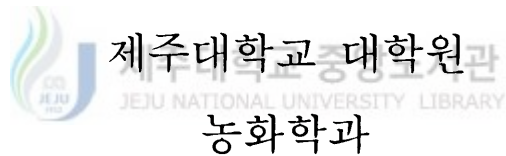


석사학위논문

Phthalein purple을 이용한 토양치환성 칼슘의 분광학적 측정



고 광 섭

112-395

2000년 12월

Phthalein purple을 이용한 토양치환성 칼슘의 분광학적 측정

지도교수 현 해 남

고 광 섭

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



고광섭의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 인

위 원 _____ 인

위 원 _____ 인

제주대학교 대학원

2000년 12월

Spectrophotometric Determination for Soil Exchangeable Calcium Using Phthalein Purple

Kwang-Sup Ko

(Supervised by Professor Hae-Nam Hyun)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

December 2000

목 차

Summary

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 토양 및 시약의 조제	4
1) 토양	4
2) 발색시약	4
3) 표준용액	5
4) 침출액	5
2. 분석방법	5
1) 최적조건의 결정	5
2) 시험과정	6
3) 치환성 칼슘의 측정	6
4) 토양치환성 칼슘 측정	6
5) 분광광도법의 정확도 평가	6
3. 측정기기	7
1) 분광광도계	7
2) 원자흡광광도계	7

Ⅲ. 결과 및 고찰	8
1. 측정조건의 최적화	8
1) AMP 완충용액	10
(1) pH의 영향	10
(2) AMP 농도의 영향	12
2) Phthalein purple 용액	14
(1) pH의 영향	14
(2) Phthalein purple 농도의 영향	16
3) 토양용액의 양	18
4) 방해물질인 Mg의 영향	20
(1) Mg 방해영향의 크기	21
(2) 8-hydroquinol에 의한 방해제거	22
5) Phthalein purple-Ca 착화합물의 특성	24
(1) 흡광스펙트럼 특성	25
(2) 발색안정도	26
2. 원자흡광광도법과의 비교평가	28
1) 직선성	28
2) 정밀성	31
3) 정확성	34
Ⅳ. 요약	36
Ⅴ. 참고문헌	37

Summary

Spectrophotometric determination for soil exchangeable calcium using phthalein purple was proposed, based on fast reaction of complexation between phthalein purple and calcium. After optimum conditions were set using calcium standard solution, they were applied to measure exchangeable calcium in soil solution extracted by 1N ammonium acetate solution.

The optimum conditions were fit to be pH 11 and 100 g L^{-1} of AMP buffer solution, pH 1.37 and 0.05 g L^{-1} of phthalein purple solution, 0.2 mL of sample volume, 2.0 g L^{-1} of 8-quinolinol concentration, 574 nm of wavelength and measuring time between 10 and 40 minute after adding the final reagent of phthalein purple solution.

The calibration curve showed highly significant linearity between range of 0 and 200 mg L^{-1} . Being compared with the values of exchangeable calcium measured by atomic absorption spectrophotometer, those obtained by this method was accurate to be significantly correlated ($r = 0.9929^{***}$), standard deviation(SD) of $< \pm 0.2 \text{ cmol kg}^{-1}$ and coefficient of variation(CV) of $< 5\%$, meaning that the spectrophotometric method using phthalein purple could be applied to replace atomic absorption spectrophotometer.

I. 서론

농민들이 토양 비료에 대한 관심이 증가되면서 토양분석에 의한 주문배합비료 사용이 증가되고 있다. 이러한 토양분석의 양적 증가는 신속한 토양 분석을 요구하고 있으며, 현장에서 신속한 토양분석법의 개발이 요구되고 있다. 흙살리기 운동 사업종합보고서(제주도 농업기술원, 2000)에 따르면 토양검정에 의한 주문비료의 지원은 북제주군의 경우 ha당 1,667kg을 살포하여 2,500포대(50톤)를 지원하였으며 작목별 비료절감은 작목별로 104 ~ 850%까지 절감하였다고 보고되었다.

토양치환성 칼슘은 치환성 염기 중 가장 많고, 총 염기 중 60-70%를 점하고 있다. 칼슘은 토양반응(pH)을 변화시키고 각종 유해물질과 중금속을 중화, 억제시키며, 토양 입단 형성의 촉진 등에 의해 토양구조를 개선해 주며, 토양미생물의 활성을 증대시키는 등 작물의 양분으로서의 기능보다는 작물의 생육환경을 양호하게 하는 효과가 실제적으로 더 크다(임 등, 1999).

칼슘을 분석하는 원자흡광광도계은 장비구입 비용이 고가이며 기기조작이 전문성을 필요로 하며 현장에서 측정할 수 없는 단점을 가지고 있다. 반면에 분광광도계는 저가의 장비로 기기 조작이 쉽고 현장에 적용이 가능하다는 잇점이 있다.

