

基于“药辅合一”的牛至精油-石榴皮多酚纳米乳制备及性能研究

王鑫^{1,2}, 范鑫^{1,2}, 郑佳俊^{1,2}, 买吾兰江·买提努尔¹, 阿吉艾克拜尔·艾萨^{1*}, 吴涛^{1*}

1. 中国科学院新疆理化技术研究所 新疆特有药用资源利用重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要:目的 基于“药辅合一”理念, 构建牛至精油-石榴皮多酚纳米乳(*Origanum vulgare* essential oil and *Granati Pericarpium* polyphenols nanoemulsion, OVEO-GPP-NE) 阴道递药系统, 并对其处方筛选、理化性质表征及体外透黏膜性能、抑菌活性评价。方法 应用伪三元相图与形态观察法筛选纳米乳的处方, 并对纳米乳剂类型、微观形态、粒径、 ζ 电位、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、pH 值、稳定性等理化性质进行表征。通过体外透黏膜实验和抑菌活性实验研究 OVEO-GPP-NE 在阴道黏膜处的药物递送效果。结果 OVEO-GPP-NE 最优处方: OVEO、GPP、肉豆蔻酸异丙酯 (IPM)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 (RH-40)、聚山梨酯-80 (Tween-80, T80)、Transcutol® P 二乙二醇单乙醚 (diethylene glycol monoethyl ether, DGME)、水质量比为 2.00 : 3.00 : 7.00 : 8.55 : 5.70 : 4.75 : 69.00; 按最优处方所制 OVEO-GPP-NE 外观澄清透明, 乳剂类型为 O/W 型, 平均粒径为 (25.49 ± 0.21) nm, PDI 为 0.43 ± 0.05 , ζ 电位为 (-16.73 ± 0.35) mV, 透射电子显微镜观察结果显示, OVEO-GPP-NE 的乳滴呈球形, 外观圆整, 大小在 25 nm 内。OVEO-GPP-NE 离心稳定性、放置稳定性良好, pH 值为 3.92 ± 0.02 。体外透黏膜性能研究结果表明, OVEO-GPP-NE 中石榴皮多酚的累积渗透量是石榴皮多酚纳米乳 (*Granati Pericarpium* polyphenols nanoemulsion, GPP-NE) 的 2.8 倍、黏膜滞留量是 GPP-NE 的 1.61 倍。抑菌活性实验结果表明, OVEO-GPP-NE 对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)、大肠杆菌 *Escherichia coli* 均具有较好的抑菌效果, 其中石榴皮多酚与牛至精油对 2 种金黄色葡萄球菌表现出协同抑菌效果。结论 基于“药辅合一”理念, 成功构建了 OVEO-GPP-NE 递药系统, 为需氧菌性阴道炎的治疗提供了可行方案。

关键词: 药辅合一; 牛至精油; 石榴皮多酚; 纳米乳; 需氧菌性阴道炎; 体外透黏膜性能; 抑菌活性; 伪三元相图; 金黄色葡萄球菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)10-3513-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.010

Preparation and characterization of *Origanum vulgare* essential oil and *Granati Pericarpium* polyphenols nanoemulsion based on “unification of medicines and excipients”

WANG Xin^{1,2}, FAN Xin^{1,2}, ZHENG Jiajun^{1,2}, MAIWULANJIANG·Maitinuer¹, HAJIAKBER·Aisa¹, WU Tao¹

1. Key Laboratory of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To construct a vaginal drug delivery system of *Origanum vulgare* essential oil and *Granati Pericarpium* polyphenols nanoemulsion (OVEO-GPP-NE), screen the prescription, characterize the physicochemical properties, evaluate the *in vitro* transmucosal properties and antibacterial activity based on the concept of “unification of medicines and excipients”. **Methods** Pseudo-ternary phase diagram and morphological observation were applied to determine the prescription of the nanoemulsion. The type, microscopic morphology, average droplet size, ζ potential, polydispersion index (PDI), pH and stability of OVEO-GPP-NE were

收稿日期: 2025-01-19

基金项目: 新疆维吾尔自治区“天山英才科技创新领军人才”培养计划 (2023TSYCLJ0044); 新疆维吾尔自治区自然科学基金杰出青年科学基金 (2024D01E33)

作者简介: 王鑫, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究。E-mail: wangxin22@mails.ucas.ac.cn

*通信作者: 阿吉艾克拜尔·艾萨, 研究员, 博士生导师, 研究方向为民族药研发。E-mail: haji@ms.xjb.ac.cn

吴涛, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药民族药新药研发。E-mail: wutao@ms.xjb.ac.cn

characterized. The drug delivery effect of OVEO-GPP-NE at the vaginal mucosa was investigated by *in vitro* transmucosal assay and bacteriostatic activity assay. **Results** The optimal prescription mass ratio of OVEO-GPP-NE was OVEO: GPP: isopropyl myristate (IPM): polyoxyethylene hydrogenated castor oil (RH-40): Tween-80, (T80): Transcutol® P diethylene glycol monoethyl ether (DGME): water as (2.00:3.00:7.00:8.55:5.70:4.75:69.00). The type of emulsion was O/W and the appearance of OVEO-GPP-NE made according to the optimal prescription was clear and transparent. The average particle size was (25.49 ± 0.21) nm, the PDI was 0.43 ± 0.05 , the ζ potential was (-16.73 ± 0.35) mV. The results of transmission electron microscopy showed that the emulsion droplets of OVEO-GPP-NE were spherical in shape, round in appearance, and within 25 nm in size. The centrifugal stability and placement stability of OVEO-GPP-NE were good, and the pH was 3.92 ± 0.02 . The *in vitro* permeation results showed that the cumulative drug penetration of GPP in OVEO-GPP-NE was 2.85 times higher and the mucosal retention was 1.61 times higher than that of *Granati Pericarpium* polyphenols nanoemulsion (GPP-NE). The results of bacteriostatic activity showed that OVEO-GPP-NE was effective against *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, in which GPP and OVEO showed synergistic bacteriostatic effects on two kinds of *S. aureus*. **Conclusion** Based on the concept of “unification of medicines and excipients”, this study successfully constructed the OVEO-GPP-NE drug delivery system, which provides a feasible solution for the treatment of aerobic vaginitis.

