

액체/액체 계면에서 테트라사이클린 전이반응의 전기화학적 분석 및 응용

리우샤오원 · 한혜연 · 고은서 · 이혜진[†]

경북대학교 자연과학대학 화학과 및 청정나노소재 연구소
(2017년 5월 26일 접수, 2017년 6월 5일 심사, 2017년 6월 26일 채택)

Electrochemical Analysis and Applications of Tetracycline Transfer Reaction Process at Liquid/liquid Interfaces

XiaoYun Liu, Hye Youn Han, Eunseo Goh, and Hye Jin Lee[†]

Department of Chemistry and Green-Nano materials Research Center, Kyungpook National University, 80 Daehakro, Buk-gu, Daegu-city 41566, Republic of Korea

(Received May 26, 2017; Revised June 5, 2017; Accepted June 26, 2017)

초 록

편극화된 물/1,2-dichloroethane (1,2-DCE) 계면에서 이온화가 가능한 테트라사이클린(tetracycline, TC) 화학종 전이 반응을 순환전압전류법과 시차펄스전위법을 이용하여 조사하였다. 물의 pH 변화에 따라 전하 상태가 다른 TC 이온 화학종이 물/1,2-DCE 계면에서 전이하는 전위 값을 측정하여 TC 이온의 상 분배 도표를 얻었다. 이를 통해 각 pH에 따라 수용액 또는 유기 용액 층에서 좀 더 우세한 TC 이온 화학종 형태를 확인하였다. 이와 함께 상기 계면에서 TC 전이 반응의 형식 전이 전위, 분배 계수 및 Gibbs 에너지 값을 포함한 열역학적 정보를 얻었다. 또한 TC 이온을 정량 분석 가능한 센서로 제작하기 위해 고분자 박막에 단일 마이크로 홀을 만들고 유기성의 polyvinylchloride-2-nitrophenyloctylether (PVC-NPOE) 젤을 도포하여 물/젤 계면을 형성하였다. 물/1,2-DCE 계면에서 TC 이온의 전이 반응과 매우 유사하게 수용액의 pH가 4.0일 때 TC 이온의 농도 변화에 따라 전류 값이 증가하는 것을 순환전압전류법으로 관찰하였다. 시차펄스전위법을 이용하여 상기 물/젤 계면에서 완충 수용액에 존재하는 TC 화학종을 5 μM 까지 검출할 수 있었으며, 5 μM 에서 30 μM 까지 정량분석 할 수 있었다.

Abstract

The transfer reaction characteristics of tetracycline (TC) across a polarized water/1,2-dichloroethane (1,2-DCE) interface was studied via controlling both pH and ionic strength of the aqueous phase in conjunction with cyclic and differential pulse voltammetries. Formal transfer potential values of differently charged TC ionic species at the water/1,2-DCE interface were measured as a function of pH values of the aqueous solution, which led to establishing an ionic partition diagram for TC. As a result, we could identify which TC ionic species are more dominant in the aqueous or organic phase. Thermodynamic properties including the formal transfer potential, partition coefficient and Gibbs transfer energy of TC ionic species at the water/1,2-DCE interface were also estimated. In order to construct an electrochemical sensor for TC, a single microhole supported water/polyvinylchloride-2-nitrophenyloctylether (PVC-NPOE) gel interface was fabricated. A well-defined voltammetric response associated with the TC ion transfer process was achieved at pH 4.0 similar to that of using the water/1,2-DCE interface. Also the measured current increased proportionally with respect to the TC concentration. A 5 μM of TC in pH 4.0 buffer solution with a dynamic range from 5 μM to 30 μM TC concentration could be analyzed when using differential pulse stripping voltammetry.

Keywords: tetracycline, ITIES, ionic partition diagram, lipophilicity, voltammetric ion sensor

1. 서 론

테트라사이클린(tetracycline, TC)은 hydronaphthacene 구조를 지닌 tetracycline계 항생제로서 여드름, 콜레라, 매독, 전염병 등 광범위한

감염성 질환에 사용된다. 이 항생제에 대한 내성균의 문제와 여러 부작용으로 인하여 최근에는 제한적인 용도로만 사용되고 있다[1]. 그러나 1978년도부터 수십 년 동안 의학학 분야뿐 아니라 수산업, 농업 및 축산업 등에서도 광범위하게 사용되어 이미 환경에 막대한 양이 잔류되어 있는 상황이다[2]. 이에 따라 생태계의 지속적인 항생제 노출에 따른 여러 문제점이 나타나고 있으며[1] 따라서 환경에 잔류된 TC 양을 검출 또는 분석할 수 있는 기술에 많은 관심이 쏠리고 있다.

다양한 환경 샘플에서 TC를 분석하는 방법으로 고성능 액체크로마토그래피 또는 전기영동 분석법[3], 흐름 주입-전류법[4], 생물학적[5],

[†] Corresponding Author: Kyungpook National University, Department of Chemistry and Green-Nano materials Research Center, 80 Daehakro, Buk-gu, Daegu-city 41566, Republic of Korea
Tel: +82-53-950-5336 e-mail: hyejinlee@knu.ac.kr

광학적[6] 및 전기화학적 검출법[7-9] 등이 활용되고 있다. 이 중 현장 적용성, 저가 소재 사용 및 소형화가 용이하다는 장점을 갖는 전기화학 분석법이 많이 개발되어 왔는데 그 예로 수은 적하 전극을 이용한 벗김 전압-전류법[8], 교류 폴라로그래피[9] 및 탄소나노튜브와 글나노입자를 도포한 전극을 이용한 검출법[7] 등을 들 수 있다. 또 다른 전기화학적 방법으로 서로 혼합되지 않는 액체/액체 계면(interface between two immiscible electrolyte solutions, ITIES)에서의 약물의 전이 반응을 활용한 센서/분석법 개발도 들 수 있다. 또한 약물 검출 외에도 약물동력학(pharmacokinetics) 연구 분야에 필요한 친유성 또는 지질 친화도(lipophilicity)[10-11] 및 한 개 이상의 pKa 값을 갖는 약물들의 수용액 pH에 따른 전하와 구조 변화 등의 중요한 정보를 알아낼 수 있는 기술로도 많이 활용되고 있다[12-13]. 따라서 많은 연구팀들이 ITIES에서 전하 전이 반응을 기반으로 한 전기화학 분석법을 이용하여 다양한 약물 관련 연구를 지속적으로 하고 있다[13-21]. 예를 들어 TC의 경우 Koryta et al.은 1983년 최초로 물/nitrobenzene 계면에서 전이하는 TC의 특성을 이용하여 특정 pH에서 TC 농도에 따른 순환전압전류법(cyclic voltammetry, CV) 데이터를 얻어 TC를 정량적으로 분석 가능함을 보여주었으며[21], Dassie et al.은 1,2-DCE와 접촉된 수용액을 강산과 강염기 조건으로 만들었을 때 TC를 포함한 TC 유도체(예 : oxytetracycline, chlortetracycline) 약물이 분해되어 생성된 이온 화학종이 상기 계면에서 전이하는 반응을 전기화학적으로 연구하였다[17]. 최근 본 연구그룹도 pH 3.0의 수용액과 1,2-DCE 계면에서 TC 이온의 전이반응을 전기화학적으로 조사한 예비 연구 결과를 보고하였다[22].

