



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

나노 리포솜에 의해 캡슐화 된
비오틴 성분의 안정성에 관한 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

양 성 준

2020年 2月

나노 리포솜에 의해 캡슐화 된 비오틴 성분의 안정성에 관한 연구

指導教授 尹 景 燮

梁 成 俊

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2019年 12月

梁成俊의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 大學院

2019年 12月

Study on the Stability of Biotin Encapsulated by Nano Liposome

Seong Jun Yang
(Supervised by Professor Kyung-Sup Yoon)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2019. 12.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	10
1. 원료 및 기기	10
2. 리포솜 제조	11
2-1. 리포솜 제조 예비실험	11
2-1-1. 리포솜 제조 예비실험	11
2-1-2. 고압유화 조건을 확립하기 위한 나노 리포솜 제조 예비실험	12
2-2. 비오틴 나노 리포솜 제조	13
2-3. 알지닌 첨가 비오틴 나노 리포솜 제조	15
3. 리포솜 안정성 평가	16
3-1. 온도별 관능평가	16
3-2. pH 측정	16
3-3. 입자크기 및 제타전위 측정	16
3-4. 비오틴의 함량 분석	19
4. Dialysis Membrane Method	20
4-1. 비오틴 나노 리포솜의 캡슐화율(capsulating efficiency) 측정	21
5. In vitro 피부흡수 실험(Franz diffusion cell method)	22
5-1. 비오틴 나노 리포솜의 피부흡수율(skin permeation) 측정	22
6. 비오틴 나노 리포솜의 형상관찰	24
7. 통계분석	24

III. 결과 및 고찰	25
1. 제형안정성 평가	25
1-1. 온도별 제형 안정성 관능평가	25
1-2. 입자크기(particle size) 및 제타전위(zeta potential) 결과	28
1-2-1. 나노 리포솜 용매선정 실험 결과(Liposome #1)	28
1-2-2. 고압유화 조건선정 실험 결과(Liposome #2)	28
1-2-3. 비오틴 나노 리포솜 용매선정 실험 결과(Liposome #3)	29
1-2-4. 알지닌 첨가 비오틴 나노 리포솜 제조 실험 결과(Liposome #4)	29
2. 비오틴 나노 리포솜 캡슐화율(capsulating efficiency)계산	37
2-1. 비오틴 HPLC 정량	37
2-2. HPLC 측정을 통한 비오틴 추세곡선	38
2-3. 리포솜내 비오틴 캡슐화율 계산	39
2-3-1. Liposome #3-3 캡슐화율 결과	39
2-3-2. Liposome #3-4 캡슐화율 결과	39
3. 비오틴 나노 리포솜 피부흡수율(skin permeation) 결과	42
4. 비오틴 나노 리포솜 형상 관찰 결과	43
IV. 요약 및 결론	45
V. 참고문헌	47

List of Tables

Table 1. Formula for Nano Liposome Preparation with Different Oil Phase Composition	11
Table 2. Formula for Nano Liposome Preparation with Different Nanodisperser Conditions	12
Table 3. Formula for Biotin Encapsulated in Nano Liposome	13
Table 4. Formula for Biotin Encapsulated in Nano Liposome Add Arginine · 15	
Table 5. Results of Nano Liposome pH Measurement and Sensory Evaluation	25
Table 6. After 1 Day, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	30
Table 7. After 1 Day, Biotin Capsulated Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	30
Table 8. After 7 Days, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	31
Table 9. After 7 Days, Biotin Encapsulated in Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	31
Table 10. After 14 Days, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	32
Table 11. After 14 Days, Biotin Encapsulated in Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	32
Table 12. After 30 Days, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	33
Table 13. After 30 Days, Biotin Encapsulated in Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results	33
Table 14. Results of Biotin in Water Dispersion HPLC Analysis	37
Table 15. Results of Dialysis Membrane Method Capsulating Efficiency	40
Table 16. Results of Contents and Diffusion Rate of Liposome #4-4	41

List of Figures

Figure 1. Pathways of biotin catabolism.	2
Figure 2. Structure of biotin (Vitamin H).	3
Figure 3. Schematic drawing of liposome structure and lipophilic or hydrophilic drug entrapment models.	5
Figure 4. Liposome classification based on size and lamellarity.	7
Figure 5. Schematic diagram of nanodisperser.	8
Figure 6. Biotin nano liposome preparation method.	14
Figure 7. DLS analysis principle.	17
Figure 8. Zeta potential analysis principle.	18
Figure 9. Biotin HPLC analysis conditions.	19
Figure 10. DMM (dialysis membrane method) principle.	20
Figure 11. Franz diffusion cell method preparation.	18
Figure 12. Sensory evaluation of nano liposome after 1 day, 7 days, 14 days and 30 days at room temperature.	27
Figure 13. Results of preliminary experimental nano liposome Particle size change trend with over time.	34
Figure 14. Results of biotin encapsulated in nano liposome Particle size change trend with over time.	34
Figure 15. Results of preliminary experimental nano liposome PDI change trend with over time.	35
Figure 16. Results of biotin encapsulated in nano liposome PDI change trend with over time.	35
Figure 17. Results of preliminary experimental nano liposome zeta potential change trend with over time.	36
Figure 18. Results of biotin encapsulated in nano liposome zeta potential change trend with over time.	36
Figure 19. Biotin HPLC calibration curve.	38

Figure 20. Biotin add arginine HPLC calibration curve.	38
Figure 21. Liposome #4-3 membrane outer HPLC results.	40
Figure 22. Liposome #4-3 membrane inner HPLC results.	41
Figure 23. Liposome #4-4 membrane outer HPLC results.	41
Figure 24. Liposome #4-4 membrane outer HPLC results..	41
Figure 25. Cryo-TEM pictures of A,B (Liposome #4-3) and C,D (Liposome #4-4).	44

Abstract

Study on the Stability of Biotin Encapsulated by Nano Liposome

Seong Jun Yang

Department of Chemistry, Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Kyung-Sup Yoon

In this study, Biotin encapsulated in nano liposome was prepared for the purpose of stabilized nanoliposome and solubility enhancement of low water soluble biotin. The particle size, zeta potential and PDI were confirmed with a nano zetasizer. And also, DMM (dialysis membrane method) was used to measure the capsulating efficiency of biotin encapsulated in nano liposome, and the capsulating efficiency was quantified by HPLC system. In this experiment, we confirmed that the stability of biotin encapsulated nano liposome has a large effect by pH. In order to further confirm the stability of biotin to pH, a biotin diluent and a biotin diluted with 10% aqueous solution of L-arginine were determined by HPLC according to concentration, respectively. The shape of the nano liposome and biotin solubility in nano liposome was observed by Cryo-TEM. In addition, the skin permeation rate of the biotin encapsulated in nano liposome as a DDS (drug delivery system) was evaluated by Franz diffusion cell method and quantified by HPLC system.

Through this study, we confirmed that biotin, which is introduced as closely related to hair health, can be incorporated into nano liposome, which is a drug delivery system, to make biotin drug carriers that compensate for low solubility and precipitation problems.

I. 서론

비오틴(biotin)은 비타민 B 복합체 중 하나로 비타민 B7 이라고도 불린다. 1927년 독일의 M. A. Boas는 실험동물에게 대량의 생 난백을 먹이면 피부염이나 탈모 등의 증상이 나타나는 것을 관찰하고, 이 증상을 예방하는 물질이 동물의 간장 내에 존재하는 것을 발견하였다.^{1,2)} 1931년 독일의 P. Gorgy는 이 피부염 예방인자를 농축하여 유효물질을 얻고 이 물질을 피부(Haut)를 뜻하는 독일어 의 첫 자를 따서 비타민 H라 명명하였다. 그 후 비타민 H가 비오틴과 동일물질이라는 것을 증명하였고, 화학구조 또한 밝혀졌으며, 1946년 S. A. Harris 연구진에 의해 화학적으로 합성되었다.³⁻⁵⁾

비오틴은 황을 함유한 물에 대한 용해도가 낮은 수용성 비타민으로 여러 신진대사 경로에서 carboxylase효소의 필수 보완제 역할을 한다.⁶⁾ 특히 carboxylase 효소 복합체는 포도당신생합성(gluconeogenesis), 지방산합성(fatty acid synthesis) 및 아미노산 이화작용(metabolic metabolism)과 같은 다양한 대사 과정에서 중요한 역할을 한다.⁷⁾

비오틴은 carboxylase에 대한 공유 결합 코엔자임(coenzyme)의 역할로 오랫동안 인식되어왔다. 보다 최근에는 비오틴이 세포 신호 전달, 유전자의 후성 유전적 조절 및 염색질 구조에서 독특한 역할을 한다는 증거가 나타났다.⁸⁻⁹⁾

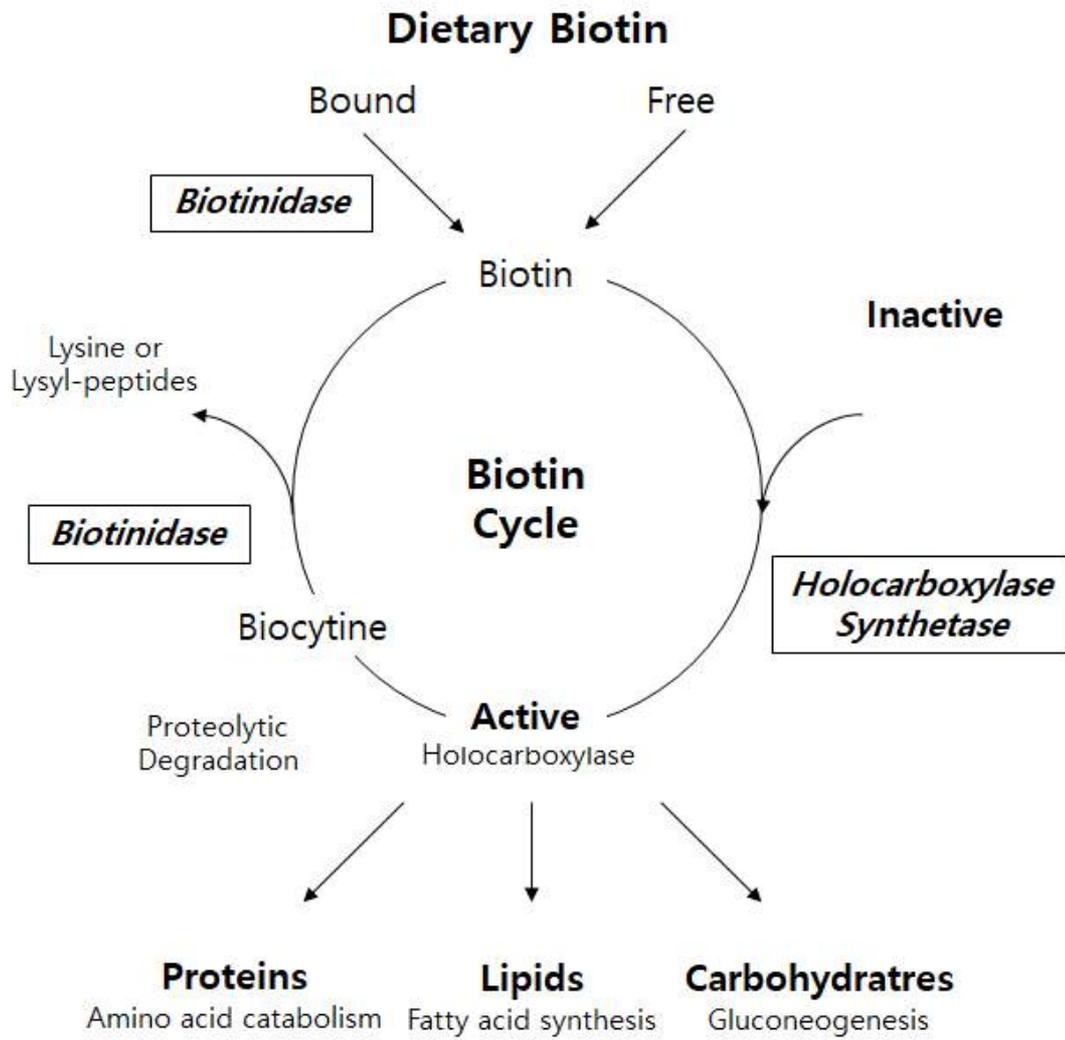


Figure 1. Pathways of biotin catabolism.

비오틴의 단백질 합성 기능 중 특히 케라틴 생성 기능은 건강한 손발톱과 모발 성장에 기여하는 것으로 나타났다. 비오틴은 많은 식품에서 쉽게 발견되며 정상적인 장내 세균에 의해 생산된다. 비오틴 함량이 높은 식품에는 견과류, 콩과 식물, 곡류, 볶음밥 및 계란 노른자가 포함된다.¹⁰⁾ 상대적으로 저렴한 비용과 미용 제품으로서의 유용성 때문에 비오틴은 길고 건강한 머리카락과 건강한 손톱을 원하는 소비자에게 새로운 트렌드가 되었다.¹¹⁾

현재까지는 국내외적으로 비오틴 제형화 연구는 초기상태이며 안정성과 용해도를 동시에 높일 수 있는 기술은 아직 보고된 바가 없다. 비오틴을 식품 및 화장품으로 개발하고 이와 관련된 기술적인 문제를 해결하기 위해서는 제조 및 유통 과정에서 변질되지 않고 본래의 활성이 유지될 수 있도록 하는 안정화 기술 즉, 제형화 기술이 요구된다.¹²⁾

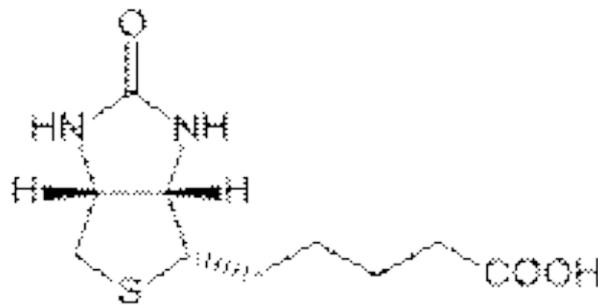


Figure 2. Structure of biotin (vitamin H).

