

세치제에 함유된 비효소계 항산화제의 경시변화에 따른 잔류량

박정은 · 박용덕 · 흥태기¹ · 장종화²경희대학교 치과대학 예방/사회치과학교실 · ¹한서대학교 화학과 · ²한서대학교 치위생학과

Residue by elapsed time of non-enzymatic antioxidants in dentifrice

Jung-Eun Park · Yong-Duk Park · Tae-Gi Hong¹ · Jong-Hwa Jang²Department of Preventive and Social Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul · ¹Department of Chemistry, Hanseo University · ²Department of Dental Hygiene Science, Hanseo University

*Corresponding Author: Jong-Hwa Jang, Department of Dental Hygiene Science, Hanseo University, 46 Hanseo 1-ro, Haemi-myun, Seosan, Chungcheongnam-do, 356-706, Korea, Tel: +82-41-660-1574, Fax: +82-41-660-1579, E-mail: jhjang@hanseo.ac.kr

Received: 21 August 2016; Revised: 25 October 2016; Accepted: 26 October 2016

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study is to evaluate the non-enzymatic antioxidants stabilities in dentifrices by ascorbic acid and tocopherol according to the chemical condition.**Methods:** For the analysis of two antioxidants, HPLC UV detector system was used. HPLC was performed using sodium sulfate, acetonitrile(ACN), methanol(MeOH) and measuring absorbance at 240-295 nm. To confirm general pH reaction of two compounds, buffer solution was prepared for the analysis. The dentifrice was titrated by pH so as to examine the change of elapsed time in dentifrice. Linearity of calibration curve of two antioxidants was measured.**Results:** Each compound showed good linearity at optimized wavelength as well as showing good precision. General pH reaction of two antioxidants was examined. Ascorbic acid showed the highest residue(63.23%) at pH 10 and the lowest residue(2.77%) at pH 4. Tocopherol showed the highest residue(55.70%) at pH 7 and the lowest residue(3.31%) at pH 4. As a result of changing elapsed time of antioxidants in dentifrice by pH, components were remained stably at low temperature(39.2°F) and pH 7.**Conclusions:** It is necessary to keep dentifrice including ascorbic acid and tocopherol, and non-enzymatic antioxidants at pH 7 and low temperature for improving chemical stability.**Key Words:** antioxidants, change of elapsed time, dentifrice, non-enzymatic antioxidants, stability**색인:** 경시변화, 비효소계 항산화제, 세치제, 안정성, 항산화제

서론

활성산소(Reactive oxygen species)란 산소의 산화물로서 인체가 섭취한 산소에서 물로 환원되지 않은 2-3%의 잔자를 흡수하려는 자유기(free radical) 과정에서 생성된다.

과량의 활성산소는 질병과 관련되며 그중에서 허혈에 의한 조직 손상, 대사증후군, 암, 노화 등과 관련하여 정상 DNA 세포 및 조직의 손상 등을 초래한다[1-4].

현대의학에서는 활성산소에 의하여 발생하는 각종 질병 뿐만 아니라 구강 내 연조직의 치주질환 등과 관련하여 활성산소를 억제시키는 항산화제에 대한 개발과 연구가 활발하게 진행되고 있다. 인체는 산화 스트레스에 보호하기 위하여 인체 내부의 효소계 항산화제와, 외부에서 체내로 공급이 가능한 비효소계 항산화제를 통하여 세포 내외적 자극

에 대응한다[5,6]. 그중 외부에서 체내로 공급하는 비효소계 항산화제는 ascorbic acid, tocopherol, catechin, curcumin, beta-carotene 및 flavonoid 등은 수많은 연구들을 통하여 항산화 효능을 입증해 왔다[7]. 경우에 따라 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT) 및 butylated hydroxyanisole(BHA)이 사용되어 왔으나 유해성이 보고된 이후 점차 사용량이 감소되고 있어[8,9] 인체에 위해작용을 주지 않으면서 항산화 효능이 유지되는 천연 항산화제를 점차 활용하고 있다[10,11].

Ascorbic acid(Asc)와 Tocopherol(Toc)은 비효소계의 천연항산화제의 일종으로 식품 및 약품 등 다양한 제형으로 복용하기도 하며, 구강에 적용하는 세치제와 구강세정제 등에 유효물질로 혼합하여 사용되고 있다. 이 성분들은 효소계의 작용을 받지 않는 HO· 와 1O_2 등과 반응하여 독성을 억제하며, 생체조직과 막을 보호 한다[5,12]. 뿐만 아니라 제품자체의 산화적 손상을 방지하는 용도로 사용될 수 있어 [13], 보존제의 목적으로 혼합하여 사용할 수 있다.