본 논문에서는 약물 전이에 중요한 역할을 하는 이온 세기와 pH 변수를 조절한 수용액과 1,2-DCE를 이용하여 액체/액체 계면을 형성하고, 상기 계면에서 TC의 전이 반응 과정을 CV와 시차펄스전위법(differential pulse voltammetry, DPV)으로 조사하였다. 그 결과 pH 변화에 따라 다른 전하를 띤 TC 이온 화학종이 계면에서 전이함을 알 수 있었으며, 각 pH 3.0과 4.0의 경우 TC 농도에 따라 전류 값이 정량적으로 증가함을 확인하였다. 또한 DPV 데이터로부터 각 pH에서 TC 이온의 형성 전이 전위 값을 구하여 물과 1,2-DCE층에 좀 더 우세하게 존재하는 TC 이온 화학종을 알 수 있는 상 분배 도표를 정립하였으며, TC의 표준 전이 전위, 분배계수 및 Gibbs 전이 에너지 값을 구하였다. 상기 결과를 바탕으로 TC 이온을 정량 분석 가능하도록 단일 마이크로 홀로 지지된 물/유기성 젤 계면을 형성하였으며, 시차펄스 stripping 전위법(differential pulse stripping voltammetry, DPSV)을 이용하여 완충용액에 첨가된 TC 이온을 5에서 30 μM 까지 분석할 수 있었다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시약

Tetracycline ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$), maleate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$), citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), sodium hydroxide (NaOH), sodium acetate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), sodium dihydrogen phosphate-monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), disodium hydrogen phosphate-heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), boric acid (H_3BO_3), sodium chloride (NaCl), 1,2-dichloroethane (1,2-DCE), tetraoctylammonium chloride (TOACl), methanol (CH_3OH), tetraoctylammonium bromide (TOABr), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), polyvinylchloride (PVC, high molecular weight), tetrapropylammonium chloride (TPrACl)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Acetic acid (CH_3COOH)는 Duksan pure and chemical Co. Ltd에서 구입하였고,

lithium chloride (LiCl)는 Fluka에서 구입하였으며, lithium tetraakis(pentafluorophenyl)borate etherate (LiTB)는 Boulder Scientific Co에서 구입하였다. 유기층 전해질인 tetraoctylammoniumtetraakis(pentafluorophenyl)borate (TOATB)는 이전에 발표된 논문을 참고하여 합성하였다[23].

2.2. 물/1,2-DCE 계면에서 이온 이동반응 연구에 필요한 전기화학 측정 장치

편극된 물/1,2-DCE 계면에서 TC 이온이 전이할 때의 전기화학적 신호를 측정하기 위해 Girault 연구팀이 개발한 원형의 유리 튜브 셀로 이루어진 전형적인 4-전극 전기화학 셀을 사용하였다[24]. 이때 형성된 물/1,2-DCE 계면의 지름은 약 1.13 cm^2 이었다. 전하 이동에 의한 전류는 각각 물과 유기층에 넣은 Pt 와이어 보조 전극(CE_w , CE_o)을 통하여 흐르며, 계면에 인가하는 전위는 각 물과 유기층에 넣은 Ag/AgCl 기준 전극(RE_w , RE_o)을 통해 조절하였다. 이때 RE_o 전극은 Luggin 관을 이용하여 TOACl과 LiCl 혼합 전해질 수용액에 넣어 유기층과 접촉하였다.

2.3. 단일 마이크로 홀로 지지된 물/PVC-NPOE 젤 계면 제작

단일 마이크로 홀로 지지된 물/PVC-NPOE 젤로 구성된 계면은 이전에 보고된 방법을 사용하여 준비하였다[25]. 약 $12 \mu\text{m}$ 두께의 polyethylene terephthalate (PET) 필름에 바늘을 사용하여 단일 마이크로 홀을 뚫는다. 약 80°C 에서 3% PVC와 10 mM TOATB가 혼합된 NPOE 용액 $8 \mu\text{L}$ 를 PET 필름의 마이크로 홀에 도포한 후 실온에서 약 12 h 보관하여 유기성 젤로 만들어 사용하였다.

2.4. 전기 화학 측정 조건

액체/액체 또는 액체/젤 계면에서 전기 화학적 측정은 Autolab PGSTAT30 (Ecochemie)의 전위차계(potentiostat)를 사용하였다. DPV의 경우, 단계 전위는 10 mV, 펄스 진폭은 50 mV 및 스캔 속도는 100 mV/s 조건에서 시행되었으며 DPSV의 경우, 1 V에서 사전 농축 시간은 30 s, 단계 전위는 3 mV, 펄스 진폭은 50 mV, 펄스 지속 시간은 50 ms 및 스캔 속도는 8 mV/s의 조건을 이용하였다. 또한 CV의 경우 마이크로 홀-액체/젤 계면에서는 20 mV/s를, 물/1,2-DCE 계면에서는 100 mV/s의 스캔 속도를 사용하였다. 수용액의 pH를 2.5에서 9.5까지 조절을 위해 5 mM의 말레인산(maleate), 시트르산(citrate), 아세트산(acetate), 인산(phosphate) 또는 붕산(borate) 완충용액을 이용하였으며, 각 pH 완충용액에서 NaCl 농도를 조절하여 이온세기를 0.02 M로 유지하였다[26]. 모든 실험은 실온에서 수행하였으며, 실온이 아닌 경우에는 해당하는 온도를 별도로 표기하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 물/1,2-DCE 계면에서의 테트라사이클린 이온의 전이 반응

Cell 1에 나타난 것과 같이 전기화학 셀을 구성하고, 전기장을 인가하여 편극화된 물/1,2-DCE 계면에서 테트라사이클린(tetracycline, TC) 이온이 물에서 1,2-DCE층으로 또는 1,2-DCE에서 물층으로 전이하는 반응을 CV 및 DPV방법으로 조사하였다. 특히 pH 3.0에서 9.5까지의 모든 수용액의 이온세기는 염화소듐을 이용하여 0.02 M로 고정하였다. 수용액의 pH가 4.0, 6.0 및 8.0일 때 TC 이온이 유기층으로 및 유기층에서 물층으로 전이하는 반응 시 얻어진 대표적인 순환전압전류 곡선을 Figure 1a에 나타내었다. 이때 각 pH 용액에 TC의 $\Delta_{\text{red}}^{\text{red}} \phi^{\text{red}}$

