

물/1,2-Dichloroethane 계면에서 Cefotiam 약물 이온의 전이 반응 연구 및 약물 센서에 응용

리우샤오원 · 신타제시카 · 이혜진[†]

경북대학교 자연과학대학 화학과 및 청정나노소재 연구소
(2018년 6월 14일 접수, 2018년 6월 29일 심사, 2018년 7월 12일 채택)

Electrochemical Study on Transfer Reaction of Ionizable Cefotiam across a Water/1,2-dichloroethane Interface and Drug Sensing Applications

XiaoYun Liu, Shinta Jeshycka, 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 June 14, 2018; Revised June 29, 2018; Accepted July 12, 2018)

초 록

본 논문은 편극화된 물/1,2-dichloroethane (1,2-DCE) 계면에서 세포티암(cefotiam, CTM) 항생제 약물의 전이 반응을 전기화학적 방법으로 조사하였다. CTM 약물은 물의 pH에 따라 서로 다른 전하를 가지고 이온화되며 각 pH에서 이들 이온의 전이 반응을 연구함으로써 처음으로 CTM 약물이 좀 더 우세하게 물 또는 유기층에 분배되는 정도를 나타내는 상 분배 도표를 세웠다. 이를 바탕으로 CTM 약물의 형식 전이 전위값 및 형식 Gibbs 전이 에너지 값을 포함한 열역학적 정보와 함께 분배 계수를 포함한 중요한 약물동태학 정보를 얻었다. 특히 pH 3.0 수용액에서 양전하를 띠는 CTM 이온의 전이 반응을 순환전압전류법으로 조사한 결과 CTM 농도에 따라 측정된 전류 값이 비례하여 증가한다는 점을 확인하였다. 이를 바탕으로 CTM 이온을 정량 분석 가능한 센서를 개발하였다. 휴대성과 이동성을 보완하기 위해 polyethylene terephthalate 필름에 마이크로홀을 만들어 지지체로 사용하고, 1,2-DCE 유기용매를 polyvinylchloride-2-nitrophenyloctylether (PVC-NPOE) 유기성 젤로 대체하여 도포하는 방식으로 센서를 제작하였다. 상기 센서를 이용하여 CTM 약물을 1 μM 에서 10 μM 까지 정량 분석할 수 있었다.

Abstract

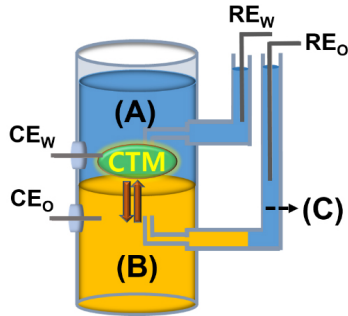
In this article, electrochemical investigation of the transfer reaction of ionizable cefotiam (CTM), an antibiotic molecule across a polarized water/1,2-dichloroethane (water/1,2-DCE) interface was studied. Ion partition diagram providing the preferred charged form of CTM in either water or 1,2-DCE phase was established via the voltammetric evaluation of the transfer process of differently charged CTM species depending upon the pH variation of aqueous solutions. Thermodynamic information including the formal transfer potential and formal Gibbs transfer energy values in addition to important pharmacokinetics including partition coefficients of ionizable CTM were also evaluated. In particular, the current associated with the transfer of CTM present at pH 3.0 aqueous solution proportionally increased with respect to the CTM concentration which was further used for developing CTM sensitive ion sensor. In order to improve the portability and convenient usage, a single microhole interface fabricated in a supportive polyethylene terephthalate film was used of which hole was filled with a polyvinylchloride-2-nitrophenyloctylether (PVC-NPOE) gel replacing 1,2-DCE, a toxic organic solvent. A dynamic range of 1-10 μM CTM was obtained.

Keywords: cefotiam (CTM), ITIES, formal transfer potential, partition coefficient, ionic partition diagram

1. 서 론

Cefotiam (CTM)은 정맥 주사로 투여되는 2세대 세팔로스포린계 항생제이며, 헤모필 루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 및 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 일반적인 양성균 및 음성균에 대한 항균 활성이 우수하며, 다양한 감염의 예방 및 치료에 사용되어 왔다[1-6]. 약물의 동력학(pharmacokinetics)은 용량 의존적

[†] 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



Scheme 1. Schematic diagram of Cell 1.

인 것으로 알려져 있으며, 일부 연구에서는 CTM의 경우 세팔로스포린과 사람 혈청 알부민(HSA) 사이의 결합 친화도가 주로 친유성과 관련이 있다는 것을 보고하였다[7-8]. 약물의 친유성 또는 친화성 정도를 나타내는 인자로 사용되는 분배 계수는 크로마토그래피 방법, shake-flask 방법, 광학 및 전기화학적 방법을 이용하여 구할 수 있다[9-12].

전기화학적 방법 중 서로 섞이지 않는 액체(수용액)/액체(유기용액) 계면(interface between two immiscible electrolyte solutions, ITIES)에서 전하를 띤 약물의 이동반응을 전기화학적 방법으로 조사하여 분배 계수를 구하는 방법도 많이 사용되어 왔다[13-19]. 특히 이 방법은 계면 전위를 제어함으로써 이온 분포를 제어할 수 있기 때문에 전하를 띤 이온이 특정 전위에서 계면을 전이할 때 전류량 측정을 통해 약물의 분배 계수를 검출하는데 유용하게 활용되어 왔다. 지금까지 약물의 분배 계수, 약물동력학 및 생물학적 정보를 얻기 위해 ITIES에서 약물 이동반응을 전압전류법을 이용하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 또한 이를 통해 이온화 가능한 약물의 계면에서 전이 반응 메커니즘을 예측하고 해석하는데 유용한 정보를 제공하는 이온 분배 도표를 구할 수 있으며, 이는 포괄적이고 정확한 이온 전달 시각화를 제공하여 약물 전달 및 분할 메커니즘을 이해하는데 도움을 제공할 수 있다[13,20-23].

