沿, 2021, 10(2): 98-107.

DOI: 10.12677/amb.2021.102012

(Gram-positive bacteria), and *Escherichia coli* (Gram-negative bacteria) were used as the indicator bacteria to study the bacteriostatic effect of *Taxus chinensis* spray in vitro and to evaluate its bacteriostatic performance. The results showed that *Taxus* sprays could inhibit bacteria and fungi. It was found that the short-term bactericidal efficacy was lower than 75% alcohol, while the long-term bacteriostatic efficacy was better than 75% alcohol. It provided a basis for the development of *Taxus chinensis* disinfection products and the further exploration of the air freshener.

## Keywords

*Taxus chinensis*, Pure Dew, Bacteriostasis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

红豆杉(*Taxus chinensis*), 又名紫杉, 1996 年被列入世界珍稀濒危植物, 近年来伴随着我国大规模种植, 目前国内种植红豆杉已达 1.85 亿株, 储量已超世界二分之一[1]。红豆杉的药用价值主要体现在紫杉醇的抗肿瘤作用, 但据全球紫杉醇市场增长报告显示[2], 近年来红豆杉产量已超出药用所需, 存在过剩危机。药理学研究表明, 在抗肿瘤功效之外, 红豆杉属植物的根、皮等组织提取物有抗血管内皮细胞增生、镇痛、降血糖、抗氧化等多种药理作用[3] [4]。红豆杉枝叶中紫杉醇含量较低, 故相关药理研究较少, 但萃取得到的红豆杉树叶提取物已被证实具有广谱的抗菌功效[5], 其抗菌活性成分可能存在于挥发油之中[6]。

水蒸气蒸馏法是制备挥发油最常用的方法, 在香料产业中挥发油又被称为精油。红豆杉叶精油, 经气相色谱-质谱(GC-MS)分析可得到 39 种脂肪族类、11 种芳香族和 6 种萜类物质[7]。其中, 脂肪族化合物含量最大(63.78%), 包括脂链醛、酮、醇、酸、酯、烃; 烯炔类成分主要为柠檬烯、角鲨烯和雪松烯; 而萜类则占比很小(4.59%), 主要为  $\beta$ -紫罗兰酮[8]。精油的抗菌活性可能与其所含柠檬烯、香茅醛和一些亲脂性成分破坏细胞质膜结构、抑制 ATP 合成有关[9]。

纯露又称水精油、芳香蒸馏水、芳香水等, 是精油提取过程中馏出的冷凝液, 通常被认为是精油的副产品[10]。由于其成分天然纯净, 香气清淡, 可以作为添加剂, 广泛用于香水、护肤品、香薰、护发剂等日用化学品和饮料中, 在美、英、法、德、日等多国较盛行[11]。纯露的主体是水, 相关生物活性成分的浓度较低, 但也存在一定的功能特性。红豆杉叶片是紫杉醇含量较低、无药用价值的部位, 为了探索其在日化产业中的潜在应用价值, 该研究采用水蒸气蒸馏法提取制备红豆杉纯露, 以白色念珠菌(真菌)、金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)和大肠杆菌(革兰氏阴性菌)为指示菌, 评估其抑菌性能, 并进一步探索红豆杉纯露作为兼有杀菌效力的空气清新剂的应用价值。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

菌株: 大肠杆菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、白色念珠菌(ATCC10231), 上海保藏生物技术中心。

试剂: 无水乙醇、蒸馏水、南方红豆杉鲜叶(由浙江省红豆杉开发应用协会提供, 公红豆杉)、纯净水

(杭州娃哈哈集团)、生理盐水(上海试四赫维化工有限公司)、各类培养基(杭州微生物试剂有限公司)。

仪器: 电热恒温水浴锅(上海博讯仪器有限公司)、生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、KG-SX-500 蒸汽灭菌器(浙江新丰仪器有限公司)、精密恒温培养箱 B-9082 (上海一恒仪器有限公司)、UV-5100 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)、超净工作台(亚泰科隆仪器有限公司)。