이러한 토양 중 칼슘을 측정하는데는 표준분석법으로서 원자흡광광도계가 이용되고 있으나, Phthalein purple을 이용한 비색법이 여러 연구자들에 의해 연구되어지고 있다. 칼슘의 비색측정은 혈청(Olansky 등, 1977 ; Kessler와 Volfman, 1978, ; Lin 등, 1999. ; Chapoteau 등, 1993 ; Stern와 Lewis, 1957), 동물사료(Basson과 van Staden, 1978 ; Basson, 1982 ; Roach, 1966), 우유(Basson과 van Staden, 1979 ; Ortega 등, 1998 ; Joe 등,

1966), 규산염(Oguma 등, 1985), 우유와 음료수(Oliveira 등, 2000), 제지공장 유출폐수(Nyman과 Ivaska, 1993 ; 1995), 폐수(Hansen 등, 1978), 물, 오줌 및 의학용시료(van Staden과 Taljaard, 1996), 물, 식물체 우유, 비료, 석회암(Rocha 등, 1998) 등의 시료에 대하여 분석되어졌다.

Phthalein purple은 칼슘을 비색법으로 측정하는 여러 시약중 하나이다. 분자량은 636.6 g mol^{-1} 이고 구조식은 Fig. 1과 같으며 일반명은 *o*-cresol phthalein complexone(CPC)이며 IUPAC 명명법으로는 *o*-coresolphthaline-3',3''-bis methyleneiminodiacetic acid 로 명명된다.

Anderegg 등(1954)은 EDTA 적정에서 칼슘을 측정하기 위한 착체시약으로 phthalein purple을 처음 소개하였는데, 칼슘과의 착화합물은 Ca^{2+} (또는 Mg^{2+})과 $\text{Ca}(\text{CPC})^4$, $\text{CaH}(\text{CPC})^3$, $\text{Ca}_2(\text{CPC})^2$ 등 강한 착화합물을 형성하고, 약한 착화합물로는 $\text{H}_2(\text{CPC})^4$ 가 형성되며, CPC 착화합물의 색은 phthalein 분자의 lactone ring 형성이 그 원인이라고 보고하였다.

Corns와 Ludman(1987)은 칼슘과 phthalein purple의 4단계 반응 메카니즘으로 가정하여 1:1과 2:1 복합체를 모두 형성한다는 것을 발견하였다. 또한, 저농도 칼슘에서는 직선성이 나타나지 않는 원인이 1:1 복합체가 지배적이기 때문이며, 고농도에서는 검량선이 일정농도 이상에서 평형에 이르는 plateau가 형성된다고 보고하였다. van Staden과 Malan(1996)은 Ca과 phthalein purple 반응의 주발색단은 $\text{Ca}_2(\text{CPC})^2$ 이라고 보고하였다.

완충용액은 Kessler와 Wolfman(1964)가 diethylamine-sodium acetate 용액을 사용하였고 Moorehead와 Biggs(1974)는 diethylamine 완충용액이 독성이 강하고 휘발성이기 때문에 보다 안전한 AMP 용액으로 대체하여 사용하였다. Basson과 van Staden(1978)은 동물사료 중 칼슘을 분석하기 위한 안정제로서 독성 KCN 대신에 AMP로 대체하였다.

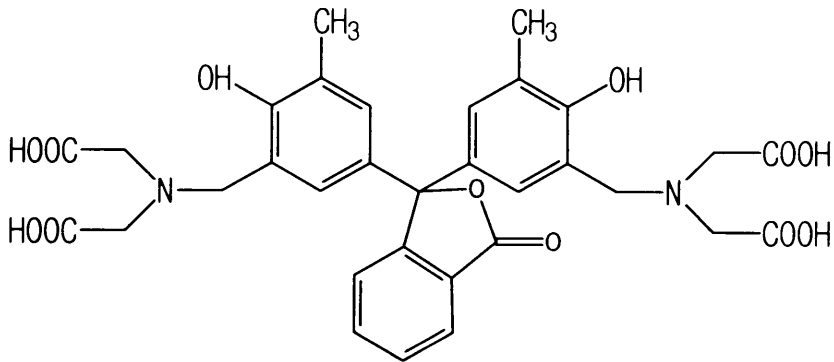


Fig. 1. Structure of phthalein purple (Lin 등, 1999).

Hansen 등(1978)은 phthalein purple을 이용한 칼슘의 비색측정에 사용되는 완충용액을 sodium tetraborate decahydrate (borax) 용액을 사용하였다. Cowley 등(1986)은 AMP 완충용액에 sodium acetate를 첨가하여 검량선의 직선성을 연장시켜 개선하였다. van Staden과 Malan(1996)은 검량선의 직선성이 완충용액인 AMP 대신에 boric acid 완충액을 사용함으로써 개선되었다고 보고하였다.

Gitelman(1967)은 Mg 방해물을 제거하기 위한 가리움제(masking agent)로서 8-quinolinol을 첨가하여 마그네슘의 방해는 더 이상 문제가 없었다고 보고하였다. Hofmann 등(1990)은 8-quinolinol의 Mg 방해물을 제거하는 반응은 부반응계수(side reaction coefficient)를 계산하여 제거할 수 있다고 하였다.

