

이온 선택성 전극을 이용한 의약품 정량: Calix[4]arene과 Dibenzo-18-crown-6-ether에 의한 verapamil-선택성 polymeric membrane electrode

이은엽* · 김성진* · 김영학 · 김재현** · 허문희 · 안문규
경성대학교 약학대학 약학과, *(주) 현대약품연구소, **국립보건안전연구원

(Received December 17, 1994)

Ion-Selective Electrodes in Drugs Analysis: Verapamil-Selective Polymeric Membrane Electrodes Based on Calix[4]arene and Dibenzo-18-crown-6-ether Ionophores

Eun Yup Lee*, Sung Jin Kim*, Young Hak Kim, Jae Hyun Kim**,
Moon Hye Hur, and Moon Kyu Ahn

Department of Pharmacy, KyungSung University, #110-1, Daeyundong, Namgu, Pusan 608-736, Korea

*Hyun-Dai Pharmaceutical Co., Ltd. Research center, Puchun-City Kyonggi-Do 422-231 Korea

**National Institute of Safety Research, Seoul 122-020

Abstract—PVC membrane electrodes based on the lipophilic neutral carrier, dibenzo-18-crown-6, cyclic oligomers of *tert*-butylphenol-formaldehyde condensates, calix[4]arenes as the active sensors for verapamil have been prepared and tested in a variety of plasticizers. At pH 5.0, the electrode exhibits a Nernstian response in the range of $10^{-2} \sim 5 \times 10^{-5}$ M verapamil with a slope of 49.1 ± 0.5 mV per concentration decade. The electrode constructed in this work can be used continuously for at least 1 month before any damage to the membrane occurs. And the analyses of the local anesthetic amine, which are good to select a specific compound in a mixed solution, were also accomplished by using of another neutral carrier, a DB18C6, for comparing with calix[4]arene.

Keywords □ Ion-Selective Electrodes(ISEs), Neutral ionophores, Calix[4]arene, Dibenzo-18-crown-6, Verapamil

각종 무기 금속이온에 대해 선택성을 갖는 전극과 유기화합물에 대한 선택성을 가진 전극이 최근 많이 연구 개발되고 있다. Ion-Selective Electrodes(ISEs)는 조작이 간편, 신속하면서도 비용이 저렴하고 쉽게 정량이 가능한 장점을 가지고 있어 중요한 연구분야로 주목되고 있으며 그 선택성이나 예민성은 ISEs를 구성하는 막에 의한 것이므로 그 막의 구성성분과 그 비율, 저항 등의 물리적 성질과 이들의 선택성, 예민성과의 상호 관계를 규명하려는 연구¹⁾도 많이 행하여 왔다. 무기 금속이온에 대해 우수한 선택성을

가진 대부분의 전극들은 acyclic ligands나 crown ethers 혹은 이와 유사한 macrocyclic hosts 등 neutral ionophores를 이용^{2, 13)}하였고, 유기 화합물에 대해서는 대부분 친유성 염을 형성하는 ion-exchanger를 electroactive compounds로서 사용한 정도이다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 최근에 들어 neutral ionophores가 유기 화합물에 대한 정량에도 응용^{2, 3, 14, 17, 18)}되어 3,4급 amine의 분석에 crown-ether^{19, 20)}를 주로 사용한 것이 보고되었으나, calixarene은 1급 amine^{2, 3)}에 대하여만 적용하였으므로 이에 본인 등은 항부정맥 치료제로 사용되고 있는 3급 amine인 verapamil · HCl을 calix[4]arene 유도체와 crown ether 유도체를 사용하여 정

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

량하고, 3급 amine 등 다른 유기 의약품에 대한 적용 가능성을 검토한 바 몇가지 지점을 얻어 이에 보고 코저 한다.

