



Scan online to view this article

## Synthesis, study and characterization of nano niosomal system containing Glycrrizha glabra extract in order to improve its therapeutic effects

Milad Akhlaghi<sup>1</sup>, Marziyeh Ebrahimpour<sup>2</sup>, Kazem Ansari<sup>3</sup>, Fatemeh Parnian<sup>4</sup>, Maryam Zarezadeh Mehrizi<sup>5</sup>, Mohammad Taebpour<sup>6</sup>, Bibi fatemeh Haghilosadat<sup>2\*</sup>

1- Department of clinical biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2- Medical Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

3- Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran

4- Department of Medical Biotechnology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

5- Faculty of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

6- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical sciences, Yazd, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** The use of medical herbs and their extracts because of their low side effects is increasing all over the world. Glycrrizha glabra is one of these plants with proven therapeutic effects, but conventional prescribing of them faces challenges. Using of drug delivery nanocarriers such as Niosome is one of the new strategies to overcome these challenges. The aim of this study was to synthesis and characterization of nano niosomal system containing Glycrrizha glabra extract in order to improve its therapeutic effects.

**Material and methods:** Nanoniosome were synthesized using Tween-60 (70%) and cholesterol (30%) by thin film method and by using inactive method, Glycrrizha glabra extract was loaded into them. Their physico-chemical features were assayed by Zeta sizer, AFM and FTIR and at last the release rate of extract and toxicity of Nanoniosome on normal cells were assayed.

**Results:** Data showed that the synthesized nanoniosomes are anionic with  $-21.2 \pm 1.64$  mV zeta potential, size of  $90.7 \pm 3.6$  nm, dispersion index of 0.53 and 55.36% encapsulation efficiency. The nanoniosomal system presented slow and controlled release of the extract. AFM and FTIR analysis demonstrated that nanoparticles have appropriate morphology and the system does not interact with the extract. The results of MTT assay also approved that the system has not toxicity effects on normal cells.

**Conclusion:** The results indicated that synthesized nanosiosome vesicles because of their appropriate features, could be good carrier for delivering of Glycrrizha glabra extract and thus improve its therapeutic effects.

**Key words:** Niosome, Slow release, Glycrrizha glabra Encapsulation, Cell survival, IAU science.

### Corresponding author:

Medical Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran  
Email: Phaghirosadat@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت  
آنلاین اسکن کنید

## تولید، بررسی و مشخصه‌یابی نانو سامانه نیوزومی حاوی

### عصاره شیرین بیان به منظور بهبود خواص درمانی آن

میلاد اخلاقی<sup>۱</sup>، مرضیه ابراهیم‌پور<sup>۲</sup>، کاظم انصاری<sup>۳</sup>، فاطمه پرنیان<sup>۴</sup>، مریم زارع زاده مهریزی<sup>۵</sup>،  
محمد طائب‌پور<sup>۶</sup>، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات<sup>۷\*</sup>

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۲- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۳- شرکت ریز فناوران فردانگر، مرکز زیست فناوری، پارک علم و فناوری، یزد، ایران

۴- گروه زیست فناوری، پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۵- دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** استفاده از گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها به‌دلیل عوارض جانبی کم در سرتاسر دنیا در حال افزایش است. شیرین بیان از جمله این گیاهان با خواص درمانی ثابت شده است اما استفاده از آن با روش‌های سنتی با چالش‌هایی رو به رو است. استفاده از نانو حامل‌های دارویی مثل نیوزوم از جمله استراتژی‌های نوین برای غلبه بر این چالش‌ها است. هدف از این مطالعه، تولید و بررسی خواص نano نیوزوم‌های حاوی عصاره شیرین بیان به منظور ارتقاء خواص درمانی آن است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه پس از عصاره‌گیری از ریشه گیاه شیرین بیان به روش سوکسله، ویزیکول‌های نیوزومی با استفاده از توئن-۶۰ (۷۰٪) و کلسترول (۳۰٪) به‌روش فیلم نازک سنتز و عصاره شیرین بیان به صورت غیرفعال در آن بارگذاری گردید. سپس با استفاده از دستگاه‌های زتا سایزر، AFM و FTIR به ترتیب اندازه و بار، مورفلوژی و عدم برهمنکش سامانه با نانو ذره تعیین و در آخر میزان رهایش عصاره در دمای ۳۷°C عدم سمت آن بر روی سلول‌های نرمال با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** سامانه سنتز شده، آنیونی با بار سطحی mV ۱/۶۴ ± ۲/۱، اندازه ۳/۶ ± ۰/۷ نانومتر، شاخص پراکندگی ۵۳٪ و میزان درون‌گیری ۳۶٪ است. همچنین سامانه ساخته شده از نوع آهسته رهش و با حداکثر میزان رهایش ۴۸ درصد در ۴۸ ساعت است. بررسی‌های AFM و FTIR نیز نشان می‌دهد که نانوذرات دارای مورفلوژی مناسب است و سامانه با عصاره بر هم کنشی نداشته است. همچنین نتایج تست MTT نشان دهنده عدم سمت سامانه بر روی سلول‌های نرمال بود.

**بحث:** در این مطالعه عصاره شیرین بیان درون حامل‌های نano نیوزومی بارگذاری و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی داده‌ها نشان داد که سامانه آهسته رهش و آنیونی سنتز شده بدون تغییر در ماهیت عصاره و اثر جانبی بر روی سلول‌های نرمال سبب افزایش پایداری عصاره گردیده است.

**نتیجه‌گیری:** سامانه نیوزومی سنتز شده، می‌تواند حامل مناسبی برای عصاره شیرین بیان باشد و سبب افزایش پایداری و درنتیجه بهبود عملکرد آن گردد.

**واژه‌های کلیدی:** نیوزوم، آهسته رهش، انکپسولیشن شیرین بیان، درصد زنده‌مانی، IAU science

### مقدمه

نویسنده مسئول:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد

پست الکترونیکی: Phaghirosadat@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۱

باعث ایجاد خواص درمانی آن مانند خاصیت ضد توموری، ضد التهابی، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی آن می گردد. همچنان مطالعه های زیادی تأثیر شیرین بیان و عصاره آن را بر سلول های دستگاه تنفسی و بهبود بیماری های دستگاه تنفسی تصدیق می کند (۱۹، ۲۰).

امروزه خواص درمانی مناسب و اثرهای زیان‌بار کم داروهای گیاهی، مصرف آن‌ها در سرتاسر دنیا را افزایش داده اما استفاده آن‌ها به‌شکل سابق با مشکلاتی همانند اثرگذاری بر بافت غیر هدف و یا اثرگذاری کم بر بافت هدف و همچنین اکسید شدن برخی مواد مؤثر موجود در عصاره و یا انسانس گیاه روبه رو است که همین امر نیاز به استفاده از نانو حامل‌های دارویی نظیر لیپوزوم و نیوزوم روشن می‌سازد که بتواند این دشواری‌ها را رفع و استفاده از داروهای گیاه را تسهیل بخشد و باعث اثرگذاری بهتر و بهبود عملکرد درمانی گیاهان دارویی شود (۲۰، ۲۱).

نیوزوم برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ در صنعت آرایشی به عنوان یک فاکتور کاربردی معرفی شد و سپس کاربرد آن برای حامل‌های دارو مورد بررسی قرار گرفت. نیوزوم‌ها حامل‌های لیپیدی هستند که از تجمع سورفاکтанت‌های غیریونی در محیط آبی شکل گرفته و ساختار دو لایه‌ایی محصوری را ایجاد می‌کنند و می‌توان به عنوان حامل داروهای چربی‌دوست و آب‌دوست از آن‌ها استفاده شود. در بسیاری از موارد برای تهیه نیوزوم از کلسترول و مشتقان آن استفاده می‌شود. از جمله مزایای این نانو حامل دارویی می‌توان به طراحی آسان، زیست سازگاری، انعطاف‌پذیری و رهایش آهسته دارو اشاره کرد.(۲۲،۲۳).

با توجه به استفاده گستردہ و ثابت شده از عصاره شیرین بیان در درمان بسیاری از بیماری‌ها و همچنین مزایای نیوزوم‌ها به عنوان نانو حامل‌های دارویی، هدف از مطالعه حاضر، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی عصاره شیرین بیان بهروش آب پوشانی لایه نازک و بررسی سمیت نانو نیوزوم‌ها پر روی سلول‌های نرمال بدن انسان است.