Ammonium acetate로 침출된 토양치환성 칼슘의 분석에서 phthalein purple을 이용한 분광광도계 측정은 아직 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 phthalein purple을 이용하여 분광광도계로 측정되어 얻어진 치환성칼슘의 함량과 표준분석법인 원자흡광광도계로 얻어진 칼슘함량과의 정밀성, 정확성을 비교·평가하여 phthalein purple 법을 정립하는데 목적이 있다.

II. 재료 및 방법

1. 토양 및 시약의 조제

1) 토양

본 연구에 사용된 토양은 56점의 밭토양, 논토양, 과수원토양, 시설재배지 토양으로 표토(0 ~ 10 cm)를 채취하여 풍건한 다음 2 mm체를 통과시켜 사용하였다.

2) 발색시약

본 연구에 사용된 시약조제와 실험과정은 van Staden과 Taljaard(1996)이 보고한 방법을 변형하여 수행하였다. Phthalein purple은 칼슘과 반응하여 분홍색 착화합물을 형성(Nyman과 Ivaska, 1995)하는 발색시약이며 AMP (2-amino-2-methylpropan-1-ol) 완충용액은 pH를 안정화하여 완충능력을 주기 위해 사용된다(van Staden과 Taljaard, 1996) 또한, 8-quinolinol은 Mg의 방해를 제거하기 위하여 사용된다(Gitelman, 1967).

본 연구의 시약제조는 다음과 같다. 발색시약은 phthalein purple 0.05 g을 5.0 M HCl 20 mL에 녹이고 1.0 g의 8-quinolinol을 첨가하여 녹인 다음 증류수를 첨가하여 1 L로 정확하게 희석하여 제조하였다. 완충용액은 AMP(2-amino-2-methylpropan-1-ol) 140 g을 900 mL 증류수에 녹이고 희석된 HCl을 사용하여 pH 10.5로 조절한 다음 1 L로 정확하게 희석하여 제조하였다.

3) 표준용액

1000 mg L⁻¹의 칼슘표준용액을 토양치환성 칼슘의 침출용액인 1N ammonium acetate 용액(pH 7.0)으로 희석하여 농도별로 20, 40, 80, 120, 180, 200 mg L⁻¹의 조제하였다. 또한, blank(0 mg L⁻¹)는 1N ammonium acetate 용액(pH 7.0)을 사용하였다.

4) 침출액

토양치환성 칼슘의 침출용액은 1N ammonium acetate 용액을 pH 7.0으로 조절하여 조제하였다.

2. 분석방법

분석과정은 phthalein purple을 이용하여 토양치환성 칼슘을 측정하기 위한 최적조건을 먼저 결정하였다. 이어서 공시토양 56점을 1N ammonium acetate 용액으로 침출하여 토양치환성 칼슘이 함유되어 있는 침출액을 얻었고 이 침출액을 먼저 최적조건이 결정된 Phthalein purple을 사용하여 분광광도계로 치환성 칼슘함량을 3반복 측정하였다. 또한, 비색측정법의 정확도를 평가하기 위해서 위의 침출액으로 원자흡광광도계로 3반복 측정하여 비교·평가하였다.

1) 최적조건의 결정

치환성칼슘을 분광광도계로 측정하기 전에 먼저 최적조건을 결정하는 과정을 선행하였다. 결정단계는 칼슘표준용액을 이용하여 단계적으로 ① AMP 완충용액의 pH 및 농도, ② Phthalein purple 발색시약의 pH 및 농도,

③ 시료용액의 양 ④ 마그네슘 방해 제거제인 8-quinolinol의 양, ⑤ 최적파장, ⑥ 발색시간을 결정하였다.

2) 시험과정

칼슘표준용액을 이용하여 최적조건을 결정하는 각 단계의 실험과정은 일정량의 시료용액($0-200 \text{ mg L}^{-1}$ 의 Ca를 포함하는 용액)을 시험관에 넣고 증류수 5mL, AMP 완충용액 5 mL을 순서대로 가하여 혼합한 다음 phthalein purple용액 5mL를 가하여 혼합한다. 10분동안 방치한 다음 분광광도계로 573nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 치환성 칼슘의 침출

치환성 칼슘의 침출은 pH 7.0으로 조절된 1N ammonium acetate 용액을 풍건토양 5g에 침출액 50mL를 첨가하여 30분간 진탕한 다음 Whatman 여과지 No. 2로 여과하여 침출액을 얻었다.

4) 토양치환성 칼슘의 측정

공시토양의 침출액은 phthalein purple 법과 원자흡광광도계로 각각 측정하였다. Phthalein purple 법은 결정된 최적조건 적용하여 분광광도계로 3반복 측정하였으며 원자흡광광도계로 3반복 측정하였다.