본 논문에서는 편극화된 물/1,2-dichloroethane (1,2-DCE) 계면에서 이온화된 세포티암(cefotiam, CTM) 항생제 약물의 전이 반응을 순환 전압전류법(cyclic voltammetry, CV)과 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry, DPV)으로 조사하였다. 물의 pH에 따라 서로 다른 전하를 가지며 이온화되는 CTM 약물의 전이 반응을 pH 2.6에서 8.0까지 변화시키면서 전기화학적 신호를 측정하여 처음으로 CTM 약물의 상 분배 도표를 얻었다. 또한 전기화학적 데이터를 바탕으로 CTM 약물의 형식 전이 전위값 및 형식 Gibbs 전이 에너지 정보를 구하였다. pH 3.0 수용액에서 양전하를 띤 CTM 이온의 전이 반응에 의한 전류 값이 CTM 농도에 비례하는 현상에 기반을 둔 새로운 CTM 이온 정량 센서를 개발하였다. 상기 센서는 1,2-DCE 유기용매를 polyvinylchloride-2-nitrophenyloctylether (PVC-NPOE) 유기성 젤로 대체하여 PET 필름에 제조된 마이크로홀에 도포하는 방식으로 제작하였으며, 이와 함께 시차펄스 stripping 전압전류법(differential pulse stripping voltammetry, DPSV)을 이용하여 CTM 약물을 1 μ M까지 검출할 수 있었다.

2. 실험

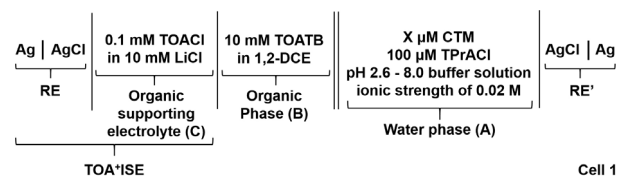
2.1. 재료 및 시약

Cefotiam dihydrochloride hydrate ($C_{18}H_{23}N_9O_4S_3 \cdot 2HCl \cdot H_2O$, Sigma-Aldrich), hydrogen chloride (HCl, Sigma-Aldrich), maleate ($C_4H_4O_4$, Sigma-Aldrich), citric acid ($C_6H_8O_7$, Sigma-Aldrich), sodium hydroxide

(NaOH, Sigma-Aldrich), acetic acid (CH_3COOH , Duksan pure and chemical Co. Ltd), sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$, Sigma-Aldrich), sodium dihydrogen phosphate-monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Sigma-Aldrich), disodium hydrogen phosphate-heptahydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, Sigma-Aldrich), boric acid (H_3BO_3 , Sigma-Aldrich), sodium chloride (NaCl, Sigma-Aldrich), tetraoctylammonium bromide (TOABr, Sigma-Aldrich), lithium tetrakis (pentafluorophenyl) borate etherate (LiTB, Boulder Scientific Co.), 1,2-dichloroethane (1,2-DCE, Sigma-Aldrich), lithium chloride (LiCl, Fluka), tetraoctylammonium chloride (TOACl, Sigma-Aldrich), tetrapropylammonium chloride (TPrACl, Sigma-Aldrich), polyvinylchloride (PVC, high molecular weight, Sigma-Aldrich), 2-nitrophenyloctylether (NPOE, Sigma-Aldrich), 유기층의 지지 전해질(organic supporting electrolyte solution)로 tetraoctylammonium tetrakis (pentafluorophenyl) borate (TOATB)를 사용하였으며, 이는 이전에 보고된 방법으로 제조하였다[24]. 모든 수용액은 Millipore-filtered 물을 이용하여 제조하였으며, 완충 수용액의 pH 범위 조절은 다음과 같이 수행하였다. pH 2.6-3.0의 경우 말레산염 완충액(maleate buffer), pH 3.0-3.5의 경우 구연산염 완충액(citrate buffer), pH 4.0-5.5의 경우 아세테이트 완충액(acetate buffer), pH 6.0-7.5의 경우 인산염 완충액(phosphate buffer) 그리고 pH 8.0의 경우 보레이트 완충액(borate buffer)을 사용하였다[25]. 모든 pH 범위의 완충액에 불활성염인 염화나트륨을 일정량 첨가함으로써 수용액 층의 이온세기를 0.02 M로 조절하였다.

2.2. 물/1,2-DCE 계면에서 CTM 전이 반응 측정을 위한 전기화학셀 셋업

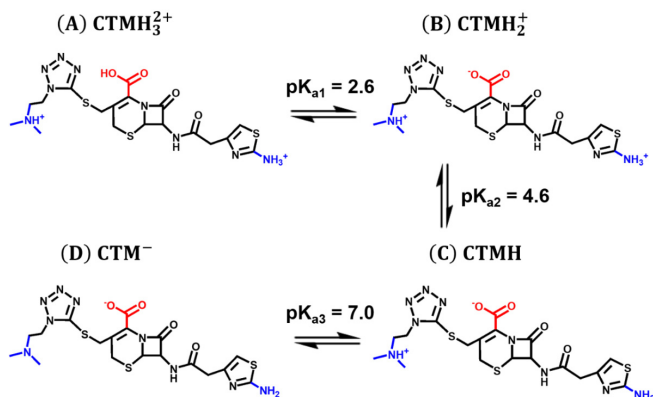
편극화된 물/1,2-DCE 계면에서 CTM의 전이 과정의 전기화학적 측정을 위해 4-전극 유리 셀[26]을 이용하였으며 셀 구성은 아래 Cell 1에 나타내었다.



본 실험에서는 보편적인 3전극 시스템과 달리 4전극 시스템을 사용하였는데, 이는 비교적 큰 계면을 가진 large ITIES에서 흔히 사용되는 구성이다. 2개의 Ag/AgCl (silver/silver chloride) 기준 전극(REw, REo)을 물과 유기용액 층에 각각 담가 전위를 걸어줌으로써 Luggin 모세관을 통해 계면을 편극화하였고, Pt 보조 전극(CEw, CEo) 역시 물과 유기용액 층에 각각 담가 전류가 순환되도록 하였다. 여기서의 작업전극은 2개의 기준 전극으로 편극화된 물/유기용액 계면 그 자체라고 할 수 있는데, 그 이유는 계면을 가로지르는 이온의 이동으로 인해 변화되는 전류를 측정하기 때문이다[27]. 물/1,2-DCE 계면의 면적은 약 1.13 cm^2 이며, 전기화학셀은 Faraday cage 안에서 운영함으로써 외부의 전기적 소음을 최소화하였다.

2.3. CTM 센서 제작을 위한 마이크로홀-물/PVC-NPOE 계면 형성 방법

Polyethylene terephthalate (PET) 필름(~12 μ m 두께)에 바늘을 사용



Scheme 2. The acid–base equilibria of CTM.

