

종이 기반 소수성 채널에서의 효율적이고 간편한 비타민 C의 검출 기술 개발

황장선, 서영민, 최종훈*

Facile and Effective Detection of Vitamin C on a Paper Based Kit

Jangsun Hwang, Youngmin Seo, and Jonghoon Choi*

Received: 19 January 2016 / Revised: 20 February 2016 / Accepted: 25 February 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Recently paper based diagnostic kits have drawn great interest in the point-of-care testing market (POCT). The paper based detection systems provide inexpensive, rapid and safe analyses for disease markers and/or pathogens. Vitamin C (i.e., ascorbic acid) regulates body's immune system as an antioxidant agent. Humans, however, do not have enough amounts of enzymes involved in the synthesis of vitamin C that it is required to be obtained from their diets (e.g., beverages and/or supplements). Here, we have prepared a paper based kit to detect the concentration of Vitamin C presented in commercially available beverages. The evaluation provides the fast, simple and accurate results for detecting Vitamin C in the prepared paper based kit.

Keywords: Vitamin C, Point-of-care testing (POCT), Paper based diagnostic kits, Detection

1. INTRODUCTION

비타민은 1912년 Funk에 의해 생리활성 작용을 하는 질소화합물인 아민 (amine)을 함유한 물질 (vitalic amine)이라는 의미에서 'vitamine'이라 명명했으나 비타민 중에 amine을 함유하지 않은 물질이 있다는 것이 밝혀지면서 'e'가 빠진 'vitamin'으로 명명되어지고 있으며 탄수화물, 지방, 단백질,

무기질과 함께 체내에서는 합성되지 않는, 식물로 섭취해야만 하는 필수영양소 중 하나이다 [1,2]. 또한 효소나 조효소와 같이 체내에서 한 가지 이상의 생화학적 작용이나 생리적 작용에 관여하기 때문에 정상적인 체내 기능을 위해 반드시 필요한 영양소이다. 비타민은 크게 수용성과 지용성으로 나뉘며 그 중 수용성 비타민은 비타민 B복합체, 비타민C, 비오틴, 폴산, 콜린, 이노시톨, 비타민L, 비타민 P 등이 알려져 있다 [3]. 이들 중 비타민 C는 대표적인 항산화 물질로 활성 산소로부터 인체를 보호하고, 면역 체계도 강화시킨다 [4]. 또한 펩타이드 중 티로신 대사 등에 사용되고 철 이온의 흡수에도 관여하며 콜라겐 같은 결합조직과 지지조직 합성에도 관여한다. 비타민 C의 대표적인 결핍증은 영양소 섭취가 어려운 긴 항해를 떠난 선원들에게 많이 발병한 괴혈병으로, 체내 콜라겐 합성이 이루어지지 않아 결합조직에 이상이 생기며 결핍증상이 지속되면서 피하 출혈을 일으키게 된다 [5]. 이러한 비타민 C는 언급한 것처럼 인체 내에서 합성되지 않기 때문에 따로 섭취해야만 한다 [6,7]. 따라서 많은 사람들이 건강보조식품인 비타민이 첨가된 식품들을 통해 인체에 보충하고자 하며, 상업적인 광고를 통해 건강기능식품이라 표방하는 비타민이 첨가된 음료나 사탕 등을 심심치 않게 볼 수 있다. 그런데 조인스빌의 '유기농 사탕 (Organic Assorted Vitamin C Lollipops)'의 경우, 1회 제공량 (17 g) 기준 비타민 함량이 75 mg이라고 표시되어 있으나 시험 결과 비타민 C가 전혀 검출되지 않아 식품 등의 표시 기준에 부적합한 것으로 드러났다 [8]. 한국 건강 기능 식품 협회에 따르면 비타민·미네랄 성분은 해당 영양소가 영양소 기준치의 최소 30% 이상 함유되어야 한다 [9]. 하지만 앞선 조인스빌의 '유기농 사탕'의 예로 인해 시중에 판매되고 있는 비타민 혹은 미네랄 성분이 들어갔다고 표기된 제품들에 대한 신뢰성과