Ascorbic acid(Asc)는 대표적인 천연 항산화제로서 DNA의 산화 손상을 방지하여[14] 치주인대의 혈관형성과 교원섬유의 성숙을 증가시키는 효과를 기대할 있다[15]. 또한 Asc 유도체인 아스코빌인산(Ascorbyl phosphate)이 함유된 세치제를 사용할 경우 산화스트레스와 관련된 치은조직의 노화를 억제하고, 치주조직의 손상을 방지할 수 있는 효능이 보고되었다[16].

Tocopherol(Toc)은 자유기의 연쇄반응을 억제하는 강력한 항산화제로 알려져 있으며, 자유기와 반응하여 인체조직의 손상을 방지하는 작용을 한다[17]. Asc와 Toc을 병용할 시 치은 내 교원질의 저하와 치조골 흡수를 유발하는 산화스트레스를 억제하여 치주조직에 긍정적인 영향을 줄 수 있다[18-20]. 반대로 혈청 내 항산화제가 결핍되었을 경우 치주질환의 위험요인으로 작용될 수 있다고 보고되었다[21].

이렇게 다양한 목적에 의하여 영양보충제, 가공식품 및 세치제 내에는 다양한 항산화제를 첨가하고 있다. 그러나 항산화제는 산화노출, pH, 온도, 금속 및 빛 등의 여러 요인들로 인하여 화학적 분해가 발생할 가능성이 높고[22], 항산화제 상품의 제조나 보관과정 중에서도 분해될 수 있다고 보고되었다[23,24]. 일반적으로 세치제 내의 수분에 의하여 가수분해, 화학성분 간의 반응이 발생하기 때문에 이에 대한 안정성의 확보에 따른 기초자료가 필요하다.

항산화제 또는 각종 화학성분들의 안정성 평가는 시료의 matrix 및 간섭물질 등의 전처리를 실시한 후 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 또는 LC-MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)로 분석하여 평가되고 있다[25,26].

따라서 본 연구에서는 Asc와 Toc의 HPLC-UV 분석방법을 개발하고, 이 성분들이 함유된 세치제의 안정성을 평가하여 그 농도가 화학적으로 유지될 수 있는 최적화된 환

경을 모색하고자 한다.

연구방법

1. 실험재료

실험에 사용된 비효소계 항산화제 표준품으로 Ascorbic acid와 Tocopherol 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이동상은 Sodium hydroxide(HPLC-grade) 용액을 사용하였으며 Fisher Scientific(Fair Lawn, NJ, USA)에서 구입하였다. 표준품, 시료 및 이동상은 18M Ω 3차 증류수(Billerica, MA, USA)를 사용하였으며, 모든 샘플은 시린지 필터 처리(hydrophobic polytetrafluoroethylene(PTFE) membrane; pore size: 0.20 μ m; Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan)후 분석하였다.

2. HPLC 분석조건 (Chromatographic condition)

항산화제 분석에 사용된 기기 및 펌프는 UltiMate3000 series(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)와 UV-DAD detector를 이용하여 분석하였다. 이때 Asc의 고정상은 Hypersil Gold aQ column(150 \times 2.1-mm internal diameter, 3- μ m particle size; Thermo, Waltham, MA, USA)을 이용하였으며, 등용매 용리(Isocratic elution)를 적용하여 90 mM의 Sodium sulfate를 pH 2.28로 제조하여 분석하였다. 유속은 0.2 mL/min, 주입량은 10 μ L로 분석하였다. Toc의 고정상은 Hypersil GOLD C18 column(150 \times 2.1 mm internal diameter, 3- μ m particle size; Thermo, Waltham)를 이용하였으며, Acetonitrile(ACN)과 Methanol(MeOH)을 9:1로 혼합한 이동상으로 분석하였다. 이때 유속은 0.4 mL/min, 주입량은 10 μ L에서 분석하였다. 두가지 화합물의 UV wavelength는 240-295 nm의 범위 내에서 분석하였다.

3. 분석방법의 검증(Validation)

외부 표준법을 이용하여 Asc 와 Toc의 농도 0.1, 0.5, 1, 10, 그리고 20 μ g/mL로 조제하여 검량선을 작성하여 상관 계수 및 직선성(linearity)을 검토하였다.

4. 항산화제제의 분석

저장액(Stock solution)은 농도 1000 μ g/mL 이 되도록 하였으며 Asc는 3차 증류수, Toc은 메탄올로 희석하여 전처리하였다. 분석방법 개발 시 사용된 모든 표준품은 매일 분석시마다 새로이 제조하여 분석하였으며, 지용성 Toc은 표준품 시료 전처리 후 시린지 필터 처리(hydrophobic polytetrafluoroethylene(PTFE) membrane; pore size: 0.20 μ m; Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan)과정을 거친 다음 분석기기에 주입하였다.