گیاهان دارویی در ترکیب‌های شیمیایی خود دارای مقدار مشخصی ماده مؤثره هستند که می‌تواند در پیشگیری، تشخیص، کمک به روند درمانی و در مجموع حفظ حالت فیزیولوژیک طبیعی بدن کمک کنند (۱-۳). طب سنتی و استفاده از آن از ابتدای تاریخ مورد توجه انسان‌ها بوده است. در بسیاری از کشورها و ملیت‌ها با فرهنگ‌های مختلف استفاده از گیاهان برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و افزایش سلامت جامعه رایج است (۴،۵،۶). مطالعه‌های اخیر نتایج سودمند استفاده از گیاهان در درمان و پیش‌گیری بیماری‌هایی همچون دیابت (۷،۸)، آترواسکلروزیس (۹،۱۰)، بیماری‌های عصبی (۱۱) و سرطان (۱۲) را تأیید می‌کند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان از جمله مکانیسم‌های مهم آن‌ها است که در درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌توان از آن استفاده کرد (۱۴،۱۵). مصرف گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها به دلیل قیمت مناسب، عوارض جانبی کم و همچنین فراوانی و در دسترس بودنشان در حال افزایش است (۱۶). همچنین منشاء طبیعی داروهای گیاهی سبب سازگاری بهتر آن‌ها با ارگانیسم‌های زنده از جمله بدن انسان نسبت به داروهای شیمیایی می‌گردد (۱۷). شیرینیان با نام علمی Glycyrrhiza glabra که دارای ریشه یونانی و از دو کلمه glykos به معنای شیرین و rhiza به معنای ریشه مشتق شده است. در هند به آن mulaithi و در خاورمیانه به آن شیرین‌زبان (locarice) می‌گویند. این گیاه از خانواده Fabaceae است که طول آن به یک متر می‌رسد. دارای برگ‌های پنجه‌ای حدود ۱۵-۷ سانتی‌متر با ۹ تا ۱۷ کاسبرگ و با گل‌هایی با طول ۰/۸ تا ۱/۲ سانتی‌متر و رنگ بنفش تا آبی کمرنگ مایل به سفید است. ریشه و ساقه‌های زیرزمینی این گیاه مصرف دارویی دارند. بررسی‌های فتوشیمیایی نشان می‌دهد که گلیسیریزین که یک ترکیب تری‌ترپنوتئید است باعث ایجاد طعم شیرین ریشه این گیاه و همچنین ترکیب‌های فلاونوتئید مثل لیکریتین و ایزولیکریتین سبب ایجاد رنگ زرد این گیاه می‌شوند که همین ترکیب‌های شیمیایی مثل فلاونوتئیدها و ساپونین‌ها

## مواد و روش‌ها

### عصاره‌گیری

رقت‌سازی درون حلال‌های PBS و ایزوپروپیل ساخته شد. سپس طیف جذبی بهوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر Epoch، (آمریکا) در محدود ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر برای تمام رقت‌ها خوانش شد. طول موج مaksimum، طول موجی بود که بیشترین مقدار جذب در آن در تمام رقت‌ها صورت پذیرفته شده بود. سپس با استفاده از جذب‌های بهدست آمده از رقت‌های مختلف در طول موج مaksimum، منحنی استاندار عصاره Glycrrizha glabra در بافر PBS و ایزوپروپیل رسم گردید و با استفاده از نمودار حاصل شده معادله خط عصاره در PBS و ایزوپروپیل محاسبه گردید. آزمایش‌ها در این مرحله با سه بار تکرار انجام شد.

### Glycrrizha glabra

روش آب‌پوشانی لایه نازک (Thin Film hydration) روشی بود که برای سنتز نانو سامانه مورد آزمایش از آن استفاده گردید. بهمنظور ساخت نانو نیوزوم‌ها، ابتدا توئن ۶۰ و کلسترونول به نسبت مولی ۷۰ به ۳۰٪ و عصاره شیرین‌بیان با غلظت ۲ mg/mL در کلروفرم حل گردیدند و سپس محلول حاصل در دمای ۴۵°C بر روی روتاری (Heidolph، آلمان) با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد تا فیلم نازک خشک تحت شرایط خلاء ساخته شود. هیدراتاسیون فیلم نازک لیبیدی بهمنظور ایجاد نیوزوم‌های کروی حاوی عصاره، در دمای ۶۰°C و بهمدت ۱ ساعت با اضافه کردن بافر PBS به نسبت ۱x انجام گرفت. کاهش اندازه نانوذره‌ها نیز بهوسیله سونیکیت حمامی با توان اولتراسونیک ۱۰۰ وات و فرکانس ۲۸ ± ۰.۵ کیلوهرتز در مدت زمان یک ساعت انجام گرفت.<sup>(۲۴)</sup>

### بررسی میزان درون‌گیری سامانه

برای بررسی میزان عصاره بارگذاری شده ابتدا عصاره‌های بارگذاری نشده و آزاد در محلول، بهوسیله روش کیسه دیالیز

پس از تهیه گیاه شیرین‌بیان و قبل از عصاره‌گیری، نوع و گونه گیاهی آن به تأیید کارشناسان حوزه گیاه‌شناسی داشگاه یزد رسید. عصاره‌گیری از ریشه گیاه شیرین‌بیان انجام گرفت که برای این‌منظور، ابتدا ریشه گیاه در درمای محیط در سایه و به دور از نور خورشید خشک گردید و سپس با استفاده از آسیاب برقی، پودر آن بهدست آمد. به‌منظور عصاره‌گیری از روش سوکسله استفاده گردید. سوکسله از رایج‌ترین روش‌های عصاره‌گیری در آزمایشگاه‌ها است. دستگاه سوکسله شامل ۴ قسمت عمده گرم‌کن، بالن، محفظه استخراج و کندانسور است. ابتدا ۵۰ گرم از پودر حاصل شده داخل محفظه کارتوش فشرده شد و سپس درون ستون سوکسله قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ در درون بالن ریخته و سوکسله به آن متصل گردید، در آخر با نصب کندانسور و ورودی و خروجی آب عملیات عصاره‌گیری انجام گرفت. بعد از کامل شدن سیکل ششم، عصاره درون بالن را توسط کاغذ واتمن صاف گردید و بهمنظور خشک شدن و تبخیر حلال، عصاره درون ظرف‌های شیشه‌ایی و به دور از نور خورشید در دمای محیط قرار گرفت. در آخر عصاره بهدست آمده وزن شد و تا زمان استفاده درون یخچال قرار گرفت.

تعیین طول موج مaksimum و رسم منحنی استاندارد از روش اسپکتروفوتومتری بهمنظور تعیین طول موج مaksimum عصاره شیرین‌بیان استفاده گردید. در این روش ابتدا محلول استوک عصاره شیرین‌بیان با غلظت ۱ mg/mL در حلال PBS (Merck، آمریکا) و ایزوپروپیل (Sigma، آلمان) ساخته شد. سپس با استفاده از محلول استوک، غلظت‌های مختلفی از عصاره (۵۰۰، ۶۲۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از روش‌های

ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی به کار می‌رود (۲۵). در این روش، از عصاره شیرین‌بیان، نیوزومهای فاقد عصاره و سامانه نیوزومی حاوی عصاره شیرین‌بیان استفاده شد و طیف FTIR هر سه نمونه به صورت جداگانه به دست آمد. برای این منظور ابتدا مقدار ۱ میلی‌گرم از هر نمونه با نسبت ۱ به ۱۰۰ را به نمک پاتاسیم برماید (KBr) اضافه و در یک هاون پودر و به وسیله دستگاه پرس هیدرولیک و تحت فشار ۵ تا ۸ تن بر سانتی‌متر مکعب فشرده گردید (روش قرص-سازی) و با ضخامتی در حدود ۰/۱ سانتی‌متر بر روی صفحه‌ای قرار گرفت و هر نمونه در طول موج  $4000\text{ cm}^{-1}$  ۴۰۰ توسط دستگاه FT-IR (Bruker، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت و گروههای عاملی آن شناسایی گردید.