중앙대학교 창의ICT공과대학 융합공학부
School of Integrative Engineering, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea
Tel: +82-2-820-5258, Fax: +82-2-814-2651
e-mail: nanomed@cau.ac.kr

민고 구매하는 소비자의 건강과 경제적인 손해를 위해 비타민 혹은 미네랄 성분에 대한 정확한 성분 검증이 요구된다. 또한 비타민 C의 경우 열 과 빛에 쉽게 파괴되는 민감한 영양소 이기 때문에 철저한 관리에 입각한 유통과정이 필요하며 이를 판정할 수 있는 손쉬운 툴이 요구되어진다 [10]. 따라서 우리는 휴대하기 편리하고 시료를 키트에 흡수시켜 성분을 확인할 수 있는 간편한 종이키트를 개발하였다 [11]. 종이 기반 비타민 C검출용 키트는 프로그램을 통해 고안된 디자인을 왁스 프린트를 이용하여 필터 페이지 위에 소수성의 채널을 만들고, 필터 페이지의 흡수성을 이용해 왁스 프린팅이 종이 표면에서 바닥까지 흡수되게 한다 [12-15]. 그렇게 왁스 wall 을 만들어준 후 뒷면에 sealing film을 이용해 시료의 샘을 방지한다. 이러한 종이 기반 검출 키트는 특별한 기술이 필요하지 않고, 저비용으로 생산해 낼 수 있고, 상품화되어있는 비타민 C를 함유한 제품들을 빠르고 간편하게 검출이 가능하게 한다 [16,17]. 본 실험에서는 시중에서 쉽게 구할 수 있는 5가지 대표적인 비타민C 함유 음료를 이용하여 그 함량을 정량 분석하였으며 간단하게 제작된 종이키트 신뢰성을 검증하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

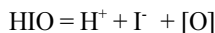
2.1. 시료 준비

요오드 (Iodine), 아스코빅 산 (Ascorbic acid)는 시그마 알드

리치에서 구입하여 사용하였으며, 와트만 필터 페이지 2, 파라 필름을 주재료로 하였다. 또한 실험에 사용된 비타민C 함유 음료는 상품명을 표기하지 않았으며 xx-water, 꿀물, xxx-화이버, 그리고 xx-500으로 표시하였다.

2.2. 비타민 C 검출 메커니즘

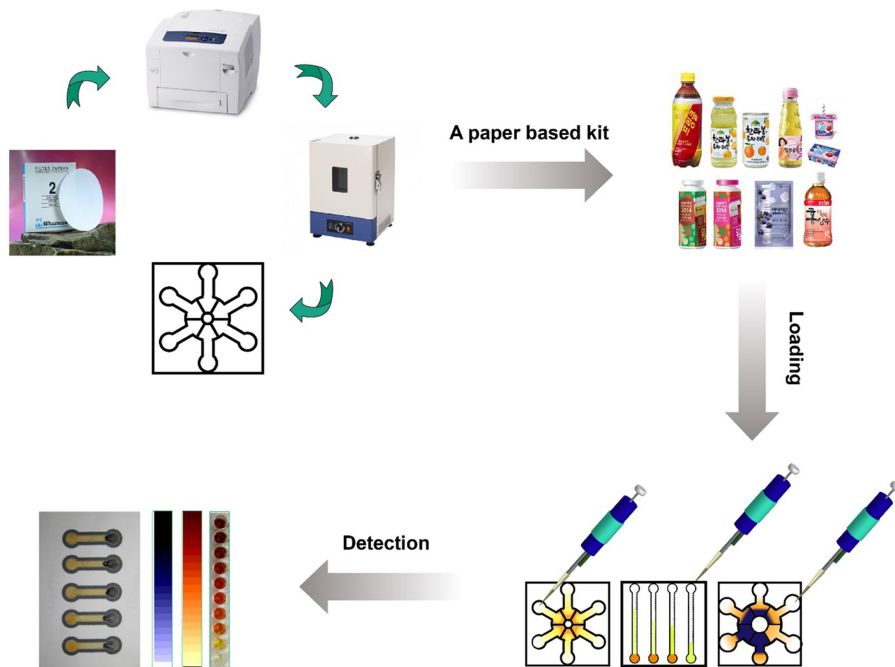
산화 작용이 있는 요오드와 비타민 C가 만나면 요오드가 환원되어 이온으로 변하고 이온화된 요오드는 고유의 색이 없어지고 투명하게 된다 [18].