5. 항산화제의 pH 안정성 검사

실험에 사용된 항산화제의 일반적인 pH반응을 확인하기 위하여 완충용액(buffer solution)을 제조하였다. 완충용액은 각 pH 4, 7, 및 10의 완충용액을 제조하였으며 Asc 50 µg/mL, Toc 10 µg/mL을 첨가하였다. 완충용액의 제조 직후를 기준(control)으로 하여 7일간의 정량 및 보존율을 산출하여 안정성을 평가하였으며, 3회 반복측정 후 평균과 표준편차를 검토하였다.

6. 항산화성분 함유 세치제의 제조

세치제에 함유된 항산화제의 경시변화에 따른 잔류량을 확인하기 위하여 pH 별 세치제를 제조하였다. 실험에 사용된 베이스 치약에 Calcium carbonate(99%, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)를 첨가하여 pH 7과 pH 10의 알칼리성 치약을 제조하였다.

확립된 HPLC 분석조건에서 베이스 치약의 간섭 피크의 유무를 확인하기 위하여 Spiked 검사를 실시하였다. 시료의 최종 보관방법은 실온을 유지하여, 암막조건 하에서 4개월 간 6일 간격으로 3회 반복 측정을 하였다.

7. 통계분석

항산화제의 통계적 차이는 SPSS 21.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)로 pH와 온도를 구분하여 비모수적 통계방법으로 분석하였다. 항산화제의 pH 안정성 검사는 Kruskal-Wallis

test를, 세치제 내 비타민은 Mann-Whitney U test를 0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

연구결과

1. 항산화제제의 분석

수용성 Asc는 주로 HPLC 분석방법에 이용되는 역상 고정상에서 머물지 못하며 반면, 지용성 Toc은 높은 농도의 유기용매를 사용하여 역상칼럼에서 녹여서 분석해야 한다. 따라서 본 실험의 2가지 항산화제의 동시 분석은 서로 다른 극성으로 인하여 매우 어렵다. 이에 본 연구에서는 Asc는 극성 시료의 머무름의 손실을 방지하기 위하여 C18의 사슬 중간에 극성기가 도입된 hypersil gold aQ column의 고정상을 이용하여 분석하였으며, Toc은 보편적으로 사용하는 역상 고정상으로 분석하였다. 각 성분의 직선범위와 직선성의 결과는<Table 1>과 같다. 검량선의 직선성(linearity)을 측정된 결과 R²값 직선성은 0.999이상의 직선성을 나타내었다.

2. 항산화제의 pH 안정성 검사결과

두 가지 항산화제의 피크 간섭물질이 없는 상태에서 일반적인 pH 반응에 따른 화학적 안정성을 검토하기 위하여 완충용액(pH 4, 7, 및 10)을 제조하여 경시변화를 분석하였으며, 그 결과는<Table 2>와 같다. 공통적으로 시간이 경과

Table 1. Investigated linear range, linear equation, correlation coefficient.

| Compounds | Linear range(µg/g) | Linear equation* | r ² |
|---------------|--------------------|----------------------|----------------|
| Ascorbic acid | 0.1-20 | y = 1.9871x - 0.4083 | 0.9995 |
| Tocopherol | 0.1-20 | y = 1.7894x - 0.0411 | 1.0000 |

*y=Sx+σ

aLOD: 3.3 σ/S; bLOQ: 10 σ/S (σ, the standard deviation of the y-intercept of the regression; S, the slope of the calibration curve)

Table 2. Content(µg/g) and residue(%) of the change of elapsed time by pH level of antioxidants

| Days | Ascorbic acid | | | Tocopherol | | |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | pH 4 | pH 7 | pH 10 | pH 4 | pH 7 | pH 10 |
| Control | 49.48±2.20 (100.00) | 51.86±3.68 (100.00) | 43.34±2.91 (100.00) | 8.87±0.60 (100.00) | 9.90±1.20 (100.00) | 9.48±0.82 (100.00) |
| 1 | 25.50±1.40 (51.54) | 38.64±2.24 (74.51) | 38.76±2.16 (89.43) | 6.02±0.71 (67.82) | 10.30±0.66 (104.01) | 8.70±0.82 (91.79) |
| 5 | 4.69±0.32 (9.48) | 27.25±0.88 (52.55) | 31.94±0.84 (73.70) | 0.52±0.08 (5.88) | 6.65±0.13 (67.13) | 6.06±0.19 (63.96) |
| 7 | 1.37±0.35 (2.77) | 12.55±0.19 (24.19) | 27.41±1.76 (63.23) | 0.29±0.02 (3.31) | 5.52±0.14 (55.70) | 4.74±0.02 (49.96) |
| p-value* | | 0.082 | | | 0.421 | |

(Mean±SD), The measurement was repeated 3 times

*by Kruskal-Wallis test at α=0.05

함에 따라 항산화제의 농도가 감소하였다. 실험에 사용된 2가지의 항산화제는 pH 4의 환경에 가장 취약하여 <3.31%으로, 7일 내에 대부분이 분해되었다. Asc는 pH 10에서 27.41 µg/g, 63.23%로 분석되어 pH 7보다 pH 10에서 안정적이었다. Toc은 pH 7에서 5.52 µg/g, 55.70%로 분석되어 pH 10보다 pH 7에서 안정적이었다.