پیررسی مورفولوژی نانوسامانه سنتز شده

برای بررسی مورفولوژی و به دست آوردن شکل و ساختار نانوسامانه سنتز شده نیز از مشاهده میکروسکوپی استفاده شد. میکروسکوپ انرژی اتمی (AFM)، میکروسکوپ مورد استفاده در این مطالعه بود که با آن مورفولوژی نانوذرات از نظر زیری، شکل و توده‌ای بودن بررسی گردید. میکروسکوپ نیروی اتمی ابزاری برای مشاهده نمونه‌ها با ابعاد نانومتری و بررسی توپوگرافی سطحی آن‌ها است. این میکروسکوپ نمونه‌ها را با یک سوزن تیز به طول ۲ میکرون و قطر کمتر از ۱۰ نانومتر مورد آنالیز قرار داد.<sup>(۲۶)</sup>

بی دسی، سایز و پتانسیل ذتای ذرات سنتز شده

برای اندازه‌گیری قطر نانو ذره‌ها و بار سطحی (پتانسیل زتا) آن‌ها از دستگاه زتا سایزر (Malvern Instrument مدل Nano zeta sizer ES، انگلستان) استفاده گردید. اندازه-گیری نانو نیوزوم‌ها در یک زاویه  $90^\circ$  درجه و تابش نور لیزر با طول موج  $657\text{ nm}$  در دمای  $25^\circ\text{C}$  صورت گرفت. همچنین اندازه‌گیری نمونه‌ها در  $5^\circ$  مرتبه و هر مرتبه با مدت زمان  $30\text{ }\mu\text{s}$  ثانیه انجام گردید. جهت تعیین اندازه از  $600\text{ }\mu\text{L}$  نمونه با غلظت  $0.5\text{ mg/mL}$  تا  $0.1\text{ mg/mL}$  استفاده شد.

تعیین پتانسیل زتا/بار سطحی نانو نیوزوم‌ها در دمای اتاق با

دماي  $^{\circ}\text{C}$  ۴ در درون بشرى حاوی بافر فسفالين سالين حذف گردیدند. اساس روش کيسه دیاليز از خصوصيت های غشاء های نيمه تراوا که بين محلول و بافر دیاليز قرار می-  
گيرد نشأت می گيرد. اين غشاها که بهطور معمول از جنس سلولزی دارند داراي حفره های هستند که اجازه عبور به مولکول های کوچک تر را می دهند و از عبور مولکول های بزرگ جلوگیری می کنند. بهمنظور پرورده کردن کيسه دیاليز، ابتدا کيسه دیاليز به مدت ۱۰ دقيقه با بافر کيسه دیاليز ( ۱ mM EDTA، سديم بي كربنات .٪ ۲ ) جوشانيده شد ( دما  $^{\circ}\text{C}$  ۸۰ ). در مرحله بعد برای حذف مواد بافر، کيسه دیاليز به مدت ۱۰ دقيقه دیگر در آب مقطر جوشانده شد. سپس، نيو زوم های حاوی عصاره به نسبت های ۱ به ۱۰، ۱۰ به ۱ و ۱ به ۴۰ با ايزوپروپيل مخلوط شدند تا ديواره ليبيدي آن ها شکسته شود و عصاره محبوس در آن ها آزاد گردد. در آخر ميزان جدب عصاره آزاد شده در رقت های ذكر شده و در طول موج ماكسيموم تعين شده به وسيله دستگاه اسپكتروفوتومتر بدست آيد و با استفاده از منحنى استاندارد عصاره در ايزوپروپيل و رابطه ۱، درصد بارگذاري عصاره در نيو زوم ها تعين گردید ( ۲۱ ).

### رابطه (۱)

$$\frac{\text{مقدار عصاره شده}}{\text{مقدار عصاره اولیه}} \times 100 = \text{درصد عصاره بارگذاری شده}$$

بررسی عدم بر هم کنش سامانه به عصاره شیرین بیان برای بررسی تعامل و عدم بر هم کنش میان سامانه نیوزومی سنتز شده با عصاره شیرین بیان از تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده گردید. طیف‌سنجی مادون قرمز یا FTIR بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش به عنوان روشی پرقدرت و توسعه یافته برای تعیین

تست MTT این سلول‌ها برای ۴۸ ساعت در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت داده شدند، بعد از رسیدن تعداد سلول‌ها بهمیزان مورد نیاز ( $10^4 \times 10$ )، سلول‌ها برای ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف ( $1,000, 100, 10, 1, 0.1$  mg/mL) از نانو سامانه لیپونیوزومی فاقد عصاره تیمار شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمک MTT با غلظت ۰/۵ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و انکوباسیون ۴ ساعت انجام گرفت. سپس مایع رویی خارج و بهمنظر حذف کریستال‌های فورمازون ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید و ۳۰ دقیقه ریگر انکوباسیون انجام گرفت. بعد از آن جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (synergy HTX, Bio Tek, USA) خوانده و میزان زنده-مانی سلول‌ها با استفاده از رابطه ۲ به محاسبه گردید.

#### رابطه (۲)

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \times 100$$

#### یافته‌ها

##### تعیین طول موج ماکسیموم و نمودار استاندارد

بررسی‌های طیف جذبی عصاره شیرین‌بیان در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر نشان داد که بیشترین مقدار جذب مشترک در غلظت‌های مختلف عصاره ریشه این گیاه در طول موج ۳۳۰ نانومتر است (نمودار ۱). سپس با استفاده از این طول موج نمودارهای استاندارد شیرین‌بیان در بافرهای PBS و ایزوپروپانول رسم گردید. نمودار استاندارد شیرین‌بیان در بافر PBS (نمودار ۲) خطی راست با معادله  $Y=0.0012X-0.0053$  و ضریب تعیین ( $R^2$ ) ۰/۹۹۹ است. این نمودار در بافر ایزوپروپانول نیز خطی راست با معادله  $Y=0.0017X-0.0067$  و ضریب تعیین ۰/۹۹۹ است.

##### راندمان انکپسولاسیون سامانه نیوزومی و بررسی الگوی رهایش دارو

میزان انکپسولاسیون عصاره شیرین‌بیان درون سامانه نیوزومی سنتز شده با توجه به نمودار استاندارد شیرین‌بیان

استفاده از  $\mu\text{L}$  ۱۵۰۰ نمونه با غلظت  $0/1\text{ mg/mL}$  تعیین گردید و برای جلوگیری از آلوهه شدن ذرات با گرد و غبار که تأثیر بهسزایی در نتایج ایجاد می‌کند نمونه‌ها بلافالسه بعد از آماده‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش‌ها در این مرحله نیز با ۳ بار تکرار صورت گرفت.

##### تعیین الگوی رهایش عصاره شیرین‌بیان از سامانه نیوزومی

روندهایش عصاره از سامانه سنتز شده با استفاده از روش کیسه دیالیز مورد بررسی قرار گرفت. در این روش مقدار  $20\text{ ml}$  از لیپوزوم‌های حاوی عصاره درون کیسه دیالیز قرار گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت  $200\text{ mL}$  بافر PBS  $\text{pH}=7/4$  و در دمای  $37^\circ\text{C}$  (نسبت ۱ به ۱۰) میزان از بافر (۱) به فواصل زمانی منظم و متناوب ( $0/5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24$  و  $48$  ساعت) مقدار  $1\text{ mL}$  از بافر PBS اطراف کیسه دیالیز برداشته و به همان مقدار ( $1\text{ mL}$ ) بافر جدید با دما و pH یکسان اضافه گردید سپس جذب نمونه‌های برداشت شده با استفاده از دستگاه اسپکترومتری در طول موج ماکسیموم تعیین شده، خوانده و نمودار رهایش عصاره از نانو ذره‌ها با استفاده از منحنی استاندار عصاره در بافر PBS رسم گردید.

##### سنجه سمتیت سامانه بر روی سلول‌های نرم‌مال

برای سنجه میزان سمتیت سامانه در این مطالعه از روش MTT استفاده گردید. آزمون MTT که یک آزمون بر پایه رنگ‌سنجدی است. اساس این آزمون احیاء کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم (فرمول شیمیائی  $3-[4,5-\text{dimethylthiazol}-2\text{-yl}]-2,5\text{-diphenyl-tetrazolium bromide}$  (MTT)) توسط رودکتازهای میتوکندریایی سلول‌های زنده است. سلول‌های نرم‌مال رده‌ی فیبروبلاست پوست مطالعه، از نوع سلول‌های نرم‌مال رده‌ی انسان (HFF) بودند که از انتستیتوی پاستور تهران تهییه گردیدند و طبق پروتکل‌های کشت سلولی در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) در دمای  $37^\circ\text{C}$  و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند. برای انجام

۱۲۱۳ که مرتبط با گروه عاملی  $P=O$  است را در ساختمان عصاره ریشه گیاه شیرین‌بیان نشان می‌دهد. با بررسی و مقایسه پیک‌های موجود در طیف FTIR نانو نیوزومهای حاوی عصاره شیرین‌بیان (شکل C-۳) و نانو نیوزومهای فاقد عصاره (شکل B-۳) مشاهده شد که تغییرهای جزئی در پیک‌های مربوط به سامانه حاوی عصاره نسبت به سامانه فاقد عصاره اتفاق افتاده که نشان‌دهنده ورود عصاره به درون سامانه است. برای مثال پیک‌های شاخص موجود در نانو نیوزومهای فاقد عصاره مثل پیک نواحی  $3445\text{ cm}^{-1}$  و  $2925\text{ cm}^{-1}$  بعد از ورود عصاره به سامانه باشد که تغییر به ترتیب به نواحی  $3437\text{ cm}^{-1}$ ،  $2922\text{ cm}^{-1}$  و  $1622\text{ cm}^{-1}$  می‌باشد. همچنین با توجه به این که در طیف FTIR سامانه حاوی عصاره پیکی جدیدی اضافه نشده و پیکی هم ناپدید نگشته می‌توان به این نتیجه رسید که میان سامانه و عصاره بر هم‌کنش شیمیایی رخ نداده و هر دو ماهیت خود را حفظ و از تغییر به دور مانده‌اند.