Key words: unification of medicines and excipients; *Origanum vulgare* essential oil; *Granati Pericarpium* polyphenols; nanoemulsions; aerobic vaginitis; mucosal permeability *in vitro*; antimicrobial activity; pseudoternary phase diagram; *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*

需氧菌性阴道炎 (aerobic vaginitis, AV) 是一种以乳酸杆菌菌群破坏和金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等需氧菌数量增加为特征的阴道炎症^[1-3]。目前, 治疗 AV 的药物以唑类药物为主, 长期使用会导致内分泌紊乱、神经系统失衡、肝损伤等生理功能危害, 并可能引发细菌耐药和阴道菌群失衡, 从而加重患者病情^[4]。因此, 寻找更为安全、有效的治疗策略成为当下研究的热点之一。

天然植物有效成分因其作用机制多样, 安全性高且不易引发微生物耐药, 在 AV 治疗领域展现出潜在的应用前景^[5]。石榴皮多酚 (*Granati Pericarpium* polyphenols, GPP) 是从石榴科石榴属植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮中提取的总多酚成分^[6-7], 已有研究表明其在阴道炎等妇科疾病的治疗上具有一定的潜力^[8-13]。然而, GPP 中富含高相对分子质量 ($>1\ 000$) 多酚成分, 其相对分子质量大和脂溶性低的特点会限制 GPP 在阴道黏膜屏障作用下的吸收效果^[14-15]。

牛至精油 (*Origanum vulgare* essential oil, OVEO) 是从唇形科牛至属植物牛至 *Origanum vulgare* L. 的干燥全草中提取出的天然植物精油, 富含百里香酚和香芹酚等活性成分, 具有广谱抑菌功效^[16-17]。此外, 植物精油常表现出优异的黏膜渗透性能^[18], 可以作为天然促渗透增强剂提高其他生物活性成分的黏膜渗透效率^[19-20], 体现“药辅合一”的独特优势^[21]。

纳米乳作为一种新型药物递送系统, 具有黏膜给药优势^[22-23], 能够较好地通过黏膜屏障抵达病灶

处发挥药效^[24]。为提高石榴皮多酚在阴道黏膜的渗透效果, 本研究基于“药辅合一”理论^[21,25-27], 制备石榴皮多酚与牛至精油共载纳米乳 (OVEO and GPP nanoemulsion, OVEO-GPP-NE), 用于阴道药物递送, 并对纳米乳乳剂类型、微观形态、粒径、 ζ 电位、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、pH 值、稳定性等理化性质进行表征, 对其体外透黏膜性能和抑菌活性进行评价, 有望为 AV 治疗提供安全有效的方案^[28-30]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Spectra Max® 190 型读板机, 美谷分子仪器有限公司; pHs-3C pH 计, 上海仪电科学仪器有限公司; JEM-F200 型场发射透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; NRY-100C 型恒温振荡摇床, 上海南荣实验室设备公司; DHP-9162 型恒温培养箱, 上海赛伦生物技术股份有限公司; SB5003 型电子天平, 慈溪市华徐衡器实业有限公司; YR-140BW 型智能恒温磁力搅拌器, 上海兴创科学仪器设备有限公司; ZTY TP-3A 型智能透皮扩散仪, 上海兴创科学仪器设备有限公司; SK5210HP 型超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; BT25S 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; 5417R 型冷冻离心机, 德国艾本德股份公司。

1.2 材料

福林酚 (批号 JS22765A)、磷酸溶液 (2%,

pH 7.0, 批号 JR27464A)、中链甘油三酯 (medium chain triglycerides, MCT, 批号 N09IS230636)、无水碳酸钠 (批号 JS241147)、MD1434 透析袋 (截留相对分子质量 8 000~14 000), 均购自上海源叶生物有限公司; 聚山梨酯-80 (Tween-80, T80, 批号 P248221)、Transcutol® P 乙二醇单乙醚 (diethylene glycol monoethyl ether, DGME, 批号 P2090987)、聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油 (RH-40, 批号 P2505064), 均购自上海泰坦科技股份有限公司; 肉豆蔻酸异丙酯 (isopropyl myristate, IPM, 批号 C15707509)、油酸乙酯 (ethyl oleate, EO, 批号 C14493906)、没食子酸对照品 (批号 C15218879), 均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; Mueller-Hinton 琼脂 (Mueller-Hinton agar, MHA, 批号 HB6232)、MH 肉汤 (MH bouillon, MHB, 批号 HB6231), 均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; GPP、OVEO, 实验室自制; 纯化水; 其余试剂均为分析纯。

1.3 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 methicillin-resistant *S. aureus* ATCC43300 (MRSA)、大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922, 购买自商城北纳创联生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 OVEO-GPP-NE 的制备

采用水滴定法绘制伪三元相图, 确定水包油型纳米乳中油相、混合表面活性剂 (mixed surfactants, MS) 及水相的用量范围^[28]。精密称取处方量的 OVEO、IPM、RH-40、T80 和 DGME, 充分搅拌均匀。在 500 r/min 磁力搅拌条件下, 缓慢滴加处方量石榴皮多酚水溶液, 室温下搅拌 2 h, 制备获得 OVEO-GPP-NE。

在未添加原料药的条件下, 按以上纳米乳的制备方法制备, 即得空白纳米乳。

2.2 石榴皮总多酚含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取没食子酸对照品适量, 精密称定, 加纯化水制成 48 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取 200 μL 的 OVEO-GPP-NE 于 100 mL 量瓶中, 加入纯化水稀释至刻度。