최근에는 화장품의 유효성분을 유지하면서 안정하게 피부에 흡수시킬 수 있는 피부 경피 흡수전달체로서 리포솜(liposome) 제형에 대한 관심이 높아지고 있다.¹³⁾ 리포솜은 자기 스스로 회합하는 콜로이드 입자들의 구형인지질 구체로 정의되는데 1960년대 초 Alec Bangham에 의해 물속에서 인지질 소포체 구조로 형성되는 것을 처음 발견되었다. 리포솜은 인지질 구성된 구형의 소포체(vesicle)로서 친수성 및 친유성 성분을 동시에 캡슐화 할 수 있어서 비타민, 약품 등과 같은 활성성분에 대한 약물전달체(drug delivery system)로 많은 연구가 진행되고 있다.¹⁴⁾ 인지질은 생체막의 주요 구성성분이기 때문에 리포솜의 인지질막 또한 생체막과 유사한 생리학적 기능 및 특성을 나타낸다. 따라서 리포솜은 피부 친화적이며 안정성이 우수하기 때문에 제약 및 화장품 분야 등에서 효과적인 약물전달체로서 응용되고 있다.¹⁵⁾

약물 전달체로서, 리포솜은 대사 보호를 제공하고, 순환 시간을 연장하며, 독성을 감소시키고, 약물 방출을 제어하고, 전달 세포 / 조직 특이성을 향상시킬 수 있다. 또한 균일한 입자 크기 및 콜로이드 안정성과 같은 특성은 리포솜이 생체 내 약물 전달체로서 개발되기 위해 필수적으로 고려되어야 한다. 리포솜의 크기 특성은 약물 캡슐화 용량, 생체 내 생체 분포 및 제거율 등에 중요한 영향을 미친다.¹⁶⁾ 예를 들어, 직경이 50~200 nm 인 리포솜은 큰 것보다 클리어런스 속도가 느린 것으로 나타났다. 따라서 리포솜의 제조 방법이 특정 크기 범위 내에서 입자 크기 분포를 재현성 있게 생성하는 것이 필수적이다.¹⁷⁾

리포솜은 수용성 성분을 캡슐화 하는 지질 이중 막으로 구성된다. 리포솜 제조에서 가장 많이 사용되는 지질은 phosphatidyl-choline (PC, Lecithin)이다. Phosphatidylcholine 단독으로 리포솜을 만들면 전자적으로 중성의 리포솜이 생성된다. 여기에 구조적 안정성을 향상시키기 위하여 원형질막 성분인 gangliosid GMI, sphingomyelin, 콜레스테롤 등을 첨가한다. 리포솜과 같은 제형의 안정성은 유효성분의 안정성과 관련이 매우 깊다. 생성된 리포솜은 pH 범위가 5.50~7.00 일 때 제형이 가장 상업적으로 안정하다고 알려져 있다.¹⁸⁾

약물 전달을 위한 리포솜의 개발에서 주요 과제는 크기 및 크기 분포의 조절이다. 종래의 방법에서, 지질은 벌크상(bulk phase)에서 이중의 이중층으로 자발적

으로 조립된다. 작은 크기 및 좁은 크기 분포를 갖는 리포솜을 얻기 위해서는 압출 또는 초음파 처리에 의한 추가적인 가공이 필요하다.¹⁹⁾

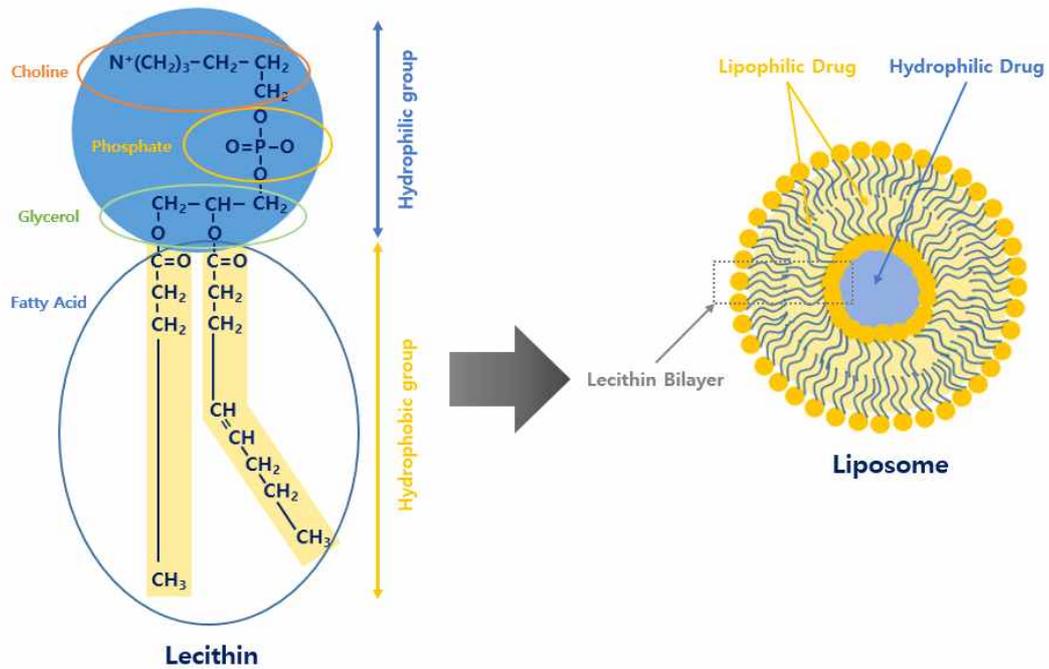


Figure 3. Schematic drawing of liposome structure and lipophilic or hydrophilic drug entrapment models.

리포좀의 종류와 특징으로 소포체의 크기와 형태에 따라 크게 MLV (multilamella vesicle)과 ULV (unilamella vesicle)로 나눌 수 있다. 특히 ULV는 크기에 따라 LUV (large unilamella vesicle), SUV (small unilamella vesicle) 그리고 GUV (giant unilamella vesicle)로 구분할 수 있다, SUV는 20~100 nm, LUV는 100~1,000 nm, GUV는 1,000 nm 이상의 범위를 갖으며 크기에 따라 구분하고 있다. MLV는 소포체의 막(lamella) 형태에 따라 OLV (oligo lamella vesicle), MLV (multi lamella vesicle), MVV (multi vesicular vesicles)로 나눌 수 있다. OLV는 100~500 nm, MLV는 500~1,000 nm, MVV는 200~3,500 nm 크기를 나타내며 이외에도 다양한 리포좀이 크기와 형태에 따라 다양하게 분류되어 진다.²⁰⁻²²⁾

Vesicle의 크기는 리포좀의 순환 반감기를 결정하는 중요한 매개 변수이며, 크기 및 수의 이중층이 리포좀 내 약물 캡슐화의 정도에 영향을 미친다. 따라서 리포좀은 전형적으로 그들의 크기 및 이중층의 수에 기초하여 분류되며 최근 개발된 이중 리포좀(double liposome) 및 MVV로 명명된 새로운 형태의 리포좀이 최근 보고되고 있다. 신규 한 예비 기술로 제조 될 수 있는 이러한 리포좀은 여러 효소에 대한 약물 보호를 향상시키는 것으로 알려져 있다.²³⁻²⁵⁾

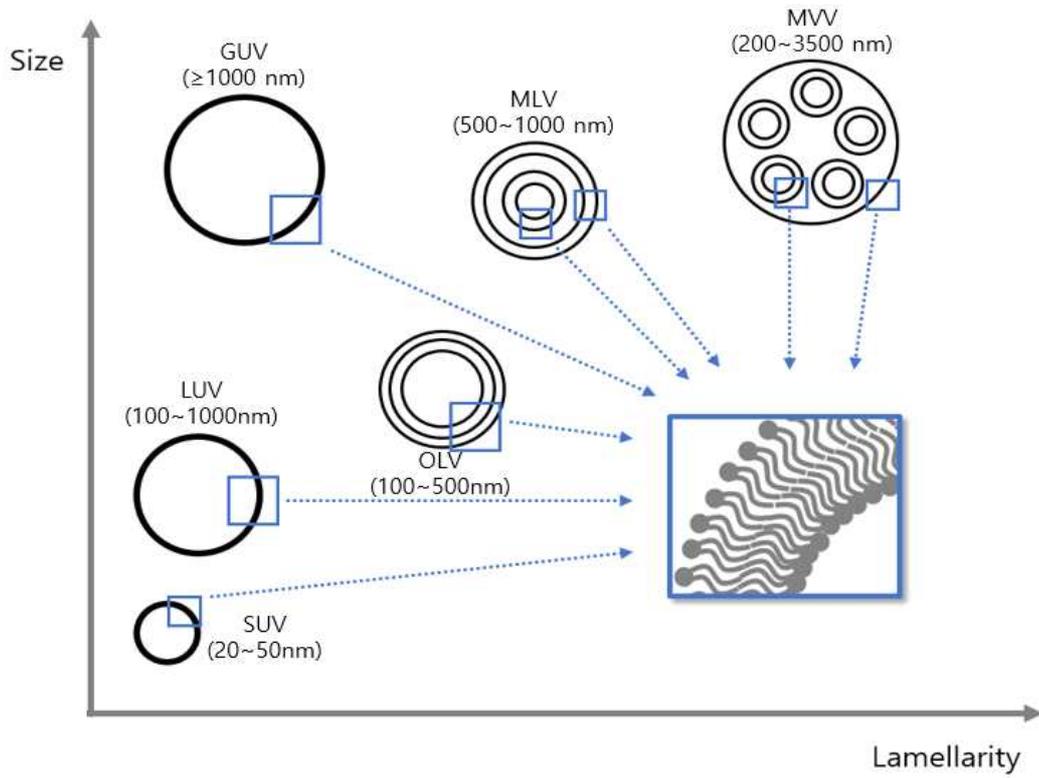


Figure 4. Liposome classification based on size and lamellarity.

리포솜이 실제 산업에서 실용화되는데 어려운 이유로 현탁액 상태에서의 현저하게 낮은 안정성, 봉입 효율의 재현성 및 캡슐화 한 약물의 누출 등 일반적인 리포솜 제조방법들이 대체로 대량생산에 부적합하였다.²⁶⁾ 이에 따라 리포솜을 산업화시키기 위해서 안정성, 캡슐화율의 재현성, 입자 분포의 균일성 등을 보완시켜야 하는데 이러한 문제들을 해결할 수 있는 방법으로 최근에 Mayhew 등은 고압유화기(Microfluidizer™ 등)를 사용하여 고농도의 지질현탁액으로부터 작은 크기의 리포솜을 제조하는 방법을 보고하였다.²⁷⁾ 여기에서 우리는 연속 흐름 미세 유체의 사용에 초점을 맞추어 재현 가능한 방식으로 더 좁은 크기 분포를 갖는 마이크로(micro), 나노(nano) 크기의 리포솜을 생산하는 것으로 보고된^{28,29)} 여러 가지 미세 유체 방법을 사용하여 안정성 및 캡슐화율을 향상시킨 리포솜을 제조하고자 한다.

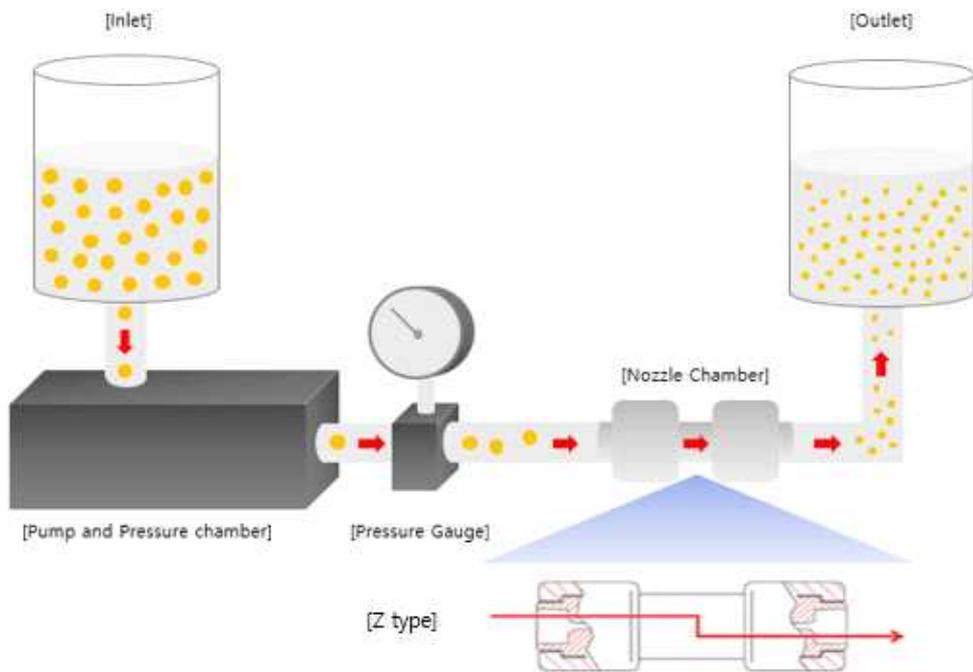


Figure 5. Schematic diagram of nanodisperser.

리포좀 제형에 나노기술을 적용하게 되면 특정 성분을 피부 속에 전달하는 역할을 하는 나노구체의 크기가 피부를 구성하는 세포보다 작기 때문에 나노입자가 포함된 기능성화장품을 바르면 약효 성분이 피부 깊숙이 잘 흡수 및 전달한다고 알려져 있다.³⁰⁾ 주름을 개선하거나 미백작용을 향상시키는데 특정 효과를 얻기 위하여 활성물질들을 투과시킬 목적으로 리포좀 제형을 사용해 왔으며,³¹⁾ 활성물질 중 다양한 효능을 갖는 ascorbic acid는 특히 피부의 미백 및 주름개선에 뛰어난 효과를 나타내나 화학적 구조상 불안정함에 따라 물이나 대기에 노출되면 산화되어 활성이 감소하는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 리포좀내에 ascorbic acid를 캡슐화 시켜 안정성 향상이 보고된 바 있다.³²⁾

따라서 본 실험에서는 피부를 통한 물질 전달의 방법으로 나노 리포좀의 효과 및 그 이용 가능성을 알아보기 위해 화장품에 사용되는 용해도가 낮은 탈모방지제 성분인 비오틴을 나노 리포좀에 캡슐화 시켜 비오틴의 리포좀내에서 안정성 및 용해도에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 또 상기한 바와 같이 나노 리포좀은 그 구성 지질 및 첨가제 등에 의해서 특성이 많이 달라지므로 지질의 조성을 다르게 하고 또 비오틴이 리포좀에 잘 캡슐화 되었는지를 확인하기 위하여 DMM을 이용해 비오틴에 대한 나노 리포좀의 캡슐화율(capsulating efficiency)을 조사하였다.