تصویربرداری با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) با توجه به تصاویر به دست آمده (شکل ۴) از نانوذرات به وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی می‌توان به این نتیجه رسید که نیوزومها یکنواخت، کروی شکل و متراکم هستند که این خود نشان از مورفولوژی مناسب این نانوذرات جهت به کارگیری آن‌ها به عنوان حاملاً های دارویی است.

بررسی اثر سمیت نانو نیوزومهای سنتز شده بر روی سلول‌های رده HFF بعد از تیمار سلول‌های رده HFF با نیوزومهای فاقد عصاره به منظور سنجش میزان سمیت این نانو ذره‌ها تست MTT انجام گرفت. نتایج این تست بعد از ۴۸ ساعت تأثیر نیوزوم‌ها نشان داد که سامانه سنتز شده دارای سمیت ناچیزی بر روی سلول‌های نرمال است چرا که بعد از تیمار سلول‌ها با سامانه نیوزومی فاقد دارو با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان زنده‌مانی سلول‌ها به

در بافر ایزوپروپیل و رابطه ۱ محسبه گردید، که مقدار عددی آن برابر با  $۵۵/۳۶$  درصد بود. همچنین با استفاده از نمودار استاندارد شیرین بیان در بافر PBS، الگوی رهایش عصاره آن از سامانه در زمان‌های مختلف و تحت شرایط فیزیولوژیک بدن تعیین و رسم گردید (نمودار ۴). بررسی الگوی رهایش عصاره نشان داد که سامانه دارای رهایش آهسته و نیمه هدفمند است و بیشترین میزان رهایش در ۴۸ ساعت برابر با  $۵۷/۳$  درصد است. همچنین از نمودار به-دست آمده این گونه نتیجه‌گیری می‌شود که رهایش عصاره از سامانه در دو فاز صورت می‌گیرد. فاز اول که رهایش سریع‌تر است و در ۱۰ ساعت اول اتفاق می‌افتد بهدلیل اختلاف غلظت زیاد عصاره در سامانه با محیط پیرامون آن است و فاز دوم که شبیه نمودار کاهش یافته و بهدلیل کاهش این اختلاف غلظت ایجاد می‌شود.

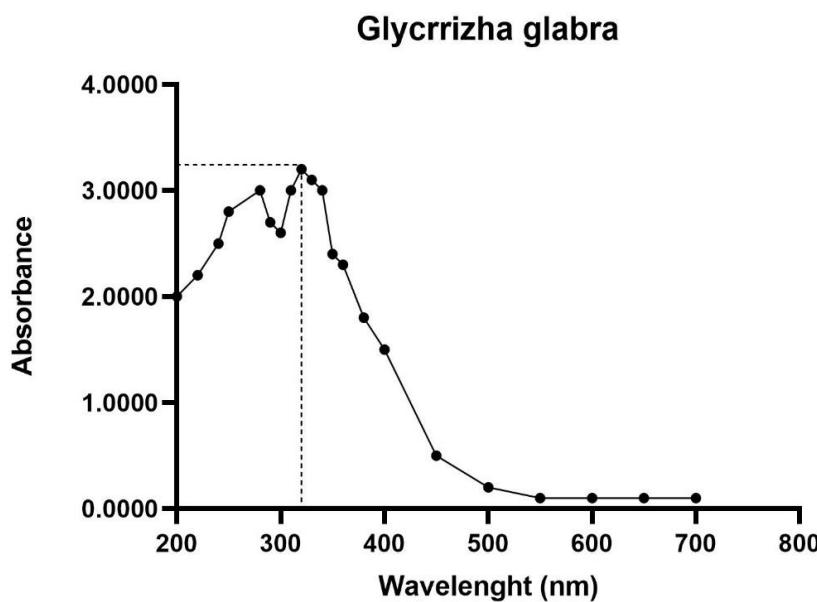
بررسی اندازه و میزان بار سطحی سامانه نیوزومی مطابق با شکل ۱، بررسی نتایج حاصل از دستگاه زتا سایزر نشان داد که سایز ذرات نیوزومی حاوی عصاره شیرین بیان برابر با  $3/6 \pm 7/0$  نانومتر و شاخص پراکندگی آن برابر با  $5/3 \pm 0/5$  بود. همچنین با توجه به شکل ۲، پتانسیل زتابی سامانه سنتز شده برابر با  $mV_{1/64} \pm 2/1/2$  است که نشان دهنده این است که سامانه از نوع آنیونی و دارای بار منفی است، که همین امر سبب کاهش سمت سامانه می‌گردد.

بررسی طیف‌های مادون قرمز حاصل از تکنیک FTIR از تکنیک FTIR به منظور سنجش عدم بر هم‌کنش سامانه نیوزومی سنتز شده با عصاره شیرین‌بیان استفاده گردید. تصاویر به دست آمده از طیف FTIR عصاره شیرین‌بیان (شکل ۳-A) وجود پیک‌های شاخصی هم‌چون پیک پهن موجود در ناحیه  $cm^{-1}$  ۳۳۰۰ که نشان‌دهنده گروه عاملی OH، پیک موجود در ناحیه  $cm^{-1}$  ۲۹۲۴ که مربوط به ارتعاش کششی C-H، پیک ناحیه  $cm^{-1}$  ۱۷۰۰ که مشخصه ارتعاش کششی C=O، پیک ناحیه  $cm^{-1}$  ۱۴۶۴ که نشان‌دهنده ارتعاش خمشی  $CH_2$  و پیک ناحیه  $cm^{-1}$

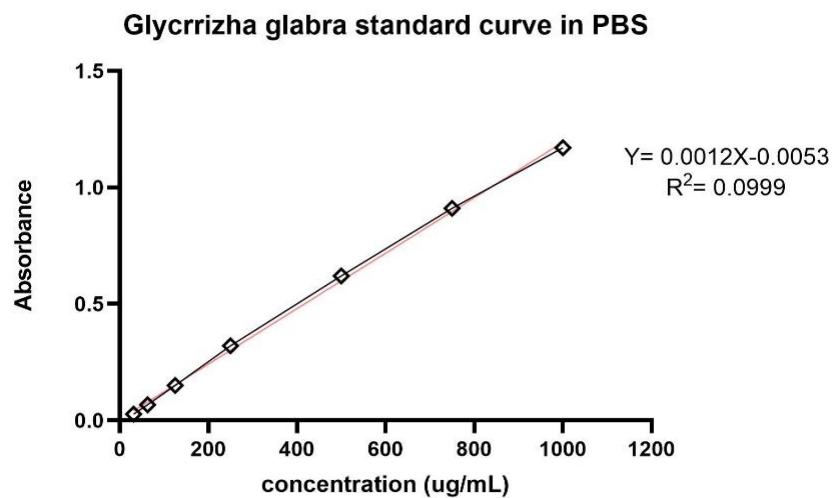
ترتیب برابر بود با ۹۵، ۹۶، ۹۸، ۹۹ و ۲۰۰ درصد که نشان از

سمیت پایین سامانه دارد (نمودار ۵).