요오드 용액 (0.05 M)을 기준으로 하여 물, 아스코빅 산 (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 mg/mL)를 첨가하여 그 색깔의 변화를 컨트롤로 하여 각각을 %단위로 환산하여 실험에 사용하였다.

2.3. 종이키트 준비

아도비 일러스트레이터 (Adobe illustraor CS6)를 이용하여 채널 벽을 두께 1 point 로 하였고 폭을 3~7 mm로 각각 디자인 하였다. 이후 왁스 프린터 (Xerox ColorQube 8570, Japan)을 이용하여 출력하였다. 프린트된 종이는 130°C에서 3분간 구워 왁스가 녹아 종이에 충분히 스며들게 하여 소수성 채널 벽을 만들게 하였다 [12,17]. 이후 파라필름을 덧대어 샘플



Scheme 1. Preparation of a paper based kit for Vitamin C detection. Kit design was drawn by having channel barriers with a diameter of 4.5 mm that can accommodate upto 100 L of samples. Then, the paper kit was printed by using a wax printer. A printed paper was baked to melt down wax inks into the paper resulting hydrophobic barriers. A parafilm was attached to the bottom of a paper kit to prevent leaking. After loading of commercially available beverages on a kit, the concentration of Vitamin C was calculated by measuring flow distances.

주입 시 종이 바닥 면으로 새는 것을 방지 하였다. 또한 폴리프로필렌 (1 mm 두께)을 뒷면에 부착시켜 안정하고 일정하게 반응할 수 있게 지지대를 만들었다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

모식도에서 보이듯이 와트만 페이지를 이용하여 지지대를 완성하고 왁스프린터로 채널을 구현한 뒤 오븐에서 왁스를 녹여 페이지기반 소수성 채널을 만들었다 (Scheme 1). 여기에 요오드 용액을 도포하여 말린 후 시중에 시판중인 음료를 적하하여 그 이동상과 함께 탈색된 (bleaching) 거리를 표본 샘플과 비교하여 음료 내 비타민 C의 함유량을 정량화하였다.

3.1. 채널 두께와 폭에 따른 유체 이동성

아도비 일러스트레이터를 이용하여 다양한 모양으로 채널 및 반응 구역을 디자인하였고 (Fig. 1A) 디자인된 채널 위에 요오드용액 (0.05 M)을 20~100 μL 씩 도포하여 채널을 코팅하였다. 유체의 이동성이 본 실험에 크게 영향을 미치는 것이 확인되어 채널 내 미리 요오드 용액을 도포하여 친수성 채널을 활성화하여 여러 채널에서 일정하게 유체가 흐르도록 준비하였다. 또한 채널 폭에 따른 유체의 이동성이 다를 것으로 판단되어 그 폭을 3~7 mm 각 단위를 0.5 mm씩 하여 채널을 제작하였고 채널 두께에 따른 유체 이동성도 고려되어야 할 것으로 판단하여 두께를 각각 1 mm, 1.2 mm로 하여 동일하게 실험하였다. Fig. 1B, 1C에서 같은 방법으로 샘플을 흘려보냈을 경우 다른 폭에 비해 유의적으로 4.5 mm에서 가장 빠르고 고르게 이동되는 것을 확인할 수 있었으며, 두께가 각각 1 mm, 1.2 mm로 다른 두께를 가지는 채널에서도 폭이 4.5

mm일 때 최대 이동성 (4.5 cm/min)을 나타내었다.