또한 탈모완화에 효과가 있는 비오틴을 피부에 효과적으로 전달하기 위한 시스템으로서 나노 리포좀을 제조하였으며, 이를 평가하기 위해 Franz diffusion cell method를 이용하여 비오틴의 피부 흡수율을 평가하였다. 이러한 연구를 통하여 피부 장벽기능을 복원하고 피부 노화를 억제하기 위한 피부 흡수 전달 시스템으로서 나노 리포좀의 이용가능성을 알아보하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 원료 및 기기

본 실험에서 리포솜 제조를 위하여 lecithin (Lipoid S 75-3, Lipoid, Germany) 과 cholesterol (Cholesterol JP, Nippon Fine Chemical Co. LTD, Japan)을 사용하였으며, pH를 조절하기 위해서 arginine (L-arginine, Ajinomoto, Japan)을 사용하였다. 용매로 butylene glycol (1,3-BG, Daicel, Japan)과 일반적으로 화장품에서 사용하는 ethanol (Ethyl alcohol 95%, Daejung, Korea)을 사용하였으며, 물은 3차 증류수를 사용하여 실험을 진행하였다. 비오틴(Biotin, Sigma-Aldrich, USA)은 순도 99%이상의 HPLC급으로 사용하였고 비오틴 함량 분석을 위해 HPLC용매로 사용한 methanol, water, acetonitrile 및 sodium hexanesulfonate는 Sigma-Aldrich (MO, USA) 제품으로 모두 HPLC 급을 사용하였다.

나노 리포솜을 제조하기 위하여 호모믹서(T.K. auto homomixer markII 2.5, Tokushukika, Japan)와 고압유화기(nanodisperser, NLM1000, Ilshin autoclave, Korea)를 사용하였고, pH 측정을 위해 pH meter (Orion star A111, Thermo scientific, USA)를 사용하였으며, 입자크기 및 제타전위 측정을 위해 나노제타사이저(Nano ZS System, Malven Instrument Ltd., UK)를 사용하였다. 리포솜내 활성성분 캡슐화율 및 활성성분을 정량하는데 HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, USA)를 사용하였다.

2. 리포솜 제조

2-1. 리포솜 제조 예비실험

2-1-1. 용매조건 확립을 위한 나노 리포솜 제조 예비실험

나노 리포솜을 제조하기 위하여 lecithin을 포함하는 cholesterol, butylene glycol 및 ethanol (ethyl alcohol 95%)로 구성되는 유상(oil phase)과 수상(water phase)을 각각 70.0~80.0 °C로 가온하여 용해시킨 후 수상에 유상을 넣고 호모믹서를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 10 min동안 유화시켜 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜을 1,000 bar, 2회 nanodisperser로 고압유화 처리하여 나노 리포솜을 제조하였다. 나노 리포솜의 형성여부를 확인하기 위하여 Table 1.에 따라 나노 리포솜 기초 제조실험을 진행하였다. 이 실험은 나노 리포솜 제조 시에 유상에서 ethanol과 butylene glycol 중 어느 용매와 함량이 더 유리한지 확인하기 위해 설계된 실험이다.

Table 1. Formula for Nano liposome Preparation with Different Oil Phase Composition

Ingredients		#1-1 (wt%)	#1-2 (wt%)	#1-3 (wt%)	#1-4 (wt%)
Oil phase	Lecithin	2.5	2.5	2.5	2.5
	Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5
	Butylene glycol	20.0	30.0	-	-
	Ethanol	-	-	10.0	15.0
Water phase	Water	Total 100	Total 100	Total 100	Total 100
	Preservative	0.3	0.3	0.3	0.3

2-1-2. 고압유화 조건을 확립하기 위한 나노 리포솜 제조 예비실험

이 실험은 앞선 용매 및 함량 선정 실험에서 선정된 조건에 따라 고압유화 조건을 확립하기 위해 진행되어진 실험이다. 나노 리포솜을 제조하기 위하여 Table. 2에 따라 구성된 유상(oil phase)과 수상(water phase)을 각각 70.0~80.0 °C로 가온하여 용해시킨 후 수상에 유상을 넣고 호모믹서를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 10 min 동안 유화시켜 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜을 각기 다른 조건에서 고압유화기(nanodisperse)로 처리하여 나노 리포솜을 제조하였다. 제조된 나노 리포솜에 대해 물성평가를 진행하여 최적의 조건을 확립하고자 하였다.

Table 2. Formula for Nano Liposome Preparation with Different Nanodisperser Conditions

Ingredients		#2-1 (wt%)	#2-2 (wt%)	#2-3 (wt%)	#2-4 (wt%)	#2-5 (wt%)	#2-6 (wt%)
Oil phase	Lecithin	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Ethanol	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Water phase	Water	Total 100	Total 100	Total 100	Total 100	Total 100	Total 100
	Preservative	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Nanodisperser condition (pressure bar / pass count)		300/1	300/2	500/1	500/2	700/1	700/2

2-2. 비오틴 나노 리포솜 제조

비오틴 나노 리포솜을 제조하기 위하여 lecithin을 포함하는 cholesterol, butylene glycol 및 ethanol로 구성되는 유상과 비오틴을 포함한 수상을 각각 70.0~80.0 °C로 가온하여 완전히 용해시킨 후 수상에 유상을 서서히 첨가하면서 호모믹서를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 10 min동안 유화시켜 리포솜을 제조하였다. 제형의 캡슐화율을 향상시키기 위해 이전과 달리 제조된 리포솜을 700 bar, 2회의 조건으로 nanodisperser로 고압유화 처리하여 나노 리포솜을 제조하였다(Figure 6). 비오틴을 함유한 나노 리포솜 형성여부를 확인하기 위해 Table 3.에 따라 제조실험을 진행하였다.

Table 3. Formula for Biotin Encapsulated in Nano Liposome

	Ingredients	#3-1 (wt%)	#3-2 (wt%)	#3-3 (wt%)	#3-4 (wt%)
Oil phase	Lecithin	2.5	2.5	2.5	2.5
	Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5
	Butylene glycol	20.0	30.0	-	-
	Ethanol	-	-	10.0	15.0
Water phase	Water	Total 100	Total 100	Total 100	Total 100
	Biotin	0.1	0.1	0.1	0.1
	Preservative	0.3	0.3	0.3	0.3

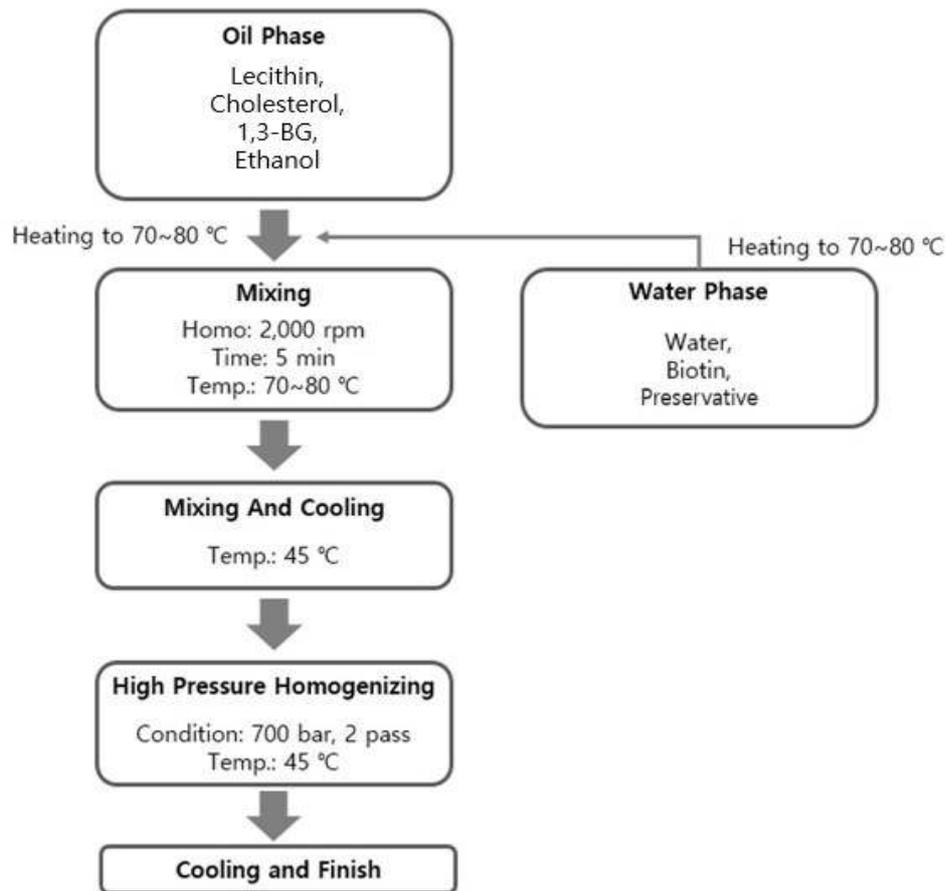


Figure 6. Biotin nano liposome preparation method.

2-3. 알지닌 첨가 비오틴 나노 리포솜 제조

기존의 비오틴 나노 리포솜에서 비오틴이 석출되는 문제를 보완하기 위해 pH를 증가시킨 비오틴 나노 리포솜을 제조 하였다. 이를 위하여 이전과 동일한 유상과 알지닌 0.06%를 포함한 수상을 각각 70.0~80.0 °C로 가온하여 완전히 용해시킨 뒤 수상에 유상을 서서히 첨가하며 호모믹서를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 10 min 동안 유화시켜 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜을 700 bar, 2회 nanodisperser로 고압유화 처리하여 나노 리포솜을 제조하였다(Table 4). 이전 실험에서 butylene glycol을 유상에서의 용매로 사용하였을 때 비오틴에 대한 용해도가 떨어져 이번 실험에서는 유상에서 butylene glycol를 제외한 ethanol만을 가지고 실험을 진행하였다.

Table 4. Formula for Biotin Encapsulated in Nano Liposome Add Arginine

	Ingredients	#4-1 (wt%)	#4-2 (wt%)	#4-3 (wt%)	#4-4 (wt%)
Oil phase	Lecithin	2.5	2.5	2.5	2.5
	Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5
	Ethanol	15.0	15.0	15.0	15.0
	Water	Total 100	Total 100	Total 100	Total 100
Water phase	Biotin	-	-	0.1	0.1
	L-arginine	-	0.06	-	0.06
	Preservative	0.3	0.3	0.3	0.3

3.. 리포솜 안정성 평가

3-1. 온도별 관능평가

제조되어진 나노 리포솜들을 각각 실온(25.0 °C), 냉온(4.0 °C), 향온(40.0 °C)에 서 보관하여 각각 1일, 7일 14일, 30일 날짜별로 경시변화를 관찰하였다. 경시변화는 리포솜의 투명도, 색상, 분리여부 및 비오틴의 석출 혹은 결정화 여부를 중 점적으로 관찰하여 평가하였다

3-2. pH 측정

제조되어진 나노 리포솜들의 정량화된 안정성을 평가하기 위해 각각의 시료에 대해 pH 측정법에 따라 pH를 25.0 °C에서 3번 반복 측정하여 평균값을 구해 비 오틴 나노 리포솜의 안정성을 확인하였다. 또한 시간에 따른 안정성을 확인하기 위해 1일, 7일 14일, 30일을 주기로 측정하였다.

3-3. 입자크기 및 제타전위 측정

제조되어진 나노 리포솜들의 안정성을 확인하기 위해 나노제타사이저(nano zetasizer)를 이용하여 입자 크기(particle size), 분산지수인 PDI (polydispersity index) 및 제타전위(zeta potential)를 각각 큐벳(DTS0012, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)과 큐벳(DTS1070, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) 에 각각 1 mL씩 취하여 나노제타사이저로 각각 3회 반복 측정하여 평균값을 계산하였다. 제조한 각각의 리포솜에 대한 입자 크기와 PDI 는 동적 광산란(dynamic light scattering : DLS) 기법을 이용하여 측정하였다. DLS는 브라운 운동 (Brownian motion)이라는 지속적인 랜덤 열 운동 상태의 미

세 입자와 분자들이 크기에 따른 속도로, 다시 말해 작은 입자가 큰 입자보다 빠르게 확산되는 현상을 이용하여 입자크기를 측정하게 된다.

또한 제타전위는 매체의 입자나 분자, 단백질이 띄고 있는 전하의 표면 전하와 용액의 농도 및 이온 유형에 따라 달라지는데 되는데, 이 전하에 따라 분산 또는 용액의 안정성이 결정되며 이를 통해 안정성을 확인 할 수 있다. 이를 측정하기 위해서 먼저 나노 리포솜 용액을 vortex mixer로 잘 혼합시킨 후 리포솜 입자에 의한 레이저 광선의 산란이 유효한 범위를 유지시키기 위하여 일정량을 취하여 100배 희석하였다.

이 때 사용한 광원은 He-Ne laser이며, 측정 파장은 633 nm, 온도는 25.0 °C로 일정하게 유지되도록 하였으며, 안정성 확인을 위해 pH 측정과 같이 1일, 7일, 14일, 30일 주기로 측정하였다³³⁾.

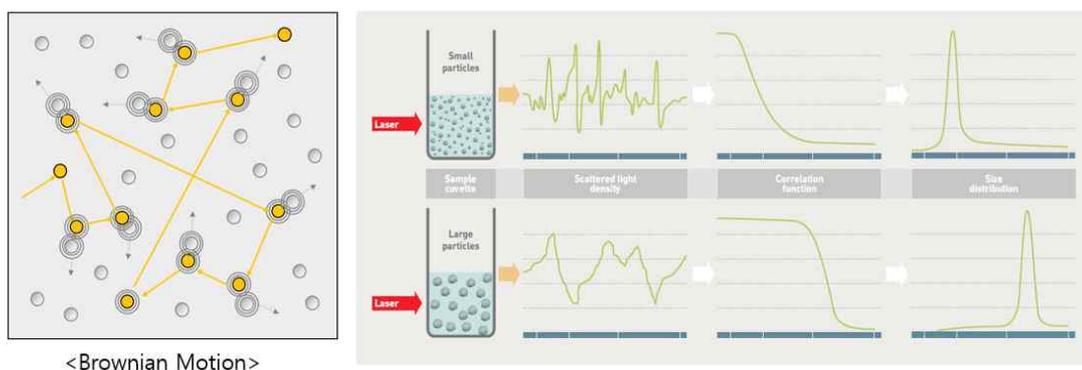


Figure 7. DLS analysis principle.