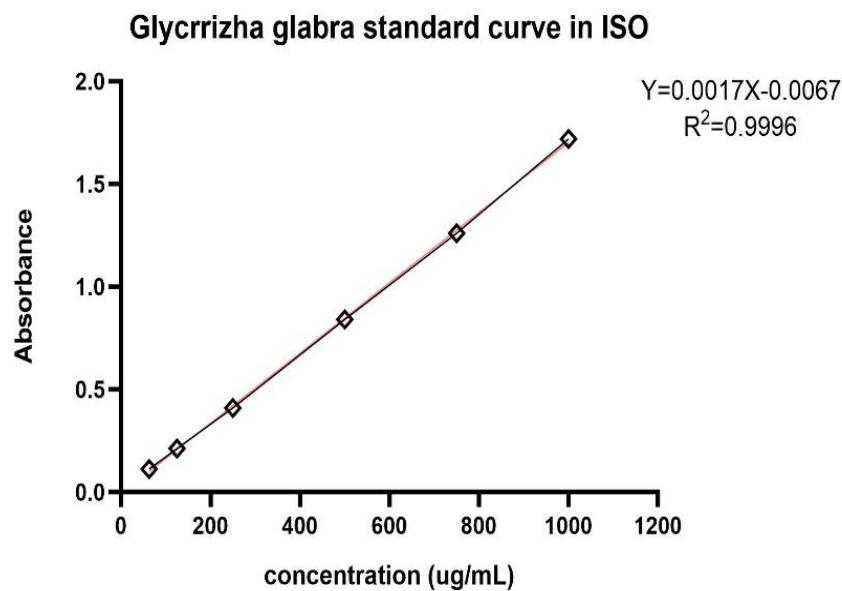
نمودار ۱: طیف جذبی حاصل از عصاره شیرین‌بیان در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر. بیشترین مقدار جذب در طول موج ۳۲۰ nm است.



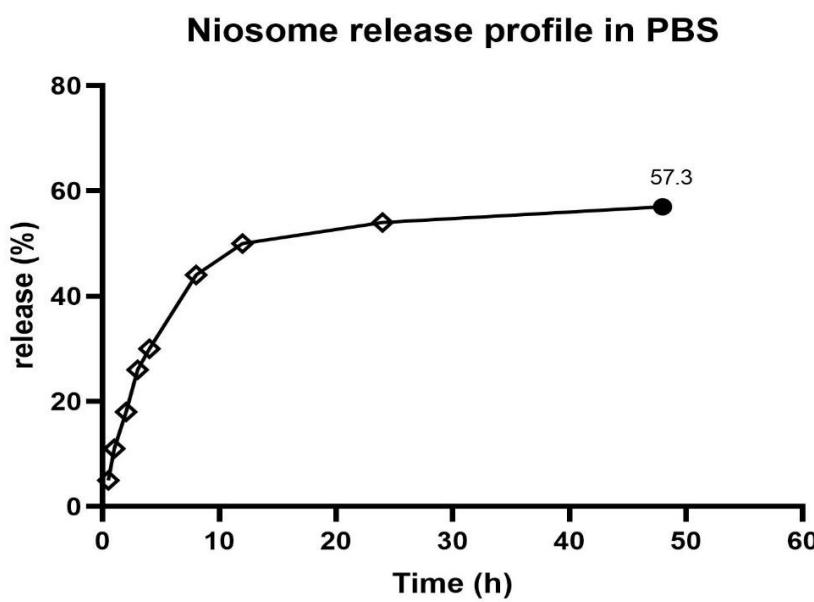
نمودار ۲: منحنی استاندار عصاره شیرین‌بیان در بافر فسفات سالین که حاصل از بررسی طیف جذبی غلظت‌های مختلف از عصاره در طول موج مکسیسیموم آن است.

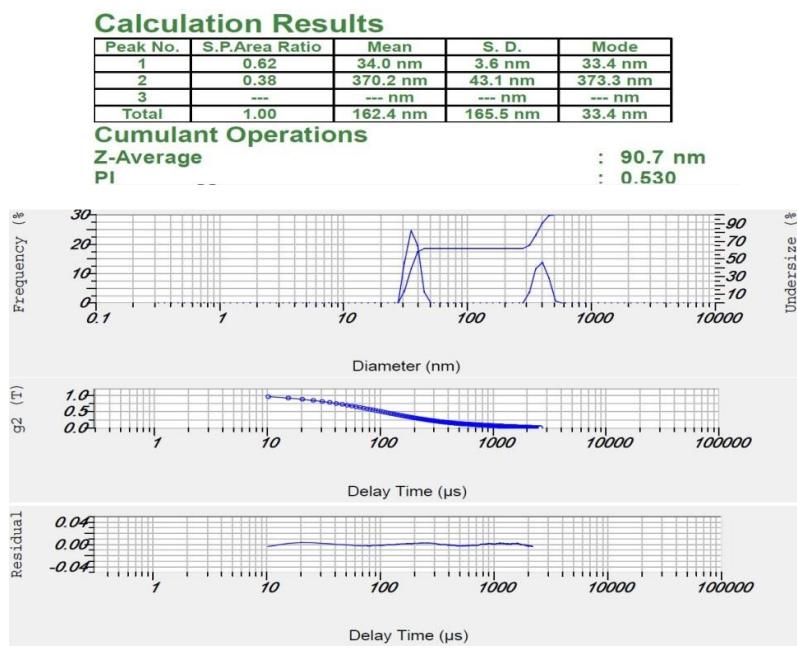


نمودار ۳: منحنی استاندار عصاره شیرین‌بیان در بافر ایزوپروپیل که حاصل از بررسی طیف جذبی غلظت‌های مختلف از عصاره در طول موج ماکسیمموم آن است.

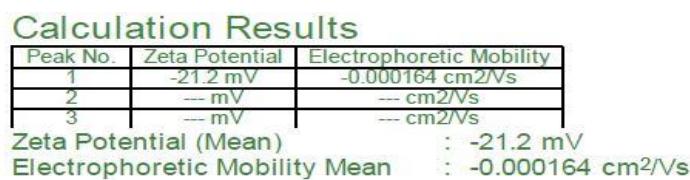
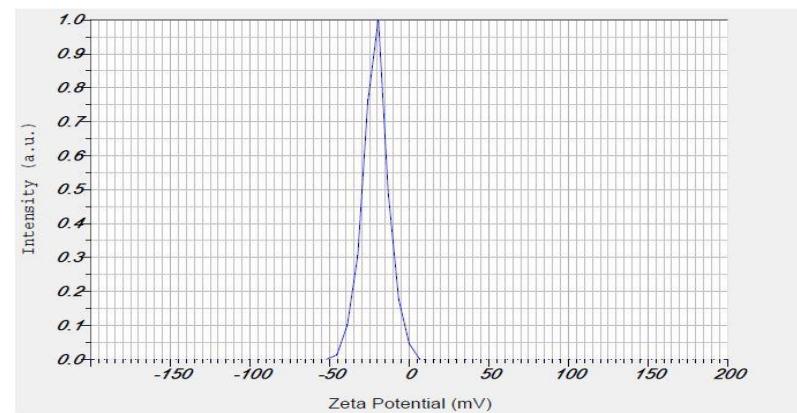


نمودار ۴: الگوی رهایش عصاره شیرین‌بیان از سامانه لیپوزومی طی ۴۸ ساعت. نمودار نشان‌دهنده آهسته رهش بودن سامانه است. همچنین بیشترین میزان رهایش عصاره از سامانه  $57/3$  درصد در طول ۴۸ ساعت است.