## 2.2. 试验方法

**纯露制备:** 称取新鲜南方红豆杉叶片 200 g, 加 1 mL 磷酸和 120 mL 蒸馏水, 组织捣碎后装入烧瓶, 至超声波清洗器处理 30 min, 而后用水蒸气蒸馏装置蒸馏至馏出液无明显气味, 在搅拌情况下往馏出液中逐滴加入吐温 80 至馏出液上层的精油完全溶解, 得红豆杉纯露。

**抑菌圈实验:** 制作无菌营养琼脂培养皿 6 个, 用记号笔在培养皿背面对等划分出 A、B 两个区域。移取约 0.1 mL 事先配制的金黄色葡萄球菌悬液( $10^6 \sim 10^8$  cfu/mL)于培养基上, 用涂布器涂布均匀。用镊子在 A、B 两区中央的培养基表面垂直放置牛津杯, 轻轻加压, 使其与培养基接触无空隙。用移液枪移取 150  $\mu$ L 75% 酒精注入 A 区牛津杯; 移取 150  $\mu$ L 红豆杉纯露注入 B 区牛津杯。小心放入培养箱中 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 18 h, 取出用游标卡尺测量抑菌圈大小, 并分别对 A、B 两区域的抑菌圈直径求平均。大肠杆菌参照执行。

对数据进行求平均, 计算相对标准偏差。

**抑制率测定(平板菌落计数法):** 参考《消毒技术规范 2002 版》[12], 和《药典》(2018 版)的无菌检查法进行改良。在无菌塑料离心试管中加入无菌生理盐水 1 mL, 再用接种环挑取少量白色念珠菌新鲜培养物与无菌生理盐水混合, 放入 27 $^{\circ}$ C 摇床中以 200 r/min 振荡 10 min 备用, 移取 0.1 mL, 进一步用 200 mL 无菌生理盐水稀释至  $2 \times 10^3$  倍, 充分振摇, 使其分散均匀, 得稀释后的菌悬液。分别移取稀释后的菌悬液至 3 支无菌试管中, 每支 0.4 mL, 在 3 支试管中分别加入 4 mL 红豆杉纯露、75% 酒精和无菌生理盐水, 静置 30 min。分别吸取 0.1 mL 于平皿中, 加入灭菌的 45 $^{\circ}$ C 沙氏琼脂培养基 20 mL 混合均匀, 静置待凝固。每支试管各进行 6 组平行试验, 纯露组记为 A 组, 生理盐水组记为 B 组, 75% 酒精记为 C 组, 其中 A 组、C 组为实验组。将冷却后的平皿放置到培养箱中, 在 27 $^{\circ}$ C 下培养至能看清菌落后, 取出并计数。抑菌率计算公式为:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{B组平均菌落数} - \text{实验组平均菌落数}}{\text{B组平均菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

对数据进行求平均, 计算相对标准偏差。使用 EXCEL(2006)软件中的 t 检验法, 对每组两两做差异显著性处理, 进行双样本等方差分析。

金黄色葡萄球菌与大肠杆菌参照上述方法实施, 不同之处在于摇床温度 37 $^{\circ}$ C, 菌悬液稀释  $1 \times 10^6$  倍, 培养基为平板计数琼脂, 培养温度 37 $^{\circ}$ C。