하여 단일 마이크로홀(반지름 = ~18 μm)을 제작하고, PVC (3%, m/m)와 10 mM TOATB 지지전해질을 혼합한 NPOE 용액 8 μL를 약 80 °C에서 마이크로 홀에 도포한 후 실온에서 약 6 h 이상 보관하여 젤화하였다[28].

2.4. 전기화학적 측정 방법

모든 전기화학적 측정은 PGSTAT30 (Ecochemie)의 전위차계 (potentiostat)를 사용하였으며, 실온에서 수행하였다. 순환전압전류법 (cyclic voltammetry, CV)의 경우, 스캔 속도는 10에서 100 mVs⁻¹ 사이로 조절하여 사용하였다. 시차펄스전위법(differential pulse voltammetry, DPV)의 경우, 단계 전위 = 10 mV, 펄스 진폭 = 50 mV, 스캔 속도 = 100 mVs⁻¹이었다. 시차펄스벗김전위법(differential pulse stripping voltammetry, DPSV)의 경우, 0.75 V에서 농축 시간 = 250 s, 단계 전위 = 3 mV, 스캔 속도 = 20 mVs⁻¹, 펄스 진폭 = 50 mV, 펄스 지속 시간 = 50 ms이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 물/1, 2-DCE 계면에서 이온화된 CTM의 전이 반응 조사

CTM은 Scheme 2의 산-염기 평형도에서 보듯이 염기성 아미노기 (amino group) 두 개와 카르복시기(carboxyl group) 한 개를 가지고 있으며, 세 개의 pKa 값(pK_{a1}^w = 2.6, pK_{a2}^w = 4.6, pK_{a3}^w = 7.0)[6,29-30]을 가지고 있어서 수용액의 pH 값에 따라 이온화가 다르며 총 4개의 화학종(CTMH₃⁺, CTMH₂⁺, CTMH, CTM⁻)이 존재한다. 이렇게 수용액의 pH 변화에 따라 서로 다른 전하를 띤 CTM 이온 상태와 확산전류를 안정적으로 유지하기 위해서는 각 pH 수용액의 이온세기를 일정한 값으로 유지하는 것이 필요하며[30-31], 본 연구에서는 그 세기를 0.02 M로 고정하였다.

수용액 pH 변화에 따라 물/1,2-DCE 계면에서 전이하는 CTM 화학종의 종류와 그 의존도를 조사하기 위해 CV를 이용하여 전이 반응을 측정하였다. Figure 1에는 수용액의 pH를 3.0에서 6.0까지 변화시킬 때 각 pH에서 존재하는 CTM 약물이 1,2-DCE 층으로 전이하고 다시 수용액 층으로 전이하는 반응을 측정한 CV 데이터를 나타내었다. 수용액 pH가 2.5 미만일 때 피크가 얻어지지 않았으며, CTM의 pK_{a1}을 고려해볼 때 주 화학종인 CTMH₂⁺ 이온의 전이 반응이 일어날 것으로 예측되었으나, 2가 양이온이 상대적으로 1가 양이온 약물보다 친수성이 강하여 지정된 전위창 내에서 관찰되지 않은 것으로 판단되었다

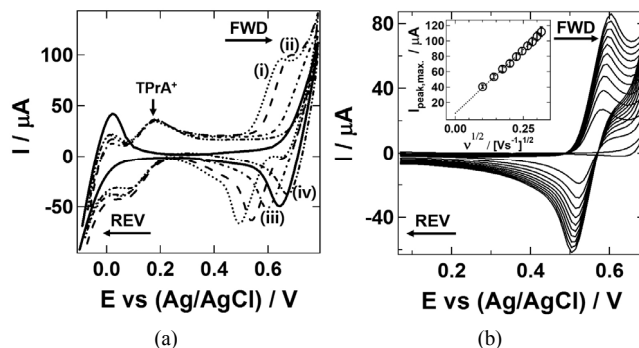


Figure 1. (a) Representative cyclic voltammograms (CVs) for the transfer of ionized CTM species (bulk concentration = 200 μM) across a polarized water/1,2-DCE interface. Cell 1 was used. The solid line is for 5 mM citrate buffer in the absence of CTM at pH 3.0. (i), (ii), (iii), and (iv) curves were obtained at pH 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 in the presence of CTM. (b) CVs for the transfer of 200 μM CTM across the water/1,2-DCE interface. The aqueous pH was 3.0 and the scan rate (ν) was varied from 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 mV s⁻¹, respectively. Inset in (b) shows a plot of the maximum peak current associated with the CTM transfer versus the square root of the scan rate and the data points were taken from (b).

[32]. pH 2.5에서 4.6의 수용액에서 CTM 약물 전이에 따른 피크 전류는 1개가 얻어졌으며, 정방향(음의 전위 값에서 양의 전위 값으로 전위를 인가할 때)과 그 반대방향의 경우 피크와 피크의 전위값 차이는 약 60 mV ($2.3RT/z_iF = 59/z_i$ [mV])[20-21,33]로 계면에서 전이 반응은 가역반응임을 알 수 있었다. Scheme 1에 비추어보았을 때 상기 pH 범위에서 전이하는 주 화학종은 CTMH₂⁺임을 추정할 수 있다. Figure 1(b)에 도시된 바와 같이 CTM의 최대 피크 전류 대 스캔 속도의 제곱근의 그래프로부터, pH 3.0에서의 CTMH₂⁺ 이온의 확산 계수($D_{CTMH_2^+}^w$)를 얻을 수 있다. 이온의 전이 반응이 가역적인 경우 잘 알려진 Randles-Sevcik 식 (1)을 따르는데[34], CTMH₂⁺ 이온이 수용액 층에서 1,2-DCE 층으로 전이하는 경우(정방향 전위 스캔) 얻어진 최대 피크 전류 대 스캔 속도의 제곱근의 그래프의 기울기 값(3.0×10^4)을 식 (1)에 대입함으로써 확산계수 값을 계산할 수 있었으며, 이는 2.914×10^{-5} cm²s⁻¹이었다.

$$I_{\text{peak}}^{\text{FWD}} = 0.4463z_iFAc_i^w \left(\frac{z_iF}{RT} \right)^{1/2} \nu^{1/2} D_i^{w1/2} \quad (1)$$

여기서 i 는 이온화학종(CTMH₂⁺), $I_{\text{peak}}^{\text{FWD}}$ 는 정방향 피크 전류, A 는 계면 면적($A = 1.13$ cm²), c_i^w 는 i 이온의 벌크 농도, D_i^w 는 i 이온의 확산계수, z_i 는 i 이온의 전하($z_i = 1$), ν 는 전위 스캔 속도이다.