실험방법

시약

2-nitrophenyl octyl ether(NPOE), ethyl p-amino-benzoate, lidocaine은 Sigma 사제 tris(2-ethylhexyl)phosphate(TEHP), dioctyl phenyl phosphonate (DOPP), bis(2-ethylhexyl)adipate(DOA), procaine·HCl, procainamide·HCl, tetrahydrofuran(THF), poly(vinyl chloride)(PVC, high molecular weight)는 Aldrich 사제 bis(2-ethylhexyl)phthalate(DOP), bis(2-ethylhexyl)sebacate(DOS)는 Fluka 사제를 사용하였고 ionophore인 dibenzo-18-crown-6-ether (DB 18C)는 Aldrich사의 시판품을 정제하지 않고 그대로 사용하였으며, calix[4]arene은 Harris, S. J.교수 (Dublin city Univ., Ireland)로 부터 증정받아 사용하였다. deionized water는 Millipore Milli-Q water system을 사용하였고 그 외의 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

기기

Electrode body ISE (Swiss Phillips IS-561), UV-visible spectrophotometer로는 Shimadzu-UV 1201, pH electrode는 Orion Co.의 model 91-02 glass electrode를, 기준전극으로는 single-junction Ag-AgCl electrode(Orion Co., Model 90-01-00)를 사용하였다. E.m.f. 측정을 위하여 16 channel A/D convertor를 사용하였다. 이는 전극에서 발생한 전위의 신호를 digital data로 전환하여 AT-286 computer로 이동시키며 이를 Borland사의 Quatro-Pro ver.3.0으로 처리하였다.

자외부 흡수도에 의한 결합능²⁰⁾ 비교- 10^{-2} M calix[4]arene 10 ml와 10^{-2} M diltiazem과 verapamil 10 ml를 30분 동안 세계 혼합하여 각각 자외부에서의 흡수도를 비교해 본 결과 diltiazem($\lambda_{max}=295.0$ nm) Abs=1.694, verapamil($\lambda_{max}=295.5$ nm) Abs=1.888로 나타나 두 화합물 중에서 calix[4]arene이 verapamil의 ionophore로 사용가능성이 있음을 알 수 있었다.

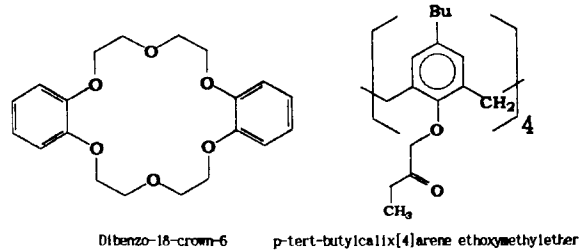
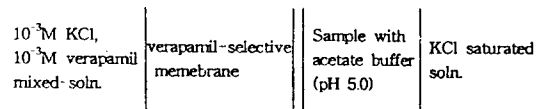


Fig. 1—General structure of DB18C6 and calix[4]arene.

막 제조 및 조립-5 w/w% calix[4]arene이나 DB 18C6(15 mg), 65 w/v% 가소제(180 mg) 그리고 30 w/w % PVC(105 mg)를 THF 2 ml에 녹인 후 glass ring(glass plate위에 부착, 고정시켰음)에 부어서 하룻동안 상온에서 증발, 건조시킨다. 생성된 막을 지름 $\phi=7$ mm인 punch를 사용하여 잘라낸 후 tweezers를 사용하여 screw-cap adaptor에 부착시켰다. 내부충진용액으로는 10^{-3} M KCl- 10^{-3} M verapamil 혼합용액을 사용하였고, 완성된 전극은 초산 완충용액으로 pH 5.0으로 조정된 10^{-3} M의 verapamil 용액에 하룻동안 담겨 condition시켰다. 사용하지 않을 시에는 pH 5.0 초산 완충용액에 담겨 실온에 보관하였다.

Electrochemical cell의 구조-



전위차 측정-16 channel에서 매초마다 측정된 data를 AT computer로 처리하였고, 100초간 안정화시킨 후 10^{-6} M에서 10^{-3} M까지 점진적으로 verapamil을 가하여 측정하였다. 선택계수(selectivity coefficient)는 mixing solution method을 사용하여 산출하였다.