**抑制率测定(比浊法):** 参考《消毒技术规范 2002 版》[12], 和《药典》(2018 版)的无菌检查法进行改良。在无菌塑料离心试管中加入无菌生理盐水 1 mL, 再用接种环挑取少量白色念珠菌新鲜培养物与无菌生理盐水混合, 放入 27 $^{\circ}$ C 摇床中以 200 r/min 振荡 10 min 备用, 移取 0.1 mL, 进一步用 100 mL 无菌生理盐水稀释至  $10^3$  倍, 充分振摇, 使其分散均匀, 得稀释后的菌悬液。取 24 支大试管, 平均分为 4 组, A 组各加入 2 mL 红豆杉纯露; B 组各加入 2 mL 的 75% 酒精, C、D 组各加入 2 mL 的 0.9% 生理盐水, A、B、C 组分别加入 0.1 mL 稀释菌后悬液, D 组再加 0.1 mL 生理盐水, 其中 A、B 组为实验组, C、D 组分别为阳性对照组和阴性对照组。将所有试管放入 27 $^{\circ}$ C 空气浴摇床中以 200 r/min 速率振荡。11 h 后取出, 迅速在波长 700 nm 处测量各组吸光度并求平均。抑菌率计算公式为:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{C组平均吸光度} - \text{实验组平均吸光度}}{\text{C组平均吸光度} - \text{D组平均吸光度}} \times 100\% \quad (2)$$

对数据进行求平均, 计算相对标准偏差。使用 EXCEL(2006)软件中的 t 检验法, 对每组两两做差异显著性处理, 进行双样本等方差分析。

金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率参照此法进行, 但摇床温度和培养温度均为 37℃, 由于生长速率不同, 大肠杆菌在接种后 8 h 测量, 金黄色葡萄球菌在接种后 9 h 测量。

**混合菌种抑菌实验:** 取已制好的平板计数琼脂无菌培养皿, 用记号笔在背面划分 A、B、C 三个平等扇形区域。分别将红豆杉纯露、75%酒精、自来水装入喷雾瓶, 选取 3 块各 1 dm<sup>3</sup> 的操作台, 分别喷上上述液体(约 0.1 mL), 1 min 后用无菌棉签刮涂喷雾区域一遍, 将刮后的棉签放入装有 2 mL 无菌生理盐水的试管中搅拌 3 min, 取出棉签轻轻甩干后用棉签刮涂培养皿的扇形区域, 红豆杉纯露、75%酒精、自来水分别对应 A、B、C 区域。重复做 9 个平皿, 将所有平皿在 37℃ 培养 18 h 后取出做菌落计数。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 纯露得率

水蒸气蒸馏所得提取物, 上方有少许油状液体, 体积约为 0.2 mL, 逐滴加入吐温 80 以后, 油状液体彻底溶解, 所得纯露为 250 mL, 纯露得率 125%。

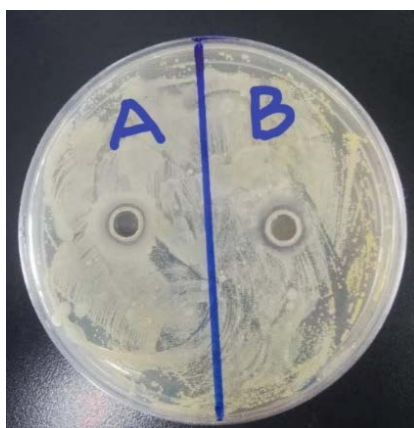
#### 3.2. 抑菌圈实验

抑菌圈实验结果见图 1 和图 2, 其中图 1 为金黄色葡萄球菌牛津杯组, 图 2 为大肠杆菌牛津杯组。抑菌圈数据的处理见表 1, 牛津杯直径为 0.9 cm, 可以看出, 红豆杉纯露与 75%酒精, 均能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 纯露对于大肠杆菌的抑制率, 要优于金黄色葡萄球菌, 如果将两种细菌看成是革兰氏阳性和阴性细菌的代表的话, 纯露对阴性菌的抑制效果, 强于阳性菌。使用红豆杉纯露的牛津杯, 两种细菌的抑菌圈直径均大于同等条件下的 75%酒精。