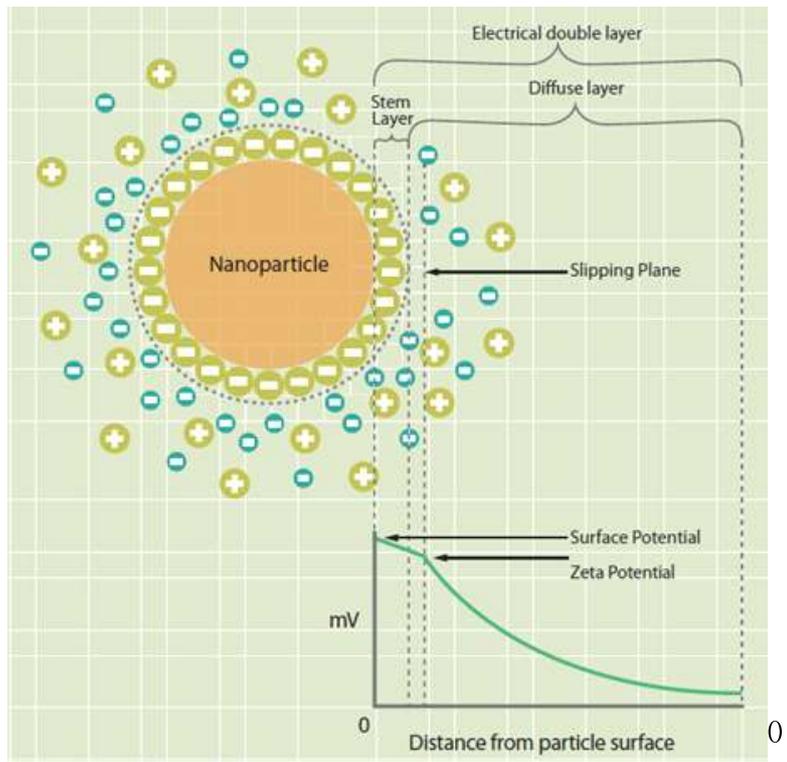


Figure 8. Zeta potential analysis principle.

3-4. 비오틴의 함량 분석

비오틴의 잔존함량은 HPLC 시스템으로 분석하여 계산하였다. HPLC system은 Agilent사 모델을 사용하여 측정을 진행하였다. 컬럼은 Agilent c18 150*4.6 mm 을 사용하였으며, 검출기는 UV검출기(200 nm)를 사용하여 유속 1.0 mL/min로 하고 오븐온도는 40.0 °C에서, 이동상으로는 acetonitrile/water(0.02% phosphoric acid) = 15/85 으로 혼합한 용매를 사용하여 분석하였다. 모든 시료는 다음과 같은 조건으로 걸어서 분석을 진행하였으며 분석은 모두 3회 반복 측정하여 평균값을 계산하였다. 비오틴 표준품 및 제품은 methanol(0.05% phosphoric acid) 용매를 이용하여 희석하여 분석을 진행하였다.

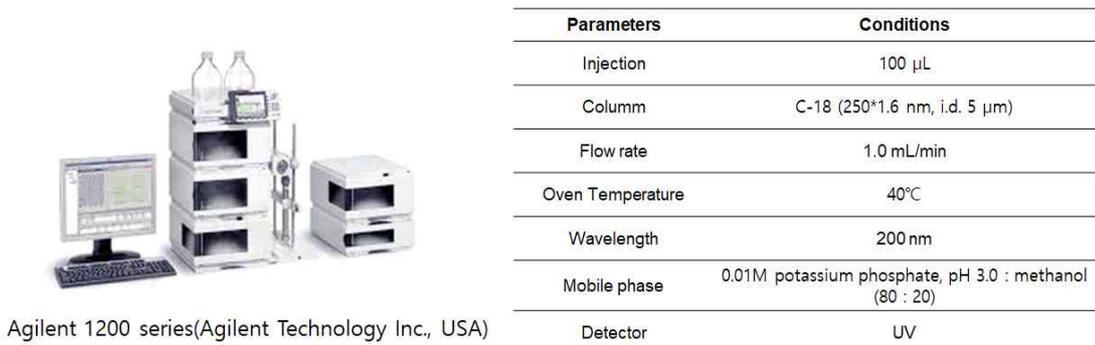


Figure 9. Biotin HPLC analysis condition.

4. Dialysis Membrane Method

제조되어진 나노 리포솜에 대한 캡슐화율(capsulating efficiency)을 측정하기 위해 DMM (dialysis membrane method)를 통해 확인하였다. DMM은 리포솜 용액 (1.0 mL)의 분취량을 300 Da 분자량 한계인 membrane dialysis bag (Spectra / Por Dialysis membrane Bio Tech CE; Spectrum Laboratories, New Zealand)에 넣어준 뒤 클립으로 완전히 밀봉 시켜준다. 이후 밀봉된 membrane bag을 1X PBS buffer (pH 7.4) 200 mL의 방출매체가 담긴 비이커에 침지시켰다. 비이커 안에 magnetic bar를 넣은 다음 27.0 °C의 조건에서 220 rpm으로 진탕시켜 준다. 5 h 후 membrane bag을 투과한 outer 용액과, 투과하지 못한 inner 용액을 각각 분취하여 준비한다. 각각의 용액들은 0.45 µm syringe filter (Biomed Scientific, USA)로 여과 시켜준 후 HPLC system에서 크로마토그래피를 수행 하였다. 조건은 비오틴 함량분석 조건과 동일하게 하여 진행하였다.

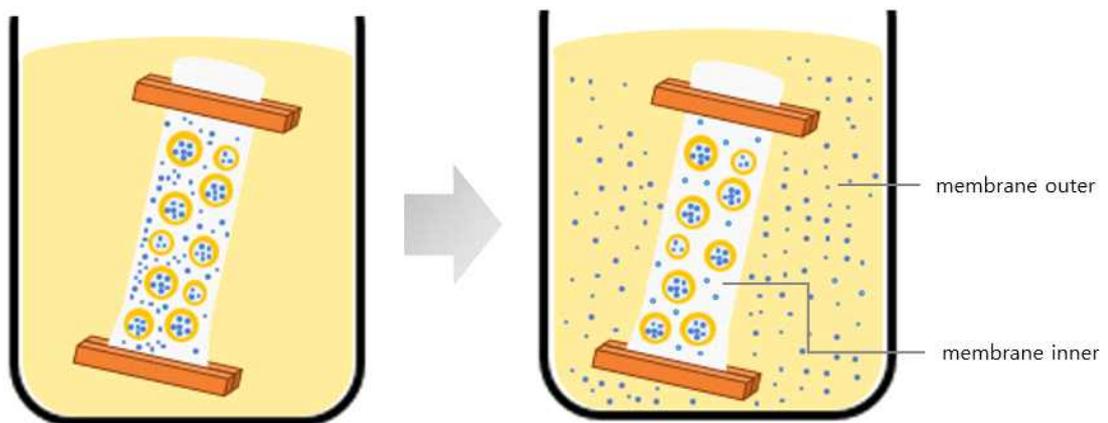


Figure 10. DMM (dialysis membrane method) principle.

4-1. 비오틴 나노 리포솜의 캡슐화율(capsulating efficiency) 측정

비오틴 나노 리포솜의 캡슐화율 측정을 위한 전처리는 먼저 5 h 동안 dialysis membrane bag을 투과한 outer 용액을 취하고, dialysis membrane bag을 투과하지 않은 inner 용액을 각각 나누어 준비하였다. outer용액은 원액을 검액으로서 사용하였으며, inner 용액의 경우 원액과 정제수에 10% 분산시켜 2가지의 검액으로 만들어 HPLC 측정을 진행하였다. 각각의 시료 5 g을 정제수에 100 mL가 되도록 희석시킨 후 검액을 만들어 준비하였다. 표준용액은 비오틴 나노 리포솜 원액을 검액으로 만들어 사용하였다.

먼저 캡슐화율을 구하기에 앞서 dialysis membrane bag을 투과한 시료에서의 비오틴 함량과 비오틴 나노 리포솜의 비오틴 함량을 상대 비교하여 구한다(Equation 1). 이는 리포솜으로 캡슐화 되지 않은 비오틴의 함량으로 볼 수 있다.

두 번째로 dialysis membrane bag 을 투과하지 못한 시료에서의 비오틴 함량과 비오틴 나노 리포솜의 비오틴 함량을 상대 비교하여 구한다(Equation 2). 이는 실제 리포솜으로 캡슐화된 비오틴의 상대적 함량으로 볼 수 있다.

최종적으로 Equation 1과 Equation 2에서 구한 값의 합이 100에 가까울수록 회수율이 높아 신뢰도 또한 높은 것으로 볼 수 있다.

$$\frac{C_2}{C_1} \times 100 (\%) \dots\dots\dots (\text{Equation 1})$$

$$\frac{C_3}{C_1} \times 100 (\%) \dots\dots\dots (\text{Equation 2})$$

C_1 = amount of biotin in origin liposome (%)

C_2 = amount of biotin in membrane outer liposome (%)

C_3 = amount of biotin in membrane inner liposome (%)

5. In vitro 피부흡수 실험(Franz diffusion cell method)

5-1. 비오틴 나노 리포솜 피부흡수율(skin permeation) 측정

비오틴 나노 리포솜의 피부흡수율을 확인하기 위해 Franz diffusion cell method을 이용하여 피부 투과 실험을 진행하였다. 피부 흡수 실험에 사용한 membrane은 인간피부표피를 모사한 Strat-M membrane을 사용하였다. Receptor chamber에 비오틴 나노 리포솜 5 mL를 채운 후 각질층이 위로 향하도록 donor와 receptor phase사이에 membrane을 고정시켰다. 실험이 진행되는 동안 항온수조를 이용해 온도를 37.0 ± 1.0 °C로 유지하였다. 각 시료들을 0.4 mL씩 donor를 통하여 피부 표면에 가한 후 시간에 따라 매회 0.5 mL의 receptor phase를 sampling port를 통하여 채취하였다. 채취 직후 동량의 receptor phase를 receptor chamber에 보충하였다(Figure 11). 채취한 시료 속 비오틴의 양은 HPLC를 이용하여 측정하였다. 8 h 후 각질층과 피부에 남아있는 비오틴의 양을 측정하기 위해 membrane을 PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿지 않은 부분을 잘라내고 남은 부분에 대해 가위를 이용해 세절하였고 세절한 membrane을 10 mL의 ethanol을 넣고 1 h동안 초음파 세척기를 이용하여 추출 처리하여 membrane에 남아있는 비오틴의 양을 따로 측정하였다. 각 질층에 남은 양은 HPLC를 이용하여 측정하였다.

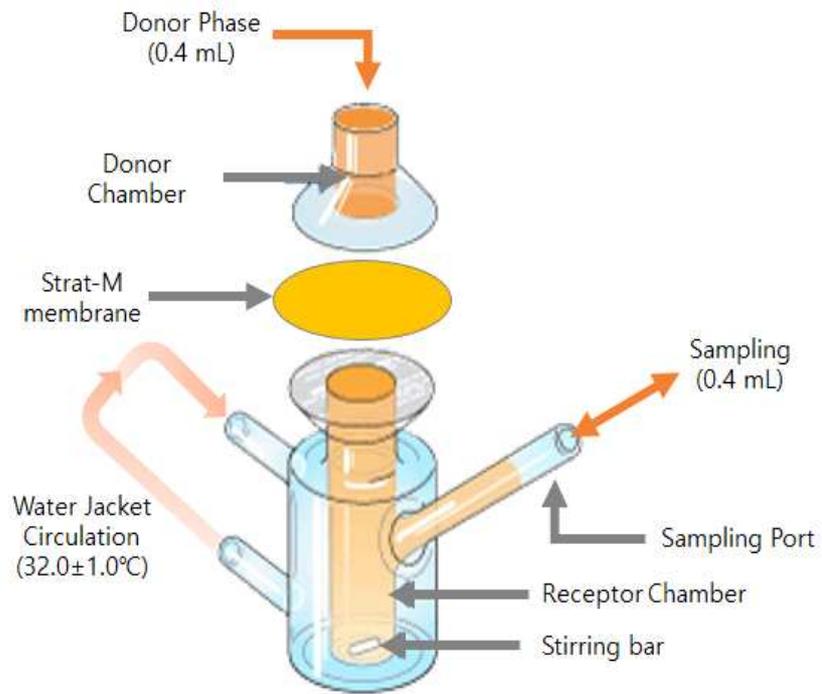


Figure 11. Franz diffusion cell method preparation.

6. 비오틴 나노 리포솜의 형상관찰

형성된 나노 리포솜의 형상 관찰은 냉전계 방출 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, Tecnai F20 G2, FEI Company, USA)을 사용하여 측정하였다. 시료의 전처리는 cryo system을 이용하였다. 먼저, 시료의 동결은 jet freezing device (JFD 030, BALTEC, Pfäffikon ZH, Switzerland)을 이용하여 2,100 bar 이상의 고압 상태에서 액화 질소 냉매를 이용하여 급속 동결시킨다. 이렇게 동결 고정 방법에 의해 물리적으로 고정된 상태의 시료들을 freeze-fracture/etching system (MED 020 GBE, BALTEC, Pfäffikon ZH, Switzerland)을 이용하여 시편을 잘라낸 후 $-90.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 탈수(Etching) 시키고 온도를 $-120.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 를 유지하면서 TEM에서 형상을 관찰하였다.³⁵⁾

7. 통계분석

각 측정치의 결과분석은 SAS (Statistics Analytical System, USA) 프로그램 (Ver. 9.3)을 사용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 평균치간의 유의성을 검증하였다($p < 0.05$).

III. 결과 및 고찰

1. 제형안정성 평가

1-1. 온도별 제형 안정성 관능평가

안정성 평가는 각각 실온(25.0 °C), 냉온(4.0 °C), 향온(40.0 °C)에서 진행되었으며, 1일 7일 14일 주기로 관능평가를 진행하였다. 대부분의 나노 리포솜들이 시간이 지남에 따라 붉어지는 현상이 나타났으며 탁도 또한 증가하는 경향을 보였다(Figure 12). 또한 비오틴을 넣지 않은 일반 나노 리포솜(#1-1~#1-4)들은 석출이 일어나지 않았지만 비오틴을 첨가한 일반 나노 리포솜(#3-1~#3-4)에서는 모두 일정 물질들이 석출되는 현상을 나타냈으며, 이를 통해 비오틴이 일반 나노 리포솜내에서 용매에 상관없이 석출되는 문제점이 있음을 확인하였다.