결과 및 고찰

Calix[4]arene을 이용한 verapamil의 감응도-calix[4]arene에 가소제와 pH를 변화시켜가면서 verapamil에 대한 감응도를 조사한 결과는 Table I과 같으며 가소제를 phenyl ether형 NPOE(전극 2)로 사용하였을 때 pH의 변화에 따라 그 감응 기울기에 많은 변화가 일어났으며 여기에 phosphate형 DOPP

Table 1—Properties of verapamil-selective PVC membrane electrode based on calix[4]arene, fabricated with a variety of plasticizers

Electrode No.	ionophore	plasticizer	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	Slope ΔS	D.T. ^{a)}
1	calix[4]arene	TEHP	44.9	44.45	48.1	46.15	48.1	4.5×10^{-6}
2	calix[4]arene	NPOE	16.1	29.3	47.4	41.55	47.4	4.5×10^{-6}
3	calix[4]arene	NPOE + DOPP	20.25	31.75	49.1	44.95	49.1	1.0×10^{-6}
4	calix[4]arene	TEHP + DOPP	46.35	41.75	48.4	43.95	48.4	4.5×10^{-6}
5	calix[4]arene	DOA	31.61	43.2	43.95	46.15	43.9	—
6	calix[4]arene	DOS	35.85	39.35	37.85	41.0	37.8	—
7	calix[4]arene	DOP	26.72	37.6	32.25	30.8	32.2	—

^{a)}D.T.=detection limit; ^{b)}=unable to measure the detection limit

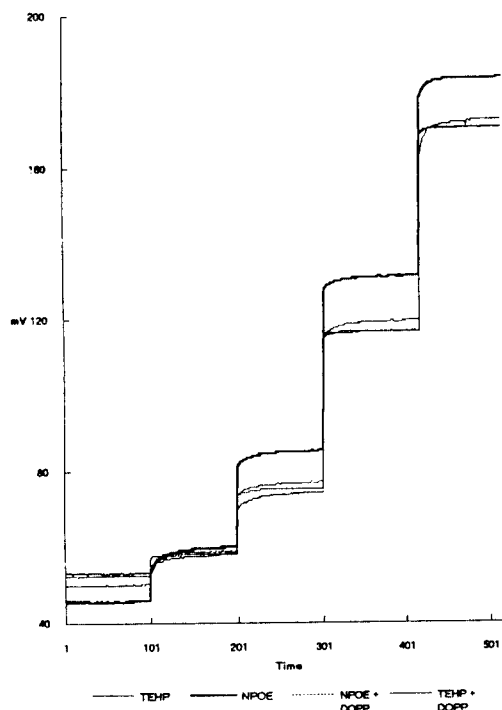


Fig. 2—Potentiometric response of verapamil-selective membrane electrodes doped with calix[4]arene in various solvent. (electrode 1~4)

(전극 3)를 첨가하면 그 변화를 감소시킬 수 있었고, 또한 약간의 상승 효과가 있었다. 이에 비해 TEHP (전극 1)는 NPOE보다는 안정된 전위값을 유지하였으나 diester형인 DOA, DOS, DOP의 경우에는 전위값이 불안정하게 나타났다(Fig. 2, 3). 가소제는 높은 친유성과 적당한 유전 상수를 가져야 하기 때문에 현재까지 주로 DOS나 DOP가 많이 사용되어 왔다.

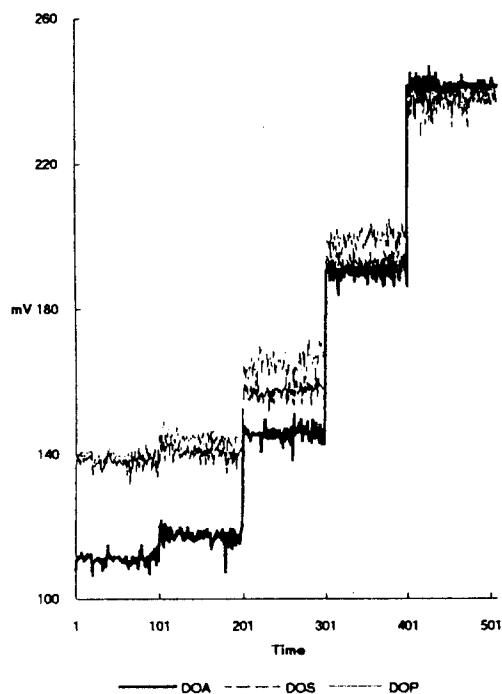


Fig. 3—Potentiometric response of verapamil-selective membrane electrodes doped with calix[4]arene in various solvent. (electrode 5~6).