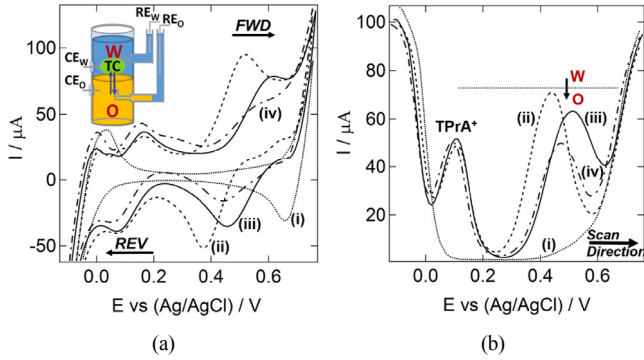
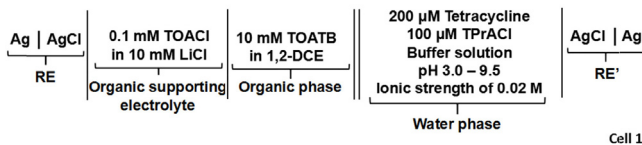


Figure 1. A series of (a) cyclic and (b) differential pulse voltammograms for the transfer of ionizable TC species across a polarized water/1,2-DCE interface. A fixed 200 μM concentration of TC was used. (i) is the baseline at pH 4.0 in the absence of TC molecules. The pH of the buffer solution varied in (ii) 4, (iii) 6, and (iv) 8. Cell 1 was employed.

(formal ion transfer potential) 값을 얻기 위해 $\Delta_0^w \phi^{0'}$ 값을 알고 있는 tetrapropylammonium (TPrA⁺) 이온을 내부 표준물질로 첨가하였다. TC와 TPrA⁺ 이온을 첨가하지 않았을 때 양(+) 전위는 0.77 V (vs Ag/AgCl)로 그리고 음(-) 전위는 -0.12 V (vs Ag/AgCl)로 전위 창 (potential window)이 고정됨을 볼 수 있으며, 전위창 내에 어떠한 피크 모양의 전류 변화가 일어나지 않았다. 제한된 전위창의 전위 값은 수용액 층과 유기층에 존재하는 지지전해질(양전위의 경우 H⁺와 Li⁺ 또는 TB⁺, 음전위의 경우 CH₃COO⁻ 또는 TOA⁺) 이온의 전이 반응에 의해 결정된 것으로 판단되었다[27].



수용액 층에 TC 이온이 존재할 때, 피크 모양의 순환전압전류 곡선이 얻어짐을 볼 수 있다. 즉 전위를 좀 더 양(+)의 값으로 증가하면 수용액에서 유기층으로, 그리고 전위 값을 좀 더 음(-)의 방향으로 증가하면 유기층에서 수용액으로 TC 이온이 전이함을 나타내는 피크들이 관찰되었다. 이러한 전압전류 곡선의 형태는 보편적인 액체/액체 계면에서 볼 수 있는 이온들의 전형적인 전이 양상을 나타내며 피크 전위나 반파장 전위와 같은 전위 특성들은 각 이온종들이 계면에서 나타내는 고유적인 성질과 관련이 있다[21].

먼저 pH 4.0, 6.0과 8.0에서 TC 전이 반응에 의한 피크 전류가 나타나는 전위 값이 서로 다르다는 것을 볼 수 있다. Figure 1a를 보면 pH 4.0에서 피크 전류가 나타나는 전위 값은 0.52 V (vs Ag/AgCl), pH 6.0에서는 0.60 V (vs Ag/AgCl), 그리고 pH 8.0에서는 0.55 V (vs Ag/AgCl)이었다. 이를 통해 각 pH 용액에 서로 다른 전하를 띤 TC 이온종이 존재함을 예측할 수 있으며, TC의 pKa 값(pKa₁ = 3.3, pKa₂ = 7.68, pKa₃ = 9.69 및 pKa₄ = 10.7)을 고려해볼 때 예측 가능한 결과이다[28-29]. 또한 pH 4.0과 6.0의 경우 약물의 전이반응에 의한 피크 전류가 나타나는 전위 값이 좀 더 양의 방향으로 이동하는 것은 이미 보고가 되었으며[26], 본 연구에서도 같은 결과가 얻어짐을 확인할 수 있다. 이와 다르게 pH 8.0의 경우 피크 전류가 나타나는 전위 값이 pH

6.0보다 감소했음을 볼 수 있다. pKa₃와 pKa₄를 고려해볼 때 pH 9.5 수용액에서 TC 분자의 또 다른 이온 형태가 예상되지만 전위창 내에서 피크 전류 변화를 볼 수 없었으며 이는 염기성 환경에서 TC가 이온 형태가 바뀌기 보다는 isotetracycline으로 구조 변화가 일어나기 때문에 계면에서 전이하는 것을 관찰할 수 없는 것으로 생각된다[30-31]. pH 9.5 이상의 경우 사용한 Ag/AgCl 기준전극이 알칼리 용액에서 불안정하여 전압전류 곡선을 얻을 수 없었다.

또한 수용액의 pH가 증가할수록 TC 이온이 물에서 유기층으로 전이할 때 나타나는 피크 전위 값이 양의 전위창 전위 값과 유사하게 나타나서 피크 전위 값을 정확하게 얻기 어려운 것을 볼 수 있다. 이는 CV 대신 DPV를 사용하여 해결할 수 있는데[27,32-33], 그 결과를 Figure 1b에 나타내었다. 수용액의 pH 변화에 따라 서로 다른 전하를 띤 TC 화학종이 물/1,2-DCE 계면에서 분배되는 정보를 얻기 위해 pH 변화에 따라 DPV 데이터를 얻었다. 먼저 얻어진 DPV 곡선으로부터 TC 이온이 물/1,2-DCE 계면에서 전이할 때 필요한 형식 전이 전위 ($\Delta_0^w \phi_{TC}^{0'}$) 값을 구하고자 하였으며, 이를 위해 상기 계면에서 이미 형식 전이 전위 값이 알려진 내부 표준 물질로 TPrA⁺ 이온을 이용하였다. Figure 1b에서 보면 200 μM TC를 포함한 수용액에 100 μM TPrA⁺ 이온을 첨가하였을 때 약 0.10 V (vs Ag/AgCl) 전위에서 TPrA⁺ 이온이 물에서 유기층으로 전이하는 반응에 대한 DPV 피크 전류가 얻어졌다. DPV 데이터로부터, TPrA⁺ 및 TC 이온의 실험적인 반파 전이 전위($\Delta_0^w \phi_{1/2}$) 값을 측정하고, 아래 식 (1)과 (2)를 사용하면 각 pH에서 TC 이온의 형식 전이 전위 값을 구할 수 있다[32-33]. 여기서 $\Delta_0^w \phi_{peak,TC}$ 는 각 pH에서 TC 이온이 전이할 때 DPV의 피크 전류가 나타나는 전위 값이며, $\Delta_0^w \phi_{1/2,TC}$ 와 $\Delta_0^w \phi_{1/2,TPrA^+}$ 는 각각 TC 및 TPrA⁺ 이온이 전이할 때 얻어진 DPV 피크 전류 값이 절반이 되는 반파 전이 전위 값이다. ΔE 는 인가한 펄스의 진폭이며 본 실험에서는 50 mV를 그리고 $\Delta_0^w \phi_{TPrA^+}^{0'}$ 는 -93 mV를 사용하였다[34].