**Table 1.** Diameter of bacteriostatic zone in each group

**表 1.** 各组抑菌圈直径

	金黄色葡萄球菌(cm)	大肠杆菌(cm)
75%酒精(A 区)	0.98 ± 0.19	1.11 ± 0.17
红豆杉纯露(B 区)	1.10 ± 0.19	1.49 ± 0.20



**Figure 1.** Oxford Cup test-SA Group  
**图 1.** 牛津杯实验 - 金黄色葡萄球菌组



**Figure 2.** Oxford Cup test-*E. coli* Group  
**图 2.** 牛津杯实验 - 大肠杆菌组

### 3.3. 抑制率实验结果

表 2 和表 3 分别列出了使用平板菌落计数法和比浊法测得的抑制率。实验中还使用了人体体表真菌感染时常见白色念珠菌, 红豆杉纯露对于白色念珠菌的抑制率介于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌两种细菌之间。除固体抑制率测定实验中白色念珠菌的纯露组与盐水组是有差异外( $P < 0.05$ ), 其余各组抑菌率测定值之间均为差异显著( $P < 0.01$ )。抑菌率实验结果见图 3 至图 11, 其中图 3 至图 5 为金黄色葡萄球菌组, 图 6 至图 8 为大肠杆菌组, 图 9 至图 11 为白色念珠菌组。三组图片对比发现结果与抑菌圈实验相反——纯露的杀菌效能, 不如 75% 的酒精。这主要是由于在抑制率测定实验中, 抑菌物质的作用是一次性的, 而在抑菌圈实验中, 抑菌物质需要长期发挥效能。在抑菌圈实验中, 伴随牛津杯中 75% 酒精的挥发, 酒精的抑菌能力迅速失去。但是红豆杉纯露中的抑菌成分相对不容易挥发, 能深入到培养基中发挥效能。这说明短期快速杀菌上, 红豆杉纯露的效能低于 75% 酒精, 但是杀菌效能的长期维持方面, 优于 75% 酒精。

**Table 2.** The inhibition rate was measured by plate counting method

**表 2.** 平板计数法测得抑制率

	金黄色葡萄球菌抑制率	大肠杆菌抑制率	白色念珠菌抑制率
红豆杉纯露(A 组)	33% ± 3%	79% ± 4%	30% ± 2%
75%酒精(B 组)	93% ± 2%	100% ± 1%	98% ± 2%

**Table 3.** Inhibition rate measured by turbidimetry

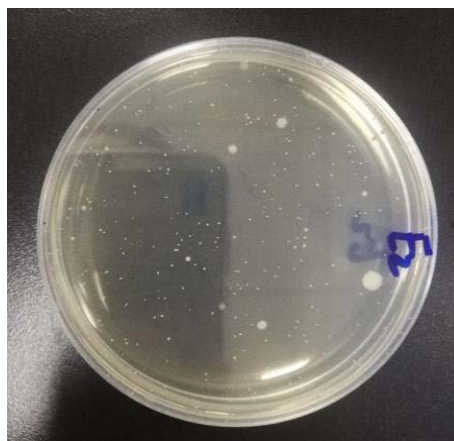
**表 3.** 比浊法测得抑制率

	金黄色葡萄球菌抑制率	大肠杆菌抑制率	白色念珠菌抑制率
红豆杉纯露(A 组)	95% ± 2%	94% ± 2%	95% ± 2%
75%酒精(B 组)	99% ± 1%	98% ± 3%	100% ± 1%