본 실험에서의 verapamil 선택성 전극에서는 가소제의 조건으로 친유성보다 유전 상수가 더 크게 영향을 미치고 있음을 알 수 있었고 또한 사용된 calix[4]arene이 ether형이기 때문에 막 내에서 diether 형인 용매와 어떤 특수한 결합을 형성하여 반응 감도가 매우 낮게 나타난 것으로 생각된다(전극 5~7). 혼합 용액법으로 선택성을 조사 한 결과 전극 1과 2는 lidocaine과 benzocaine에 대한 방해 정도가 심하게

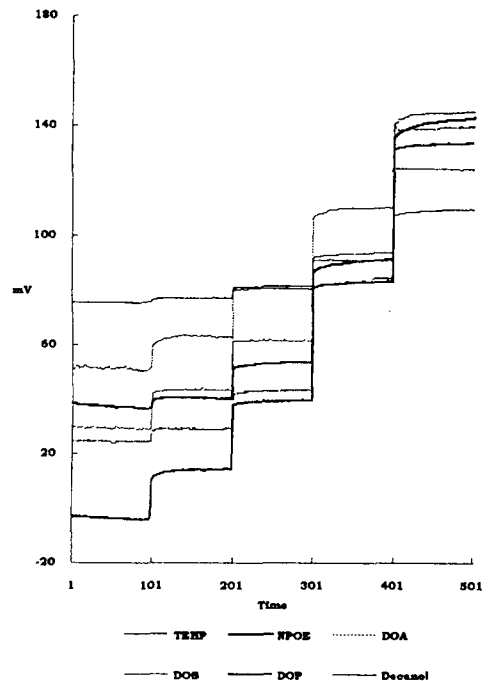
Table II—Properties of verapamil-selective PVC membrane electrode based on DB18C6, fabricated with a variety of plasticizers

Electrode No.	ionophore	plasticizer	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	slope ΔS	D.L.*
8	DB18C6	TEHP	45.4	50.8	48.6	47.6	50.8	5.0×10^{-6}
9	DB18C6	NPOE	—	44.45	—	—	44.45	4.5×10^{-6}
10	DB18C6	DOA	—	32.35	—	—	32.25	2.0×10^{-6}
11	DB18C6	DOS	—	31.3	—	—	31.3	5.0×10^{-6}
12	DB18C6	DOP	—	47.1	—	—	47.1	1.0×10^{-6}
13	DB18C6	decanol	—	13.9	—	—	13.9	2.5×10^{-5}

*D.L.=detection limit

나타났으나 전극 3과 4에서는 tetracaine에 대한 방해만이 나타났고 특히 전극 3은 tetracaine을 제외한 다른 amine 화합물에 비하여 verapamil의 선택성이 월등히 향상되었다. DOPP의 첨가는 여러 금속이온 중에서 Li^+ , H^+ , NH_4^+ 에 대한 선택성을 3배 이상 증가시키고, K^+ , Rb^+ , Cs^+ 에 대한 선택성은 2배 정도 감소시키는 효과가 최근에 보고된 바 있다.²¹⁾ 전극 3과 4에서도 친유성기를 가진 tetracaine이 증가하였고 *m*-위치에 methyl기를 가진 lidocaine은 DOPP를 사용시 선택성이 떨어졌다(Fig. 5). 그러므로 calix[4]arene을 ionophores로 한 전극에서는 NPOE와 DOPP를 첨가한 전극 3이 가장 적합하였으며 이를 이용하여 검량선을 작성한 결과 기울기는 49.1 mV/decade, 검출한계 $1.0 \times 10^{-6}M$, 감응적선범위 $10^{-8}M \sim 5.0 \times 10^{-5}M$ 로 나타났다.