5) 분광광도법의 정확도 평가

원자흡광분광광도법과 phthalein purple을 이용한 분광광도계법으로 각각 3반복으로 측정된 치환성 칼슘함량은 직선성, 정밀성, 정확성을 비교평가하였다. 직선성은 $0 \sim 250 \text{ mg L}^{-1}$ 범위의 칼슘표준용액을 사용하여 평가하였으며, 정밀성은 표준편차와 변이계수, 정확성은 평균간의 상관계수로 평가하였다.

3. 측정기기

1) 분광광도계

Phthalein purple을 이용한 토양치환성 칼슘의 비색측정은 분광광도계 (SPECTRONIC[®] GENESYS[™] 5, USA)로 10mm 석영셀 사용하여 측정하였다.

2) 원자흡광광도계

원자흡광광도법에 의한 토양 치환성칼슘 측정은 치환성칼슘 여과액을 원자흡광광도계(Varian SpectrAA 220, Australia)로 측정하였다.

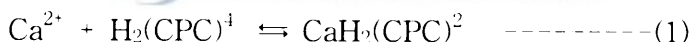


II. 결과 및 고찰

1. 측정조건의 최적화

칼슘의 비색측정은 일정범위의 pH에서 금속이온인 칼슘과 phthalein purple이 빠르게 착화합물을 형성하는 반응에 기초를 둔 방법이며(van Staden과 Taljaard, 1996), 분홍색 착화합물을 형성한다고 보고되었다(Nyman과 Ivaska, 1995). Phthalein purple은 Ca 또는 Mg과 $\text{Ca}(\text{CPC})^4$, $\text{CaH}(\text{CPC})^3$, $\text{Ca}_2(\text{CPC})^2$ 의 강한 복합체를 형성하는 반면, 약한 복합체로는 $\text{H}_2(\text{CPC})^4$ 가 형성된다.

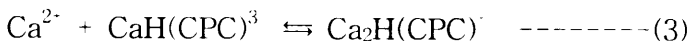
Corns와 Ludman(1987)은 칼슘과 phthalein purple의 반응 메카니즘은 다음과 같이 가정하였다.



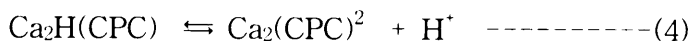
(1)의 복합체가 이온화되면



(2)의 복합체는 이차 칼슘이온과 다시 반응하여



(3)의 복합체가 다시 이온화하여



을 형성하는 4단계의 반응이며 1:1과 2:1 복합체를 모두 형성한다는 것을 발견하였다. 이러한 복합체들은 pH, 금속이온의 농도, 이온환경 등의 영향을 받는 것으로 보고되었다(Anderegg 등, 1954 ; van Staden과 van Rensburg, 1990). 따라서, Phthalein purple을 이용하여 토양중 칼슘함량을 측정하기 위한 최적조건은 사용되는 시약의 농도 및 pH, 시료의 양등을 결정하여 최적

의 반응환경이 먼저 결정되어야 한다. 따라서, 본 연구에서는 시약의 농도, pH등 실험조건을 달리하여 최적조건을 결정하였다.

완충용액의 선택은 여러 완충용액에 대하여 비교된 연구를 바탕으로 선택되었다. AMP 완충용액은 독성과 휘발성이 있는 diethylamine 완충용액에 비해 매우 안정적이다(Moorehead와 Biggs, 1974). 또한 암모니아 완충용액 보다는 blank와 칼슘을 포함하는 용액과의 흡광도비율(S/B ratio)이 더 높기 때문에 감도가 크다고 보고되었다(van Staden과 Taljaard, 1996). 따라서, 이러한 이유 때문에 본 연구에서는 AMP 완충용액을 선택하여 실험에 사용하였다.



1) AMP 완충용액

(1) pH의 영향

Nyman과 Ivaska(1995)는 완충용액의 pH가 칼슘과 phthalein purple 반응에 관여함과 동시에 마그네슘과의 반응을 억제하는 중요한 요인이라고 보고하였다. 또한, Phthalein purple 시약은 산염기 지시약으로 작용하여 pH 12에서 진하게 채색된 형태로 존재하기 때문에 칼슘에 대한 감도는 감소하는 것으로 보고되었다(Moorehead와 Biggs, 1974 ; van Staden과 van Rensburg, 1990). 그러므로 완충용액의 pH는 phthalein purple 발색에 영향을 주기 때문에 완충용액의 pH에 따른 칼슘용액의 발색정도를 살펴보았다.