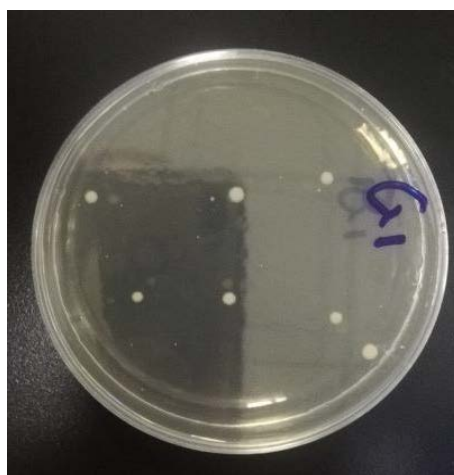
### 3.4. 混合菌种涂布实验

混合菌种涂布的实验结果见图 12, A (纯露) 区域的菌落数  $29 \pm 8$ , 明显少于 C (自来水) 区域的菌落数  $53 \pm 6$ , B (75% 酒精) 区域的菌落数  $11 \pm 3$  最少。混合菌种涂布实验用到了自然界中的微生物, 从实验方法上讲, 它的定量也是不精确的, 但是相比较而言, 用于操作台表面喷雾杀菌时, 红豆杉纯露有一定杀

菌效果，但效果低于 75%酒精。



**Figure 3.** SA-hydrolat Group  
**图 3.** 金黄色葡萄球菌 - 纯露组



**Figure 4.** SA-75% alcohol Group  
**图 4.** 金黄色葡萄球菌 - 75%酒精组



**Figure 5.** SA-NS Group  
**图 5.** 金黄色葡萄球菌 - 盐水组



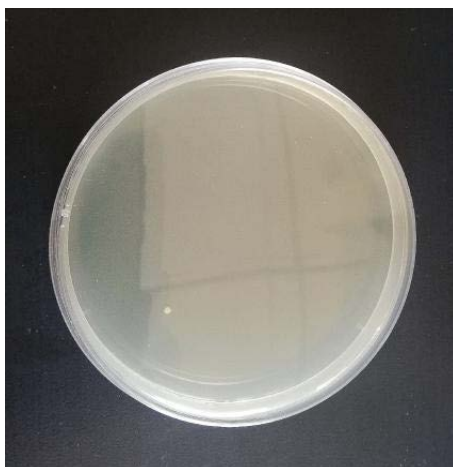
**Figure 6.** *E. coli*-hydrolat Group  
**图 6.** 大肠杆菌 - 纯露组