Dibenzo-18-crown-6-ether를 이용한 verapamil의 감응도—DB18C6에 가소제와 pH를 변화시켜가면서 감응도를 조사한 결과는 Table II와 같았다(Fig. 4). 완충액의 pH가 4.0에서 가장 높은 기울기를 나타내었고, DOP를 제외하고는 diether형 용매인 DOS와 DOA는 30 mV/decade 정도의 낮은 기울기를 나타내었고, decanol을 사용하였을 때는 13.9의 가장 낮은 감응성을 보였다. 선택계수는 DB18C6를 사용한 전극 8이 가장 높은 50.8 mV/decade를 나타내었지만 calix[4]arene의 동일한 가소제를 사용한 전극 1,4에 비하여 tetracaine의 방해 정도가 $K_{v,i} > 1.5$ 이상 증가하였고, 전극 9와 12에서는 비교적 verapamil에 대하여 선택적인 전극으로 반응하였지만 전극 9의 기울기가 44.5로 Nernstian의 이론치에서 많이 벗어나 전극으로는 적합하지 못하였고, DB18C6를 ionophore로 한 전극에서는 DOP를 용매로 하는 것이 가

**Fig. 4**—Potentiometric response of verapamil-selective membrane electrodes doped with DB18C6 in various solvents(electrode 8~13).**Table III**—The effect of diverse ion quantity

Volume (ml)	E (mV)	ϕ
1	122.2	34919.71
2	121.8	34530.18
3	121.2	33840.67
4	120.5	33016.12
5	117.7	29333.77

장 적합하였으며(Fig. 5) 이를 이용하여 검량선을 작성한 결과 기울기는 47.1 mV/decade, 검출한계는

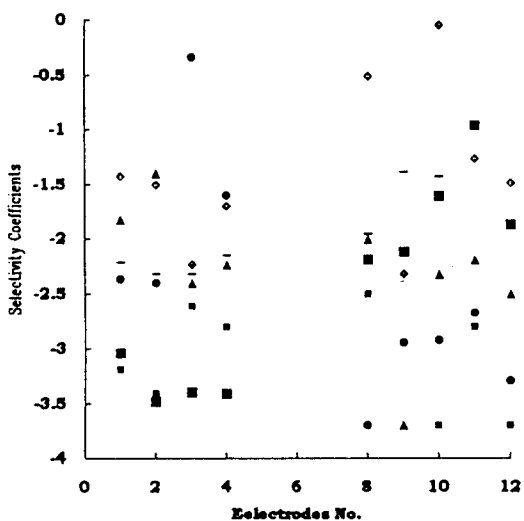


Fig. 5—Selectivity coefficients for verapamil in electrodes of calix[4]arene with different membrane solvents.

◇; benzocaine ■; procainamide ▲; lidocaine -; diltiazem ●; tetracaine ▪; procaine

$1.0 \times 10^{-6} M$, 감응직선범위 $10^{-2} M \sim 2.5 \times 10^{-5} M$ 로 나타났다.

선택계수²²⁾—혼합용액법에 따른 verapamil 선택성 전극의 K_{verj}^{pot} 구하는 방법은 다음과 같다. 120 ml의 완충액(C_v)에 $10^{-4} M$ verapamil을 넣어 전위값을 측정하고 0.5M의 각각의 방해이온(C_a)들을 1, 2, 3, 4, 5 ml씩 첨가시키고 그 전위값을 측정한다.

$Z_v = Z_a$: Z_v 와 Z_a 의 전하가는 동일하기 때문에

$[Verapamil] = (C_v \cdot V_o) / (V_o + V)$ (verapamil의 농도)

$[amine] = (C_a \cdot V) / (V_o + V)$ (방해물질의 농도)