2.2.3 总多酚含量测定方法及线性关系考察 精密量取没食子酸对照品储备液, 采用逐级稀释的方

法配制质量浓度分别为 48、24、12、4.8、0.96 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸对照品溶液, 各吸取 50 μL , 分别加入 100 μL 福林酚试剂, 静置 3 min 后, 再加入 200 μL 质量分数为 15% Na_2CO_3 溶液, 静置 30 min, 在波长 760 nm 处测定吸光度 (A) 值。以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.0134X+0.0843$, $R^2=0.9996$, 结果表明没食子酸在 0.96~48.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.4 精密度考察 精密量取没食子酸对照品溶液, 重复测定 6 次, 按照“2.2.3”项下方法, 在波长 760 nm 处测定 A 值, 记录 A 值并计算其 RSD 为 0.59%, 表明该方法精密度良好。

2.2.5 稳定性测定 精密量取同一供试品溶液, 于室温下放置, 按照“2.2.3”项下方法, 在 760 nm 波长处, 每 2 小时测定 A 值, 测定 12 h, 记录 A 值并计算其 RSD 为 0.62%, 表明 OVEO-GPP-NE 供试品溶液在 12 h 内药物性质稳定。

2.2.6 重复性测定 分别精密量取 6 份供试品溶液, 按照“2.2.3”项下方法, 在波长 760 nm 处测定 A 值, 记录 A 值并计算其 RSD 为 0.64%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率测定 取同一批供试品溶液 6 份, 精密加入定量的没食子酸对照品溶液, 按照“2.2.3”项下方法, 在波长 760 nm 处测定 A 值, 记录并计算平均回收率及其 RSD 分别为 101.92% 和 2.52%, 表明该方法准确度良好。

2.3 OVEO-GPP-NE 处方筛选

经预实验研究发现, OVEO 作为天然促渗透增强剂可以与多种油相混合得到澄清混合油相, 进一步通过成乳能力以及成乳稳定性初步确定待筛选油相为 IPM、EO、MCT。基于油相与不同亲水亲油平衡值 (hydrophilic and lipophilic balance value, HLB) 乳化剂的成乳能力差异, 初步筛选乳化剂的 HLB 值为 12~15 (乳化剂由不同比例的 RH-40 和 T80 组成)。基于预实验中石榴皮多酚在不同助乳化剂中的溶解度研究, 初步筛选助乳化剂为 DGME、1,2-丙二醇、乙醇。同时, 初步筛选乳化剂与助乳化剂的质量比 (K_m) 值为 1:1、2:1、3:1、4:1。

恒温 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 将乳化剂与助乳化剂按一定的 K_m 值混合, 分别按照 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 的质量比称取油相与混合乳相于西林瓶中, 磁力搅拌下水逐滴加

入,待体系由浑浊变为澄清透明或有淡蓝色乳光,激光照射有丁达尔现象,表明体系此时已到达临界转相点,记录此时的水相用量。以油相、水相和混合表面活性剂在临界点的各自质量分数,用 Origin 2021 软件绘制伪三元相图,确定微乳区^[31]。以伪三

元相图微乳区域面积大小为指标筛选纳米乳的处方组成,如图 1~4 所示,确定纳米乳的油相为 IPM,乳化剂 HLB 值为 12,助乳化剂为 DGME, K_m 值为 3:1,通过进一步实验得 IPM、RH-40、T80、DGME、水的质量比为 9.00:8.55:5.70:4.75:72.00。通过

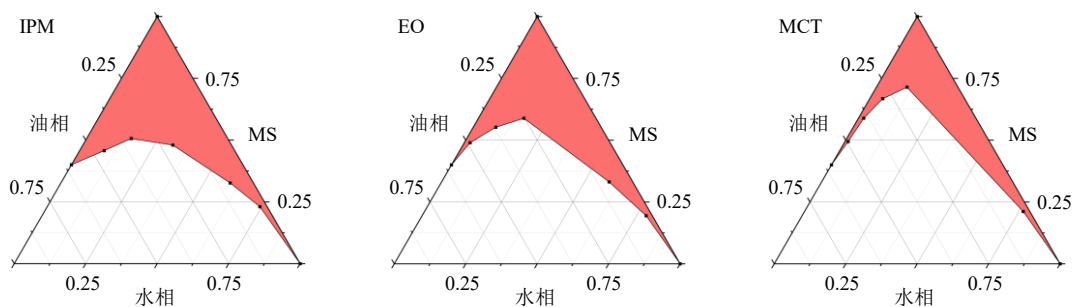


图 1 油相 (IPM、EO、MCT) 筛选的伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram for oil phase (IPM, EO, MCT)

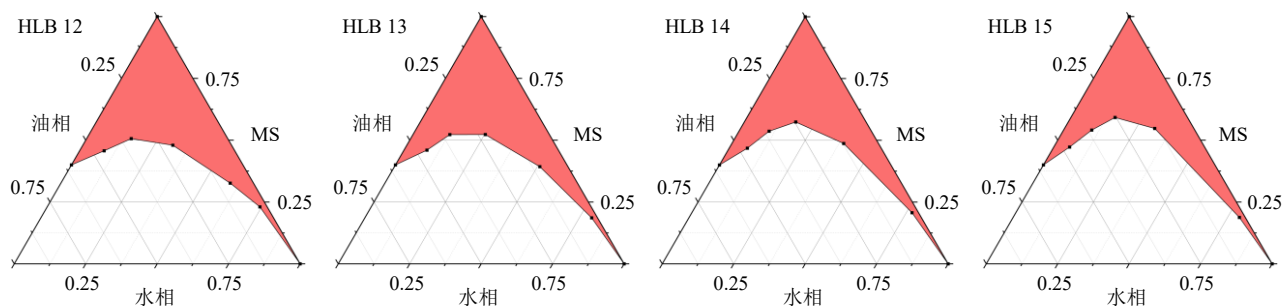


图 2 乳化剂 (HLB 12、13、14、15) 筛选的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram for screening of emulsifiers (HLB 12, 13, 14, 15)