3.2. 표준용액 제조 및 표준 탈색거리 측정

일정농도의 아스코빅 산 (0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0 mg/mL)를 이용하여 요오드용액의 환원성을 색깔로 구별하는 실험을 진행하였다. 우선 요오드 용액 200 μL 를 96well 플레이트 well에 넣은 뒤 표준화된 아스코빅 산 (0~5 mg/mL)를 첨가하여 그 색의 변화를 관찰하여 기준으로 삼았다. (Fig. 2A) 원래 요오드 용액의 색을 100%, 무색이 되었을 때를 0%로 정한 뒤 색의 변화를 각각 10% 단위로 하여 탈색 표준 시료를 준비하였다. 샘플 (A~E, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0 mg/mL Ascorbic acid)을 각각 10 μL 씩 첨가하였을 때 색의 변화는 Fig. 2B에서 나타내었다 E 시료에서 색의 변화가 가장 크게 나타난 것으로 관찰되었다. 이렇게 표준화된 용액샘플을 종이키트 (길이 5 cm, 폭 4.5 mm, 채널 두께 1 mm) 위에 적하 하여 실험의 유의성과 정확성을 검증하였다. 우선 Fig. 2C와 같이 표준 샘플용액을 종이키트 위에 적하 시켜 그 이동상을 확인하였다 탈색 거리 (Bleaching Distances)는 물에서는 거의 보이지 않았으며 아스코빅 산 5.0 mg/mL에서 4 cm로 가장 크게 나타났다 이러한 컨트롤의 직선성은 $R^2=0.9713$ 으로 표현되며 좋은 직선형을 나타내어 그 정확도가 신빙성이 있음을 알 수 있었다.

여기에 샘플 (A~E)를 도포시켰을 경우 Fig. 2D와 같은 결과를 도출하였다. A의 경우 물과 같이 Bleaching Distances가 나타나지 않았으며, E의 경우 Bleaching Distances가 4 cm를 초과하는 결과를 얻어서 시료 내 아스코빅 산의 농도가 5 mg/mL 이상임을 입증하였다. 이러한 결과는 아래 Table 1에 표기하였다.

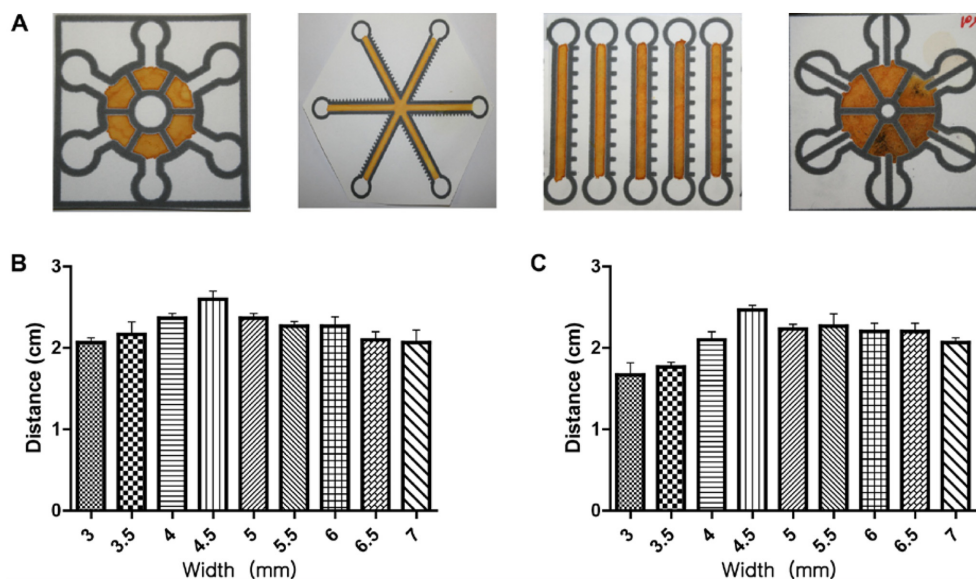


Fig. 1. Photographs showing variously designed paper based kits (A). Distances of the flow in channels, barrier thickness of 1 mm (B). Distances of the flow in channels, barrier thickness of 1.2 mm (C).