3. 세치제에 함유된 항산화제의 경시변화

세치제에 함유된 Asc의 경시변화에 따른 함량과 비율은 <Table 3>, <Fig. 1>과 같다. Asc는 pH에 관계없이 실온보관을 하였을 때, 3주 후 모두 분해되어 사라졌으며(p<0.01),

이는 저온보관을 함으로써 보존함량을 안정적으로 유지할 수 있었다. 저온보관 시 pH 10보다 pH 7환경에서 2주가량 보존을 연장시킬 수 있었다. 따라서 Asc는 저온보관과 pH 7에서 보존이 잘 되었으며, 보다 안정적이다.

Toc에 대한 함량과 비율은<Table 4>, <Fig. 1>과 같다. Toc은 실온에서 조기에 분해에 영향을 받지 않았으나, 5-7주경과 후부터 온도에 따른 큰 차이가 나타나 영향을 받았다(p<0.05). 경시변화 농도의 비율을 살펴보았을 때 Toc 또한 저온보관과 pH 7에서 안정적인 것으로 분석되었다.

Table 3. Content(mg/g) and ratio by the change of elapsed time of Asc in dentifrice

| Weeks | Concentration(mg/g) | | | | The ratio of concentration | | | |
|----------|---------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | pH 7 | | pH 10 | | pH7/10 | | 39.2°F/68°F | |
| | 68°F | 39.2°F | 68°F | 39.2°F | 68°F | 39.2°F | pH 7 | pH 10 |
| Control | 1.95±0.32 | 2.23±0.40 | 1.96±2.05 | 2.17±0.19 | 0.99 | 1.0 | 1.15 | 1.10 |
| 1 | 1.02±0.11 | 1.25±0.03 | 1.11±0.30 | 2.10±0.25 | 0.92 | 0.6 | 1.22 | 1.89 |
| 2 | 0.59±0.04 | 1.25±0.03 | 0.49±0.07 | 1.67±0.38 | 1.21 | 0.7 | 2.12 | 3.45 |
| 3 | 0.59±0.06 | 1.14±0.06 | 0.33±0.01 | 1.43±0.38 | 1.81 | 0.8 | 1.93 | 4.39 |
| 5 | - | 1.13±0.07 | - | 0.92±0.24 | 0.00 | 1.2 | 0.00 ^a | 0.00 ^a |
| 7 | - | 1.07±0.24 | - | 0.75±0.06 | 0.00 | 1.4 | 0.00 ^a | 0.00 ^a |
| 9 | - | 0.82±0.06 | - | 0.65±0.01 | 0.00 | 1.3 | 0.00 ^a | 0.00 ^a |
| 11 | - | 0.71±0.01 | - | 0.63±0.04 | 0.00 | 1.1 | 0.00 ^a | 0.00 ^a |
| 13 | - | 0.57±0.02 | - | 0.61±0.04 | 0.00 | 0.9 | 0.00 ^a | 0.00 ^a |
| 15 | - | 0.49±0.06 | - | 0.42±0.01 | 0.00 | 1.2 | 0.00 ^a | 0.00 ^a |
| 17 | - | 0.46±0.02 | - | - | 0.00 | 0.00 ^a | 0.00 ^a | 0.00 |
| p-value* | <0.001* | 0.865 | <0.001* | 0.784 | - | - | - | - |

(Mean±SD), The measurement was repeated 3 times

^aThe number of "0" was not detected in the pH 10. So it is calculates as "0"

*by Mann-Whitney test at α=0.01

Table 4. Content(mg/g) and ratio by the change of elapsed time of Toc in dentifrice