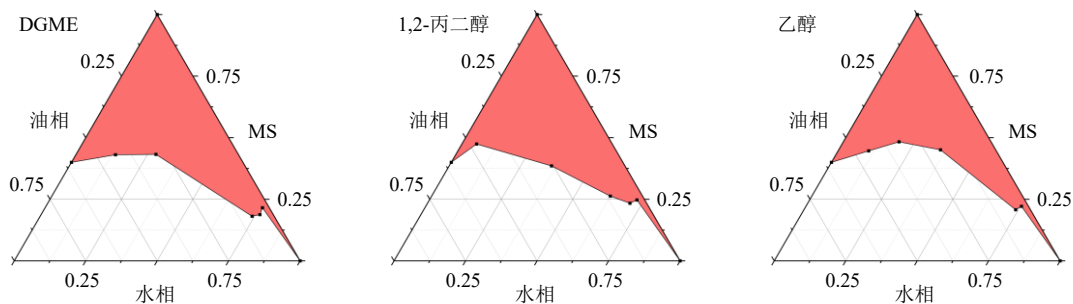


图 3 助乳化剂 (DGME、1,2-丙二醇、乙醇) 筛选的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram for screening of co-emulsifiers (DGME, 1,2-propanediol, ethanol)

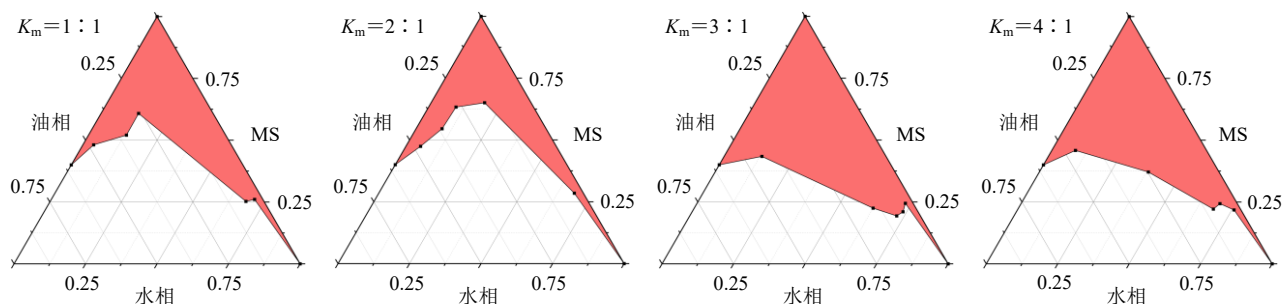


图 4 K_m 值筛选的伪三元相图

Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagram for selection of K_m

纳米乳形态观察和成乳稳定性筛选 OVEO 和 GPP 在纳米乳中的添加量。结果见表 1, 处方 8 所制 OVEO-GPP-NE 澄清透明且具有较好的成乳稳定性。因此, 确定 OVEO-GPP-NE 的最终处方 OVEO、GPP、IPM、RH-40、T80、DGME、水质量比为 2.00 : 3.00 : 7.00 : 8.55 : 5.70 : 4.75 : 69.00。

表 1 载药纳米乳处方考察

Table 1 Prescriptive investigation of drug-loading nanoemulsions

处方	GPP/%	OVEO/%	形态观察	离心稳定性	稀释稳定性
1	4.00	2.50	浑浊分层	—	—
2	4.00	2.00	浑浊分层	—	—
3	4.00	1.50	浑浊分层	—	—
4	3.50	2.50	浑浊分层	—	—
5	3.50	2.00	澄清透明	—	+
6	3.50	1.50	浑浊分层	—	+
7	3.00	2.50	浑浊分层	—	—
8	3.00	2.00	澄清透明	+	+
9	3.00	1.50	澄清透明	+	+

“+”表示具有稳定性; “—”表示不具有稳定性; 表 2、3 同。

“+” indicates stability; “—” indicates instability; same as tables 2, 3.

2.4 纳米乳的理化性质

2.4.1 OVEO-GPP-NE 乳剂类型鉴别 采用染色法进行纳米乳剂类型的鉴别。取等量 OVEO-GPP-NE 于玻璃瓶中, 分别加入适量且等量的甲基蓝 (水溶性染料) 和油红 O (脂溶性染料), 比较 2 种染料在 OVEO-GPP-NE 中的扩散速度。结果显示, 甲基蓝在 OVEO-GPP-NE 中扩散速度更快, 表明 OVEO-GPP-NE 为 O/W 型纳米乳。

2.4.2 宏观和微观形态观察 采用 TEM 对 OVEO-GPP-NE 的微观形态进行表征。取适量 OVEO-GPP-NE, 采用蒸馏水稀释数倍后的滴加到铜网表面, 用滤纸吸去多余液体, 以 2% 磷钨酸溶液 (pH 7.0) 负染 5 min, 滤纸吸去多余液体, 自然晾干后在 TEM 下观察纳米乳的微观形貌。结果如图 5 所示, 纳米乳外观澄清透明、泛淡蓝色乳光、激光灯照射具有丁达尔效应, 且乳滴呈球形, 外观圆整, 粒径在 25 nm 内。

2.4.3 粒径、多分散系数及 ζ 电位 按最终处方平行制备 3 批 OVEO-GPP-NE, 取适量稀释, 在室温下采用纳米粒度仪测定纳米乳的平均粒径、PDI 及 ζ 电位。结果 (图 6) 表明, OVEO-GPP-NE 的平均粒径为 (25.49 ± 0.21) nm, PDI 为 0.43 ± 0.05 , ζ 电位为 (-16.73 ± 0.35) mV。

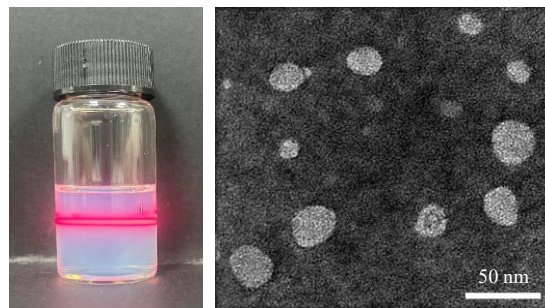


图 5 纳米乳的宏观和微观形态

Fig. 5 Macroscopic and microscopic morphology of nanoemulsions

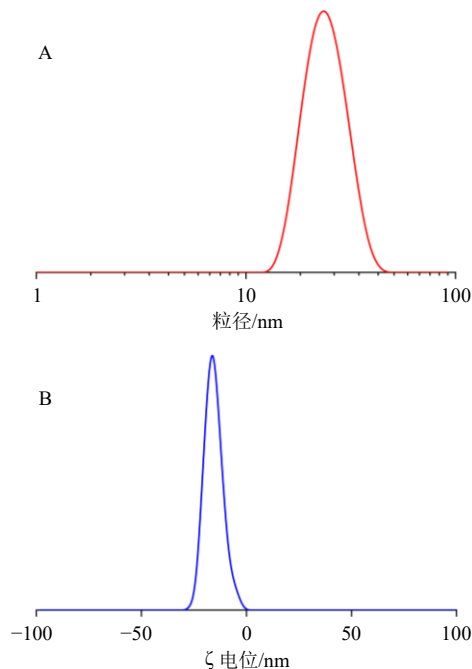


图 6 OVEO-GPP-NE 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位分布 (B)