Table 1은 pH 9.5에서 pH 12.5 범위의 서로 다른 AMP 용액을 조제하여, 칼슘을 함유하지 않은 0 mg L^{-1} 와 칼슘을 포함하는 $80, 200 \text{ mg L}^{-1}$ 표준용액의 흡광도를 각각 측정하여 S/B 비를 나타내었다. S/B 비는 분광광도계로 측정할 때에 0 mg L^{-1} 의 흡광도(B)와 표준용액의 흡광도(S)와의 비율이며 흡광도의 감도를 나타내는 지표로 사용된다. 즉, S/B 비가 가장 크다는 것은 최대 감도를 의미한다. 따라서, 본 연구의 AMP 완충용액의 최적 pH는 S/B 비가 가장 큰 값을 선택하여 최대 감도를 가지는 pH를 선택하였다. 따라서, Table 1의 결과에서 pH 11.0에서의 S/B 비는 $80, 200 \text{ mg L}^{-1}$ 에서 각각 10.5, 20.6으로 가장 큰 값을 나타내었기 때문에 최적 pH로 결정하였다.

이와 같은 최적 완충용액 pH에 대한 연구는 Moorehead와 Biggs(1974)가 혈청의 분석에서 diethylamine 대신에 AMP를 사용하여 AMP 완충용액의 최적 pH를 pH 10.0으로 결정하였고, van Staden과 Taljaard(1996)는 S/B 비율이 pH 10.0에서 최대값을 보였으나 pH 10.5에서 완충력이 가장 크기 때문에 pH 10.5를 최적 pH로 결정하였다. 또한, Nyman과 Ivaska(1993)

은 최적 pH를 이론적으로 계산하여 pH 10.5를 최적 pH로 결정하였다.

Table 3. Sample to blank (S/B) ratio of AMP solution with pH increase at three levels of 0, 80 and 200 mg Ca L⁻¹

pH	Absorbance			Sample to blank ratio (S/B ratio)	
	0 mg Ca/L (B)	80 mg Ca/L (S ₁)	200 mg Ca/L (S ₂)	S ₁ /B	S ₂ /B
9.5	0.049	0.301	0.686	6.1	14.0
10.0	0.047	0.402	0.898	8.6	19.1
10.5	0.067	0.557	1.125	8.3	16.8
11.0	0.062	0.651	1.276	10.5	20.6
11.5	0.078	0.648	1.309	8.3	16.8
12.0	0.077	0.664	1.28	8.6	16.6
12.5	0.078	0.694	1.34	8.9	17.2

(2) AMP 농도의 영향

동일 농도의 phthalein purple 발색시약과 pH 11.0의 조건하에서 50, 100, 140, 200 g L⁻¹의 농도로 각각 조제된 AMP 완충용액은 blank, 80, 200 mg Ca L⁻¹의 칼슘표준용액을 발색시키고 흡광도를 측정하였다. Fig. 2는 AMP 농도에 따른 표준용액의 흡광도 변화를 나타낸 그림으로 AMP 완충용액의 농도가 증가할수록 80, 200 mg L⁻¹ 표준용액의 흡광도는 증가하다가 모두 100 mg L⁻¹부터 평형이 형성되는 경향을 보이거나 blank 흡광도는 큰 변화를 보이지 않았다. 칼슘표준용액의 평형형성은 더 이상의 발색이 나타나지 않는 상태로서 최대 흡광도를 나타내어 가장 큰 감도를 나타낸다. 따라서, 최적농도는 최대감도가 형성되는 범위의 농도에서 시약조제의 경제성을 고려하여 평형상태가 형성되기 시작하는 농도로 결정하였다. 따라서, 본 연구에서는 100 g L⁻¹를 최적 AMP 완충용액농도로 결정하였다.

농도가 증가할수록 흡광도가 증가하다가 평형이 형성되는 경향은 Basson과 van Staden(1978 ; 1979)의 보고와 일치하였다. 최적 AMP 농도는 우유중 칼슘분석에서 140 g L⁻¹으로 적용하였다(Basson과 van Staden, 1979). 동물사료중 칼슘분석에서 80 g L⁻¹를 적용하였다(Basson과 van Staden, 1978). van Staden과 Taljaard(1996)는 35, 70, 140의 농도중 140 g L⁻¹에서 가장 높은 흡광도를 보여 최적 농도로 결정하였다.