하지만 나노 리포솜 #4-4에서 알지닌(arginine)을 첨가한 나노 리포솜의 경우 이러한 현상이 거의 나타나지 않았음을 확인할 수 있었다. 또한 나노 리포솜 #4-2와 나노 리포솜 #4-4 실험을 통해 알지닌을 첨가한 나노 리포솜에서 붉어지는 현상(discoloration)이 완화된 것을 확인할 수 있었으며 이는 pH 측정 결과에서 알지닌 첨가에 따른 pH 증가가 비오틴의 리포솜내에서의 용해도 및 안정성을 향상시킨 것으로 보여진다(Table 5).

Table 5. Results of Nano Liposome pH Measurement and Sensory Evaluation

Sample	Temp. (°C)	pH	Sensory evaluation (after 7 days)
Liposome #1-1	25.0	6.06±0.16	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #1-2	25.0	6.41±0.15	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration

Liposome #1-3	25.0	6.32±0.18	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #1-4	25.0	6.82±0.14	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #2-1	25.0	6.41±0.12	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #2-2	25.0	6.24±0.11	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #2-3	25.0	6.12±0.13	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #2-4	25.0	6.12±0.15	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #2-5	25.0	6.18±0.14	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #2-6	25.0	6.21±0.18	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #3-1	25.0	4.48±0.12	deposition
	4.0	-	deposition
	45.0	-	deposition
Liposome #3-2	25.0	4.77±0.18	deposition
	4.0	-	deposition
	45.0	-	deposition
Liposome #3-3	25.0	4.62±0.20	deposition
	4.0	-	deposition
	45.0	-	deposition
Liposome #3-4	25.0	4.88±0.24	deposition
	4.0	-	deposition
	45.0	-	deposition
Liposome #4-1	25.0	7.12±0.36	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	discoloration
Liposome #4-2	25.0	9.17±0.18	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	clear
Liposome #4-3	25.0	4.88±0.21	clear
	4.0	-	deposition
	45.0	-	discoloration

Liposome #4-4	25.0	5.62±0.12	clear
	4.0	-	clear
	45.0	-	clear

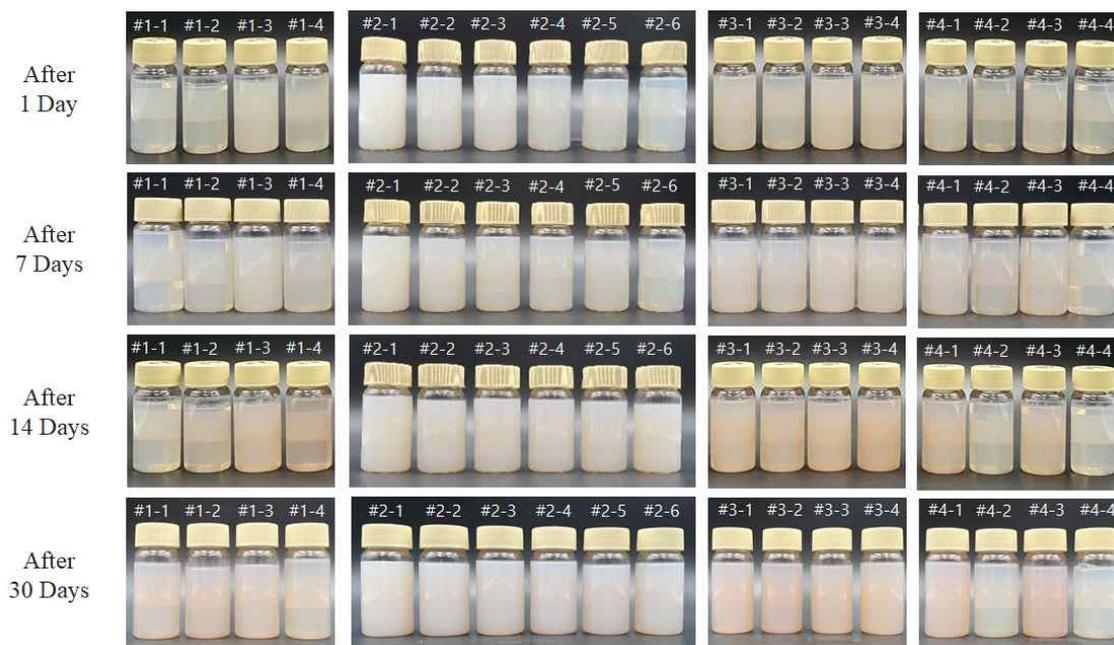


Figure 12. Sensory evaluation of nano liposome after 1 day, 7 days, 14 days and 30 days at room temperature.

1-2. 입자크기(particle size) 및 제타전위(zeta potential) 결과

1-2-1 나노 리포솜 용매선정 실험 결과 (Liposome #1)

나노제타사이저(Nanozetalyzer)를 통해 제조된 나노 리포솜의 입자 크기 및 제타전위를 측정된 결과 제조에 사용되어진 용매에 따라 입자크기 및 제타전위가 다른 것을 확인 할 수 있었으며 이중 용매를 ethanol로 사용한 제형이 butylene glycol을 사용한 제형보다 입자크기가 상대적으로 작으며 제타전위 절대 값이 커 훨씬 안정한 제형 성상을 제조할 수 있음을 확인하였다. 또한 시간 경과에 따른 관찰에서도 ethanol을 용매로 선정한 리포솜이 butylene glycol을 용매로 선정한 리포솜에 비해 입자크기, 제타전위 평가에서 안정한 경형을 띄었으며 이를 통해 나노 리포솜 제조 시에 ethanol을 용매로 선정하여 추후 실험들을 진행하였다.

1-2-2 고압유화 조건선정 실험 결과 (Liposome #2)

고압유화 조건선정 실험 결과 고압유화의 압(bar)이 높고, 처리횟수가 많을수록 입자크기가 줄어들고 제타전위 값이 커져 안정하였으며 경시변화 관찰에서도 확연히 투명하고 안정하게 평가 되어졌다. 또한 시간 경과에 따른 입자크기, 제타전위 및 경시변화에서도 가장 높은 압으로 많은 고압유화 처리를 한 나노 리포솜 #2-6이 가장 안정한 것을 확인하였다. 때문에 고압유화 조건을 700 bar, 2회 조건으로 하여 추후 실험을 진행하였다. 추가적으로 더 높은 압과 많은 횟수로 고압유화를 처리할 경우 더 작은 입자크기의 리포솜을 얻을 수 있지만 입자크기가 너무 작을 경우 캡슐화 할 수 있는 리포솜의 공여공간이 줄어들어 캡슐화율이 줄어들 수 있을 뿐만 아니라 피부투과 시에 오히려 피부에 부정적인 영향을 줄 수 있어 고압유화 조건을 700 bar, 2회 로 확립 하였다.

1-2-3 비오틴 나노 리포솜 용매선정 실험 결과 (Liposome #3)

비오틴을 첨가한 나노 리포솜에서 비오틴이 어떤 용매에서 더 안정적인지 평가하기 위해 다음과 같은 실험이 진행되어졌으며, 결과적으로 ethanol을 용매로 선정한 리포솜이 butylene glycol을 용매로 선정한 리포솜 보다 입자크기, 제타전위 및 경시변화에서 우수하게 평가되었다. 그러나 7일후 경시변화 평가에서 4개의 제형에서 모두 비오틴이 석출되는 현상이 나타났다. 이는 pH 측정결과에서 pH가 이전 일반 나노 리포솜에 비해 현저하게 낮아졌음을 확인 할 수 있었다. 이는 비오틴이 나노 리포솜 제조 시 첨가되면서 pH가 감소함에 따라 리포솜이 불안정해지게 되는 원이 되었을 것으로 판단되어진다. 또한 비오틴 역시 pH가 낮을 경우 물에서의 용해도가 떨어지는 경향을 보이는데 이로 인한 비오틴 석출현상이 나타나는 것으로 판단되었다.

1-2-4 알지닌 첨가 비오틴 나노 리포솜 제조 실험 결과 (Liposome #4)

비오틴 나노 리포솜 제조시 비오틴이 석출되는 문제점을 해결하고자 용매를 알지닌을 첨가한 비오틴 나노 리포솜 제조 실험을 진행하였다. pH 측정 결과 알지닌을 첨가한 나노 리포솜 #4-2와 #4-4에서 pH가 증가하였으며, 특히 비오틴을 같이 첨가한 나노 리포솜 #4-4의 pH가 5.62로 리포솜이 안정하게 유지되는 pH 조건에 부합함을 확인하였다. 또한 입자크기, 제타전위 및 경시변화에서도 확연히 알지닌을 첨가한 비오틴 나노 리포솜이 그렇지 않은 일반 비오틴 나노 리포솜보다 더욱 뛰어난 것을 확인 하였다($p < 0.05$). 이를 통해 최종적으로 알지닌을 첨가한 비오틴 나노 리포솜 #4-4을 최종 제형으로 선정하였다.

Table 6. After 1 Day, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Particle Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #1-1	25.0	194.0±12.80	0.461±0.088	-57.8±0.3
Liposome #1-2	25.0	223.8±9.42	0.517±0.024	-78.0±7.1
Liposome #1-3	25.0	396.0±11.25	0.454±0.066	-27.0±1.1
Liposome #1-4	25.0	409.9±14.82	0.580±0.013	-22.8±1.8
Liposome #2-1	25.0	211.12±13.32	0.415±0.017	-81.3±0.8
Liposome #2-2	25.0	163.17±8.51	0.432±0.031	-63.6±4.9
Liposome #2-3	25.0	152.97±12.34	0.460±0.044	-71.3±1.3
Liposome #2-4	25.0	120.89±13.21	0.423±0.041	-72.6±1.5
Liposome #2-5	25.0	116.99±7.42	0.456±0.018	-55.4±1.6
Liposome #2-6	25.0	91.41±5.48	0.310±0.021	-64.7±0.8

Table 7. After 1 Day, Biotin Encapsulated in Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Particle Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #3-1	25.0	132.4±6.25	0.581±0.007	-57.8±3.5
Liposome #3-2	25.0	129.4±4.36	0.643±0.003	-83.4±9.2
Liposome #3-3	25.0	260.3±8.77	0.520±0.023	-20.9±0.8
Liposome #3-4	25.0	392.3±2.21	0.553±0.042	-14.5±1.1
Liposome #4-1	25.0	156.2±13.90	0.608±0.024	-56.3±1.9
Liposome #4-2	25.0	98.6±3.42	0.539±0.011	-45.4±2.8
Liposome #4-3	25.0	129.7±4.97	0.619±0.005	-39.2±1.3
Liposome #4-4	25.0	144.8±2.51	0.595±0.007	-27.9±4.2

Table 8. After 7 Days, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #1-1	25.0	198.92±6.28	0.439±0.082	-92.9±5.4
Liposome #1-2	25.0	223.57±3.33	0.543±0.003	-89.5±3.6
Liposome #1-3	25.0	385.42±18.58	0.469±0.101	-29.5±2.1
Liposome #1-4	25.0	398.02±5.08	0.548±0.012	-15.2±1.8
Liposome #2-1	25.0	213.97±5.31	0.414±0.021	-30.4±0.6
Liposome #2-2	25.0	163.78±9.01	0.420±0.033	-28.1±1.3
Liposome #2-3	25.0	152.90±1.94	0.452±0.013	-32.0±0.8
Liposome #2-4	25.0	125.06±0.94	0.379±0.034	-60.5±3.4
Liposome #2-5	25.0	119.68±1.48	0.426±0.008	-76.8±6.2
Liposome #2-6	25.0	98.10±0.42	0.332±0.029	-62.9±1.0

Table 9. After 7 Days, Biotin Encapsulated in Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #3-1	25.0	136.28±2.12	0.594±0.008	-53.6±3.8
Liposome #3-2	25.0	130.19±1.19	0.644±0.013	-96.4±7.5
Liposome #3-3	25.0	239.98±10.58	0.540±0.024	-19.4±1.3
Liposome #3-4	25.0	377.43±2.37	0.594±0.020	-13.9±1.8
Liposome #4-1	25.0	138.82±1.68	0.624±0.012	-61.5±4.2
Liposome #4-2	25.0	129.70±1.91	0.543±0.004	-67.0±3.8
Liposome #4-3	25.0	130.00±2.04	0.618±0.008	-53.5±0.7
Liposome #4-4	25.0	107.57±1.63	0.588±0.008	-68.2±2.8

Table 10. After 14 Days, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #1-1	25.0	200.64±5.04	0.410±0.047	-68.6±3.4
Liposome #1-2	25.0	220.34±3.84	0.559±0.016	-57.6±1.9
Liposome #1-3	25.0	356.96±11.66	0.593±0.013	-25.5±2.2
Liposome #1-4	25.0	365.63±4.87	0.577±0.003	-14.6±0.4
Liposome #2-1	25.0	216.13±	0.406±0.088	-29.7±0.7
Liposome #2-2	25.0	172.69±	0.343±0.032	-27.4±0.9
Liposome #2-3	25.0	158.47±	0.447±0.012	-31.9±1.4
Liposome #2-4	25.0	137.06±	0.304±0.009	-57.0±2.1
Liposome #2-5	25.0	128.55±	0.393±0.003	-70.6±6.4
Liposome #2-6	25.0	113.72±	0.308±0.018	-62.3±3.2

Table 11. After 14 Days, Biotin Encapsulated in Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #3-1	25.0	138.84±1.46	0.617±0.007	-63.1±1.8
Liposome #3-2	25.0	156.10±1.90	0.527±0.047	-55.4±0.8
Liposome #3-3	25.0	243.78±10.04	0.510±0.008	-19.4±2.2
Liposome #3-4	25.0	389.05±1.65	0.608±0.001	-12.9±1.1
Liposome #4-1	25.0	142.00±0.70	0.608±0.025	-60.9±2.3
Liposome #4-2	25.0	121.16±2.76	0.561±0.013	-79.2±1.8
Liposome #4-3	25.0	133.41±2.11	0.607±0.021	-65.7±0.9
Liposome #4-4	25.0	103.34±1.26	0.581±0.044	-67.0±3.2