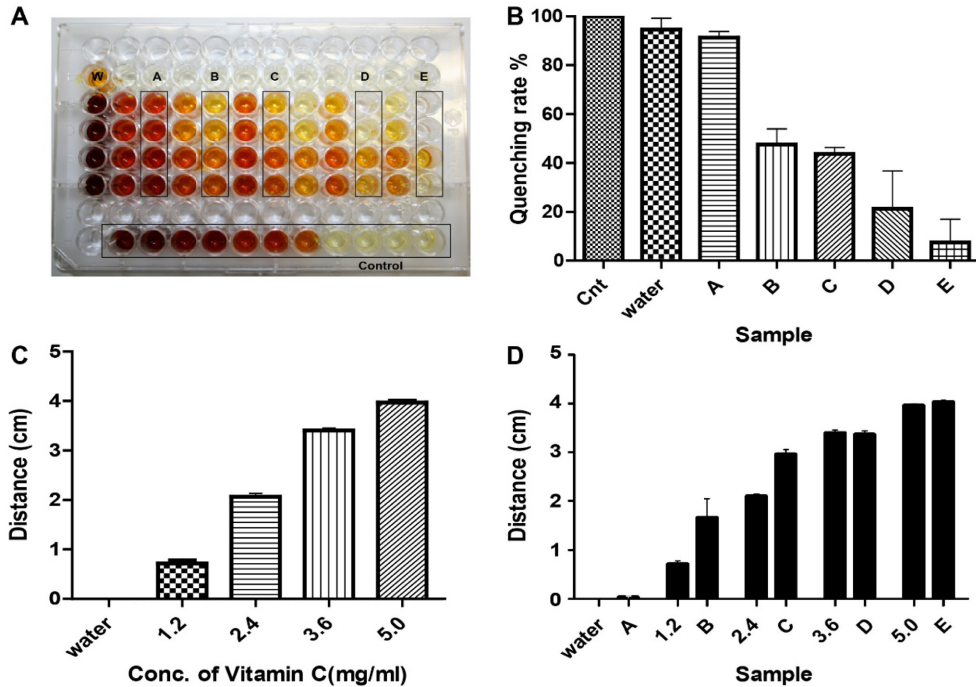


Fig. 2. Blind test of iodine/Vitamin C with and without samples. Iodine reduction test performed on different concentrations of Vitamin C in 96 wells. The color change was measured by bare eyes (A). Quantitative image analyses of measured Vitamin C from iodine reduction test (B). Bleached distance analyses of samples in a paper based kit from standard vitamin solution (C). The blind test result of samples comparing with standard bleaching distances obtained (D).

Table 1. Detected Vitamin C concentrations from measuring the flow distances

Sample	A	B	C	D	E
Standard sol. (cm)	0	0.75	2.1	3.4	4
Result (cm)	0.1	2	2.9	3.3	4.05
Detected Vitamin C (mg/mL)	0	1	3.3	3.6	6
Standard Vitamin C (mg/mL)	0	1	3.5	3.5	5
Recovery %	100	100	94	102	120

3.3. 시판 음료 중 vitamin C의 농도

요오드용액이 고르게 도포된 채널 안에서는 유체의 이동성이 같고 이때 비타민 C의 농도에 따라 도포된 요오드와 반응하여 그 색을 탈색하게 된다. 이렇게 탈색된 요오드와의 거리는 비타민 C의 농도와 직접적으로 비례하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 본 실험에서는 시중에 판매되는 음료 다섯 가지를 이용하여 음료에 표기된 비타민 C의 함량과 본 실험에서 구현된 종이키트를 가지고 그 양을 측정 및 검증하였다.