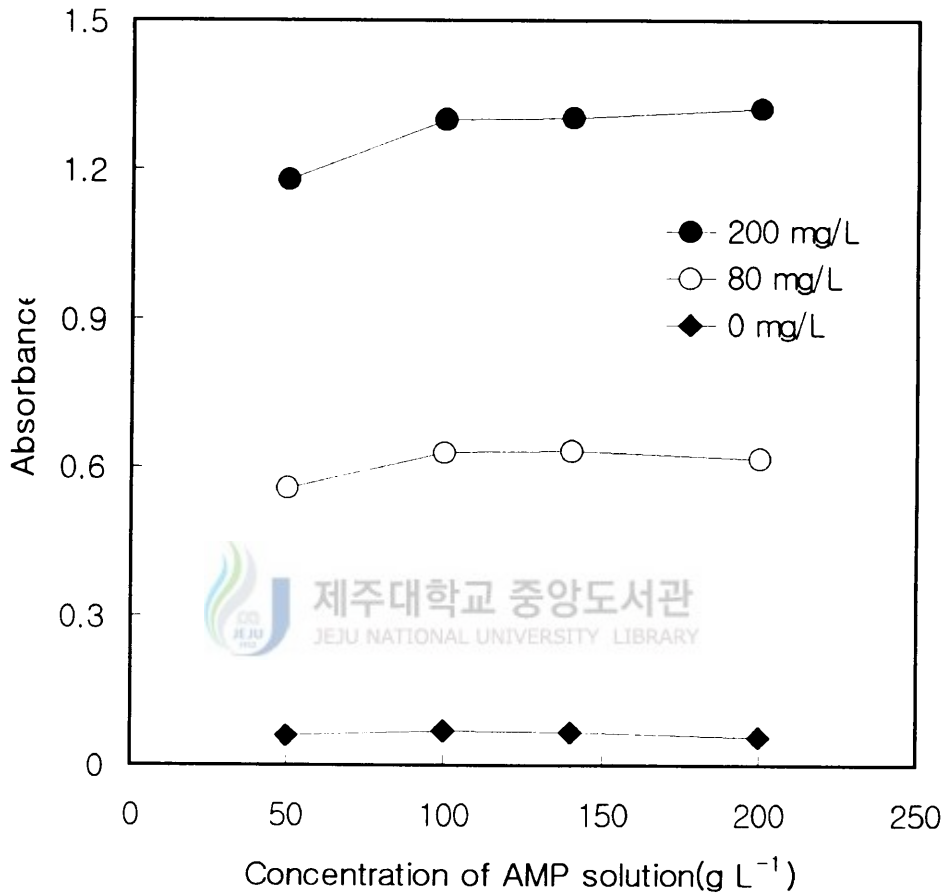


Fig. 2. Effect of AMP(2-amino-2-methylpropan-1-ol) concentration on calcium absorbance at three levels of 0, 80 and 200 mg Ca L⁻¹.

2) Phthalein purple 용액

(1) pH의 영향

Phthalein purple은 해리되었을 때 phthalein-Ca 착화합물의 과장과 같은 과장에서 최대흡광도를 나타내기 때문에 phthalein purple 용액의 과도한 해리를 막고 안정된 착화합물을 형성하기 위해서는 pH 조절과정은 필수적인 과정이다(Rocha 등, 1998). 따라서, Phthalein purple 용액의 pH 변화에 따른 발색변화를 관찰하기 위하여 phthalein purple 조제시 첨가되는 HCl의 첨가량을 달리하여 pH 1.01에서 pH 3.49의 범위의 phthalein purple 용액을 조제하였다. 이 용액은 0, 80, 200 mg L⁻¹의 칼슘표준용액과 반응시켜 흡광도를 측정하고 S/B 비를 구하여 Table 2에 나타내었다. Phthalein purple 용액의 pH가 감소할수록 0, 80, 200 mg L⁻¹의 흡광도는 감소하여 van Staden과 van Rensburg(1990)는 phthalein purple이 산성화될수록 흡광도가 약간 증가한다는 보고와는 반대되는 경향을 보였으나 S/B 비는 다른 경향을 나타내었다. S/B 비는 0 mg L⁻¹의 흡광도(B)와 표준용액의 흡광도(S)와의 비율이며 흡광도의 감도를 나타내는 지표로 사용되어 진다. 즉, S/B 비가 가장 크다는 것은 최대 감도를 나타낸다고 할 수 있다. 따라서, Table 2에서 최적 phthalein purple pH는 80, 200 mg L⁻¹에서 각각 11.8, 24.1로 S/B 비가 가장 큰 값을 나타내는 pH 1.37을 최적 pH로 결정하였다. van Staden과 Taljaard(1996)는 phthalein purple 최적 pH를 S/N 비가 가장 큰 pH 1.9로 결정하였다.

Table 4. Sample to blank (S/B) ratio of phthalein purple solution with pH increase at three levels of 0, 80 and 200 mg Ca L⁻¹

pH	Absorbance			Sample to blank ratio (S/B ratio)	
	0 mg Ca/L (B)	80 mg Ca/L (S ₁)	200 mg Ca/L (S ₂)	S ₁ /B	S ₂ /B
3.49	0.067	0.706	1.371	10.5	20.5
1.61	0.062	0.651	1.32	10.5	21.3
1.37	0.052	0.612	1.254	11.8	24.1
1.18	0.051	0.555	1.216	10.9	23.8
1.01	0.049	0.511	1.111	10.4	22.7