수용액의 pH를 2.6에서 6.0 사이로 조절하였을 때 CTM 화학종의 전이 반응에 의한 피크 전류가 정방향 및 역방향 스캔에서 각각 한 개 관찰되었고, 반 피크 전위는 약 60 mV ($2.3RT/z_iF$)로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 상기 pH 범위에서 CTM의 전이 반응은 가역적이라 할 수 있다(Figure 1 참조). Scheme 1에서 보듯이 pH 2.6-4.6 수용액에서 주 화학종은 CTMH₂⁺이므로 관찰된 피크 전류는 CTMH₂⁺의 전이 반응에 의한 것으로 사료된다. 반면에 pH 4.6에서 6.0 사이에는 주 화학종은 중성인 CTMH로 전류 피크는 수용액 층의 수소 이온(H⁺)의 도움을 받아 보조 전이 반응에 의한 것으로 추정된다. 수용액의 pH

Table 1. Thermodynamic and Pharmacokinetic Information for CTM

	Cefotiam		Cefotiam
$\Delta_o^w \phi_{CTMH_2^+}^{o'}$	0.3602 V	$D_{CTMH_2^+}^w$	$2.914 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$
$\Delta G_{tr,CTMH_2^+}^{o',w \rightarrow o}$	34.754 kJ/mol	pK_{a1}^w	2.6
$\log P_{CTMH_2^+}^{o'}$	-6.203	pK_{a2}^w	4.6
$\log P_{CTMH}^o$	1.3	pK_{a3}^w	7.0

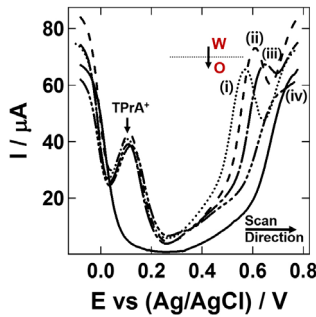


Figure 2. Differential pulse voltammograms (DPVs) for the transfer of CTM (200 μM) and TPrA+ (100 μM) across the water/1,2-DCE interface while varying the aqueous pH as (i) 3.0, (ii) 4.0, (iii) 5.0, and (iv) 6.0. The solid line is for 5 mM citrate buffer in the absence of CTM at pH 3.0. Cell 1 was used.

가 7보다 큰 경우, CTM 주 화학종이 음전하를 띠고 있어 제시된 전위 창 내에서 전이 반응이 관찰되지 않았다.

3.2. CTMH₂⁺ 약물에 대한 열역학 및 약물동력학 정보 추출

수용액의 pH 변화에 따라 서로 다른 전하를 갖는 CTM 약물의 전이 반응에 대한 열역학적 정보를 얻기 위해 피크 전류 모양을 좀 더 명확하게 제공할 수 있는 DPV 방법[35]과 TPrACl 이온을 내부 표준물로 첨가하여 전기화학적으로 조사하였다.

물과 1,2-DCE 계면에서 내부 표준물의 형식 전이 전위값은 -93 mV ($\Delta_o^w \phi_{TPrA^+}^{o'}$)이다. Figure 2에 각 pH에서 얻어진 대표적인 DPV 데이터를 나타내었으며, pH에 따라 얻은 CV 데이터의 정방향 스캔 곡선과 유사함을 알 수 있다. 수용액 pH가 2.5 이상으로 증가함에 따라 CTMH₂⁺의 전이 반응에 의한 피크가 나타났다. 각 pH에서 이온화한 CTM 약물과 기준물질의 전이 반응에 대한 DPV 데이터와 식 (2)-(4)를 이용하여 CTM 약물의 형식 전이 전위 값과 형식 Gibbs 전이 에너지 값을 계산하였으며, 얻어진 값들은 Table 1에 나타내었다.

$$E_{\text{peak,CTM}} = E_{1/2,CTM} - \frac{\Delta E}{2} \quad (2)$$

$$E_{1/2,CTM} - \Delta_o^w \phi_{CTM}^{o'} = E_{1/2,TPrA^+} - \Delta_o^w \phi_{TPrA^+}^{o'} \quad (3)$$

$$\Delta_o^w \phi_{CTMH_2^+}^{o'} = \frac{\Delta G_{tr,CTMH_2^+}^{o',w \rightarrow o}}{z_1 F} \quad (4)$$

여기서 ΔE는 펄스 진폭이었고, 그 값은 50 mV로 고정하였다. DPV 데이터로부터 얻은 피크 전위 값을 식 (2)에 대입하여 CTM 약물과 기준물질의 반과전위 값을 계산한 후 이 값과 알려진 약물의 형

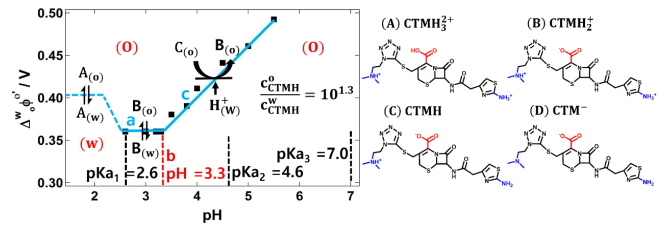


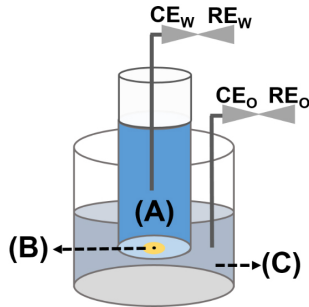
Figure 3. Ionic partition diagram of CTM at the water/1,2-DCE interface. The formal transfer potential values were taken from DPV data sets with respect to the aqueous pH values. The longitudinal dashed lines represent pK_a values of CTM species. The solid line a, b and c represent the equation (5), (6) and (7) respectively.

식전위 값을 식 (3)에 대입하여 CTM 약물의 형식 전이 전위 값을 계산하였다. CTM의 형식 전이 전위 값을 식 (4)에 대입하여 형식 Gibbs 전이 에너지 값을 구하였다. DPV 데이터와 상기 식을 이용하여 얻어진 형식 전이 전위 값을 pH에 따라 도시화함으로써 CTM 약물의 이온 분배 도표를 확립하였다(Figure 3). 즉, 형식 전이 전위 값의 변화는 CTM 약물의 이온화 정도가 다르다는 것을 암시하며[36], 형식 전이 전위가 변하는 지점은 이온 분배 도표에서 경계선의 교차점에 해당한다.