우선 종이키트 (길이 5 cm, 폭 4.5 mm, 채널 두께 1 mm)에 요오드 용액을 도포시킨 후 완전히 건조시킨 후 폴리 프로필렌 수지를 이용하여 최대한 종이키트를 평평하게 유지하였다. 이후 각각의 음료를 100 μL씩 채널 끝에 적하시켜 이동 거리에 따른 요오드의 탈색거리 (Bleaching Distance)를 측정하였다. 그 결과 물에서는 탈색되지 않아 0의 값이 도출되었고 xxx워터에서는 1.6 mg/mL로 측정되어 표기된 15 mg/dL

Table 2. Detected Vitamin C concentrations in samples from measuring flow distances

Sample	Distance (cm)	Concentration (mg/mL)	Labeled Vitamin C (mg/dL)	Recovery %
Water	0	0	0	100
Honey-water	0.5	0.5	비표기	0
Xxx-water	1.7	1.6	150	106
Xxx-fiber	2.3	2.5	300	83.3
Xx-500	4.5	5	500	100

보다 높게 측정되었다. 그리고 xx-500에서는 5 mg/mL로 검출되어 음료 표기된 500 mg/dL를 충족하는 결과를 도출하였다. (Fig. 3A, 3B) 측정된 결과는 Table 2에 표기하였다.

4. CONCLUSION

아스코빅 산에 의한 요오드의 환원메커니즘을 이용하여 그 농도를 판별하였으며 이를 이용하여 종이를 기반으로 하는 간단한 유체 채널을 왁스 프린터로 인쇄하여 종이키트를 제작하였다. 이 종이키트는 채널 폭에 따라 유체의 이동성이 달라지며 폭이 4.5 cm일 때 가장 빠르게 이동하는 것을 확인하였다. 또한 점도가 유사한 샘플에서 요오드가 환원되어 아

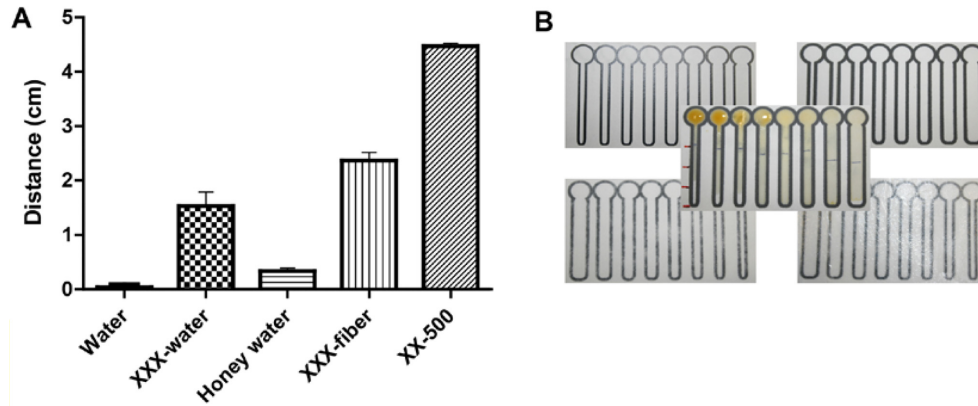


Fig. 3. Evaluation of the amount of Vitamin C in 5 different commercially available beverages. Bleached distance analysis of a paper based kit performed for 5 different commercially available beverages (A). Tested paper based kits with various channel widths (n=5) (B).