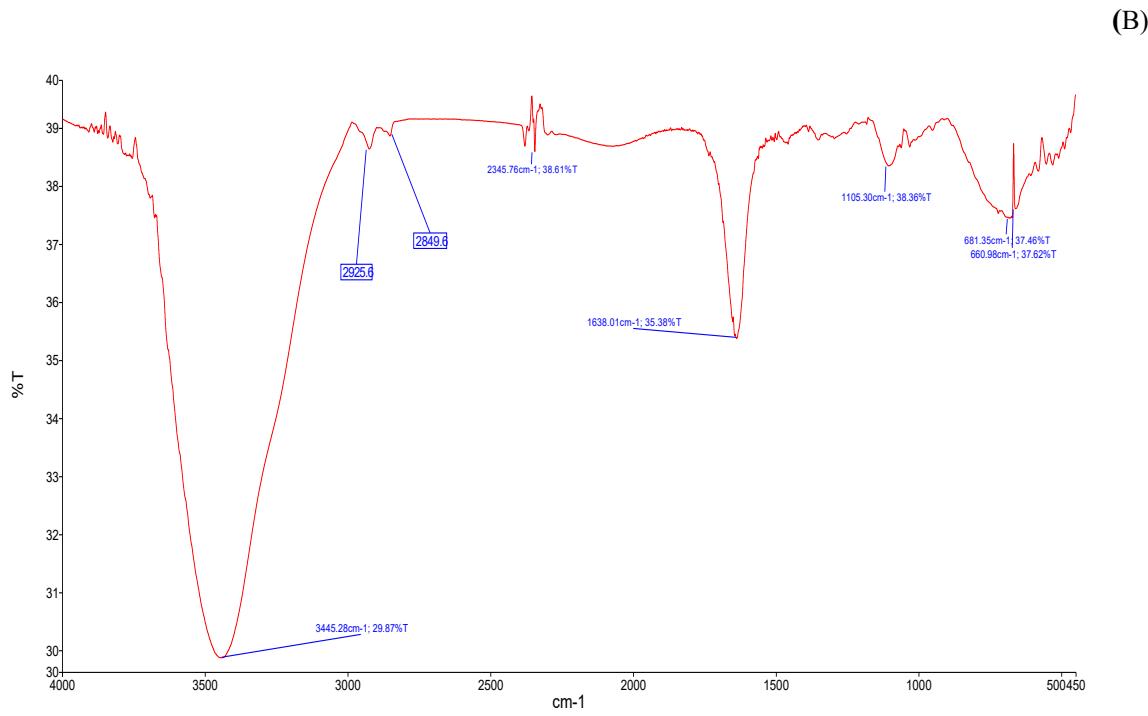
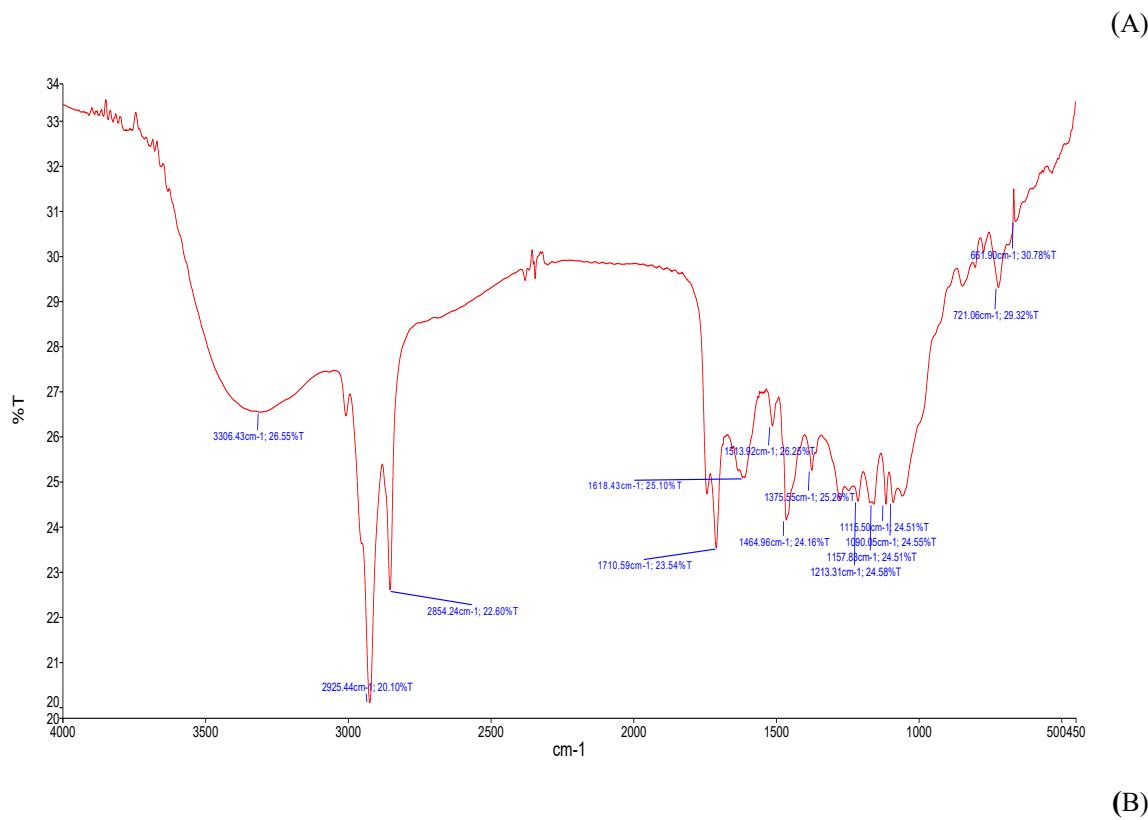


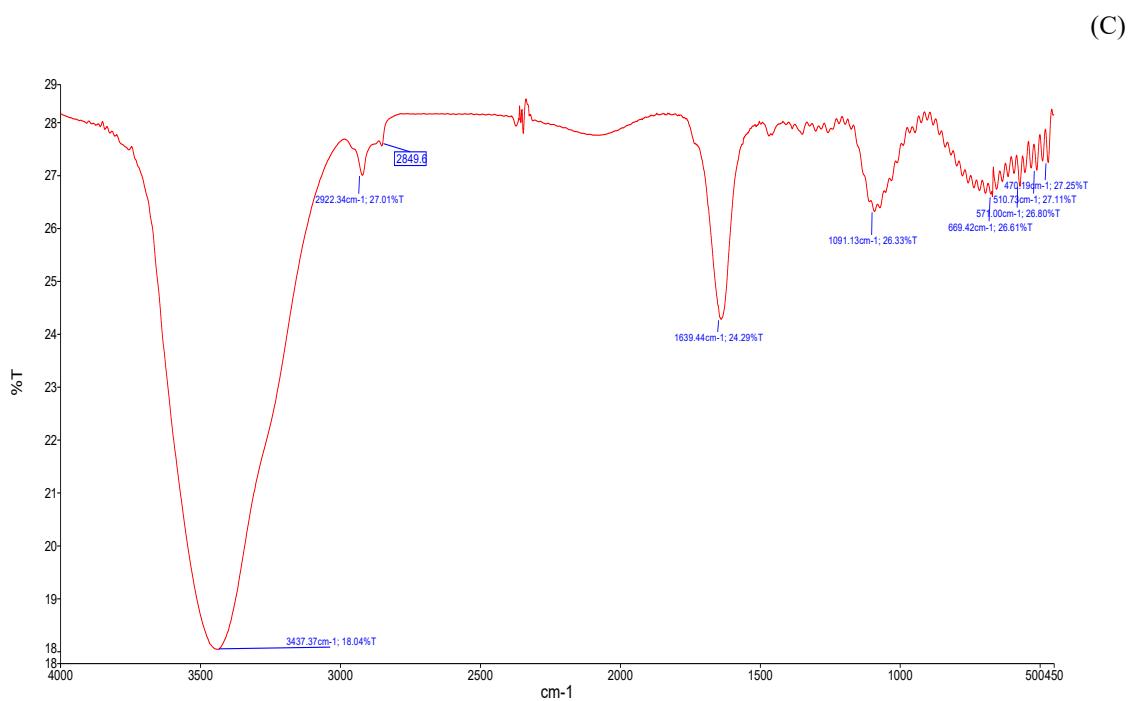


شکل ۱- داده‌های حاصل از تجزیه سامانه نیوزومی بهوسیله دستگاه زتا سایزر. براساس این داده‌ها میانگین اندازه نانوذرات برابر با ۹۰/۷ نانومتر و شاخص پراکندگی آن‌ها برابر با ۰/۵۳۰ است.

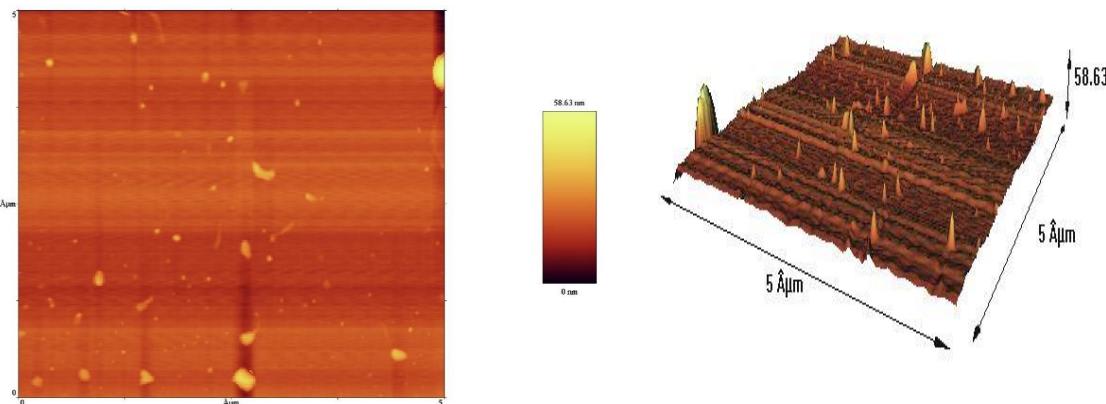


شکل ۲- نمایش میانگین پتانسیل زتای ذرات بر حسب میلیولت. داده‌ها نشان می‌دهد پتانسیل زتای نانو ذرات برابر با  $1/64 \pm 1/2$  است.