$$\Delta_0^w \phi_{peak,TC} = \Delta_0^w \phi_{1/2,TC} - \frac{\Delta E}{2} \tag{1}$$

$$\Delta_0^w \phi_{1/2,TC} - \Delta_0^w \phi_{TC}^{0'} = \Delta_0^w \phi_{1/2,TPrA^+} - \Delta_0^w \phi_{TPrA^+}^{0'} \tag{2}$$

물/1,2-DCE 계면에서 물의 pH를 2.5-9.5까지 변화시킬 때 각 pH에서 얻은 TC 이온의 $\Delta_0^w \phi_{TC}^{0'}$ 값을 도식화한 이온 분배 도표(ionic partition diagram)를 Figure 2에 나타내었다. pH 3.3 미만에서 $\Delta_0^w \phi_{TC}^{0'}$ 값은 pH와 관계없이 0.19 V로 일정하게 유지되다가 pH 3.3부터 $\Delta_0^w \phi_{TC}^{0'}$ 값의 급격한 증가가 나타나는 것을 볼 수 있는데, 이는 pH 3.3 (pKa₁)을 기준으로 두 가지의 다른 전하를 가진 TC 이온종들이 물/1,2-DCE 계면에서 전이한다는 것을 의미한다. TC 분자가 세 개의 pKa 값을 갖고 있으며[14,28], 이에 따른 산 해리 평형 반응식(그림 하단 참조)을 볼 때 본 논문에서 실험한 pH 조건인 3.0에서 9.5 사이에서는 적어도 세 가지의 다른 전하를 띤 TC 화학종이 존재함을 유추할 수 있다. 즉 pH < pKa₁ (3.30)일 때는 TC의 양성자 형태(H₄TC⁺)가 우세할 것으로 보이며, pKa₁ (3.30) < pH < pKa₂ (7.68)일 때는 H₄TC⁺가 H⁺를 잃어 양쪽성 이온(H₃TC⁰)을 형성할 것이다. 또한 pH > pKa₂ (7.68)일 때는 음이온의 형태가 우세하며 따라서 pH가 증가함에 따라 음이온의 비율은 점점 더 증가할 것으로 예측된다.

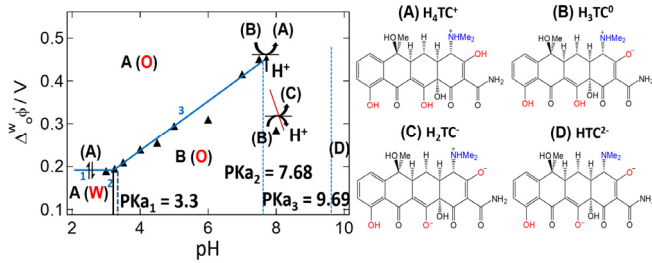


Figure 2. A representative ionic partition diagram showing the plot of the values of differently charged TC species at the water/1,2-DCE interface with respect to different pH buffer solution. The DPV data sets were used to calculate values. Three longitudinal dotted lines are the pKa₁, pKa₂ and pKa₃ of TC while solid lines 1, 2, and 3 are for equations 3, 4, and 5, respectively.

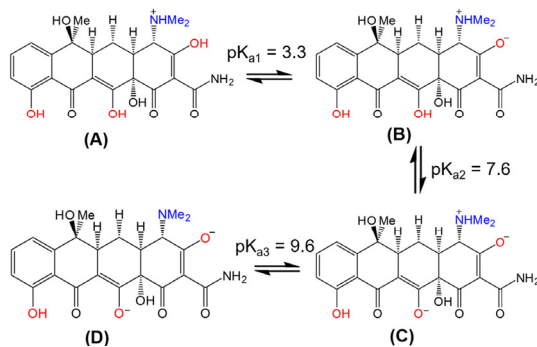


Figure 2에 제시한 이온 분배 도표로부터 TC 화학종의 친유성 (lipophilicity) 정보를 얻기 위해 Girault 연구팀에서 2001년도에 발표한 이론을 도입하였다[35]. 즉, 세 개의 상 경계선(phase boundary)으로 구성된 액체/액체 계면에서 어떤 알칼리성 분자의 형식 전이 전위 값과 친유성의 상관 관계는 식 (3-5)로 정리할 수 있으며, 각각의 식은 Figure 2에 세 개의 선(line 1, 2와 3)으로 표기가 가능하다.

$$\Delta_0^w \phi^0 = \Delta_0^w \phi_{H_4TC^+}^{0'} \quad [\text{line 1 in Figure 2}] \quad (3)$$

$$\text{pH} = \text{pKa}_1 - \log P_{H_3TC^0}^0 \quad [\text{line 2 in Figure 2}] \quad (4)$$

$$\Delta_0^w \phi = \Delta_0^w \phi_{H_4TC^+}^{0'} + \frac{2.3RT}{F} (\log P_{H_3TC^0}^0 - \text{pKa}_1) + \left(\frac{2.3RT}{F} \right) \text{pH} \quad [\text{line 3 in Figure 2}] \quad (5)$$

Figure 2에서 line 1 [식 (3)]은 pKa₁ 값보다 낮은 pH에서는 pH 변화에 따라 $\Delta_0^w \phi^0$ 값의 변화가 없다는 것을 나타낸다. Line 3은 pH > pKa₁일 때 pH가 증가함에 따라 $\Delta_0^w \phi^0$ 값이 증가함을 나타내며 이는 pH 변화에 따른 중성 형태의 TC 분자가 생성되기 때문으로 추정된다. 또한 $\Delta_0^w \phi^0$ 값이 크게 변화하기 시작하는 pH 지점(line 2)은 보통의 친유성 분자와 유사하게 TC 분자 역시 pKa₁에서 약간 빛나가 있음을 나타낸다[36]. pKa₁ (3.3)에서 중성을 나타내는 TC 화학종의 형식 전이 전위 값과 친유성의 상관 관계를 직접적으로 나타내는 식 (5)를 이용하면 TC의 분배 계수($\log P_{H_3TC^0}^0$)를 계산할 수 있으며 그 값은