Table 12. After 30 Days, Preliminary Experimental Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #1-1	25.0	192.07±1.10	0.349±0.004	-54.6±4.8
Liposome #1-2	25.0	222.40±3.52	0.369±0.005	-62.0±3.5
Liposome #1-3	25.0	326.83±6.99	0.486±0.017	-23.4±0.8
Liposome #1-4	25.0	378.73±18.30	0.454±0.088	-14.7±0.3
Liposome #2-1	25.0	229.60±8.74	0.371±0.043	-28.6±1.0
Liposome #2-2	25.0	191.53±1.89	0.296±0.011	-26.7±0.8
Liposome #2-3	25.0	183.50±0.70	0.339±0.052	-29.2±0.9
Liposome #2-4	25.0	162.13±2.32	0.287±0.005	-66.6±4.0
Liposome #2-5	25.0	153.53±4.71	0.313±0.038	-69.6±3.1
Liposome #2-6	25.0	148.97±2.86	0.278±0.002	-58.0±0.3

Table 13. After 30 Days, Biotin Encapsulated in Nano Liposome Particle Size and Zeta Potential Analysis Results

Sample	Temp.	Size	PDI	Zeta Potential
	℃	d.nm		mV
Liposome #3-1	25.0	154.27±3.74	0.530±0.049	-32.0±0.9
Liposome #3-2	25.0	167.40±1.51	0.551±0.004	-28.2±2.1
Liposome #3-3	25.0	270.20±2.69	0.452±0.076	-16.5±0.5
Liposome #3-4	25.0	398.63±12.10	0.504±0.021	-10.7±0.2
Liposome #4-1	25.0	175.37±7.60	0.527±0.028	-34.7±2.0
Liposome #4-2	25.0	114.50±4.92	0.554±0.037	-32.9±2.1
Liposome #4-3	25.0	163.63±4.54	0.547±0.010	-33.6±0.4
Liposome #4-4	25.0	101.30±1.76	0.571±0.005	-31.8±0.6

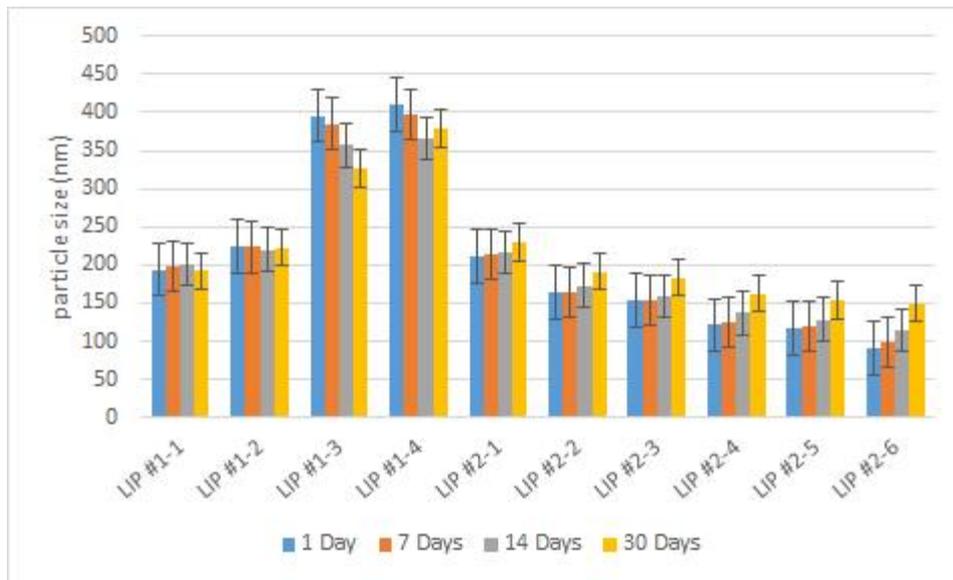


Figure 13. Result of preliminary experimental nano liposome Particle size change trend with over time.

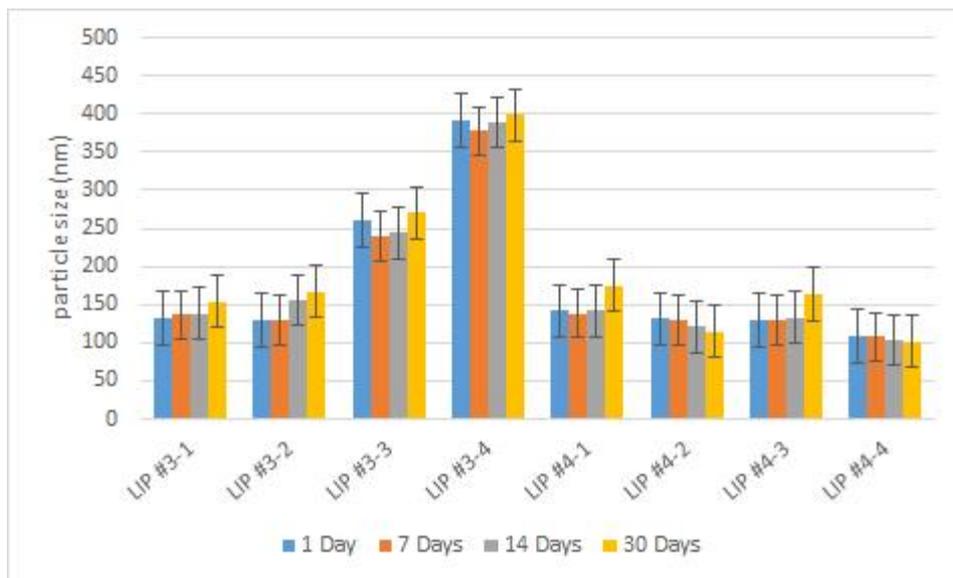


Figure 14. Result of biotin encapsulated in nano liposome Particle size change trend with over time.

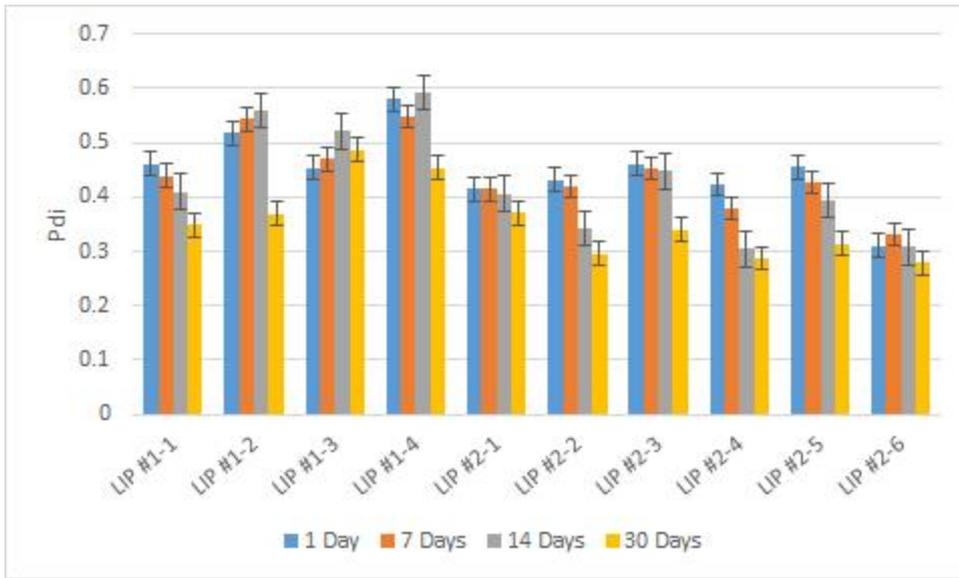


Figure 15. Results of preliminary experimental nano liposome PDI change trend with over time.

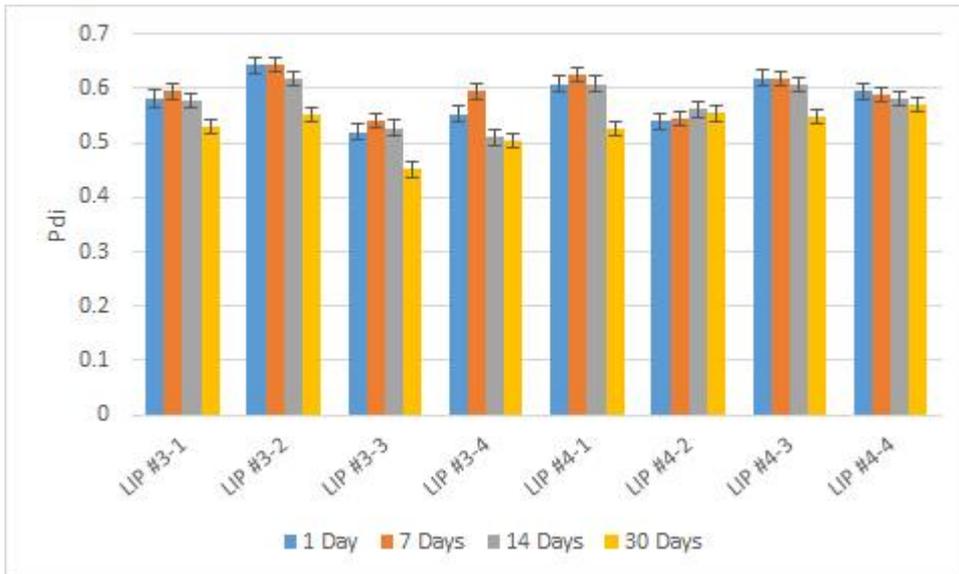


Figure 16. Results of biotin encapsulated in nano liposome PDI change trend with over time.

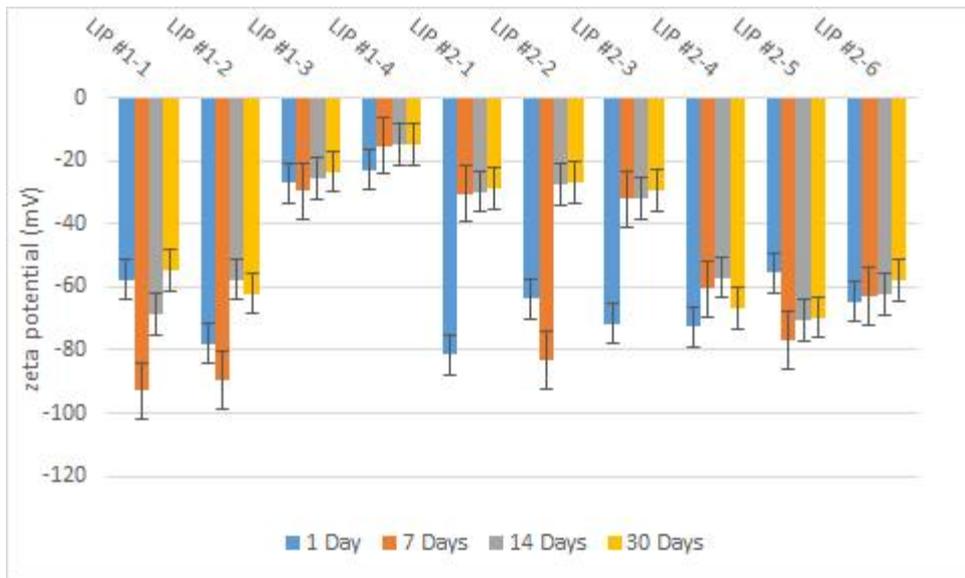


Figure 17. Results of preliminary experimental nano liposome zeta potential change trend with over time.

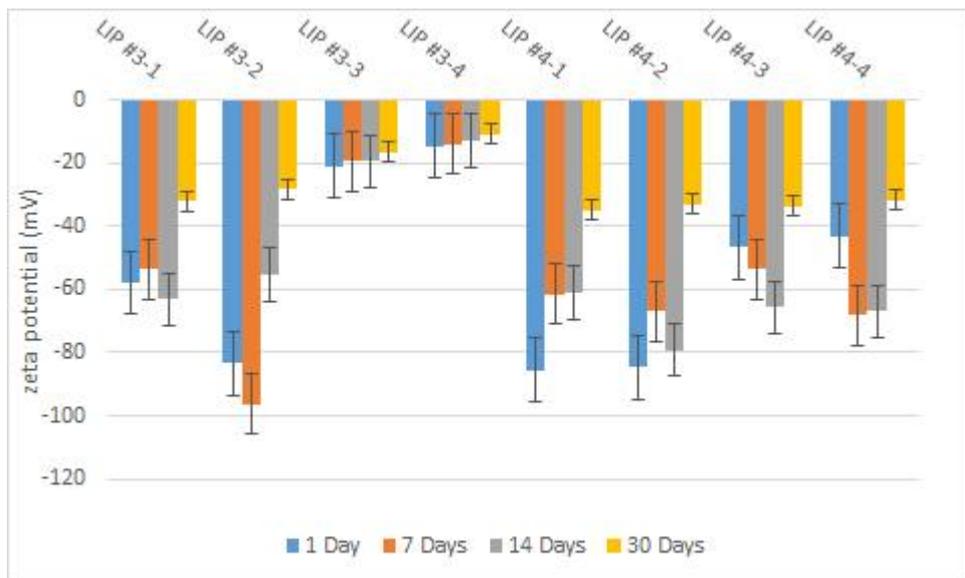


Figure 18. Results of biotin encapsulated in nano liposome zeta potential change trend with over time.

2. 비오틴 나노 리포좀 캡슐화율(capsulating efficiency) 계산

2-1. 비오틴 HPLC 정량

기존 비오틴에 알지닌을 첨가함에 따라 안정성이 유지되는지 여부를 확인하기 위하여 일반 비오틴 수용액의 농도별 HPLC 측정과 알지닌 첨가 비오틴 수용액의 농도별 HPLC 측정을 진행하였다. 실험결과에 따르면 일반 비오틴 수용액의 HPLC 분석결과와 알지닌 첨가 비오틴의 HPLC 분석결과가 유사한 결과값을 나타내었으나 알지닌 첨가 비오틴이 일반 비오틴에 비하여 약 12~14%정도의 비오틴 활성이 떨어졌음을 확인할 수 있었다(Table 14).

2-2. HPLC 측정을 통한 비오틴 추세곡선

DMM을 통해 비오틴 리포솜의 비오틴 캡슐화율을 구하기 위해 우선적으로 비오틴 농도에 따른 HPLC 측정을 통해 추세곡선을 그렸다(Figure 19). 또한 알지닌을 0.06% 첨가한 비오틴 추세곡선을 그려 다음과 같은 식을 통해 비오틴의 나노 리포솜내 캡슐화율을 구하였다(Figure 20).