Fig. 6 Particle size distribution (A) and potential distribution (B) of OVEO-GPP-NE

2.4.4 pH 值 人体健康阴道环境中的 pH 为 3.8~4.2, 呈弱酸性。外用阴道制剂直接作用于阴道黏膜, 容易影响阴道处的 pH 平衡。按最终处方平行制备 3 批 OVEO-GPP-NE, 应用 pH 计于室温条件下分别测定 3 次。pH 测定结果: S1 (3.93、3.94、3.95), S2 (3.90、3.93、3.92), S3 (3.93、3.91、3.90), 即 OVEO-GPP-NE 的 pH 为 3.92 ± 0.02 , 符合阴道制剂的 pH 要求。

2.4.5 稳定性考察

(1) 离心稳定性考察: 按最终处方平行制备 3 批 OVEO-GPP-NE, 在 12 000 r/min 下离心 (离心半径 8.27 cm) 30 min, 观察离心前、后纳米乳的外观性状、粒径及 PDI 的变化。结果见表 2, OVEO-

表 2 OVEO-GPP-NE 的离心稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Centrifugal stability investigation of OVEO-GPP-NE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

离心转速/(r·min ⁻¹)	外观性状	平均粒径/nm	PDI
0	+	25.14±0.46	0.39±0.01
12 000	+	24.52±0.09	0.39±0.00

GPP-NE 离心前、后外观性状保持良好, 未出现明显的相分离、沉淀、破乳等现象, 粒径 (RSD<3%) 和 PDI (RSD<3%) 未发生显著变化, 表明 OVEO-GPP-NE 具有较好的离心稳定性。

(2) 放置稳定性考察: 按最终处方平行制备 3 批 OVEO-GPP-NE, 将装有 OVEO-GPP-NE 的玻璃瓶用锡箔纸包裹避光, 置于 25 °C 条件下放置 3 个月, 观察纳米乳的外观性状、粒径及 PDI 的变化^[26]。结果见表 3, OVEO-GPP-NE 在 25 °C 条件下放置 3 个月, 其外观性状保持良好, 未出现明显的相分离、沉淀、破乳等现象, 粒径 (RSD<3%) 和 PDI 值 (RSD<3%) 未发生显著变化, 表明 OVEO-GPP-NE 在 25 °C、避光条件下放置稳定性良好。

2.5 体外释放

分别精密吸取 5 mL 新鲜制备的 OVEO-GPP-NE, GPP-NE 加入透析袋内, 以 pH 7.4 的 PBS 作

表 3 OVEO-GPP-NE 的放置稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Placement stability investigation of OVEO-GPP-NE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

放置时间/d	外观性状	平均粒径/nm	PDI
0	+	25.49±0.21	0.43±0.05
90	+	26.12±0.42	0.42±0.01

表 4 OVEO-GPP-NE 和 GPP-NE 的体外释放动力学方程拟合结果 ($n=3$)

Table 4 Results of fitting kinetic equations for *in vitro* release of OVEO-GPP-NE and GPP-NE ($n=3$)

模型	模型方程	
	OVEO-GPP-NE	GPP-NE
零级动力学方程	$Q_n=4.435 t-0.720, R^2=0.964 3$	$Q_n=4.284 t+0.707 1, R^2=0.888 9$
一级动力学方程	$Q_n=193.877 (1-e^{0.025 t}), R^2=0.966 1$	$Q_n=78.771 (1-e^{0.085 t}), R^2=0.939 6$
Higuchi 方程	$Q_n=18.275 t^{1/2}-13.260, R^2=0.968 0$	$Q_n=18.170 t^{1/2}-12.126, R^2=0.962 6$
Ritger-peppas 方程	$Q_n=4.289 t^{1.003}, R^2=0.961 0$	$Q_n=6.098 t^{0.853}, R^2=0.911 7$

2.6 透黏膜性能研究

2.6.1 体外透黏膜实验 将离体牛阴道黏膜平铺于加入转子的改良 Franz 扩散池上, 黏膜层朝供给池, 向接收池中加入含 30%乙醇的生理盐水作接收液, 置于智能透皮仪中, 设置参数温度为 (37.0±0.5) °C、转速为 400 r/min, 平衡 20 min。分别吸取 3 mL

为释放介质, 将透析袋置于 37 °C 恒温振荡摇床中, 转速 150 r/min 振荡 48 h, 分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、48 h 时间点吸取透析外液 1 mL, 并相应补充等温同 pH 值 PBS 溶液 1 mL, 按照“2.2”项下方法测定透析外液中总多酚含量, 计算各时间点总多酚的累积释放率并绘制累积释放曲线。

$$Q_n=(C_nV+\sum_{i=1}^{n-1}C_iV_i)/W$$

Q_n 为第 n 个时间点的累积释放率, V 为接收液体积, V_i 为取样体积, C_n 和 C_i 分别为第 n 次和第 i 次取样时接收液中药物浓度, W 为制剂中所含药物质量

结果见图 7, OVEO-GPP-NE 和 GPP-NE 药物释放曲线趋势一致, 均在 12 h 后趋于饱和, 对累积释放曲线方程拟合结果进行分析, OVEO-GPP-NE 和 GPP-NE 在 pH 7.4 的释放介质中的药物释放规律均符合 Higuchi 动力学方程与一级动力学方程相结合的模型, 模型见表 4。