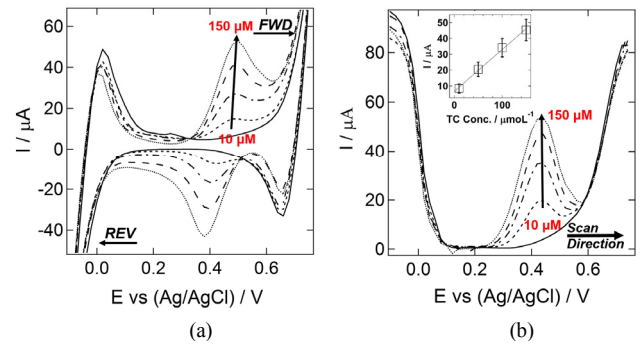


Figure 3. (a) Cyclic and (b) differential pulse voltammograms for the transfer of various concentrations of TC molecules in pH 4.0 buffer solution across the water/1,2-DCE interface. Solid line is for 5 mM acetate buffer in the absence of TC. Concentrations of TC were varied from 10 to 150 μM . Cell 1 was used. Inset in (b) shows a plot of the peak current as a function of the TC concentration ranging from 10 to 150 μM .

0.104이었다. 이 값을 식 (4)에 대입하면 pH는 3.2가 얻어지며 이는 추출 산성도 상수($\text{pK}_{a,\text{ext}}$)로 간주될 수 있다[37]. 따라서 실제로 유기층에서 H_3TC^0 를 추출하려면 수용액 층을 pKa₁보다 더 강한 산성으로 만들어 주어야 할 것으로 예상된다.

TC 약물의 친유성뿐만 아니라, 물의 pH < pK_{a,ext}일 때 아래 식 (6)과 (7)을 사용하면, 물/1,2-DCE 계면에서 주 화학종인 H_4TC^+ 이온이 전이하는데 필요한 Gibbs 전이 에너지($\Delta G_{tr}^{0,w \rightarrow 0}$)와 H_4TC^+ 의 분배 계수($\log P_{H_4TC^+}^0$)를 계산할 수 있다[12,36-37].

$$\Delta_0^w \phi_{H_4TC^+}^{0'} = \frac{\Delta G_{tr}^{0,w \rightarrow 0}}{zF} \quad (6)$$

$$\log P_{H_4TC^+}^0 = \frac{-\Delta G_{tr}^{0,w \rightarrow 0}}{2.3RT} \quad (7)$$

그 결과 $\Delta G_{tr}^{0,w \rightarrow 0}$ 는 18.48 kJ · mol⁻¹이었으며, $\log P_{H_4TC^+}^0$ 의 경우 -3.28로, 중성 TC 종의 경우(0.104)보다 작은 것을 볼 때 H_4TC^+ 화학종이 H_3TC^0 보다 좀 더 친수성을 고려해보면 이 또한 타당한 값이라 할 수 있겠다.

본 논문에서는 ITIES 계면에서 TC 약물의 이온 이동반응을 이용하여 TC를 정량적으로 분석 가능한 센서로 응용하고자 하였으며, 이를 위해 먼저 특정 pH 값을 갖는 완충 수용액에 다양한 농도의 TC를 첨가하였을 때 TC 이온 전이 반응에 의한 전류 값이 증가하는 경향을 살펴보았다. Figure 3a는 pH를 4.0으로 이온세기는 0.02 M로 고정한 상태에서 서로 다른 농도의 TC 이온의 전이 반응에 대한 CV 데이터를 나타내었다. 수용액에 TC를 전혀 넣지 않은 경우에는 전위창 범위에서 TC 이온 전이 반응에 의한 피크 전류 변화가 관찰되지 않았으나 TC를 첨가할 경우 정방향 및 역방향 스캔에서 TC 화학종의 전이에 의한 피크가 관찰되었다. 또한 TC 이온의 농도가 증가함에 따라 정방향(수용액 층 → 1,2-DCE층) 및 역방향(1,2-DCE층 → 수용액 층) 스캔 모두에서 TC 이온 전이 반응에 해당하는 전위에서 피크 전류 값이 증가하는 것을 볼 수 있다. 이러한 현상은 고체 전극에서 산화 환원 활성을 갖는 화학종의 산화와 환원 반응에 의해 얻어지는 전류 값이

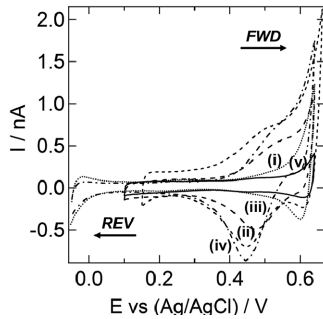


Figure 4. Representative cyclic voltammograms for the transfer of 30 μM TC in different pH solutions across a single microhole supported water/PVC-NPOE gel interface. The pH of buffer solution was (ii) 2.5, (iii) 3.5, (iv) 4, and (v) 7. (i) is for 5 mM acetate buffer at pH 4.0 in the absence of TC. Cell 2 was used.

그 화학종의 농도와 비례하는 관계를 정의한 Randles-Sevcik[38] 식을 사용할 수 있음을 암시한다.

$$I_p^{FWD} = 0.4463z_i A F c_i \sqrt{\frac{z_i F}{RT}} \sqrt{v} \sqrt{D_i} \quad (8)$$

여기서 I_p^{FWD} 는 수용액 층에서 유기층으로 TC 이온이 전이할 때 얻어진 피크 전류이며, z_i 는 TC 이온의 전하량, A 는 액체/액체 계면의 면적, F 는 패러데이 상수, R 은 기체 상수, T 는 절대 온도, c_i 는 TC 이온의 농도, v 는 스캔 속도이며, D_i 는 TC의 확산 계수이다.

식 (8)로부터 계산한 기울기 값은 $0.599 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 으로 이는 pH 4.0에서 TC 이온이 전이할 때 얻어진 전류 값이 TC 이온 농도에 따라 얼마나 민감하게 감응하느냐(민감도)를 이론적으로 예측할 수 있는 정보이다. Figure 3에 나타난 CV 데이터로부터 TC 이온 농도 변화에 따른 이온의 이동 반응에 의한 전류 값 증가를 도시화할 때 얻어진 실험적인 기울기 값은 $0.264 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 이었으며, 이는 이론적인 민감도와 유사함을 알 수 있다. 또한 Figure 3b는 pH 4.0에서 TC 화학종의 농도 변화에 따른 DPV 데이터를 나타내었으며, 삽입된 그래프는 전위를 정방향으로 스캔했을 때 10 μM 부터 150 μM 까지의 TC 농도 변화에 따른 피크 전류 값을 도시한 것이다. CV와 마찬가지로 TC의 농도가 증가할수록 DPV 피크 전류 값도 비례적으로 증가함을 볼 수 있다. 상기 CV와 DPV 결과는 ITIES 계면에서 TC 이온 전이반응을 전기화학적으로 측정함으로써 TC 분석용 이온 센서를 제작할 수 있음을 나타낸다.