| Weeks | Concentration(mg/g) | | | | The ratio of concentration | | | |
|----------|---------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------------|--------|-------------|-------|
| | pH 7 | | pH 10 | | pH7/10 | | 39.2°F/68°F | |
| | 68°F | 39.2°F | 68°F | 39.2°F | 68°F | 39.2°F | pH 7 | pH 10 |
| Control | 2.89±1.18 | 2.92±1.16 | 2.95±0.13 | 2.89±0.54 | 0.98 | 1.01 | 1.01 | 0.98 |
| 1 | 2.79±0.32 | 2.86±0.03 | 2.81±0.37 | 2.70±0.49 | 0.99 | 1.06 | 1.03 | 0.96 |
| 2 | 2.75±0.03 | 2.85±0.02 | 2.78±0.15 | 2.70±0.21 | 0.99 | 1.06 | 1.03 | 0.97 |
| 3 | 2.71±0.15 | 2.87±0.07 | 2.49±0.17 | 2.65±0.23 | 1.09 | 1.08 | 1.06 | 1.07 |
| 5 | 1.83±0.16 | 2.64±0.15 | 2.32±0.07 | 2.69±0.08 | 0.79 | 0.98 | 1.44 | 1.16 |
| 7 | 1.41±0.18 | 2.66±0.16 | 1.41±0.34 | 2.66±0.00 | 1.00 | 1.00 | 1.89 | 1.89 |
| 9 | 1.30±0.00 | 2.43±0.04 | 0.97±0.05 | 1.42±0.06 | 1.35 | 1.71 | 1.87 | 1.47 |
| 11 | 1.27±0.27 | 2.01±0.20 | 0.85±0.02 | 1.38±0.04 | 1.50 | 1.45 | 1.58 | 1.63 |
| 13 | 1.00±0.08 | 1.91±0.15 | 0.78±0.02 | 1.32±0.11 | 1.29 | 1.44 | 1.91 | 1.70 |
| 15 | 0.80±0.02 | 1.83±0.15 | 0.46±0.01 | 1.31±0.04 | 1.72 | 1.39 | 2.30 | 2.84 |
| 17 | 0.59±0.07 | 1.79±0.02 | 0.48±0.34 | 1.26±0.00 | 1.24 | 1.42 | 3.03 | 2.65 |
| p-value* | 0.203 | 0.042* | 0.210 | 0.042* | - | - | - | - |

(Mean±SD), The measurement was repeated 3 times

*by Mann-Whitney test at α=0.05

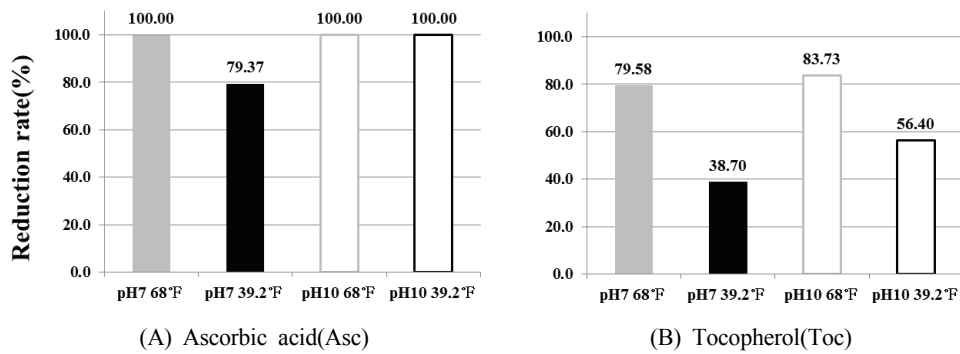


Fig. 1. Reduction rate of antioxidant in dentifrices

총괄 및 고안

구강 내 청결을 목적으로 사용하는 세치제는 오늘날 세정작용 뿐만 아니라 다양한 목적으로 첨가하는 유효성분들이 개발되고 있다. 이러한 관점에서 구강 내 산화손상은 치주질환 및 연조직의 손상을 초래할 수 있으며, 이를 예방하기 위한 방법으로 세치제 내에 비효소계 천연항산화제를 혼합하여 사용하고 있다. 그러나 이 성분들은 빛, 온도, pH, 금속, 수분, 화학물질 등의 원인에 의해 쉽게 분해될 수 있다고 다양한 연구에서 보고되어 왔다. 이에 따른 식품, 약품, 채소 등의 항산화 물질의 안정성연구는 활발히 진행되고 있으나, 세치제 내에 포함된 항산화제에 대한 안정성의 연구는 전무하다.

따라서 본 연구에서는 세치제에 함유되는 비효소계 항산화제인 Asc와 Toc의 pH와 온도에 따른 경시변화를 평가하고, 이를 통하여 화학적으로 안정적인 조건이 될 수 있는 최적화된 환경을 모색하고자 하였다.

먼저 본 연구에서는 항산화제를 분석하기 위한 방법으로 HPLC-UV 분석방법을 통하여 분석방법의 검증절차 과정을 거쳐 항산화제의 분석을 실시하였다. Asc와 Toc을 분석하는 방법은 과일, 채소 및 약품 등에서 자외선 검출기를 이용한 방법이 주로 이용되고 있으며[27,28], 모세관 액체크로마토그래피[29], 전기화학검출기[30], 분광광도계[31], 질량분석법[32]을 이용한 다양한 방법이 개발되어 활용되고 있다. 본 실험에서 적용된 HPLC-UV 분석방법과 시료 전처리 방법은 직선범위 0.1-20 µg/g에서 직선성 0.999이상으로 분석방법에 대한 검증을 확립하였다.