스코빅 산의 색을 변화시키며 이때 진행된 거리는 농도에 비례해서 달라지고 요오드의 고유한 색 또한 탈색 (bleaching) 된다. 이는 비타민 C의 정량적 분석을 가능하게 한다. 이를 통하여 시중에 판매되는 5가지 음료 내 비타민C의 함량을 종이키트를 이용하여 검출한 결과 음료 표기 기준치와 같거나 유사한 결과를 도출하였다. xxx-fiber에서 표준편차 값이 10% 내외로 나와 가장 큰 편차가 있었다. 실험에 사용된 5가지의 음료는 점도가 유사하고 색이 검출방법과 구별되는 것으로 선택하였으며 당 또는 지방을 많이 함유한 음료에서는 점성의 차이로 실험이 진행되지 못하였다. 본 실험에서 제작된 종이키트는 디자인, 제조방법 면에서 간단하며 온도 습도 등에 제약받지 않기 때문에 간단하게 음료 내 비타민 C 함량을 측정할 수 있어 향후 이를 기반으로 하는 제품으로의 상용화를 위한 공동연구가 요구된다.

Acknowledgements

저자들은 학부 캡스톤 연구 학생으로 참여한 윤예지, 류현민, 이재희 등과 대학원 연구원 김지은, 정윤에게 연구 보조역할을 수행하였음에 감사 드립니다. 이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구이며 (나노기술을 이용한 어류 바이러스성 질병 조기진단 기술 개발) 또한 본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것입니다 (과제고유번호: HI14C3266).

REFERENCES

1. Eggersdorfer, M., G. Adam, M. John, W. Hähnlein, L. Labler, K. U. Baldenius, L. von dem Bussche-Hünnefeld, E. Hilgemann, P. Hoppe, and R. Stürmer (1996) *Vitamins*, pp. 89-102. Ullmann's

- Encyclopedia of Industrial Chemistry.
2. Sherman, H. C. and S. L. Smith (2013) *The vitamins*, pp. 271-276, *Hardpress*.
3. Davies, M. B., J. Austin, and D. A. Partridge (1991) *Vitamin C: Its chemistry and biochemistry*, pp. 154, RSC.
4. Kalt, W., C. F. Forney, A. Martin, and R. L. Prior (1999) Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 4638-4644.
5. Carpenter, K. J. (1988) *The history of scurvy and vitamin C*, pp. 198, Cambridge University Press.
6. Duarte, T. L. and J. Lunec (2005) Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Res.* 39: 671-686.
7. Dehghan, M., N. Akhtar-Danesh, C. R. McMillan, and L. Thabane (2007) Is plasma vitamin C an appropriate biomarker of vitamin C intake? A systematic review and meta-analysis. *Nutr. J.* 6: 41.
8. Korea Consumer Agency. Submission of manuscript. <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE02485240> (2013).
9. Heo, S. H. (2007) The present condition & development for labeling and advertising system of health functional food. *Food Sci. Ind.* 40: 11-15.
10. Levine, M., C. Conry-Cantilena, Y. Wang, R. W. Welch, P. W. Washko, K. R. Dhariwal, J. B. Park, A. Lazarev, J. F. Graumlich, and J. King (1996) Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: Evidence for a recommended dietary allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 3704-3709.
11. Shah, P., X. Zhu, and C. Z. Li (2013) Development of paper-based analytical kit for point-of-care testing, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 13: 83-91.
12. Yetisen, A. K., M. S. Akram, and C. R. Lowe (2013) Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip* 13: 2210-2251.
13. Martinez, A. W., S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas III, H. Sindi, and G. M. Whitesides (2008) Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal. Chem.* 80: 3699-3707.
14. Nie, Z., C. A. Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A. W. Mar-

- tinez, M. Narovlyansky, and G. M. Whitesides (2010) Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip* 10: 477-483.
15. Mosadegh, B., B. E. Dabiri, M. R. Lockett, R. Derda, P. Campbell, K. K. Parker, and G. M. Whitesides (2014) Three-dimensional paper-based model for cardiac ischemia. *Adv. Healthc. Mater.* 3: 1036-1043.
16. Martinez, A. W., S. T. Phillips, G. M. Whitesides, and E. Carrilho (2009) Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal. Chem.* 82: 3-10.
17. Carrilho, E., A. W. Martinez, and G. M. Whitesides (2009) Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal. Chem.* 81: 7091-7095.
18. Suntornsuk, L., W. Gritsanapun, S. Nilkamhank, and A. Paochom (2002) Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28: 849-855.