본 실험에서 pH가 2.6 미만일 때 CTM 약물의 전이 과정에 해당하는 피크가 관찰되지 않아 형식 전이 전위 값을 구할 수 없었으며, Figure 3에서 보듯이 pH가 2.6에서 3.3까지 형식 전이 전위 값이 일정하게 유지되었다는 것은 한 가지 주 화학종인 CTMH₂⁺ 이온이 수용액 층에서 안정하게 존재하며, 식 (5)에서 보듯이 얻어진 형식 전이 전위 값이 line a에 상응한 전위 값과 일치하는 것을 고려해 볼 때 유기층과 수용액 층의 CTMH₂⁺의 농도가 같다는 것을 암시하며, 이는 궁극적으로 CTMH₂⁺가 물과 1,2-DCE 계면에서 단순이온전이 반응을 한다는 것을 나타낸다[22,37]. 그러나 pH 3.3 이상에서는 형식 전이 전위 값이 pH 증가에 따라 pH당 60 mV (2.3RT/z₁F)만큼 증가하였다.

pH 3.3 이상에서는 식 (7)을 따르면서 형식 전이 전위 값이 pH 증가에 따라 pH 당 60 mV (2.303RT/z₁F, z₁ = 1)만큼 증가하는 것을 볼 수 있다. 계면에서 약물이 양성자와 착물을 형성하여 보조 전이하는 착물형성 메커니즘(interfacial complexation) 이론[38]을 고려해 볼 때 본 실험에서 중성인 CTMH 약물은 편극화된 계면에서 수용액 층의 수소 이온을 포착하며 수소 이온의 전이 에너지를 감소시킴으로써 전이 반응을 용이하게 한 것으로 판단할 수 있다. 즉, Figure 3, line c는 양성자(H⁺)가 중성인 CTMH 약물에 의해 보조 이온 전이 반응(assisted ion transfer reaction) 과정을 거치는 것을 의미한다고 할 수 있다. 중성인 CTMH 약물의 친유성 정도를 평가할 수 있는 분배 계수는 식 (6)을 이용하여 구할 수 있으며, 그 값은 1.3이었다.

식 (6)으로부터 나타나는 line b는 계면에서 약물의 산-염기 평형을 의미하며, 수용액 층의 CTMH₂⁺의 농도가 유기층의 중성인 CTMH의 농도와 같을 때 pH 값을 의미한다. 즉 상기 pH는 추출 산도 상수



Scheme 3. Schematic diagram of Cell 2.

($pK_{a,ext.}$)로 간주되며[37], 유기층에 존재하는 중성인 CTMH 화학종을 추출할 때 pK_{a2}^w (4.6)보다 pH 값이 낮은 산성 용액을 사용해야 한다는 것을 암시한다.

$$\text{line a: } \Delta_0^w \phi = \Delta_0^w \phi_{CTMH_2^+}^{\circ} \quad (5)$$

$$\text{line b: } pH = pK_{a2}^w - \log P_{CTMH}^{\circ} \quad (6)$$

$$\text{line c: } \Delta_0^w \phi = \Delta_0^w \phi_{CTMH_2^+}^{\circ} + \frac{2.3RT}{z_1 F} (\log P_{CTMH}^{\circ} - pK_{a2}^w) + \frac{2.3RT}{z_1 F} pH \quad (7)$$

또한 $CTMH_2^+$ 의 형식 Gibbs 전이 에너지 값을 식 (8)에 대입할 경우 $CTMH_2^+$ 의 형식 분배 계수($\log P_{CTMH_2^+}^{\circ}$) 값을 구할 수 있으며, 이는 -6.203이었다[20].

$$\log P_{CTMH_2^+}^{\circ} = - \frac{\Delta G_{tr,CTMH_2^+}^{\circ, w \rightarrow o}}{2.3RT} \quad (8)$$

식 (8)과 (6)으로부터 각각 구한 $\log P_{CTMH_2^+}^{\circ}$ 와 $\log P_{CTMH}^{\circ}$ 값의 차이 값을 구하였을 때 -7.503으로 CTM의 전하가 친유성에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있다. $CTMH_2^+$ 의 분배계수가 작은 양(+)의 값을 갖는다는 것은 Born의 용매화 모델(Born's solvation model)[32]에서 제시하듯이 이온화된 CTM 약물이 유기층에서보다 수용액 층에서 더 안정적이라는 것을 의미한다.

3.3. CTM 약물의 농도 측정용 센서

ITIES를 기반으로 한 CTM 약물 측정용 이온 센서를 개발하기 위해 1,2-DCE 유기 용매를 대신하여 젤화된 NPOE 용매를 사용하였고 좀 더 점도가 높은 젤의 사용으로 인한 iR 강화를 최소화하기 위해 반지름이 약 18 μm 인 단일 마이크로홀을 PET 필름 지지체에 제작하여 계면으로 사용하였다. 센서의 전기화학적 셀 셋업은 Cell 2에 나타내었다.

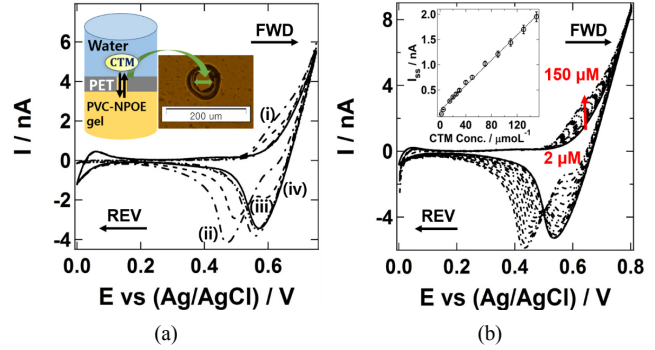
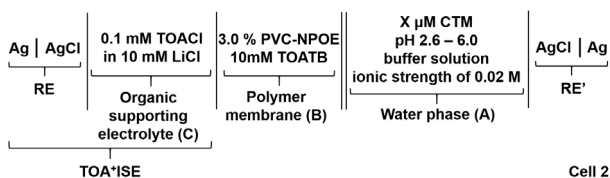


Figure 4. (a) CVs for the transfer of CTM (bulk concentration = 50 μM) across a single microhole supported water/PVC-NPOE gel interface. The pH of aqueous solutions were varied from (i) pH 3.0, (ii) pH 3.5, (iii) pH 4.0, and (iv) pH 6.0 in the present of CTM species, respectively and each curves were presented in a dotted line. Inset in (a) shows a schematic of CTM transfer across the interface with an image of the single microhole on PTE film from an optical microscopy. (b) A series of CVs for various concentrations of CTM ranging from 2 to 150 μM . The aqueous phase pH was 3.0. Inset in (b) shows the plot of the pseudo steady-state current versus the CTM concentration. The data points were taken from (b). The solid lines in (a) and (b) were for 5 mM citrate buffer in the absence of CTM at pH 3.0. Cell 2 was used.