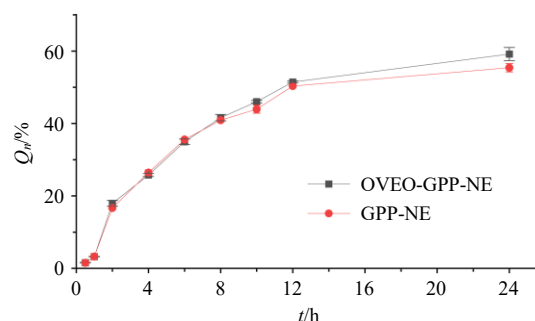


图 7 OVEO-GPP-NE 和 GPP-NE 的体外释放曲线
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 *In vitro* release curve of OVEO-GPP-NE and GPP-NE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的 OVEO-GPP-NE 和 GPP-NE 加入供给池中, 并于 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 h 从接收池中取样 1 mL, 并补充 1 mL 接收液, 按照“2.2”项下方法测定接收液中总多酚含量, 计算各时间点总多酚单位面积的累积渗透量和百分比, 并绘制累积渗透曲线, 结果见图 8。对 Q_n 和 t 进行零

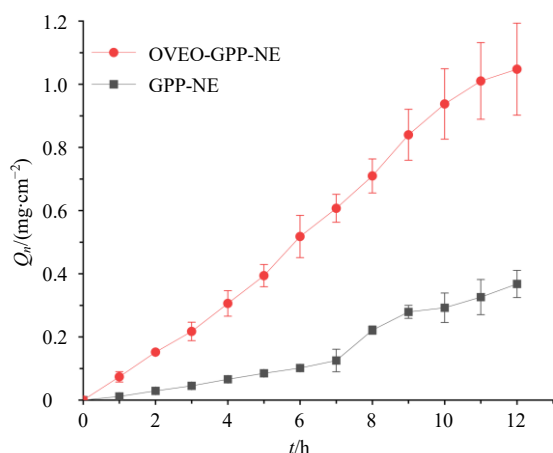


图 8 OVEO-GPP-NE 和 GPP-NE 的体外黏膜渗透曲线
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 *In vitro* mucosal permeation curve of OVEO-GPP-NE and GPP-NE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 5 OVEO-GPP-NE 和 GPP-NE 的体外透黏膜结果 ($n=3$)

Table 5 *In vitro* mucosal permeation results of OVEO-GPP-NE and GPP-NE ($n=3$)

组别	回归方程	R^2	$Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$Q_{12}/\%$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$
OVEO-GPP-NE	$Q_n=95.057t-50.174$	0.993 6	17.07 ± 0.81	35.78 ± 4.99	95.06
GPP-NE	$Q_n=34.321t-60.605$	0.944 2	10.60 ± 0.37	12.77 ± 1.36	34.32

GPP 在黏膜组织中的单位面积滞留量 (Q_s)。

结果见表 5, OVEO-GPP-NE 中 GPP 的黏膜滞留量是 GPP-NE 的 1.61 倍, 表明 OVEO 提升了 GPP 在阴道黏膜处的滞留, 并在阴道黏膜处形成药物储库, 持续释放药物发挥疗效。

2.7 抑菌活性研究

2.7.1 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的测定 本研究针对常见 AV 的病原体, 采用倍比稀释法测定该制剂的 MIC。首先, 在 MHA 平板上挑取单菌落, 接种于 MHB 培养基中, 在 37 °C 恒温振荡摇床中, 转速 150 r/min 培养 16 h 以活化细菌。随后, 采用倍比稀释法分别测定空白纳米乳 (nanoemulsion, NE)、GPP-NE、OVEO-NE (*Origanum vulgare* essential oil nanoemulsion, OVEO-NE) 和 OVEO-GPP-NE 对目标菌株的最小抑菌浓度。研究结果表明, GPP-NE、OVEO-NE 和 OVEO-GPP-NE 均表现出显著的抗菌活性, 其中 OVEO-GPP-NE 的抑菌效果优于 GPP-NE 和 OVEO-NE, 见表 6。

2.7.2 石榴皮多酚与牛至精油联合用药的效果评价 为了探究 GPP 和 OVEO 的联合抑菌效果, 采用棋盘稀释法测定并计算 OVEO 和 GPP 的部分抑菌浓

度方程拟合, 其直线斜率即稳态渗透速率 (J_s)。

$$Q_n=(C_nV+\sum_{i=1}^{n-1}C_iV_i)/S$$

C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), V 为接收池的总体积 (mL), S 为有效扩散面积 (cm^2)

结果见表 5, OVEO-GPP-NE 中石榴皮多酚在第 12 个小时的累积渗透量是 GPP-NE 的 2.8 倍, J_s 是 GPP-NE 的 2.77 倍, 表明 GPP-NE 中添加的 OVEO 可以显著提高 GPP 在阴道黏膜处的渗透效果, 从而有助于提高 GPP 在阴道处的生物利用度。

2.6.2 黏膜滞留 体外透黏膜实验后, 将黏膜组织上残留的样品用生理盐水冲洗干净, 将其剪碎后加入到 1 mL 蒸馏水, 超声 10 min, 冰箱静置过夜, 12 000 r/min 离心 (离心半径 8.27 cm) 5 min 后取上清液, 按照 “2.2” 项下方法测定总多酚含量, 计算

表 6 NE、GPP-NE、OVEO-NE 和 OVEO-GPP-NE 的抑菌活性 ($n=3$)

Table 6 Antimicrobial activity of NE, GPP-NE, OVEO-NE and OVEO-GPP-NE ($n=3$)

样品	MIC/(mg·mL ⁻¹)		
	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
NE	—	—	—
GPP-NE	0.12	0.38	—
OVEO-NE	3.34	0.84	0.10
OVEO-GPP-NE	0.09	0.19	0.38