C_v : verapamil의 초기농도 = $10^{-4} M$

V_o : 초기 verapamil의 부피 = 120.0 ml

C_a : 첨가된 방해물질의 농도

Eisenman-Nicolsky식에 의하면

$$(V_o + V)10^{Zv/S} = 10^{Zv/S} [C_v \cdot V_o + K_{verj}^{pot} (C_a \cdot V)^{Zv/Za}]$$

$$(V_o + V)^{(Za \cdot Zv/Za)}$$

$$\phi = (V_o + V)10^{E/S} \dots \dots \dots (1)$$

E: 전극의 전위값

S: 검량선의 기울기

$$K_{verj}^{pot} = - (C_v \cdot V_o) / (C_a \cdot V_x) \dots \dots \dots (2)$$

$10^{-4} M$ verapamil의 일정 농도하에서 0.5M의 방해 이온을 점진적으로 첨가하여 그 전위값을 측정한다. 이때 방해 이온의 첨가량에 대한 감응 기울기는

$$[Y = 28217.63 \times 55.95V, R = 0.9716 E(mV) \text{ vs } V(m)] \text{ 이다.}$$

이 기울기의 직선을 이용하여 $\phi = 0$ 가 되는 외삽한 V 를 V_x 값으로 하고 식 (2)에 적용하므로써 방해 이온에 대한 verapamil 선택 계수를 구할 수 있다.

결 론

1. verapamil 선택성전극의 ionophore로서 calix [4]arene을 사용시 가소제로는 유전상수 값이 높은 NPOE의 사용이 적합하며 여기에 1~5 W/W%의 DOPP의 첨가는 pH변화에 따른 감응 기울기 변화를 안정화 시키며 tetracaine을 제외한 다른 amine류에 대해 $K_{verj} > 1.5$ 이상으로 증가시켜 그 선택성을 증가시켰다.

2. TEHP를 첨가시 전극의 pH변화에 따른 감응 기울기는 큰 변화를 나타내지 않았고, DOPP의 첨가에 의한 감응 기울기의 변화나 선택계수의 큰 향상은 기대할 수 없었다.

3. DB18C6를 ionophore로 한 경우 감응 기울기는 TEHP의 경우 $50.8 \pm 1.0 mV/decade$ 로 나타났고 amine류의 선택성에 대해서는 calix[4]arene을 사용하였을 때 보다 많은 영향을 받아 verapamil 선택성 전극의 ionophore로는 calix[4]arene이 적합한 것으로 나타났다.

4. 최적 조건의 선택성 전극은 calix[4]arene을 사용하는 경우로서 가소제를 NPOE와 소량의 TEHP를 사용하였을 때이며 그 감응 기울기는 $49.1 mV/decade$, detection limit는 $1.0 \times 10^{-6} M$, linear range는 $10^{-2} M \sim 5.0 \times 10^{-5} M$ 로 나타났다.

5. 앞으로 calixarene의 6, 8환 구조와 4환 구조를 비교하여 3, 4급 amine에 보다 더 적합한 ionophore의 선택을 진행하고자 한다.