(2) Phthalein purple 농도의 영향

최적 AMP 완충용액(100 g L^{-1} , pH 11.0)조건에서 phthalein purple의 농도를 0.025 , 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 g L^{-1} 로 조제하여 각각 0 , 80 , 200 mg L^{-1} 의 칼슘표준용액과 발색시킨 다음 흡광도를 측정하여 농도에 따른 흡광도의 변화는 Fig. 3에 나타내었다. 0 , 80 , 200 mg L^{-1} 모두에서 phthalein purple의 농도가 증가할수록 초기에는 흡광도 변화가 뚜렷하게 증가하지만 일정 농도이상에서는 평형이 형성되는 경향을 보였다. 칼슘표준용액의 평형형성은 더 이상의 발색이 나타나지 않는 상태로서 최대 흡광도를 나타내어 가장 큰 감도를 나타낸다. 최적농도의 결정기준은 칼슘 최고 농도의 최대 감도를 고려하여 200 mg L^{-1} 의 흡광도 변화에서 평형이 시작되는 농도로 결정하는 것이 바람직하다. 그러나, Olansky(1977)는 phthalein purple의 양이 증가할수록 약간 직선적으로 blank의 흡광도가 증가한다고 보고하였으며, Ringbom(1963)은 복합체를 형성하지 않은 phthalein purple의 색으로 인해 0 mg L^{-1} 의 흡광도가 증가한다고 보고하였기 때문에 blank의 흡광정도도 고려하여 결정하였다. Fig. 3에서 200 mg L^{-1} 표준용액의 흡광도 변화는 0.10 g L^{-1} 에서부터 평형이 시작되므로 결정기준에 적합하지만, 이 농도에서의 0 mg L^{-1} 의 흡광도는 0.1 이상으로 비교적 높게 나타났다. 따라서, 0 mg L^{-1} 의 흡광도가 비교적 낮은 0.05 g L^{-1} 의 phthalein purple의 농도를 본 실험의 최적 농도로 결정하였다.

Oguma 등(1985)은 phthalein purple의 농도가 증가할수록 칼슘표준용액의 흡광도는 초기에는 증가하다가 0.1 g L^{-1} 이상에서 평형이 형성되었으나 phthalein purple의 절약을 위해 0.16 g L^{-1} 로 결정하여 경제성을 고려하였다고 보고하였다.

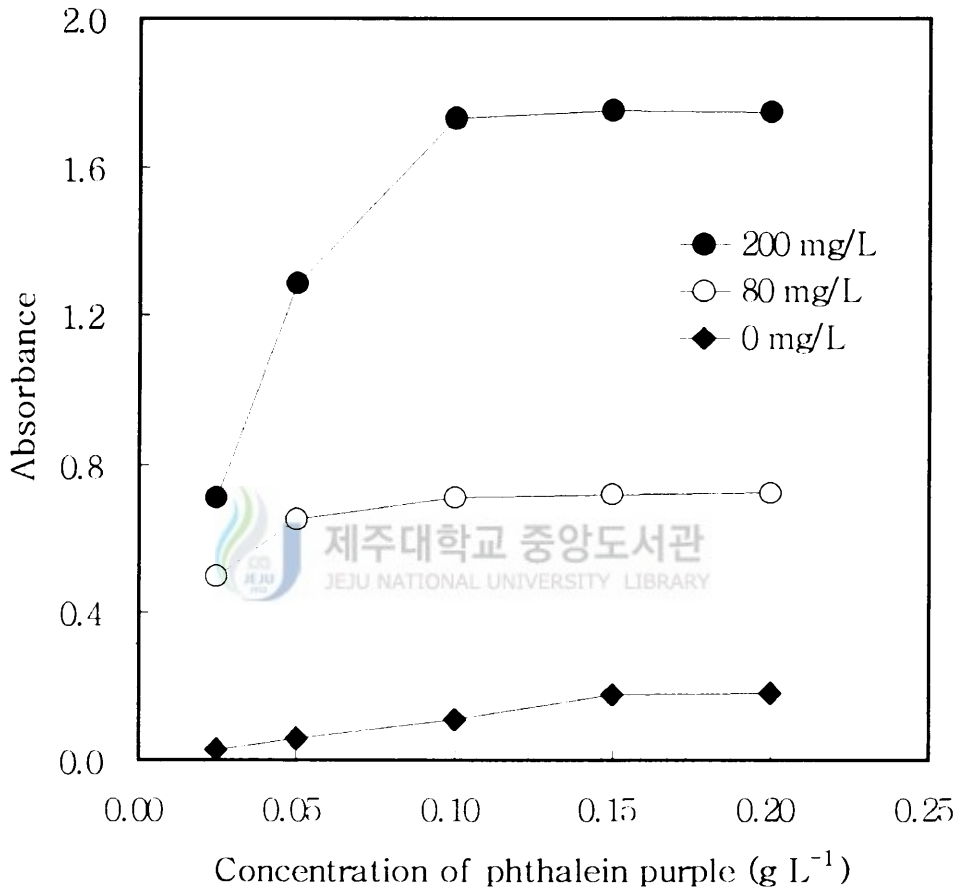


Fig. 3. Effect of phthalein purple concentration on calcium absorbance at three levels of 0, 80 and 200 mg Ca L⁻¹.