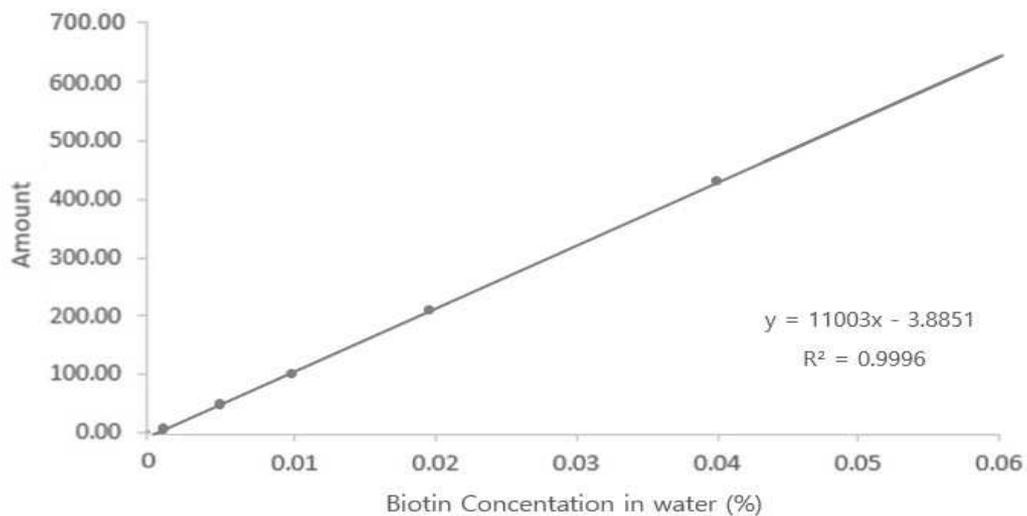


Figure 19. Biotin HPLC calibration curve.

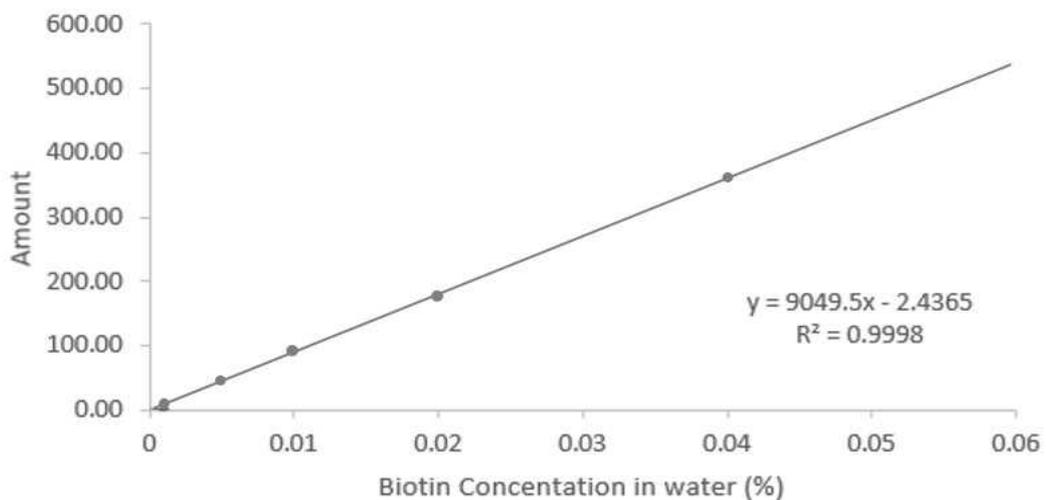


Figure 20. Biotin add arginine HPLC calibration curve.

2-3. 나노 리포솜내 비오틴 캡슐화율 계산

2-3-1 나노 리포솜 #4-3 캡슐화율 결과

$$A = \frac{C_2}{C_1} \times 100 (\%) = \frac{0.0974}{0.1072} \times 100 = 90.69 \dots\dots\dots (\text{Equation 3})$$

$$B = \frac{C_3}{C_1} \times 100 (\%) = \frac{0.0060}{0.1072} \times 100 = 5.60 \dots\dots\dots (\text{Equation 4})$$

C_1 = amount of biotin in original liposome #4-3(%)

C_2 = amount of biotin in membrane outer liposome #4-3(%)

C_3 = amount of biotin in membrane inner liposome #4-3(%)

2-3-2 나노 리포솜 #3-4 캡슐화율 결과

$$A = \frac{C_2}{C_1} \times 100 (\%) = \frac{0.0947}{0.1147} \times 100 = 82.56 \dots\dots\dots (\text{Equation 5})$$

$$B = \frac{C_3}{C_1} \times 100 (\%) = \frac{0.0317}{0.1147} \times 100 = 27.64 \dots\dots\dots (\text{Equation 6})$$

C_1 = amount of biotin in original liposome #4-4(%)

C_2 = amount of biotin in membrane outer liposome #4-4(%)

C_3 = amount of biotin in membrane inner liposome #4-4(%)

HPLC 분석을 통해 구한 Amount 값을 각 식에 대입하여 비오틴의 캡슐화율을 구한 결과 나노 리포좀 #4-3의 경우 5.60%의 캡슐화율을 나타냈으며, 회수율로 96.29%를 나타내어 오차범위 안의 신뢰도를 가졌다. 또한 나노 리포좀 #4-4의 경우 27.64%의 캡슐화율을 나타냈으며 회수율로 110.20%를 나타내어 오차범위 안의 신뢰도를 가졌다($p < 0.05$). 이를 통해 알지닌을 첨가한 비오틴 리포좀이 그렇지 않은 일반 비오틴 리포좀에 비해 비오틴 캡슐화율이 약 5배 증가하였음을 확인할 수 있다. 이를 통해 알지닌 첨가에 따른 pH 증가가 비오틴 나노 리포좀을 제조하는 데 있어 캡슐화율을 향상하는데 유리하다는 것을 확인하였다.

Table 14. Results of Dialysis Membrane Method Capsulating Efficiency

Sample	Retention time	Amount	Capsulating efficiency
	min	%	%
Liposome #4-3 (Original)	7.317±0.057	0.1072±0.0001	
Liposome #4-3 (Membrane outer)	7.292±0.014	0.0974±0.0187	5.60
Liposome #4-3 (Membrane inner)	7.299±0.059	0.0060±0.0002	
Liposome #4-4 (Original)	7.301±0.055	0.1147±0.0001	
Liposome #4-4 (Membrane outer)	7.298±0.032	0.0947±0.0003	27.64
Liposome #4-4 (Membrane inner)	7.281±0.038	0.0317±0.0004	

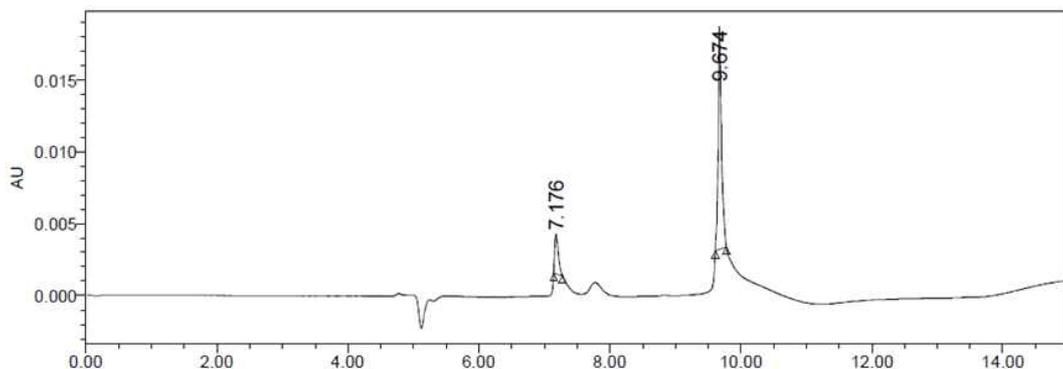


Figure 21. Liposome #4-3 membrane outer HPLC results.

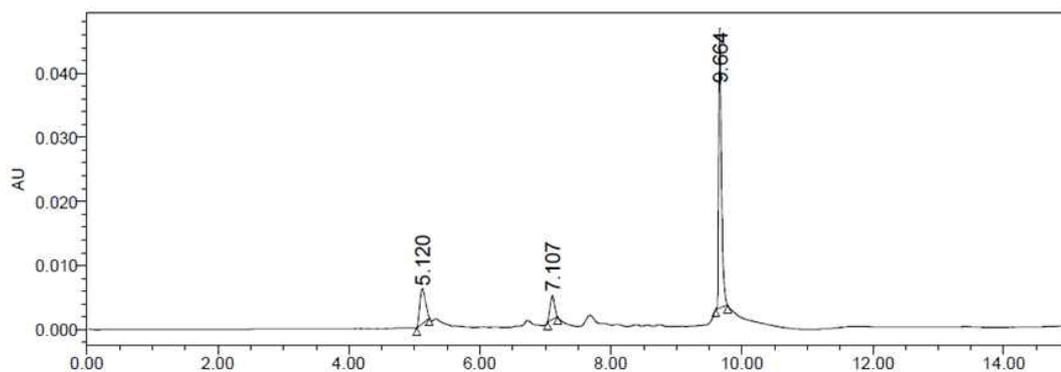


Figure 22. Liposome #4-3 membrane inner HPLC results.

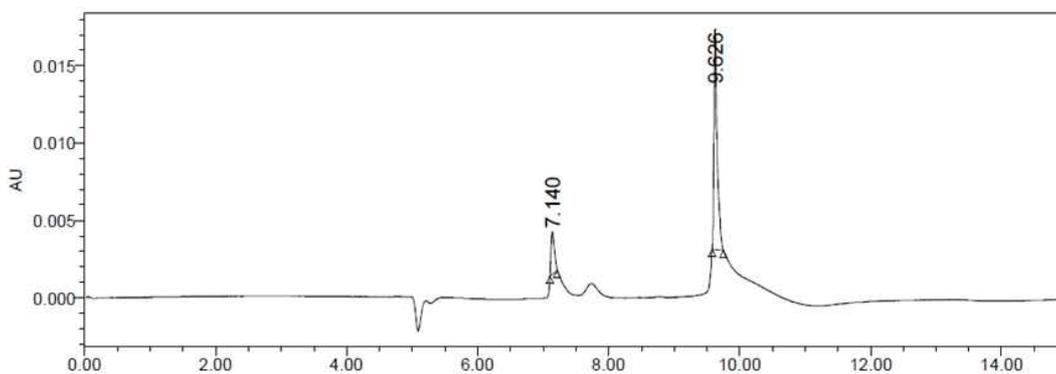


Figure 23. Liposome #4-4 membrane outer HPLC results.

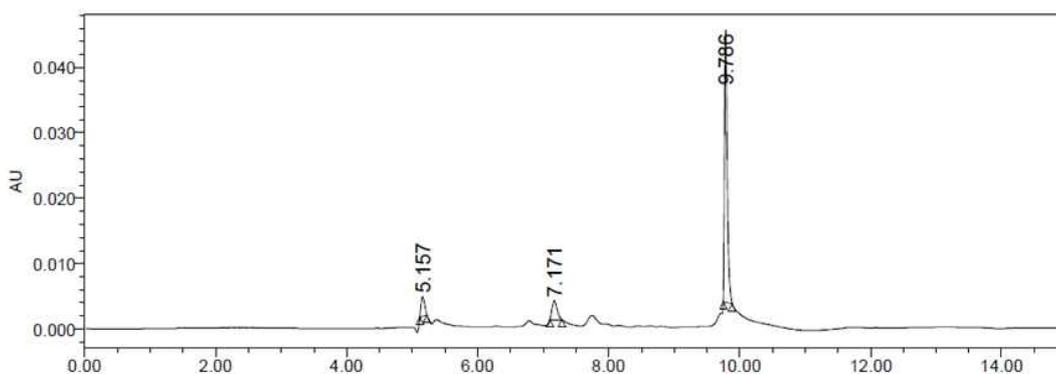


Figure 24. Liposome #4-3 membrane inner HPLC results.

3. 비오틴 나노 리포솜 피부흡수율(skin permeation) 결과

Franz diffusion cell method를 통해 비오틴 나노 리포솜의 피부흡수율(skin permeation)을 HPLC로 정량한 결과 2 h, 4 h, 8 h 경과 후 receptor phase에서 sampling한 각각의 sample에서 모두 비오틴이 검출되지 않았다. 반면에 membrane에 남은 잔존 비오틴 함량을 측정한 결과 0.88 µg의 비오틴이 석출되었다. 이를 통해 비오틴 나노 리포솜의 피부흡수율은 receptor phase의 비오틴 투과율(A)과 membrane내의 biotin 잔존률(B)을 합한 값이므로 다음과 같이 0.22% (A+B)임을 확인하였다.

$$A = \frac{C_2}{C_1} \times 100 (\%) = \frac{0.00}{574.19} \times 100 = 0.00 \dots\dots\dots \text{(Equation 7)}$$

$$B = \frac{C_3}{C_1} \times 100 (\%) = \frac{0.88}{574.19} \times 100 = 0.22 \dots\dots\dots \text{(Equation 8)}$$

C_1 = amount of biotin in donor phase (µg)

C_2 = amount of biotin in receptor phase (µg)

C_3 = amount of biotin in membrane (µg)

Table 15. Results of Contents and Diffusion Rate of Liposome #4-4

Sample	Sampling Site	Sampling time	Detected quantify
		hr	µg
Liposome #4-4	Receptor Phase	2	-
		4	-
		8	-
	Membrane	8	0.88±0.27
	Donor phase	8	574.19±21.25

4. 비오틴 나노 리포솜 형상 관찰

비오틴 나노 리포솜의 형상을 관찰하기 위하여 Cryo-TEM을 측정된 결과 일반 비오틴 나노 리포솜이 매우 작은 크기의 소포체 형태를 띄는 것을 확인 할 수 있었으며, 이를 통해 위의 진행된 리포솜 제조방법을 통해 충분히 나노 리포솜을 제조할 수 있음을 확인하였다. 또한 비오틴을 캡슐화 시킨 나노 리포솜의 경우 리포솜 내부와 외부 모두 삐침형상의 비오틴이 결정 상태로 석출된 것을 확인할 수 있었으며 이를 통해 리포솜의 상태가 불안정하다는 것을 알 수 있다. 반면 알지닌을 첨가한 비오틴 나노 리포솜은 비오틴의 결정상태가 거의 나타나지 않았음을 확인할 수 있다. 이를 통해 알지닌을 첨가하여 pH를 증가시켜 제조한 비오틴 나노 리포솜이 그렇지 않은 비오틴 나노 리포솜에 비해 안정하다는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 19).