비효소계 항산화제의 일반적인 pH반응을 평가하기 위하여 pH 4, 7, 그리고 10의 완충용액을 제조하였다. 이는 세치제 내 다양한 matrix와 간섭물질로 인한 화학적 요인을 배제하고 오로지 항산화제의 pH 반응을 평가하기 위함으로 Jang 등[33]의 세치제 내의 카테킨 성분의 화학적 안정성에 대한 실험을 참고하여 실험을 디자인하였다. 또한 일반적으로 세치제는 pH 7-10의 범위 내에서 제조하며[33], 산성은

치아의 탈회와 보철물의 침식을 일으키기 때문에 산성으로 제조하지 않는다[34,35]. 그러나 본 실험에서는 pH의 고저에 따른 반응을 살펴보기 위함으로 pH 4를 포함하여 경시변화에 따른 분석을 진행하였다.

완충용액 내의 실험결과 두 가지 항산화제의 pH반응은 pH 4에서 매우 급격하게 함량이 감소하였으며, Asc는 pH 7보다 pH 10에서 안정적인 것으로 분석되었다. Toc은 pH 7과 10이 큰 차이가 없었으나, pH 7에서 안정적인 것으로 분석되어 Asc와 Toc의 pH반응은 상이한 결과를 보였다.

세치제의 pH7 과 10의 결정은 완충용액의 pH 4, 7 그리고 10 중에서 급격하게 소실된 pH 4만을 제외하고, pH 7과 10을 중점적으로 평가하기 위하여 결정하였다. 세치제 내의 Asc는 온도에 큰 영향을 받아 두 가지의 pH에서 3주 후 모두 분해되었으며, 저온보관 시 pH 10보다 pH 7에서 더 안정적인 것으로 분석되었다. pH별, 온도별의 비율로 살펴보면 실온일 때 보다 저온보관 시 1.2-0.0, pH 10보다 pH 7에서 안정적인 양상을 보였다. 이는 완충용액과 세치제 내에서 pH에 대한 반응이 다르게 반응하였는데 완충용액은 7일간, 세치제 실험은 4개월 간 비교적 장기간의 관찰로 인한 결과로 보인다. 세치제의 1주차의 결과에서는 pH 7보다 pH 10에서 더 안정적인 양상을 보였으나, 이는 시간이 경과함에 따라 pH에 다르게 반응하였다. 또한 완충용액과는 달리 세치제 내에 포함된 다양한 화학성분과 매트릭스에 영향을 받은 것으로 보여진다. 수용성인 Asc는 제품의 보관과정 중에서도 화학적 산화가 발생되기 쉬워 성분 파괴에 예민한 특성을 가지고 있다고 보고되었다[22].

또한 Sapei와 Hwa[36], Kebede 등[37]은 Asc 성분이 온도에 큰 영향을 받으며 저온보관을 하였을 때 경시변화에 따른 보존성을 높일 수 있다는 결과와 일치하였다. 또한 온도에 의한 감소효과가 빛에 의한 광분해의 영향보다 크게 작용[38]하여 온도에 매우 민감하다고 평가할 수 있다. 따라서 많은 연구자들은 Asc가 포함된 제품의 최소화된 가공 및 포장[39], 미소유탁화(microemulsion)처리[40] 등으로 안정성을 확보하여야 한다고 보고하였다.

Toc도 마찬가지로 높은 온도에서 분해에 영향을 받아 저온보관 상에서 보다 안정적인 것으로 보였으며, 기존의 Toc의 안정성 실험결과[41]와 동일한 결과를 나타내었다. 또한 pH별 항산화제 검사결과와 세치제 내 항산화제의 안정성 평가결과가 동일하게 나타나 pH 7에서 안정적인 것으로 평가되었다. 지용성인 Toc은 산화, 빛, 가열, 보관경과시간에 따라 그 성분이 파괴된다고 알려져 있다[22]. 따라서 Asc와 Toc이 함유된 세치제는 여러 요인들 중에서 온도에 영향을 많이 받는 것으로 평가할 수 있다.

일반적인 세치제의 유통기한을 36개월 기준으로 보았을 때, 비효소계 항산화제로 사용되는 Asc와 Toc이 비교적 조기에 화학적 분해가 일어나므로, 이를 방지하기 위하여 세치제 내의 성분을 pH 7의 범위가 되도록 제조하여야 하며, 항산화제 분해를 지연시키기 위한 방법으로 저온보관 등을 고려해야 할 것이다. 또는 세치제 제조 시 나노섬유를 기반으로 한 용해식이섬유(soluble dietary fiber)를 이용하여 [42] 유효성분들의 조기 분해를 최소화해야 한다.