Figure 4(a)는 수용액의 pH를 3.0에서 6.0까지 변화시켰을 때 상기 계면에서 이온화된 CTM의 전이 반응에 의한 CV 데이터를 나타내었다. 물/1,2-DCE 계면에서의 CTM 전이 반응과 유사한 데이터가 얻어졌으며, 산-염기 평형도에 따라, pK_{a3} (pH 7.0) 이상의 pH에서 CTM 화학종이 지배적으로 존재하므로 물/1,2-DCE 계면에서 pH 7인 경우 전위창 내에서 관찰가능한 피크가 나타나지 않았다. 이는 해당 전위창 범위 내에서 CTM 화학종이 계면에서 전이하지 않음을 암시한다. 따라서 유기성 젤 층을 사용한 본 실험에서도 pH 7 이상에서는 진행하지 않았다. 수용액 pH 3의 경우 주 화학종인 $CTMH_2^+$ 이온의 전이 반응에 의한 피크 전류가 상대적으로 명확하게 관찰되었으며, 특히 $CTMH_2^+$ 이온의 농도변화에 따라 전류값이 증가함을 볼 수 있었다. 따라서 수용액의 pH를 3.0으로 고정하여 $CTMH_2^+$ 이온의 전이 반응을 통해 CTM 약물을 정량하는 센서를 제작하였으며 이는 실제시료 적용 시, pH를 조절하는 과정이 추가될 수 있으나 별다른 이온의 보조 전이용 화합물 또는 리간드의 도움 없이 이온의 직접적인 전이만으로도 간단한 센서제작이 가능하다는 장점을 가진다. Figure 4(b)에서 보듯이 pH 3.0으로 고정한 수용액에 CTM 약물을 넣지 않았을 때 전위창 내에서 전류 변화가 나타나지 않았으나 CTM의 농도를 변화하였을 때 CTM 약물이 물에서 유기성 젤 층으로 그리고 젤 층에서 물로 전이하는 반응에 의한 전류변화가 농도에 비례하여 증가함을 볼 수 있다. 이때 CTM이 수용액 층에서 유기층으로 전이할 경우 반구형 확산 흐름에 지배를 받아 pseudo 정류 상태 전류(steady-state currents)가 얻어졌으며, 유기성 젤 층에서 물로 전이할 때는 반구형과 마이크로홀 안에 채워진 유기성 젤 층 내의 선형 확산 흐름이 동시에 지배하고 있어 피크모양의 전류변화가 일어남을 볼 수 있다[28,39]. 식 (9)는 CTM 이온이 수용액에서 젤 층으로 전이할 때 전류변화와 농도와의 상관관계를 나타낸 식이다[39].

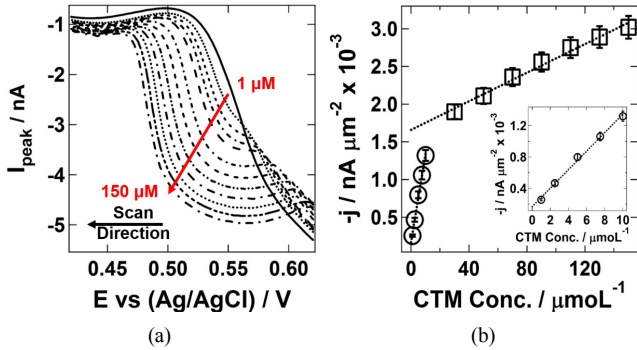


Figure 5. (a) DPSVs for various concentrations of CTM from 1 to 150 μM transferring across a single microhole supported water/PVC-NPOE gel interface. A 30 s preconcentration step holding the potential of 0.75 V and Cell 2 was used. (b) Plots of the DPSV peak current density as a function of the CTM concentration in the pH 3 buffer solution from 1 to 150 μM . The inset is for the plot of the current density with respect to the CTM concentration ranging from 1 to 10 μM .

$$I_{ss} = 4nz_iFD_1^w c_1^w r \quad (9)$$

여기서, I_{ss} 는 정류상태 전류 값이며, r 은 마이크로홀의 반지름이다.

CTM 농도 대비 정류전류의 관계로부터 얻은 기울기는 센서의 민감도를 나타내며, 실험값은 $0.0102 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ 가 얻어졌다. 식 (9)로부터 얻은 이론적인 기울기 $0.0208 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ 과 유사하지만 이론적 값이 약간 더 큰 것을 확인하였다. 그 이유는 마이크로 홀의 모양이 완벽한 원형이 아니기 때문일 수 있고 유기성 젤로 마이크로홀을 채울 때 홀을 완전히 채우지 못해 실제 계면의 크기가 이론 값보다 작아서 나타난 오차로 생각된다.

센서의 민감도는 시차펄스벡전압전류법(DPSV) 방법을 사용하여 향상할 수 있는데[40-41], 이를 위해 CTMH_2^+ 이온이 수용액 층에서 유기층으로 전이하는 전위 값 0.75 V (vs Ag/AgCl)에서 30 s 동안 고정하여 CTMH_2^+ 이온을 젤 층에 농축시키고, 전위를 0.75에서 0 V까지 스캔하여 농축된 이온을 젤 층에서 수용액 층으로 벗겨내는 방법이다. DPSV를 이용하여 CTM 농도 대비 변화한 피크전류 값을 도시화하였다. Figure 5(a)에서 보듯이 1-10 μM 농도 범위에서 전류변화에 대한 선형관계가 얻어졌고, 기울기 값은 $1.0 \times 10^{-4} \text{ nA } \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ 이었으며, CTM의 농도가 30에서 150 μM 로 증가하였을 때 기울기 값($9.0 \times 10^{-6} \text{ nA } \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$)이 다른 선형 관계가 얻어졌다. 저농도 대비 고농도 영역에서 얻어진 기울기 값이 약 100 이상 감소함을 통해 개발한 물/PVC-NPOE 계면 기반의 센서는 저농도에서 더욱 민감하게 활용될 것으로 사료된다.