문 헌

1) Eppelsheim, C., Aubeck, R. and Hampp, N.; Dete-

- mination of ethaverin and papaverine using ion-selective electrodes. *Analyst* **116**, 1001 (1991).
- 2) Odashima, K., Yagi, K., Tohda, K., Umezawa, Y.; Potentiometric discrimination of organic amines by a liquid membrane electrode based on a lipophilic hexaester of calix[6]arene. *Anal. Chem.* **65**, 1074 (1993).
 - 3) Chan, W. H., Shiu, K. K. and Gu, W. H.; Ion-selective electrodes in organic analysis; primary amine selective polymeric membrane electrodes based on a calix[6]arene ionophore. *Analyst* **118**, 863 (1993).
 - 4) Meyerhoff, M. E., Cha, G. S.; Potentiometric ion- and bio-selective electrodes based on asymmetric cellulose acetate membrane. *Talanta* **36**, 271 (1989).
 - 5) Lee, K. S., Shin, J. H., Cha, G. S., Shin, D. S., Kim, H. D.; Asymmetric carbonate ion-selective cellulose acetate membrane electrodes with reduced salicylate interference. *Anal. Chem.* **65**, 3151 (1993).
 - 6) Jung, J. H., Kim, D. Y., and Lee, S. S.; Host-guest interaction of cyclic and acyclic polyethers with alkylammonium ions. *J. Korean Chem. Soc.* **38**, 509 (1994).
 - 7) Cadogan, A. M., Diamond, D., Smyth M. R., Deasy, M., McKervey, M. A., Harris, S. J.; Sodium-selective polymeric membrane electrodes based on calix[4]arene ionophores. *Analyst* **114**, 1551 (1989).
 - 8) Kimura, K., Miura, T., Matsuo, M., and Shono T.; Polymeric membrane sodium-selective electrodes based on lipophilic calix[4]arene derivatives. *Anal. Chem.* **62**, 1510 (1990).
 - 9) Careri, M., Casnati, A., Guarinoni, A., Mangia, A., Mori, G., Pochini, A. and Ungaro, R.; Study of the behavior of calix[4]arene-based sodium-selective electrodes by means of ANOVA. *Anal. Chem.* **65**, 3156 (1993).
 - 10) Kim, S. M., Jung, S. U., Kim, J., Lee, S. S., and Kim, J. S.; Tallium(I) ion-selective electrodes based on crown ethers. *J. Korean Chem. Soc.* **37**, 773 (1993).
 - 11) Lee, D. K., Lee, I. C., Kim, J. Y., Chang, S. H., Han, S. H., and Cha, G. S.; Bis-crown ether based ion-selective membrane electrodes as a monovalent cation detector for ion chromatography. *J. Korean Chem. Soc.* **38**, 529 (1994).
 - 12) Morf, W. E., Seiler, K., Rusterholz, B., and Simon, W.; Design of a calcium-selective optode membrane based on neutral ionophores. *Anal. Chem.* **62**, 738 (1990).
 - 13) Cunningham, K., Svehla, G., Harris, S. J., and McKervey, M. A.; Sodium-selective membrane electrode based on *p*-tert-butylcalix[4]-arene methoxyethyl ester. *Analyst* **118**, 341 (1993).
 - 14) Bunaciu, A. A., Ionescu, M. S., Palivan, C. and Cosofret V. V.; Amitriptyline-selective plastic membrane sensors and their pharmaceutical application. *Analyst* **116**, 239 (1991).
 - 15) Aubeck, R., Brauchle, C. and Hampf, N.; Indomethacin ion-selective electrode based on a bis(triphenylphosphoranylidene) ammonium-indomethacin complex. *Analyst* **116**, 811 (1991).
 - 16) Rizk, M. S., Issa, Y. M., Shoukry, A. F., and Abdel-Aal, M. M.; New ampicillin selective plastic membrane and coated metal electrodes based on ampicillinium phosphotungstate ion pair. *Anal. Letts.* **27**, 1055 (1994).
 - 17) Umezawa, Y., Kataoka, M., Takami, W., Kimura, E., Koike, T. and Nada, H.; Potentiometric adenosine triphosphate polyanion sensor using a lipophilic macrocyclic polyamine liquid membrane. *Anal. Chem.* **60**, 2392 (1988).
 - 18) Chang, S. K., Son, H. J., Hwang, H. S., and Kang, Y. S.; Selective transport of amino acids derivative through calix[6]arene-based liquid membrane. *Bull. Korean Chem. Soc.* **11**, 364 (1990).
 - 19) Shirahama, K., Kamaya, H., and Ueda, I.; Ion selective crown-ether electrodes for local anesthetic cations. *Anal. Lett.* **16**, 1485 (1983).
 - 20) Hassan, S. S. M., and Elnemma, E. M.; Amphetamine selective electrodes based on dibenzo-18-crown-6 and dibenzo-24-crown-8 liquid membrane. *Anal. Chem.* **61**, 2189 (1989).
 - 21) O'Connor, K. M., Cherry, M., Svehla, G., Harris, S. J. and McKervey M. A.; Symmetrical, unsymmetrical and bridged calix[4]arene derivatives as neu-

- tral carrier ionophores in poly(vinyl chlorides) membrane sodium selective electrodes. *Talanta* **7**, 1207 (1994).
- 22) Diaz, C., Vidal, J. C., Galbam, J., Urarte, M. L., and Lanaja, J.: a double-membrane ion-selective electrodes for the potentiometric determination of potassium. *Microchemical J.* **39**, 289 (1989).