**Figure 7.** *E. coli*-75% alcohol Group  
**图 7.** 大肠杆菌 - 75%酒精组



**Figure 8.** *E. coli*-NS Group  
**图 8.** 大肠杆菌 - 盐水组



**Figure 9.** *C. albicans*-hydrolat Group  
**图 9.** 白色念珠菌 - 纯露组

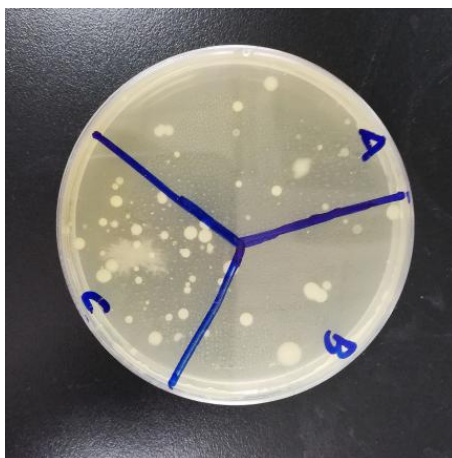


**Figure 10.** *C. albicans*-75% alcohol Group  
**图 10.** 白色念珠菌 - 75%酒精组



**Figure 11.** *C. albicans*-NS Group  
**图 11.** 白色念珠菌 - 盐水组





**Figure 12.** Experiment diagram of coating method (pure dew in Area A, 75% alcohol in area B, tap water in Area C)

**图 12.** 涂布法实验图(A 区域纯露、B 区域 75%酒精、C 区域自来水)

红豆杉纯露对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑菌作用，长效抑菌时，对格兰仕阴性菌抑制效果较高，但短时间内对革兰氏阳性菌杀灭效果更佳，对真菌中的白色念珠菌与自然微生物也起到一定的抑制作用。在实验中，红豆杉纯露的得率达到 125%，导致纯露中活性成分浓度很低，短期杀菌效能低于 75%酒精，但长效抑菌效能优于 75%酒精。如要提高纯露的杀菌效力，最方便的办法是降低纯露得率，在纯露回收率达到红豆杉叶片原料 50%左右时即终止蒸馏。考虑到纯露与 75%酒精在短期杀菌和长效抑菌效能方面的差异，如果将红豆杉纯露作为空气消毒产品开发，可以考虑与一定浓度的酒精配合使用，提升其短期杀菌效能。以红豆杉纯露为基础的空气消毒产品，同时还兼有空气清新效能，其气味不同于目前的空气清新产品，有非常淡的森林空气新鲜植物味道，且气味的持久性好，抑菌圈实验中，37℃培养 18 h 后，培养箱中仍可闻到淡淡的红豆杉气味，而来自营养琼脂培养基的臭味则被掩盖。

#### 4. 结论

水蒸气蒸馏法蒸馏红豆杉叶片所得红豆杉纯露，具有良好抑菌效果，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的长效抑菌效力优于 75%的酒精，对自然界中的微生物也有明显的抑制作用。由于红豆杉纯露杀味清新、作用长效，可以应用于兼有消毒作用的空气清新剂的开发，推动红豆杉的综合利用，填补红豆杉日化用品市场的空白。

#### 基金项目

浙江中医药大学学生科研基金项目：《天然防腐的纳米级紫杉醇雪花膏关于辅助治疗皮肤癌和抗菌消炎的研究》；浙江中医药大学远志杯项目：《关于红豆杉衍生系列特殊用途化妆品及相关日化产品开发》；浙江中医药大学创业园入住项目：《杉杉来迟日化用品有限公司——红豆杉衍生系列特殊用途化妆品及日化产品首创者》。

#### 参考文献

- [1] 王希清, 寇萍, 李弘琨, 等. 红豆杉资源加工利用产业发展现状[J]. 生物质化学工程, 2020, 54(6): 13-17.
- [2] (2019) Global Paclitaxel Market Growth. Reports Web [R/OL]. <https://www.reportsweb.com/reports/global-paclitaxel-market-growth-2019-2024>, 2020-06-21.

- 
- [3] 王楷婷, 李春英, 倪玉娇, 等. 红豆杉的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 黑龙江医药, 2017, 30(6): 1196-1199.
- [4] 王炯, 陈涵, 王章东, 等. 红豆杉的药理作用及毒性小考[J]. 西部中医药, 2017, 30(4): 139-142.
- [5] 李佳蔚, 侯璐, 高赛, 等. 红豆杉树叶提取物广谱抗菌功效的研究[J]. 人参研究, 2018, 30(2): 16-18.
- [6] 涂招秀, 付建平, 饶玉喜, 等. 有机溶剂法提取南方红豆杉茎叶中挥发油的工艺研究[J]. 江西科学, 2018, 36(6): 916-918.
- [7] 卫强, 张国升, 刘金旗, 等. 红豆杉枝叶中化学成分及含量研究进展[J]. 广州化工, 2014, 42(6): 17-20+23.
- [8] 曾慧英, 谢建春, 卢立晃, 等. 南方红豆杉叶挥发性成分[J]. 精细化工, 2011, 28(11): 1112-1116.
- [9] 刘姣. 南方红豆杉枝叶挥发性成分分析及其盆栽空气净化能力的初探[D]: [硕士学位论文]. 湖南: 吉首大学, 2016.
- [10] 王斌, 王凤君, 梁颖琪, 等. 玫瑰纯露提取工艺优化及其抑菌和抗氧化活性研究[J]. 北方园艺, 2020(18): 106-113.
- [11] 周寅寅. “水清若空”纯露品牌开发与设计[D]: [硕士学位论文]. 山东: 山东工艺美术学院, 2014.
- [12] 消毒技术规范 2002 版. GB15979-2002 [S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2002.