4. 결 론

수용액의 pH 변화에 따라 이온화 정도가 달라지는 CTM 약물이 물/1,2-DCE 계면에서 전이하는 반응을 CV 및 DPV를 이용하여 조사한 결과 pH에 따른 CTM 약물의 전하상태 변화에 따라, 물/1,2-DCE 계면에서 전이하는 정도가 다름을 알 수 있었다. 특히 pH가 2.6에서 3.3 일 경우 CTMH_2^+ 화학종은 단순 전이 반응을 통해 전이하였으며, pH가 3.3-6.0에서는 유기층에 주로 존재하는 중성인 CTM (CTMH) 화학종이 전이 에너지를 감소시키면서 수용액에서의 수소 이온 전이 반응

을 돕는다는 것을 알 수 있었다. 얻어진 DPV 데이터를 바탕으로 각 pH에서 물 또는 유기층에 어떤 전하의 CTM 이온이 좀 더 우세하게 존재하는지 확인하고, CTM 약물의 이온 분배 도표를 처음으로 정립하였다. 이와 함께 $\Delta_{\text{CTMH}_2^+}^{\text{w},\text{w} \rightarrow \text{o}}$, $\Delta G_{\text{CTMH}_2^+}^{\text{w},\text{w} \rightarrow \text{o}}$, $D_{\text{CTMH}_2^+}^{\text{w}}$ 를 포함한 열역학적 정보와 $\log P_{\text{CTMH}_2^+}^{\text{o}}$, $\log P_{\text{CTMH}}^{\text{o}}$ 를 포함한 약물동력학 정보를 얻었다. 또한 Randles-Sevcik 수식에 의해 pH 3.0 완충 용액에서의 CTMH_2^+ 약물의 확산 계수를 결정하였다. 단일 마이크로 홀로 지지된 물/PVC-NPOE 젤 계면에서 수용액의 pH를 3.0으로 고정한 경우 CTMH_2^+ 의 농도 증가에 따라 상기 이온의 전이 반응에 의한 전류 값이 비례하여 증가하는 것에 기반한 CTM 약물 농도 분석 센서를 개발하였으며, 이를 이용하여 1-10 μM 농도 영역의 CTM 약물을 정량 분석할 수 있음을 보여주었다. 이는 앞으로 다양한 환경 및 생체 시료 내에 미량으로 존재하는 CTM 약물의 정량 분석에 유용하게 활용 가능할 수 있을 것으로 사료된다.

List of Symbols and Abbreviations

$I_{\text{peak}}^{\text{FWD}}$: Peak current on forward scan (정방향 스캔할 때의 피크 전류)
z_i	: Charge number (이온의 전하)
F	: Faraday constant (패러데이 상수)
ν	: Scan rate (스캔 속도)
A	: Interface area of liquid/liquid electrochemical set-up (액체/액체 계면의 면적)
R	: Universal gas constant (기체상수)
c_i^{w}	: Concentration of ion species (이온의 농도)
D_i^{w}	: Diffusion coefficient of ion species (이온의 확산계수)
E	: Applied potential difference (전위차)
$E_{1/2}$: Half-wave potential (반파전위)
$\Delta_{\text{w}}^{\text{w} \rightarrow \text{o}}$: Galvanic potential difference (갈바니 전위차)
ΔE	: Pulse amplitude (펄스 진폭)
ϕ	: Galvani potential (갈바니 전위)
K_a^{w}	: Equilibrium constant (평형상수)
$\Delta_{\text{w}}^{\text{w} \rightarrow \text{o}}$: Formal transfer potential (형식 전이 전위값)
$\Delta G_{\text{tr}}^{\text{w},\text{w} \rightarrow \text{o}}$: Formal Gibbs transfer energy from water phase to organic phase (물층에서 유기층으로 전이할 때의 형식깁스에너지)
$\log P^{\text{o}}$: Standard partition coefficient (표준분배계수)
I_{ss}	: Steady-state current (정류상태 전류값)
r	: Microhole radius (마이크로홀의 반지름)
CE_{o}	: Counter electrode in organic phase (유기층의 보조전극)
CE_{w}	: Counter electrode in water phase (수용액 층의 보조전극)
RE_{o}	: Reference electrode in organic phase (유기층의 기준전극)
RE_{w}	: Reference electrode in water phase (수용액 층의 기준전극)

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-2016R1A2B4012026).