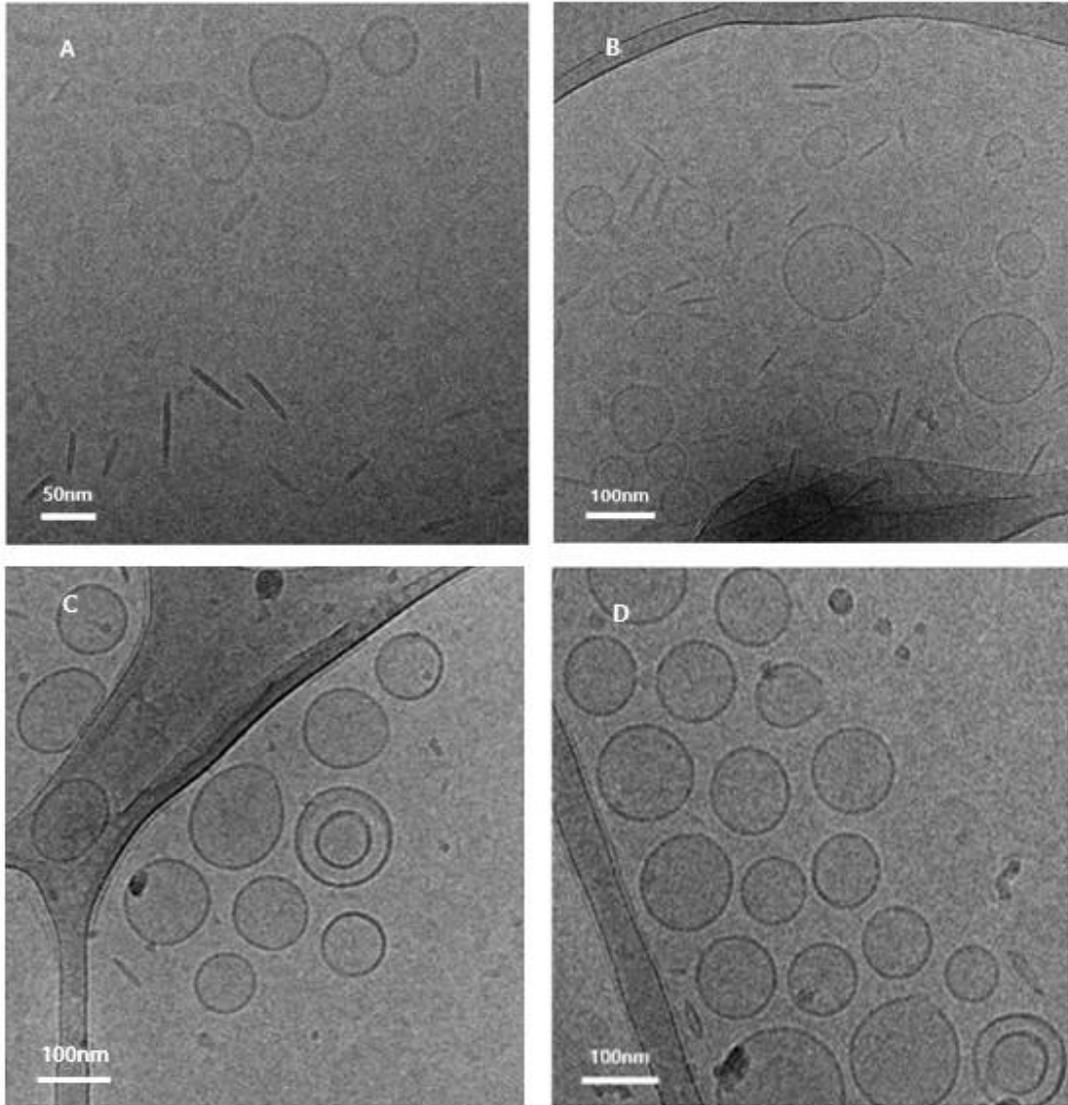


Figure 25. Cryo-TEM pictures of A,B(Liposome #4-3) and C,D(Liposome #4-4).

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 용해도가 낮은 수용성 비타민인 비오틴(biotin)을 약물전달체(drug delivery system)의 일종인 나노 리포솜(nano liposome)을 통해 기존의 현저히 낮은 비오틴의 용해도를 향상시키고 함께 나노 리포솜의 불안정성을 보완하는데 목적을 두고 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 나노 리포솜을 제조한 뒤 제타사이저를 통해 입자 크기, 제타전위를 측정하였으며, DMM (dialysis membrane method)을 통하여 비오틴 나노 리포솜의 캡슐화율(encapsulation efficiency)을 측정하여 최적의 나노 리포솜 제조 조건을 선정하였다. 최적화한 조건으로 제조된 나노 리포솜은 각 온도별로 안정성을 평가하였으며, 실험 결과를 통해 비오틴을 용해시키는 데에 가장 영향을 미치는 요소가 pH임을 확인하였다. 실제로 이 실험에서의 제조공정을 통하여 pH의 조절에 따라 비오틴의 활성이 약 12% 감소하였으나 충분히 감안할 수 있는 활성을 띄었음을 확인하였으며, 오히려 pH가 증가함에 따라 나노 리포솜 내에서 비오틴의 결정화가 일어나지 않았음을 확인하였다. 이를 통해 pH 조절을 통해 안정화된 비오틴 나노 리포솜의 제조 가능성을 확인할 수 있었다.

비오틴 나노 리포솜의 Cryo-TEM 측정 결과를 통해 제조된 나노 리포솜 모두 단일라멜라(unilamella) 구조의 SUV임을 확인할 수 있었으며, 알지닌을 첨가하여 pH를 상승 시킨 비오틴 나노 리포솜이 그렇지 않은 일반 비오틴 나노 리포솜과 비교했을 때 비오틴 석출 현상이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 pH 증가가 비오틴의 용해도를 높여주어 나노 리포솜을 더욱 안정하게 한다는 것을 알 수 있었다.

또한 DMM을 통해 비오틴 나노 리포솜에 대한 캡슐화율을 계산한 결과 알지닌을 첨가하지 않은 일반 비오틴 나노 리포솜에 비해 알지닌을 첨가한 비오틴 나노 리포솜에서의 결과가 비오틴 캡슐화율이 약 5배 증가한 것을 알 수 있었다. 이를 통해 pH 증가에 의해 비오틴이 리포솜내에 용이하게 용해되어 캡슐화율이 증가한 것으로 사료되어진다.

비오틴 나노 리포솜이 약물전달체로서의 역할을 확인하고자 in vitro assay 중

Franz diffusion cell method를 통하여 경피 흡수 실험을 추가로 진행한 결과, 기대했던 피부흡수율에 비해 많이 떨어지는 결과를 얻었다. 이는 아직 명확한 비오틴 나노 리포솜의 피부흡수평가 방법이 확립되지 않아, 추후 비오틴 나노 리포솜 제형에 대한 추가 보완실험을 통하여 피부흡수율과 나노 리포솜의 상관관계에 대해 확인하고자 한다.

V. 참고문헌

- 1) A. Claude; J. Dominique; D. Roland; “Biotin metabolism in plants, Annl Rev” Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **2000**, 51, 17-47
- 2) M. K. Han; New food chemistry, Hyungseul, Seoul, Korea, **2002**
- 3) C. U. Choi; “Easy Vitamin Story”, Korea Food Journal, Seoul, Korea, **2009**
- 4) J. W. Gwak; “Nutraceutical (Meganutrient) therapy, concepts and applications, Shinilbooks, Seoul, Korea, **2001**
- 5) G. F. M. Ball; “Vitamins in foods”, CRC presss, New York., USA, **2005**
- 6) L. J. Goldberg; Y. Lenzy; “Nutrition and hair” Clin. Dermatol., **2010**, 28(4), 412-419
- 7) R. H. Glew; P. P. Stephen; “Clinical studies in medical biochemistry” Oxford Univ. Press, New York, USA, **1987**
- 8) J. R. Knowles; “ The mechanism of biotin-dependent enzymes” Ann. Rev. Biochem. **1989**, 58, 195 - 221
- 9) J. Zemleni; “Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin“ Annu. Rev. Nutr. **2005**, 25, 175 - 196
- 10) R. M. Trueb “Serum biotin levels in women complaining of hair loss” Int. J. of Trichology, **2016**, 8(2), 73-77

- 11) D. P. Patel; S. M. Swink; L. Catelo-Scio; “A Review of the use of biotin for hair loss” *Skin appendage Disord.*, **2017**, 3(3), 166-169
- 12) Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Biotin, European Commission, **2001**
- 13) J. M. Yoo; S. Y. Kim; Master’s Thesis Dissertation, Hoseo Univ. Cheonan, Korea, **2010**
- 14) K. Y. Kyong; “R&D trends of functional cosmetics” *KIC News*, **2010**, 13(4), 1-10
- 15) E. J. Yeom; Master’s Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea **2003**
- 16) D. D. Lasic; “Novel applications of liposomes” *Trends in biotechnology*, **1998**, 16(7), 307-321
- 17) B. Yu; R. J. Lee; L. J. Lee “Microfluidic methods for production of liposomes” *Methods Enzymol*, **2009**, 465, 129-141
- 18) D. Liu; A. Mori; L. Huang; “Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes” *Biochim Biophys Acta*, **1992**, 1104, 95 -101
- 19) André O. *Handbook of Cosmetic Science and Teahology*. Marcel Dekker, Inc. USA, **2001**, 205

- 20) S. M. Johnson; A. D. Bangham; M. W. Hill; E. D. Korn “Single bilayer liposomes”, *Biochim Biophys Acta*, USA. **1971**, 233(3), 820
- 21) R. C. Roger, *New liposomes: a practical approach*, 1-104 Oxford Univ. Press, New York, USA, **1990**
- 22) K. Suzuki; K. Sakon; “The application of liposomes to cosmetics” *Cosmet. Toiletr.* UK, **1990**, 105, 65-72
- 23) G. Imokawa; S. Aakasaki; A. Kawamata; S. Yano; N. Takashi; “Water-retaining function in the stratum corneum and its recovery properties by synthetic pseudoceramide” *J. Soc. Cosmet.. Chem.* **1989**, 40, 273-285
- 24) D. H. Bae; J. S. Shin; “Silicone Nanoemulsion Stablized with Hydrogenated Lecithin” *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **2000**, 11(5), 522-528
- 25) Y. Ebato; Y. Kato; H. Onishi; T. Nagai; Y. Machida; “In vivo efficacy of a novel double liposome as an oral dosage form of salmon calcitonin” *Drug Develop. Res.*, **2003**, 58, 253-257
- 26) G. J. Grant; Y. Barenholz; E. M. Bolotin; M. Bansinath; H. Turndorf; B. Piskoun; E. M. Davidson; “A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia” *Anesthesiology*, **2004**, 101(1), 133-137
- 27) M. S. Park; J. K. Park; G. W. Lee; M. K. Baek; U. K. Jee; “Preparation and Evaluation of Aclarubicin Liposome using Microfluidizer” *Yakhak Hoeji*, Korea, **1998**, 42, 265-274

- 28) E. Mayhew; R. Lazo; W. J. Vail; J. King; A. M. Green; “Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier” *Biochim Biophys Acta*, **1984**, 775(2), 169
- 29) D. Carugo; E. Bottaro; J. Owen; E. Strider; C. Nastruzzi; “Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors” *Scientific Reports*, **2016**, 6, 25876
- 30) K. Katayama; Y. Kato; H. Onishi; T. Nagai; Y. Machida; “Double liposomes: hypoglycemic effects of liposomal insulin on normal rats” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2003**, 29(7), 725-731
- 31) S. Nie; W. W. Hsiao; W. Pan; Z. Yang; “Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies” *Int. J. Nanomedicine*, **2011**, 6, 151
- 32) M. R. Rosen; “Delivery System Handbook for Personal and Cosmetic Products” William Andrew Publishing, New York, USA, **2005**, 264
- 33) K. Y. Lee; G. G. Han; C. K. Zhoh; “The Constraint for Oxidation of Ascorbic Acid” *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2003**, 25(3), 67-86
- 34) S. H. Jeong; Master’s Thesis Dissertation, Ajou Univ., Suwon, Korea **2011**
- 35) J. G. Duman; N. J. Pathak; M. S. Ladinsky; K. L. McDonald; J. G. Forte; “Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells.” *Journal of Cell Science*, **2002**, 115(6), 1251-1258

감사의 글

대학원 입학 후 2년이라는 석사과정의 시간이 너무도 빨리 지나갔습니다. 논문 수정을 마치고 이렇게 감사의 글을 적으면서 그동안의 많은 일들이 머릿속을 스쳐 지나가며 아쉬움 또한 많이 남는 것 같습니다. 부족한 저를 이 자리에 있게 해주신 많은 분들에게 감사의 인사를 드리고자 합니다.

석사과정을 하며 화학분야에 많은 관심과 흥미를 갖게 해주신 우리 화학과 김용해 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 김덕수 교수님, 이남호 교수님, 현창구 교수님 그리고 저의 지도 교수님인 윤경섭 교수님께 진심으로 감사의 말씀드립니다.

우선 처음 제자로 받아들여주신 윤경섭 교수님께 다시 한번 감사의 말씀을 드리며, 처음으로 실험실을 같이 들어와 산전수전을 함께 겪은 미선누나, 학부생부터 대학원까지 학교에서 매일 같이 밤새며 열심히 동분서주해준 희주, 뒤에서 묵묵히 뒷받쳐준 상덕이형, 조용하지만 항상 응원해준 유연이, 그리고 우리 방 분위기 메이커 민근이 까지 모두에게 감사드립니다. 또한 매 순간순간이 처음이어서 좌충우돌할 때마다 기꺼이 도움을 주신 준오 선생님, 하나 선생님, 시연 선생님, 연정 누나께 감사의 말씀 드리고 싶습니다. 또한 대학원 동기들에게도 정말 감사의 말씀 드리고 싶습니다.

아직 끝이 아닌 시작점이라고 생각하며 여러분들의 많은 도움들이 저를 여기까지 올수 있게 하였다고 생각합니다. 이를 잊지 않고 매선에 최선을 다하여 사회에 필요한 사람이 되도록 노력 하겠습니다.

감사합니다.

2020년 2월
양성준 올림