3.2. 테트라사이클린 센서

ITIES에서의 TC 이온의 전이 반응을 이용하여 TC 이온 센서를 제작하기 위해 본 논문에서는 PET 박막에 단일 마이크로 홀을 뚫어 계면의 크기를 마이크로 스케일로 소형화한 후, 유기층으로 NPOE 유기 용매에 약 3% (wt/wt) PVC 경화제를 넣어 마이크로 홀을 갖는 박막 위에 약 8 μL 를 도포하여 젤화하였다. 이를 물과 접촉함으로써 마이크로-수용액/젤 계면을 형성하였다. 이는 센서 제작 시 한 개의 액체 상을 젤화함으로써 두 개의 서로 다른 액체상을 다룰 때 오는 어려움을 극복하는 방법 중에 하나로 우수한 내구성을 제공하는 것으로 알려져 있다[25]. 단일 마이크로 홀 수용액/유기성 젤 계면에서 TC 이온의 전이 반응을 Cell 2에 나타난 전기화학 셀과 CV 및 DPSV 방법을 이용하여 측정하였다.

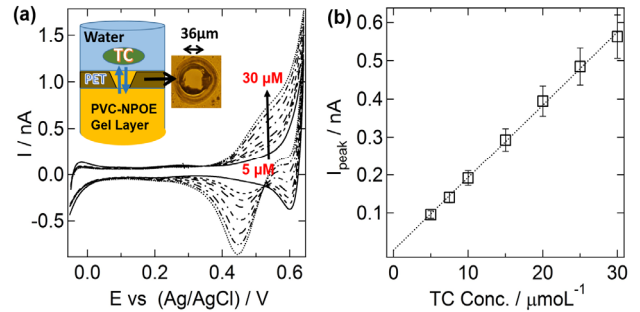
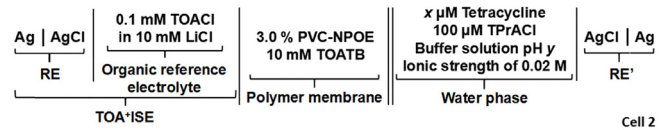


Figure 5. A series of cyclic voltammograms for various concentrations of TC molecules in pH 4.0 buffer solution transferring across a single microhole-water/PVC-NPOE gel interface. The TC concentration was changed from 5 to 30 μM and solid line is for 5 mM of acetate buffer in the absence of TC. Cell 2 was used. Inset in (a) is a scheme representing ionizable TC transfer across a microhole supported water/PVC-NPOE gel interface with the optical microscopic image of a single microhole on PET film. (b) A plot of the forward current versus the TC concentration ranging from 5 to 30 μM .



pH 2.5, 3.5, 4.0와 7.0 각각의 완충용액에 TC 농도를 30 μM 로 고정하여 첨가한 후 측정된 CV 결과를 Figure 4에 나타내었다(Cell 2 사용). 이온세기와 pH를 각각 0.02 M과 4.0으로 만든 수용액/PVC-NPOE 젤 계면에서 측정된 TC 이온 전이 반응에 대한 CV 데이터를 보면 Figure 3에 나타난 물/1,2-DCE 계면에서의 TC 전이 반응의 데이터와 유사함을 알 수 있다. 상기 결과를 바탕으로 TC 농도에 민감하게 감응하는 TC 정량분석 센서 제작을 위해 양쪽성을 띠는 이온인 H_3TC^0 가 좀 더 우수하게 존재하는 pH 4.0을 선정하였다. 그 이유는 수용액 pH 2.5에서 8.0까지 TC 농도에 따른 전류 값 변화를 측정된 결과 pH 4.0에서 직선성을 가지며 재현성이 가장 높았기 때문이다. 특히 pH 7.0 이상의 경우 TC 농도가 증가하여도 더 이상 정류 상태 전류 값이 변화하지 않음을 알 수 있었다.

pH 4.0에서 TC 화학종의 농도를 5에서 30 μM 까지 변화시키면서 측정된 CV 결과를 Figure 5에 나타내었다. TC를 첨가하지 않았을 때는 전위창 내에서 관찰 가능한 전류 변화가 나타나지 않았으나, TC가 수용액 층에 첨가되었을 때 전위창 내에서 수용액 층에서 유기성 젤층으로 H_3TC^0 화학종 전이에 의한 pseudo 정류 상태 전류(steady-state current, I_{ss})에 도달하는 것을 관찰할 수 있었으며, H_3TC^0 화학종이 유기성 젤층으로부터 수용액 층으로 전이할 때 피크 모양의 전류 변화가 나타남을 볼 수 있었다. 이러한 비대칭적 전압전류 곡선은 점성이 높은 PVC-NPOE 젤로 채워진 마이크로 홀을 액체/젤 계면으로 사용했을 때 이온 이동반응에 의해 얻어지는 전형적인 결과이다. 즉, 이온이 수용액 층에서 유기성 젤층으로 전이할 경우 반구형 흐름(hemispherical flux)의 확산이 지배적이어서 정류 상태의 전압전류 곡선이 얻어지며 반대로 유기성 젤층에서 수용액 층으로 전이할 경우에는 젤로 채워진 홀 안의 선형 흐름(linear flux)과 홀 바깥의 젤층의 반구형 흐름이 혼합된 확산으로 인해 피크 형태의 전압전류 곡선이 얻어진 것이다[25,38].

수용액 층에서 유기성 젤층으로 H_3TC^0 가 전이하였을 때의 pseudo

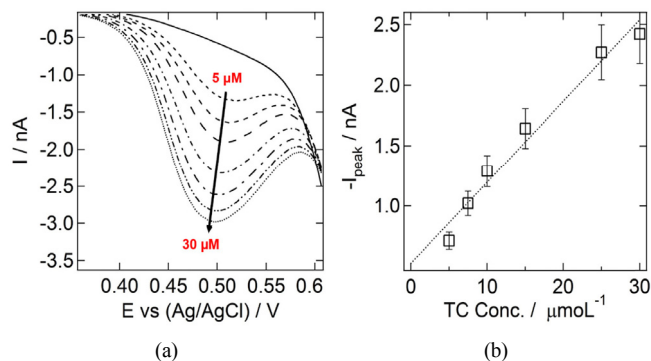


Figure 6. (a) Differential pulse stripping voltammograms for the transfer of various concentrations of TC at pH 4 buffer solution across the microhole-water/gel interface. (b) A plot of the peak current versus the TC concentration ranging from 5 to 30 μM .