References

1. K. Tsuchiya, M. Kida, M. Kondo, H. Ono, M. Takeuchi, and T. Nishi, SCE-963, a new broad-spectrum cephalosporin: In vitro and in vivo antibacterial activities, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 551-568 (1978).
2. T. Iwahi and K. Tsuchiya, Comparative activities of cefotiam and cefazolin against urinary tract infections with *Proteus mirabilis* in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 257-263 (1980).
3. M. Nakao, T. Nishi, and K. Tsuchiya, In Vitro and In Vivo Morphological Response of *Klebsiella pneumoniae* to Cefotiam and Cefazolin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 901-910 (1981).
4. B. Watt and F. V. Brown, In-Vitro activity of cefotiam against bacteria of clinical interest, *J. Antimicrob. Chemother.*, **10**, 391-395 (1982).
5. P. C. Fuchs, A. L. Barry, R. N. Jones, and C. Thornsberry, Cefotiam susceptibility testing criteria, *J. Clin. Microbiol.*, **22**, 1045-1047 (1985).
6. J. M. Brogard, F. Jehl, B. Willemin, A. M. Lamalle, J. F. Blickle, and H. Monteil, Clinical Pharmacokinetics of cefotiam, *Clin. Pharmacokinet.*, **17**, 163-174 (1989).
7. F. D.-M. P. Pehourcq, A. Radouane, L. Labat, and B. Bannwarth, Influence of lipophilicity on the protein binding affinity of cephalosporins, *Pharm. Res.*, **12**, 1535-1538 (1995).
8. S. Tawara, S. Matsumoto, Y. Matsumoto, T. Kamimura, and S. Goto, Structure-binding relationship and binding sites of cephalosporins in human serum albumin, *J. Antibiot.*, **45**, 1346-1357 (1992).
9. A. Nasal, D. Siluk, and R. Kaliszczan, Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology, *Curr. Med. Chem.*, **10**, 381-426 (2003).
10. D. Dellis, C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou, Physicochemical profile of nimesulide exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 57-62 (2007).
11. C. B. Fox, R. A. Horton, and J. M. Harris, Detection of drug-membrane interactions in individual phospholipid vesicles by confocal Raman microscopy, *Anal. Chem.*, **78**, 4918-4924 (2006).
12. 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).
13. F. Reymond, V. Chopineaux-Courtois, G. Steyaert, G. Bouchard, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. H. Girault, Ionic partition diagrams of ionisable drugs: pH-lipophilicity profiles, transfer mechanisms and charge effects on solvation, *J. Electroanal. Chem.*, **462**, 235-250 (1999).
14. G. Bouchard, A. Pagliara, G. P. van Balen, P.-A. Carrupt, B. Testa, V. Gobry, H. H. Girault, G. Caron, G. Ermondi, and R. Fruttero, Ionic partition diagram of the zwitterionic antihistamine cetirizine, *Helv. Chim. Acta*, **84**, 375-387 (2001).
15. V. Chopineaux-Courtois, F. Reymond, G. Bouchard, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. H. Girault, Effects of charge and intramolecular structure on the lipophilicity of nitrophenols, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1743-1747 (1999).
16. R. P. Nia, B. Su, M. A. Méndez, J.-M. Barbe, Z. Samec, and H. H. Girault, Ionic partition diagram of tetraphenylporphyrin at the water/1,2-dichloroethane interface, *J. Electroanal. Chem.*, **656**, 147-151 (2011).
17. G. Bouchard, A. Pagliara, P.-A. Carrupt, B. Testa, V. Gobry, and H. H. Girault, Theoretical and experimental exploration of the lipophilicity of zwitterionic drugs in the 1,2-dichloroethane/ water system, *Pharm. Res.*, **19**, 1150-1159 (2002).
18. M. Zhang, P. Sun, Y. Chen, F. Li, Z. Gao, and Y. Shao, Study of ionizable drugs transfer across the water/1,2-dichloroethane interface with phase volume ratio equal to unity using a three-electrode system, *Chin. Sci. Bull.*, **48**, 1234-1239 (2003).
19. M. Zhang, P. Sun, Y. Chen, F. Li, Z. Gao, and Y. Shao, Studies of effect of phase volume ratio on transfer of ionizable species across the water/1,2-dichloroethane interface by a three-electrode setup, *Anal. Chem.*, **75**, 4341-4345 (2003).
20. F. Reymond, G. Steyaert, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. H. Girault, Mechanism of transfer of a basic drug across the water/1,2-dichloroethane interface: The case of quinidine, *Helv. Chim. Acta*, **79**, 101-117 (1996).
21. F. Reymond, G. Steyaert, P.-A. Carrupt, D. Morin, J.-P. Tillement, H. H. Girault, and B. Testa, The pH-partition profile of the anti-ischemic drug trimetazidine may explain its reduction of intracellular acidosis, *Pharm. Res.*, **16**, 616-624 (1999).
22. F. Reymond, G. Steyaert, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. Girault, Ionic partition diagrams: A potential-pH representation, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11951-11957 (1996).
23. M. Velazquez-Manzanares, J. Amador-Hernandez, C. Cisneros-Cisneros, and K. A. Heredia-Lezama, Triazine herbicides transfer at the water/1,2-dichloroethane interface, *J. Electrochem. Soc.*, **155**, 218-222 (2008).
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. 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).
26. Z. Samec, V. Marecek, J. Koryta, and M. W. Khalil, Investigation of ion transfer across the interface between two immiscible electrolyte solutions by cyclic voltammetry, *J. Electroanal. Chem.*, **83**, 393-397 (1977).
27. S. Liu, Q. Li, and Y. Shao, Electrochemistry at micro- and nanoscopic liquid/liquid interfaces, *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 2236-2253 (2011).
28. S. N. Faisal, C. M. Pereira, S. Rho, and H. J. Lee, Amperometric proton selective sensors utilizing ion transfer reactions across a microhole liquid/gel interface, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 15184-15189 (2010).
29. Y. Yoshimura, N. Hamaguchi, and T. Yashiki, Synthesis and relationship between physicochemical properties and oral absorption of pivaloyloxymethyl esters of parenteral cephalosporins, *Int. J. Pharm.*, **23**, 117-129 (1985).
30. M. C. Rouan, F. Abadie, A. Leclerc, and F. Juge, Systematic ap-

- proach to the determination of cephalosporins in biological fluids by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **275**, 133-144 (1983).
31. P. J. Elving, J. M. Markowitz, and I. Rosenthal, Preparation of buffer system of constant ionic strength, *Anal. Chem.*, **28**, 1179-1180 (1956).
 32. 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).
 33. D. Homolka, K. Holub, and V. Marecek, Facilitated ion transfer across the water/nitrobenzene interface theory for single-scan voltammetry applied to a reversible system, *J. Electroanal. Chem.*, **138**, 29-36 (1982).
 34. P. Peljo and H. H. Girault, Liquid/liquid interfaces, electrochemistry at. In: R. A. Meyers (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1-11, John Wiley & Sons (2012).
 35. J. A. Ortuno, 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).
 36. T. J. Stockmann, A.-M. Montgomery, and Z. Ding, Formal transfer potentials of strontium and uranyl ions at water/ 1,2-dichloroethane interfaces, *Can. J. Chem.*, **90**, 836-842 (2012).
 37. 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).
 38. Y. Shao, M. D. Osborne, and H. H. Girault, Assisted ion transfer at micro-ITIES supported at the tip of micropipettes, *J. Electroanal. Chem.*, **318**, 101-109 (1991).
 39. B. Liu and M. V. Mirkin, Electrochemistry at microscopic liquid-liquid interfaces, *Electroanalysis*, **12**, 1433-1446 (2000).
 40. J. Strutwolf, M. D. Scanlon, and D. W. M. Arrigan, The performance of differential pulse stripping voltammetry at micro-liquid-liquid interface arrays, *J. Electroanal. Chem.*, **641**, 7-13 (2010).
 41. V. Marecek and Z. Samec, Electrolysis at the interface between two immiscible electrolyte solutions: Determination of acetylcholine by differential pulse stripping voltammetry, *Anal. Lett.*, **14**, 1241-1253 (1981).