본 실험에서는 pH와 온도 등에 대한 경시변화만을 평가하였지만, 세치제에 포함된 계면활성제 및 마모제 등 세치제 내에 필수적으로 함유되고 있는 성분들과의 상호작용에 대한 연구가 추후 진행되어야 할 것이다.

본 연구결과는 항산화제 함유 세치제의 품질관리와 유효성분의 분해를 최소화 할 수 있는 대안을 제시하였으며, 비효소계 항산화제 함유 세치제의 안정성의 기초자료로 활용이 가능할 것이다.

결론

본 실험은 세치제에 함유된 비효소계 항산화제인 Asc와 Toc 성분의 경시변화에 따른 잔류 함량을 평가하여, 결과적으로 세치제의 화학적 환경을 확립하기 위하여 실시되었다. 실험결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. Asc와 Toc의 각 HPLC 분석방법과 고정상의 선택은 직선성($r^2 > 0.999$)을 나타내어 분석방법에 대한 검증을 확립하였다.
2. 일반적인 pH 정도에 따른 반응을 평가하기 위한 실험에서 pH 4에서 대부분의 성분들이 소실되었으며, Asc는 pH 10에서, Toc은 pH 7에서 안정적인 것으로 분석되었다.
3. 제조된 pH별 세치제 내에서 4개월간의 경시변화 결과로 2종의 비효소계 항산화제는 저온보관(39.2°F) 및 pH 7에서 그 성분이 안정적으로 잔류하는 것으로 평가되었다.

따라서 Asc 및 Toc 등이 함유된 세치제를 제조할 경우

pH 7의 범위에서 제조하는 것이 안정성을 높일 수 있으며, 또한 세치제를 소비자가 사용하기 전까지 저온에서 보관할 수 있는 체계가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구는 비효소계 항산화제를 함유하는 세치제와 구강세정제 등의 화학적 안정성에 대한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

Acknowledgements

이 논문은 2016년도 한서대학교 교내 연구지원사업에 의하여 연구되었음.

References

1. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25: 218-24. <http://dx.doi.org/10.1249/00005768-199302000-00010>.
2. Halliwell B, John G. The chemistry of free radicals and related 'reactive species' In: *Free radical in biology and medicine*. Fourth edition. Halliwell B, John G: New York: Clarendon press oxford: 2007: 1-777.
3. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 936486. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>.
4. Volko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
5. Hong JK. A study on skin aging caused by free-radical and on efficacy of antioxidant vitamins. *Kor Aesth Soc* 2009; 7: 51-62.
6. Bounous G, Molson JH. The antioxidant system. *Anticancer Res* 2003; 23: 1411-5.
7. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00151-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00151-3).
8. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 1975; 52: 59-63. <https://doi.org/10.1007/bf02901825>.
9. Maeura Y, Weisburger JH, Williams GM. Dose-dependent reduction of N-2-fluorenylacetylacetamide-induced liver cancer and enhancement of bladder cancer in rats by butylated hydroxytoluene. *Cancer Res* 1984; 44: 1604-10.
10. Jang JH, Park YD, Ryu DY. The effect of garlic extract on antibacterial activity of periopathogens. *J Korean Soc Dent Hyg* 2012; 12: 631-40. <https://doi.org/10.13065/jksdh>.