정류 상태의 전류와 유기성 젤층에서 수용액 층으로 전이하였을 때의 피크 형의 전류 값 모두 H_3TC^0 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있다. TC의 농도에 따른 정류 상태의 전류 값을 도시한 결과 얻어진 직선의 기울기는 센서의 민감도를 의미하며 Figure 5b에서 구한 실험적 기울기 값은 $0.019 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 이었다. 제작한 마이크로 홀이 구형임을 감안할 때 민감도를 구하기 위해 다음 식 (9)를 사용하였다[38].

$$I_{ss} = 4nzFD_0c_r \quad (9)$$

여기서 r 은 마이크로 홀의 반지름이며, 본 실험에서는 약 $18 \mu\text{m}$ 이었다. 식 (9)를 이용하여 계산한 이론적 기울기 값은 $0.027 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 으로 Figure 5b로부터 얻어진 실험적 기울기 값과 유사하지만, 이론적 값이 약간 더 큰 것을 확인하였다. 그 이유로는 마이크로 홀에 젤을 캐스팅할 때 홀을 완전히 채우지 않아 사용한 마이크로 홀 크기보다 마이크로 홀-액체/젤 계면이 작게 형성되어 상대적으로 전류 값이 작게 나타난 것으로 사료된다. 하지만, TC 농도 대비 전류 값의 변화가 직선적으로 비례함을 통해 개발한 수용액/젤 기반의 TC 센서가 TC 약물의 정량 분석에 응용 가능함을 예측할 수 있다.

개발한 TC 약물센서의 감도를 증대하기 위해 기존에 액체/젤 계면 기반의 다양한 이온 센서 개발에 사용되었던 시차펄스 stripping 전위법 (differential pulse stripping voltammetry, DPSV)을 이용하였다[27]. 즉 수용액 층에 있는 H_3TC^0 가 유기성 젤층으로 이동하는 전위 값인 0.64 V (vs Ag/AgCl)에서 약 30 s간 전위를 홀딩함으로써 H_3TC^0 를 유기성 젤층에 농축시킨 후 전위를 0.64 V 에서 -0.05 V 까지 스캔함으로써 젤에 축적된 H_3TC^0 화학종을 수용액 층으로 다시 전이시키는 전압전류법을 사용하였다. Figure 6a와 b에는 pH 4.0에서 H_3TC^0 의 농도를 5에서 $30 \mu\text{M}$ 로 변화시키면서 얻은 DPSV 데이터와 이를 분석하여 얻은 검정곡선을 각각 나타내었다. 수용액 층에서 TC 약물의 농도가 증가할 때 수용액/젤 계면에서 전이하는 TC 이온 반응에 의한 전류 값이 비례적으로 증가함을 볼 수 있으며, $5 \mu\text{M}$ 농도의 H_3TC^0 이온을 검출할 수 있었다. 이는 개발한 센서가 정량적으로 테트라사이클린을 분석하는데 사용할 수 있음을 암시하며, 추후 다양한 환경 샘플에 잔존하는 테트라사이클린의 농도를 검출하는데 활용 가능함을 시사한다.

4. 결 론

물/1,2-DCE와 단일 마이크로 홀로 지지된 물/PVC-NPOE 젤 계면에

서 이온화된 테트라사이클린의 전이 반응을 CV 및 DPV를 이용하여 조사하였으며, 이를 통해 TC 분자의 이온분배도표를 정립하였다. 그 결과 주어진 pH 조건 하에서 어떠한 TC 전하 형태가 액체/액체 계면에서 좀 더 지배적으로 전이하는지 알 수 있었으며, pH에 따른 TC 분자의 전하 상태 및 친유성을 예측할 수 있었다. 이와 함께, 물/1,2-DCE 계면에서 이온화된 TC 전이 과정에 필요한 형식 전이 전위 값, 친유성 및 친수성 TC 화학종의 분배 계수와 Gibbs 전이 에너지와 같은 열역학적인 정보를 추출하여 그 결과를 나타내었다. 또한 이온 세기가 0.02 M 이며, pH 4.0인 수용액 조건에서 단일 마이크로 홀로 구성된 수용액/PVC-NPOE 젤 계면에서의 H_3TC^0 이온이 전이할 때 TC 농도 변화에 따른 전류 변화를 측정함으로써 H_3TC^0 센서를 개발하였다. 유기성 젤층에 TC 이온의 사전 농축을 가능케 하는 DPSV 기술을 적용하여 $5 \mu\text{M}$ 에서 $30 \mu\text{M}$ 의 TC 농도 범위에서 직선성을 나타내며, $5 \mu\text{M}$ 농도의 TC를 정량 분석할 수 있는 이온 센서를 개발하였다. 본 논문에서 제시한 액체/젤 기반의 마이크로 스케일 TC 센서는 추후 수질, 토양 등의 환경 시료에 잔존하는 테트라사이클린의 농도를 검출 및 정량하는데 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

감 사

This research was supported by the National Research Foundation (NRF) of Korea funded by the Ministry of Science, ICT, and Future Planning (grant number : NRF-2015R1A2A1A15052198).

References

- G. Greenstein, Clinical significance of bacterial resistance to tetracyclines in the treatment of periodontal diseases, *J. Periodontol.*, **66**, 925-931 (1995).
- R. Dagherir and P. Drogui, Tetracycline antibiotics in the environment: a review, *Environ. Chem. Lett.*, **11**, 209-227 (2013).
- H. Oka, Y. Ito, and H. Matsumoto, Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods, *J. Chromatogr. A*, **882**, 109-133 (2000).
- H. Ji and E. Wang, Flow injection amperometric detection based on ion transfer across a water - Solidified nitrobenzene interface for the determination of tetracycline and terramycin, *Analyst*, **113**, 1541-1543 (1988).
- M. Tumini, O. G. Nagel, P. Molina, and R. L. Althaus, Novel bio-assay using *Bacillus megaterium* to detect tetracycline in milk, *Rev. Argent. Microbiol.*, **48**, 143-146 (2016).
- X.-Q. Wei, Z.-F. Liu, and S.-P. Liu, Resonance Rayleigh scattering method for the determination of tetracycline antibiotics with uranyl acetate and water blue, *Anal. Biochem.*, **346**, 330-332 (2005).
- H. Wang, H. Zhao, X. Quan, and S. Chen, Electrochemical determination of tetracycline using molecularly imprinted polymer modified carbon nanotube-gold nanoparticles electrode, *Electroanalysis*, **23**, 1863-1869 (2011).
- M. A. Ghandour and A. M. M. Ali, Adsorptive stripping voltammetric determination of tetracycline and oxytetracycline, *Anal. Lett.*, **24**, 2171-2186 (1991).
- M. E. Caplis, H. S. Ragheb, and E. D. Schall, Determination of tetracycline antibiotics by alternating-current polarography, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 694-698 (1965).
- M. Velický, A. N. J. Rodgers, R. A. W. Dryfe, and K. Tam, Use