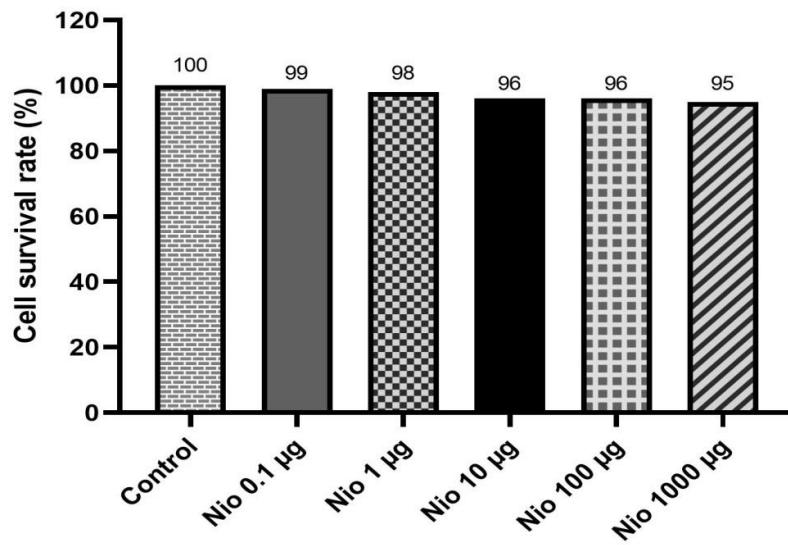
شکل ۳ - طیف‌های مادون قرمز حاصل از آنالیز بهروش طیف سنجی مادون قرمز. (A) عصاره گیاه شیرین‌بیان (B) سامانه نیوزومی فاقد عصاره. (C) سامانه نیوزومی حامل عصاره. با توجه به حضور پیک‌های شاخص نمودار A و B در نمودار C می‌توان دریافت عصاره و سامانه سنتز شده با هم بر هم کنش ندارند.



شکل ۴- تصاویر حاصل از عکسبرداری توسط میکروسکوپ نیتروی اتمی. عکس‌ها نشان‌دهنده مورفلوژی مناسب نانو نیوزوم‌ها است. نانو ذرات دارای شکلی کروی و سطحی صاف هستند.

نمودار ۴: نتایج حاصل از تست MTT بر روی رده سلولی HFF بعد از ۴۸ ساعت تیمار با سامانه نانو نیوزومی فاقد عصاره در غلظت‌های مختلف. داده‌ها نشان از عدم سمیت سامانه سنتز شده بر روی سلول‌های نرمال دارد.

### MTT assay- 48H- HFF cell line



Majdizadeh بررسی‌های DLS حاکی از این بود که اندازه این نانوذرات  $90/7\text{ nm}$  و شاخص پراکندگی آن نیز برابر با  $53/0$  بود. هم‌چنین مشخص شد که نانوسامانه سنتز شده از نوع آبیونی (بار منفی) بوده و پتانسیل زتای آن نیز برابر با  $1/64\text{ mV} \pm 21/2$  بود که این بار منفی با جلوگیری از تجمع و رسوب نانوذرات سبب کاهش سمیت سامانه و بهبود عملکرد آن می‌گردد (۲۸). بررسی‌های طیف FTIR نیز بر هم‌کنش سامانه سنتز شده با عصاره شیرین- بیان را رد و تأییدی بر حفظ ماهیت عصاره و سامانه بعد از بارگذاری آن بود. نتایج حاصل از AFM هم مورفو‌لوژی مناسب نانوذرات را تأیید کرد و نشان داد که ذرات دارای شکلی کروی، یکنواخت و صاف هستند که این بهنوبه خود می‌تواند مهر تأییدی برای استفاده از این سامانه به عنوان نانوحامل دارویی باشد. عدم سمیت سامانه بر روی سلول‌های نرمال نیز با توجه به نتایج تست MTT تأیید گشت.

### بحث

در این مطالعه، نانو سامانه نیوزومی حاوی عصاره شیرین‌بیان تهیه گردید. بررسی نتایج فیزیکوشیمیایی نشان داد که سامانه سنتز شده دارای راندمان انکپسولاسیون  $53/36\%$  و رهایش آهسته و نیمه هدفمند (کنترل شده) است و حداکثر میزان رهایش عصاره از سامانه در طول ۴۸ ساعت برابر با  $57/3\%$  بود. راندمان انکپسولاسیون از پارامترهای در نانوسامانه‌ها هستند که به عوامل مهمی از جمله، اندازه ذرات، ماهیت ماده درون‌گیری شده، نوع لیپیدهای به کار رفته و غلظت آن‌ها در ساختار نانوذرات وابسته است (۳۷). در گزارشی که در سال ۲۰۱۸ منتشر شد، Majdizadeh و همکارانش اعلام کردند که موفق به ساخت نانو سامانه حاوی انسانس *menthe piperita* با راندمان انکپسولاسیون  $38/61\%$  شدند (۲۰). نتایج مطالعه ما نیز از نظر میزان درون‌گیری سامانه نزدیک به نتایج گزارش شده توسط

تاکنون مطالعه‌های متعددی بر روی ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های دارویی انجام شده است. همان‌طور که ذکر شد، راندمان انکپسولاسیون یا همان میزان درون‌گیری سامانه از پارامترهای مهم در انتخاب نانو حامل‌های دارویی است (۲۰،۲۸). در سال ۲۰۱۹ Barakat و همکارانش گزارش کردند که نانوسامانه لیپیدی حاوی عصاره آویشن سنتز و اثر سمیت آن را بر روی سلول‌های سرطان پستان بررسی کردند. میزان درون-گیری در مطالعه آن‌ها٪۶۷/۱۱ گزارش شد (۱). در سال ۲۰۱۳ نیز Fang و همکارانش سامانه لیپیدی با درصد درون‌گیری٪۵۱ و اندازه ۷۰ nm را گزارش کردند (۲۹). Babaei و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ Ebrahimi Khosffی و همکارانش نیز نانوسامانه لیپیدی حاوی عصاره آویشن شیرازی سنتز کردند و گزارش کردند که میزان درون‌گیری سامانه در بهترین حالت برابر با٪۵۴/۴ است (۳۱). همسو با مطالعه‌های فوق مطالعه ما نیز اهمیت میزان انکپسولاسیون نانوسامانه‌های حامل دارویی را تأیید می‌کند. میزان انکپسولاسیون در مطالعه ما بیشتر و یا نزدیک به درصد همپوشانی در مطالعه‌های بالاست که این خود از مزایای پژوهش حاضر است.

میزان رهایش، عدم تعامل سامانه و دارو با یکدیگر، مورفولوژی و بار سطحی مناسب نیز از پارامترهای مهم در انتخاب نانو حامل‌های دارویی است (۳۲). Haghirsadat و همکاران در سال ۲۰۱۷، پیشنهاد فرمولاسیون جدیدی از نانوسامانه لیپیدی حاوی دوکسوروبیسین با پتانسیل زتای ۹۳/۶۱ nm را پیشنهاد فرمولاسیون٪۸۲/۸ ارائه کردند (۳۳). اندازه کوچکتر نانوذرات در مطالعه حاضر از مزایای آن نسبت به مطالعه Haghirsadat است.

Shah و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶، فرمولاسیون‌های مختلفی از نانو نیوزوم‌های حاوی ناپروکسین با ویژگی‌های فیزیوchemیایی از جمله سایزی ۳۸۱ تا ۴۱۴ نانومتر، لود

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش، ما موفق به ساخت نانو حامل‌های نیوزومی جهت رسانش عصاره شیرین‌بیان با راندمان انکپسولاسیون بالا، رهایش هدفمند و ویژگی‌های فیزیکوchemیایی مطلوب شدیم که این خود گواهی بر مناسب بودن عملکرد این نانوسامانه به عنوان یک حامل دارویی مناسب است و لذا انجام تحقیقات تکمیلی جهت کاربرد بالینی و تجاری از این سامانه پیشنهاد می‌گردد. همچنین اگر چه در این مطالعه، ما موفق به ساخت و سنتز نانو نیوزوم‌های حاوی عصاره شیرین‌بیان با ویژگی‌های فیزیکوchemیایی مناسب شدیم، اما این مطالعه نیز مانند سایر پژوهش‌ها دارای نقص و کاستی-هایی هم بود. عدم بررسی الگوی رهایش و تأثیر آن در

۶۰/۳۶ تا ۷۱/۹۸ درصد و میزان رهایش ۶۵/۹۱ تا ۷۵/۲۴ گزارش کردند (۳۴). از مزایای مطالعه ما نسبت به مطالعه Shah، اندازه کوچکتر نانوذرات است که سبب افزایش زیست‌سازگاری آن می‌شود.