- 2012.12.3.631.
11. Jang JH. The effect of dentifrice containing garlic extract on dental plaque and gingivitis. *J Korean Soc Dent Hyg* 2008; 8: 67-76.
 12. Simon JA, Hudes ES. Serum ascorbic acid and gallbladder disease prevalence among US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Arch Intern Med* 2000; 160: 931-6. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.160.7.931>.
 13. Quattrucci E, Masci V. Nutritional aspects of food preservatives. *Food Addit Contam* 1992; 9: 515-25. <http://dx.doi.org/10.1080/02652039209374105>.
 14. Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, et al. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *J Periodontal Res* 2009; 44: 434-42. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01122.x>.
 15. Zanoni JN, Lucas NM, Trevizan AR, Souza ID. Histological evaluation of the periodontal ligament from aged Wistar rats supplemented with ascorbic acid. *An Acad Bras Cienc* 2013; 85: 327-35. <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37652013005000003>.
 16. Battino M, Ferreiro MS, Armeni T, Politi A, Bompadre S, Massoli A, et al. In vitro antioxidant activities of antioxidant-enriched toothpastes. *Free Radic Res* 2005; 39: 343-50. <http://dx.doi.org/10.1080/10715760400023853>.
 17. Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidallo MA, Leger CL. α -tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; 273: 32801-5. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.49.32801>.
 18. Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 369-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.010>.
 19. Matsui S, Tsujimoto Y, Ozawa T, Matsushima K. Antioxidant effects of antioxidant biofactor on reactive oxygen species in human gingival fibroblasts. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 48: 209-13. <http://dx.doi.org/10.3164/jcfn.10-85>.
 20. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. FoxOs, Wnts and oxidative stress-induced bone loss: new players in the periodontitis arena?. *J Periodontal Res* 2011; 46: 397-406. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01354.x>.
 21. Iwasaki M, Manz MC, Taylor GW, Yoshihara A, Miyazaki H. Relations of serum ascorbic acid and α -tocopherol to periodontal disease. *J Dent Res* 2012; 91: 167-72. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034511431702>.
 22. Ball GFM. properties of vitamins In: *Vitamins in foods. Analysis, Bioavailability, and Stability*. Ball GFM: New York: CRC Press 2005; 3-777.
 23. Cahill A, Wang X, Hoek JB. Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 286-90.
 24. Huttner EA, Machado DC, de Oliveira RB, Antunes AG, Hebling E. Effects of human aging on periodontal tissues. *Spec Care Dentist* 2009; 29: 149-55. <https://doi.org/10.1111/j.1754-4505.2009.00082.x>.
 25. Gentili A, Caretti F, D'Ascenzo G, Marchese S, Perret D, Di Corcia D, et al. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 2029-43. <https://doi.org/10.1002/rcm.3583>.
 26. Leporati A, Catellani D, Suman M, Andreoli R, Manini P, Niessen WM. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the analysis of water-soluble vitamins in Italian pasta. *Anal Chim Acta* 2005; 531: 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.006>.
 27. Li K. Simultaneous determination of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate and riboflavin in multivitamin with minerals tablets by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2002; 16: 504-7. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.192>.
 28. Mattila PH, Hellstrom J, McDougall G, Dobson G, Pihlava JM, Tiirikka T, et al. Polyphenol and vitamin C contents in European commercial blackcurrant juice products. *Food Chem* 2011; 127: 1216-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.129>.
 29. Vinas P, Pastor-Belda M, Campillo N, Bravo-Bravo M, Hernandez Cordoba M. Capillary liquid chromatography combined with pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of vitamin E in cosmetic products. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 94: 173-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.001>.
 30. Lebieczinska A, Marszall ML, Kuta J, Szefer P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B(1) (thiamine), B(6) (pyridoxamine, Pyridoxal and pyridoxine) and B(12) in animal and plant foods. *J Chromatogr A* 2007; 1173: 71-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.072>.
 31. Cimadevilla HM, Hevia D, Miar A, Mayo JC, Lombo F,

- Sainz RM. Development and validation of a single HPLC method for determination of α -tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. *Biomed Chromatogr* 2015; 29: 843-52. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.3362>.
32. Vinas P, Bravo-Bravo M, Lopez-Garcia I, Hernandez Cordoba M. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of vitamins D and K in foods by liquid chromatography with diode-array and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection. *Talanta* 2013; 115: 806-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.050>.
33. Jang JH, Park YD, Ahn HK, Kim SJ, Lee JY, Kim EC, et al. Analysis of green tea compounds and their stability in dentifrices of different pH levels. *Chem Pharm Bull* 2014; 62: 328-35. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.c13-00814>.
34. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Yoshioka M, Snauwaert J, Abe Y, et al. Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. *J Dent Res* 2001; 80: 1565-9. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345010800061701>.
35. Huang HH. Corrosion resistance of stressed NiTi and stainless steel orthodontic wires in acid artificial saliva. *J Biomed Mater Res A* 2003; 66: 829-39. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10463>.
36. Sapei L, Hwa L. Study on the kinetics of vitamin C degradation in fresh strawberry juices. *Procedia Chem* 2014; 9: 62-8. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.008>.
37. Kebede E, Mannheim CH, Miltz J. Ascorbic acid retention in a model food packed in barrier plastic trays and in cans. *J Food Sci* 1998; 31: 33-7. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.10463>.
38. Kim SH. The stability evaluation and the simultaneous determination of soluble vitamins by HPLC in dietary supplements [Doctoral dissertation]. Seoul: Univ. of Sookmyung Women's, 2004.
39. Hussein A, Odumeru JA, Ayanbadejo T, Faulkner H, McNab WB, Hager H, et al. Effects of processing and packaging on vitamin C and b-carotene content of ready-to-use(RTU) vegetables. *Food Res Int* 2000; 33: 131-6. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(00\)00027-2](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(00)00027-2).
40. Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Bovo S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *Int J Pharm* 1999; 188: 233-41. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00228-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00228-8).
41. Shin TS, Samuel Godber J, Martin DE, Wells JH. Hydrolytic stability and changes in E vitamers and oryzanol of extruded rice bran during storage. *J Food Sci* 1997; 62: 704-28. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15440.x>.
42. Li J, Chotiko A, Narcisse DA, Sathivel S. Evaluation of alpha-tocopherol stability in soluble dietary fiber based nanofiber. *Food Sci Technol* 2016; 68: 485-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.042>.