- of voltammetry for in vitro equilibrium and transport studies of ionisable drugs, *ADMET DMPK*, **2**, 143-456 (2014).
11. G. Bouchard, P.-A. Carrupt, B. Testa, V. Gobry, and H. H. Girault, Lipophilicity and solvation of anionic drugs, *Chem. Eur. J.*, **8**, 3478-3484 (2002).
 12. R. Gulaboski, F. Borges, C. M. Pereira, M. N. D. S. Cordeiro, J. Garrido, and A. F. Silva, Voltammetric insights in the transfer of ionizable drugs across biomimetic membranes - Recent achievements, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **10**, 514-526 (2007).
 13. S. M. Ulmeanu, H. Jensen, G. Bouchard, P.-A. Carrupt, and H. H. Girault, Water-oil partition profiling of ionized drug molecules using cyclic voltammetry and a 96-well microfilter plate system, *Pharm. Res.*, **20**, 1317-1322 (2003).
 14. J. Pang, C. Han, Y. Chao, L. Jing, H. Ji, W. Zhu, Y. Chang, and H. Li, Partitioning behavior of tetracycline in hydrophobic ionic liquids two-phase systems, *Sep. Sci. Technol.*, **50**, 1993-1998 (2015).
 15. D. W. M. Arrigan, Bioanalytical detection based on electrochemistry at interfaces between immiscible liquids, *Anal. Lett.*, **41**, 3233-3252 (2008).
 16. R. Gulaboski, M. N. D. S. Cordeiro, N. Milhazes, J. Garrido, F. Borges, M. Jorge, C. M. Pereira, I. Bogeski, A. H. Morales, B. Naumoski, and F. Silva, Evaluation of the lipophilic properties of opioids, amphetamine-like drugs, and metabolites through electrochemical studies at the interface between two immiscible solutions, *Anal. Biochem.*, **361**, 236-243 (2007).
 17. R. A. Fernández and S. A. Dassie, Transfer of tetracyclines across the H₂O|1,2-dichloroethane interface: Analysis of degraded products in strong acid and alkaline solutions, *J. Electroanal. Chem.*, **585**, 240-249 (2005).
 18. F. Reymond, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. H. Girault, Charge and delocalisation effects on the lipophilicity of protonable drugs, *Chem. Eur. J.*, **5**, 39-47 (1999).
 19. F. Reymond, V. Chopineaux-Courtois, G. Steyaert, G. Bouchard, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. H. Girault, Ionic partition diagrams of ionisable drug: pH-lipophilicity profiles, transfer mechanisms and charge effects on solvation, *J. Electroanal. Chem.*, **462**, 235-250 (1999).
 20. J. Koryta, Electrochemical polarization phenomena at the interface of two immiscible electrolyte solutions-II. Progress since 1978*, *Electrochim. Acta*, **29**, 445-452 (1984).
 21. Y. N. Kozlov and J. Koryta, Determination of tetracycline antibiotics by voltammetry at the interface of two immiscible electrolyte solutions, *Anal. Lett.*, **16**, 255-263 (1983).
 22. H. H. Youn, Investigation on antibiotic transfer process across an interface between two immiscible electrolyte solution, MS Thesis, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea (2016).
 23. M. M. Hossain, H. H. Girault, and H. J. Lee, Voltammetric Studies of anion transfer reactions across a microhole array-water/PVC-NPOE gel interface, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **33**, 1734-1740 (2012).
 24. I. Hatay, B. Su, F. Li, M. A. Mendez, T. Khoury, C. P. Gros, J.-M. Barbe, M. Ersoz, Z. Samec, and H. H. Girault, Proton-coupled oxygen reduction at liquid-liquid interfaces catalyzed by cobalt porphine, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13453-13459 (2009).
 25. S. N. Faisal, C. M. Pereira, S. Rho, and H. J. Lee, Amperometric proton selective sensors utilizing ion transfer reactions across a micro-hole liquid/gel interface, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 15184-15189 (2010).
 26. M. A. Deryabina, S. H. Hansen, and H. Jensen, Molecular interactions in lipophilic environments studied by electrochemistry at interfaces between immiscible electrolyte solutions, *Anal. Chem.*, **80**, 203-208 (2008).
 27. H. R. Kim, C. M. Pereira, H. Y. Han, and H. J. Lee, Voltammetric studies of topotecan transfer across liquid/liquid interfaces and sensing applications, *Anal. Chem.*, **87**, 5356-5362 (2015).
 28. L. J. Leeson, J. E. Krueger, and R. A. Nash, Concerning the structural assignment of the second and third acidity constants of the tetracycline antibiotics, *Tetrahedron Lett.*, **18**, 1155-1160 (1963).
 29. N. E. Rigler, S. P. Bag, D. E. Leyden, J. L. Sudmeier, and C. N. Reilley, Determination of a Protonation Scheme of Tetracycline Using Nuclear Magnetic Resonance, *Anal. Chem.*, **37**, 872-875 (1965).
 30. M. A.-J. Mohammed-Ali, Stability Study of tetracycline drug in acidic and alkaline solutions by colorimetric method, *J. Chem. Pharm. Res.*, **4**, 1319-1326 (2012).
 31. J. L. Colaizzi and P. R. Klink, pH-Partition behavior of tetracyclines, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 1184-1189 (1969).
 32. A. Molina, C. Serna, J. A. Ortuno, J. Gonzalez, E. Torralba, and A. Gil, Differential pulse voltammetry for ion transfer at liquid membranes with two polarized interfaces, *Anal. Chem.*, **81**, 4220-4225 (2009).
 33. J. A. Ortuo, C. Serna, A. Molina, and A. Gil, Differential pulse voltammetry and additive differential pulse voltammetry with solvent polymeric membrane ion sensors, *Anal. Chem.*, **78**, 8129-8133 (2006).
 34. S. Ulmeanu, H. J. Lee, D. J. Fermin, H. H. Girault, and Y. Shao, Voltammetry at a liquid liquid interface supported on a metallic electrode, *Electrochem. Commun.*, **3**, 219-223 (2001).
 35. V. Gobry, S. Ulmeanu, F. Reymond, G. Bouchard, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. H. Girault, Generalization of ionic partition diagrams to lipophilic compounds and to biphasic systems with variable phase volume ratios, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10684-10690 (2001).
 36. J. A. Ribeiro, F. Silva, and C. M. Pereira, Electrochemical study of the anticancer drug daunorubicin at a water/oil interface: drug lipophilicity and quantification, *Anal. Chem.*, **85**, 1582-1590 (2013).
 37. H.-T. Lam, C. M. Pereira, C. Roussel, P.-A. Carrupt, and H. H. Girault, Immobilized pH gradient gel cell to study the pH dependence of drug lipophilicity, *Anal. Chem.*, **78**, 1503-1508 (2006).
 38. P. Peljo and H. H. Girault, Liquid/liquid interfaces, electrochemistry at, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 1-11, John Wiley & Sons (2012).