در سال ۲۰۱۷ Naderinezhad و همکارانش، نیوزوم‌های حاوی کورکومین با اندازه ۲۴۲ نانومتر، راندمان انکپسولاسیون٪۹۵/۲، بار سطحی mV ۳۸ - و شاخص پراکندگی٪۰/۱۷ با حداکثر میزان رهایش٪۴۳/۸۷ درصد سنتز کردند (۳۵). اندازه کوچکتر و درصد رهایش بیشتر Naderinezhad از مزیت‌های مطالعه ما نسبت به مطالعه Naderinezhad است اما راندمان انکپسولاسیون بیشتر و بار سطحی مناسب‌تر از ویژگی‌های مطلوب مطالعه Naderinezhad نسبت به مطالعه ما است.

در سال ۲۰۱۹ نیز Hemati و همکاران، نانو نیوزومی حاوی کوئرستین با ویژگی‌های فیزیوchemیایی همچون اندازه ۱۰۰ نانومتر، پتانسیل زتای ۶ - تا ۳۵ + میلیولت و درون‌گیری بین٪۷۱ تا ٪۹۵ درصد سنتز کردند (۳۶). از مزیت‌های مطالعه ما نسبت به مطالعه Hemati می‌توان به اندازه کوچکتر و بار سطحی مطلوب‌تر اشاره کرد اما میزان درون‌گیری کمتر از ضعف‌های مطالعه حاضر نسبت به مطالعه Hemati است.

شرایط سلول‌های سرطانی، عدم بررسی پایداری نانونیوزوم‌ها در شرایط مختلف، عدم سنتر فرمولاسیون‌های مختلف از نیوزوم‌ها با درصدهای مولی متفاوت از لیپیدها و کلسترون و همچنین عدم بررسی ورود سامانه به بافت هدف از جمله معایب مطالعه حاضر است که پیشنهاد بررسی آن‌ها به سایر پژوهشگران علاقمند به این زمینه می‌گردد.

- 1- Barakat F, Aboee-Mehrizi F, Haghirsadat BF, Sedighi-Khavidak S, Ashkezari MD. Designing and optimization of liposomal nano-carriers containing *Nepeta persica* extract and study of its cytotoxicity on the breast cancer cell line (MCF-7). *J. Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2019.

2- Yakhchi V, Jahanizadeh S, Yazdian F, Rashedi H, Haghirsadat BF. Synthesis and Evaluation of Lipid-based Nanoparticle Containing Ginger Extract against Aspergillus Species. *SSU\_Journals*. 2020;28(6):27.80-66

3- Van Wyk B-E, Wink M. Medicinal plants of the world: CABI; 2018.

4- Al-Snafi AE. *Glycyrrhiza glabra*: A phytochemical and pharmacological review. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2018;8(6):1-17.

5- More VV. Niosomal drug delivery-a comprehensive review. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*: Free full text articles from Asian J Pharm. 2019;12(04).

6- Thangadurai K, Amani P, Jeeva Gladys R, Rengasundari GM, Lenin M, Yuvaraj M. A review on hepatoprotective and Anti-HIV action of traditional herbs to reduce the hepatotoxicity of highly active anti-retroviral therapy (HAART).

7- Mustafa SB, Akram M, Muhammad Asif H, Qayyum I, Hashmi AM, Munir N, et al. Antihyperglycemic activity of hydroalcoholic extracts of selective medicinal plants Curcuma longa, Lavandula stoechas, Aegle marmelos, and *Glycyrrhiza glabra* and their polyherbal preparation in Alloxan-induced diabetic mice. *Dose-Response*. 2019;17(2):1559325819852503.

8- Batiha GE-S, Beshbishi AM, El-Mleeh A, Abdel-Daim MM, Devkota HP. Traditional uses, bioactive chemical constituents, and pharmacological and toxicological activities of *Glycyrrhiza glabra* L.(Fabaceae). *Biomolecules*. 2020;10(3).

9- Zaigham M, Hamiduddin M, Ikram M. Aslussoos (*Glycyrrhiza glabra* Linn): A root with immense pharmaceutical potential and its utilization in Unani system of medicine. *International J. Herbal Medicine*. 2019;7(5):27-34.

10- Sedighi M, Bahmani M, Asgary S, Beyranvand F, Rafieian-Kopaei M. A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis. *J. research in medical sciences: the official j. Isfahan University of Medical Sciences*. 2017;22.

11- Pastorino G, Cornara L, Soares S, Rodrigues F, Oliveira MBP. Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy research*. 2018;32(12):2323-39.

12- Paudel YN, Angelopoulou E, Semple B, Piperi C, Othman I, Shaikh MF. Potential neuroprotective effect of the HMGB1 inhibitor Glycyrrhizin in neurological disorders. *ACS chemical neuroscience*. 2020;11(500-485):4

13- Gioti K, Papachristodoulou A, Benaki D, Beloukas A, Vontzalidou A, Aliannis N, et al. *Glycyrrhiza glabra*-Enhanced Extract and Adriamycin Antiproliferative Effect on PC-3 Prostate Cancer Cells. *Nutrition and cancer*. 2020;72(2):320-32.

14- Sekhon-Loodu S, Rupasinghe H. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antiobesity potential of selected traditional medicinal plants. *Frontiers in nutrition*. 2019;6:53.

- 15- Unuofin JO, Lebelo SL. Antioxidant effects and mechanisms of medicinal plants and their bioactive compounds for the prevention and treatment of type 2 diabetes: an updated review. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020.
- 16- Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Barroso MF, Soares C, Moreira MM, et al. Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 2018;111:579-89.
- 17- Mehrbod P, Abdalla MA, Njoya EM, Ahmed AS, Fotouhi F, Farahmand B, et al. South African medicinal plant extracts active against influenza A virus. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):1-10.
- 18- Alagawany M, Elnesr SS, Farag MR, El-Hack A, Mohamed E, Khafaga AF, et al. Use of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) herb as a feed additive in poultry: Current knowledge and prospects. *Animals*. 2019;9(8):536.
- 19- Ashraf A, Ashraf MM, Rafiqe A, Aslam B, Galani S, Zafar S, et al. In vivo antiviral potential of *Glycyrrhiza glabra* extract against Newcastle disease virus. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2017;30.
- 20- Majdzadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghitalsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing *Mentha piperita* essential oil. *SSU\_Journals*. 2018;25(11):853-64.
- 21- Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug discovery today*. 2008;13(3-4):144-51.
- 22- Shirasand S, Keshavshetti GG. Recent advances in niosomal drug delivery—a review. May–June RJLBCS. 2019;5(3).
- 23- Ge X, Wei M, He S, Yuan W-E. Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(2):55.
- 24- Shahi MH, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, HAGHIRALSADAT BF. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. 2019.
- 25- Petit T, Puskar L. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diamond and Related Materials*. 2018;89:52-66.
- 26- Liu X, Song D, He X, Wang Z, Zeng M, Deng K. Nanopore structure of deep-burial coals explored by AFM. *Fuel*. 2019;246:9-17.
- 27- Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):255-64.
- 28- Mohawed OA, El-Ashmoony M, Elgazayerly ON. Niosome-encapsulated clomipramine for transdermal controlled delivery. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(9):567-75.
- 29- Fang Y, Wu XG, Chen J, Dang SC, Jiang DL, Chen M, et al., editors. Preparation and characterization of mpeg modified magnetic long-circulating doxorubicin hydrochloride liposomes. *Advanced Materials Research*; 2013: Trans Tech Publ.

- 30- Babaei M, Arjmand M, Seifkordi A. Evaluation the effect of nanoniosomal cisplatin on brain cancer cell line C6. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2016;6(23):61-4.
- 31- Ebrahimi Khosfi M, Khosravi Darani K, Hosseini H, Arabi Sh KFR, Kohi Kamali P. Production of nanoliposomes containing essential oil of Boiss Zatariamultiflora by response surface method. Nano Megyas. 2014;1(2):119-28.
- 32- Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. Advances in pharmacological sciences. 2018;2018.
- 33- Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. Chemical biology & drug design. 2017;90(3):368-79.
- 34- Shah N. Characterization, optimization and formulation of niosome containing naproxen. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research. 2016;5(1):1-6.
- 35- Naderinezhad S, Haghrosadat F, Amoabediny G, Naderinezhad A, Esmaili Z, Akbarzade A. Synthesis of biodegradable and self-assembled anionic nano-carrier: Novel approach for improvement of Curcumin-delivery to bone tumors cells & Mathematical modeling of drug-release kinetic. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2017;7(27):77-84.
- 36- Hemati M, Haghirsadat F, Yazdian F, Jafari F, Moradi A, Malekpour-Dehkordi Z. Development and characterization of a novel cationic PEGylated niosome-encapsulated forms of doxorubicin, quercetin and siRNA for the treatment of cancer by using combination therapy. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2019;47(1):1295-311.