度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI)。GPP 与 OVEO 对 MRSA 的 FICI 是 0.38, 小于 0.5, 说明 2 药对 MRSA 有协同抑菌作用; GPP 与 OVEO 对 *S. aureus* 的 FICI 是 0.32, 小于 0.5, 说明两药对 *S. aureus* 有协同抑菌作用。与 OVEO-GPP-NE 的抑菌效果优于 GPP-NE 和 OVEO-NE 的结果一致, 见表 7。

3 讨论

阴道作为女性生殖系统的重要组成部分, 具有独特的生理结构和黏膜屏障功能。其表面覆盖的黏液层由黏蛋白、水和电解质组成, 不仅起到润滑和保护作用, 还形成了天然的物理屏障, 限制了药物

表 7 GPP-NE 和 OVEO-NE 联合用药的抑菌活性 ($n=3$)
Table 7 Antimicrobial activity of combination of GPP-NE
and OVEO-NE ($n=3$)

样品	MIC/(mg·mL ⁻¹)			
	MRSA		<i>S. aureus</i>	
GPP-NE	单独	联合	单独	联合
	0.12	0.02	0.38	0.10
OVEO-NE	单独	联合	单独	联合
	3.44	0.83	0.84	0.05
FICI	0.38		0.32	
相互作用	协同作用		协同作用	

的渗透和吸收^[32-34]。

此外，阴道上皮细胞间的紧密连接以及黏液层的快速更新，进一步增加了药物递送的难度，导致传统剂型（如栓剂、片剂、凝胶剂）难以在局部达到有效治疗浓度。同时，传统剂型通常存在药物分布不均、滞留时间短、黏膜渗透性差等问题，限制了其在妇科疾病治疗中的应用效果^[35]。

与传统剂型相比，纳米乳剂在阴道药物递送方面具有独特的优势^[36]。研究表明^[37]，纳米乳剂具有小尺寸的液滴且形状具有一定的形变能力，能够包裹药物免受黏液的相互作用，因此在阴道黏液层具有较高的渗透性，从而提高药物的生物利用度。其次，纳米乳剂具有良好的流动性^[38]，能够均匀分布在阴道黏膜表面，并深入阴道穹窿等较深区域，确保药物在病灶处的广泛覆盖。此外，纳米乳剂可以通过表面修饰或与其他剂型结合延长其在阴道内的滞留时间^[39]，实现药物的缓释效果，减少给药频率，提高患者依从性。

本研究基于“药辅合一”的理念，制备出 OVEO-GPP-NE，可发挥牛至精油在协同抑菌和促渗上的双重功效，并与石榴皮多酚共载后用于阴道药物递送。在纳米乳的制备工艺研究方面，本研究采用温和和低能量的恒温磁力搅拌乳化法，相较于高压均质法和超声波乳化法等高能乳化法，可以避免高能量输入导致的局部升温问题，维持石榴皮多酚及牛至精油在纳米乳中的稳定性。但通过对 OVEO-GPP-NE 的粒径、PDI 和 ζ 电位测定，该工艺所制纳米乳的 PDI 为 0.43 ± 0.05 ，粒径分布较宽，分析其可能是恒温磁力搅拌剪切力较低、纳米乳乳化程度不足所致。而稳定性研究结果显示，该纳米乳体系在动力学上是稳定的，可能是处方中使用的二元乳化剂维持了体系的长期稳定，本研究后续将针对粒径分

布问题，尝试联合乳化等方法，改善纳米乳的分布均匀性。

从纳米乳的体外释放研究结果分析，OVEO-GPP-NE 与 GPP-NE 的体外释放机制一致，且药物释放曲线拟合方程中 Higuchi 方程和一级动力学方程相关系数均较高，说明纳米乳的药物释放机制不仅受扩散控制，也受浓度驱动，这可能是药物在释放过程中受到纳米乳剂油-水界面阻力影响。

MRSA 是 *S. aureus* 的耐药菌株，对多种抗生素耐药，其不仅可能引发 AV，还可能引发多种妇科疾病，如盆腔炎、子宫内膜炎、术后或产后感染等。抑菌活性实验结果表明，OVEO-GPP-NE 对 *S. aureus*、*E. coli* 和 MRSA 具有较好的抑制效果，展现出其用于 AV 治疗的潜力与优势。后期，本研究团队将继续开展 OVEO-GPP-NE 的体内药效学研究，并探索其在皮肤和软组织感染上的应用潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nguyen A T C, Le Nguyen N T, Hoang T T A, *et al.* Aerobic vaginitis in the third trimester and its impact on pregnancy outcomes [J]. *BMC Pregnancy Childb*, 2022, 22(1): 432.
- [2] Okiki P A, Eromosele E S, Ade-Ojo P, *et al.* Occurrence of *mecA* and *blaZ* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with vaginitis among pregnant women in Ado-Ekiti, Nigeria [J]. *New Microbes New Infect*, 2020, 38: 100772.
- [3] 韩姁, 薛凤霞. 妊娠期需氧菌性阴道炎的诊断与治疗 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(10): 994-998.
- [4] 吴楠婷. 止带方联合克林霉素阴道凝胶治疗湿热下注型需氧菌性阴道炎的临床观察 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [5] 唐荣, 魏欣, 马江, 等. 基于 CiteSpace 科学知识图谱分析石榴皮研究现状及热点 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3949-3961.
- [6] Yierfan N, Gulinuer A. New developments in the mechanism of action of pomegranate peel polyphenols [J]. *Int J Front Med*, 2023, 5(3): 67-71.
- [7] Teniente S L, Flores-Gallegos A C, Esparza-González S C, *et al.* Anticancer effect of pomegranate peel polyphenols against cervical cancer [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(1): 127.
- [8] 高凡, 朱明芳, 杨逸璇, 等. 石榴皮多酚乳膏抑制 NLRP3 炎性小体抗炎抗痤疮的机制研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(7): 1003-1009.
- [9] Xu Y F, Guo W P, Luo D L, *et al.* Antibiofilm effects of

- punicalagin against *Staphylococcus aureus* in vitro [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1175912.
- [10] Howell A B, D'Souza D H. The pomegranate: Effects on bacteria and viruses that influence human health [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 606212.
- [11] Silva T C, de Ávila R I, Zara A L S A, et al. Punicalagin triggers ergosterol biosynthesis disruption and cell cycle arrest in *Cryptococcus gattii* and *Candida albicans*: Action mechanisms of punicalagin against yeasts [J]. *Braz J Microbiol*, 2020, 51(4): 1719-1727.
- [12] Colombari B, Tagliazucchi D, Odorici A, et al. Pomegranate extract affects fungal biofilm production: Consumption of phenolic compounds and alteration of fungal autoinducers release [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(21): 14146.
- [13] Jia S, Huang S T, Jimo R, et al. In-situ forming carboxymethyl chitosan hydrogel containing *Paeonia suffruticosa* Andr. leaf extract for mixed infectious vaginitis treatment by reshaping the micro-biota [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 339: 122255.
- [14] 张慧慧, 施洋, 张晓霞, 等. 安石榴苷平衡溶解度与油水分分配系数的测定 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(2): 225-228.
- [15] 张伟, 张慧, 熊婧, 等. 基于 BCS 分类测定药物的平衡溶解度、油水分分配系数及渗透性 [J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(1): 111-117.
- [16] Gholami-Ahangaran M, Ahmadi-Dastgerdi A, Azizi S, et al. Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance [J]. *Vet Med Sci*, 2022, 8(1): 267-288.
- [17] Razack S A, Lee Y, Shin H, et al. Cellulose nanofibrils reinforced chitosan-gelatin based hydrogel loaded with nanoemulsion of oregano essential oil for diabetic wound healing assisted by low level laser therapy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 226: 220-239.
- [18] Avram Ş, Bora L, Vlaia L L, et al. Cutaneous polymeric-micelles-based hydrogel containing *Origanum vulgare* L. essential oil: In vitro release and permeation, angiogenesis, and safety profile in ovo [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(7): 940.
- [19] 赵宁, 王军栋, 关丽, 等. 蛇床子挥发油纳米粒在双骨架复合凝胶基质中的稳定性及其对积雪草总苷透黏膜吸收的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(15): 5061-5069.
- [20] 祝茜茜, 黄森兰, 宋芝超, 等. 热性中药挥发油透皮促渗能力与倍半萜角质层贮库效应的相关性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7742-7750.
- [21] 姚碧金, 罗玺, 张俏菊, 等. 基于“药辅合一”的蜗牛黏液载丹酚酸 B 纳米凝胶制备及其表征 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 6988-6996.
- [22] Singh Y, Meher J G, Raval K, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, 252: 28-49.
- [23] 张倩, 刘芳, 张芮苑, 等. 厚朴挥发油纳米乳凝胶的制备及其对溃疡性结肠炎小鼠的药效评价 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 746-756.
- [24] Zhu W W, Yu A H, Wang W H, et al. Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir [J]. *Int J Pharm*, 2008, 360(1/2): 184-190.
- [25] 彭磊, 封亮, 杨艳君, 等. 基于“药辅合一”理念的 Pickering 乳技术提升儿科用药羚珠散中石菖蒲挥发油热稳定性的研究 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 544-552.
- [26] 邱菁, 徐纯艺, 周玮玲, 等. 基于“药辅合一”理念的当归精油纳米乳递药系统的构建、表征及评价 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1783-1792.
- [27] Zhu J Y, Huang Y L, Zhang J Q, et al. Formulation, preparation and evaluation of nanostructured lipid carrier containing naringin and *Coix* seed oil for anti-tumor application based on “unification of medicines and excipients” [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1481-1491.
- [28] Shaker D S, Ishak R A H, Ghoneim A, et al. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs [J]. *Sci Pharm*, 2019, 87(3): 17.
- [29] 梁达均, 林宇建, 时军, 等. 绿原酸-黄芩苷共载纳米粒鼻腔原位凝胶的制备及增强鼻黏膜免疫作用 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5001-5009.
- [30] Pangen R, Panthi V K, Yoon I S, et al. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of an oral multiple nanoemulsive system for co-delivery of pemetrexed and quercetin [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(3): 158.
- [31] Chen T, Wang Z H, Gong X C, et al. Preparation of compound *Salvia miltiorrhiza*-*Blumea balsamifera* nanoemulsion gel and its effect on hypertrophic scars in the rabbit ear model [J]. *Mol Pharm*, 2024, 21(5): 2298-2314.
- [32] Nayak R, Kar B, Ghosh G, et al. Current trends in chitosan based nanopharmaceuticals for topical vaginal therapies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 193(Pt B): 2140-2152.
- [33] Vanić Ž, Jøraholmen M W, Škalco-Basnet N. Nanomedicines for the topical treatment of vulvovaginal infections: Addressing the challenges of antimicrobial resistance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 178: 113855.
- [34] Valamla B, Thakor P, Phuse R, et al. Engineering drug delivery systems to overcome the vaginal mucosal barrier: Current understanding and research agenda of

- mucoadhesive formulations of vaginal delivery [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 70: 103162.
- [35] Chindamo G, Sapino S, Peira E, *et al.* Recent advances in nanosystems and strategies for vaginal delivery of antimicrobials [J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(2): 311.
- [36] Ho H M, Huang C Y, Cheng Y J, *et al.* Squalene nanoemulsion reinforces mucosal and immunological fingerprints following intravaginal delivery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111799.
- [37] Köllner S, Nardin I, Markt R, *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems: Design of a novel vaginal delivery system for curcumin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 115: 268-275.
- [38] Sakib S, Ashvini K, Avinash G. A review on novel drug delivery system nanoemulsion [J]. *IJCSRR*, 2022, 5(9): 3616-3621.
- [39] Dos Santos M K, Kreutz T, Danielli L J, *et al.* A chitosan hydrogel-thickened nanoemulsion containing *Pelargonium graveolens* essential oil for treatment of vaginal candidiasis [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2020, 56: 101527.
- [40] Koroleva M Y, Yurtov E V. Nanoemulsions: The properties, methods of preparation and promising applications [J]. *Russ Chem Rev*, 2012, 81(1): 21-43.

[责任编辑 郑礼胜]