3) 토양용액의 양

0, 80, 200 mg L⁻¹의 칼슘표준용액을 각각 0.2에서 1.0 mL까지 첨가량을 달리하여 단계적으로 시험관에 넣고 최적조건의 phthalein purple과 AMP 완충용액을 가하여 발색시키고 흡광도를 측정하여 칼슘농도의 증가에 따른 흡광도 변화를 검량선으로 Table 3에 나타내었다. Beer-Lambert 법칙에 따르면 빛의 통과길이가 일정할 때 흡광도는 시료용액의 농도에 비례하여 증가한다. Table 3에서 200 mg L⁻¹까지의 검량선 추세는 첨가된 용액양에 따라 각각 다른 경향을 보였는데 0.2 mL일때는 직선적으로 증가하여 Beer-Lambert 법칙을 만족시키는 반면, 그 외에서는 첨가량이 증가할수록 검량선은 곡선이 되는 경향이 더 커진다. 이러한 결과는 Corns과 Ludman(1987)이 phthalein purple은 칼슘과 반응할 때 일정농도 이상의 고농도칼슘에서 더 이상 흡광도가 증가하지 않는 평형이 형성된다고 보고한 결과와 일치하였다. 또한, 앞에서 결정된 phthalein purple 농도에 의해 당량적으로 반응하는 칼슘의 농도는 약 40 μ g인 것으로 계산되며 그 이상의 칼슘함량에서는 발색이 제한되는 것으로 생각된다. 검량선이 직선이 되어 Beer의 법칙을 만족시키는 범위에서는 정확한 측정값을 얻을 수 있지만 직선이 되지 않는 범위에서는 Beer의 법칙에서 벗어나므로 정확한 측정값을 얻을 수 없다. 따라서, 200 mg L⁻¹까지 Beer의 법칙을 만족하는 직선의 검량선을 작성하기 위해서는 0.2 mL의 시료량을 첨가하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 연구의 최적 시료량은 0.2 mL로 결정하였다.

Table 3. Effect of sample volume on the linearity between calcium concentration and the absorbances

시료용액의 첨가량 (mL)	Absorbance		
	0 mg/L	80 mg/L	200 mg/L
0.2	0.052	0.63	1.285
0.4	0.054	1.08	1.465
0.6	0.055	1.307	1.5
0.8	0.046	1.327	1.5
1.0	0.051	1.357	1.506



4) 방해물질인 Mg의 영향

1N ammonium acetate 용액은 토양중의 치환성 양이온을 침출하는 시약으로 치환성 양이온인 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 나트륨등을 동시에 침출한다. 따라서, 1N ammonium acetate로 침출된 용액 중에는 다량의 마그네슘이 포함되어 있다. 95 ~ 99년 밭토양 정밀검정 사업에 따르면 밭토양의 마그네슘 함량은 제주도는 1.5, 전라남도는 1.6, 충청남도는 2.0, 경상남도는 1.39, 강원도는 0.8 ~ 1.8 cmol kg^{-1} 로 등으로 보고되어졌다. 본 연구에 사용되어진 공시토양의 마그네슘함량은 0.197 ~ 4.13 cmol kg^{-1} 범위이며 평균은 1.616 cmol kg^{-1} 으로 측정되었고 이는 원자흡광광도계의 측정값으로는 2.4 ~ 50.2 mg kg^{-1} 범위이며 평균은 19.2 mg kg^{-1} 이다.

Phthalein purple과 칼슘의 반응에서 가장 큰 방해물 주는 성분은 마그네슘이며 이러한 Mg 방해물을 제거하기 위해 Gitelman(1967)은 8-quinolinol 처음으로 사용하였으며 그 후 대부분의 연구에서 8-quinolinol을 사용하였다. 또한, Phthalein purple은 Mg과 $\text{Mg}(\text{CPC})^4$, $\text{MgH}(\text{CPC})^3$, $\text{Mg}_2(\text{CPC})^2$ 의 강한 복합체를 형성한다고 보고되었다(van Staden과 van Rensburg, 1990 ; Anderegg 등, 1954). 따라서, 본 실험에서는 먼저 phthalein purple이 칼슘, 마그네슘과의 반응정도를 비교하고 8-quinolinol의 첨가량에 따른 마그네슘 방해 제거정도를 실험하였다.

(1) Mg 방해영향의 크기

Fig. 4는 동일한 Ca과 Mg 표준용액을 8-quinolinol을 첨가하지 않은 phthalein purple 시약으로 반응시키고 발색된 용액에 대한 파장별 흡광도를 나타낸 그림이다. Phthalein purple과 착화합물을 형성한 칼슘과 마그네슘의 스펙트럼은 비슷한 모양으로 나타났으나 흡광도는 차이가 있었다. 칼슘은 574nm에서, 마그네슘은 565nm에서 최대 흡광도를 보였다. 40 mg L⁻¹의 동일한 농도의 Ca와 Mg의 최대흡광도 값을 비교할 때, 칼슘에 대한 마그네슘의 최대흡광도의 비율은 약 80%로 나타나고 있다. 따라서, Phthalein purple을 이용한 칼슘의 비색측정에서 마그네슘의 영향은 매우 크게 작용하는 것으로 나타났다.

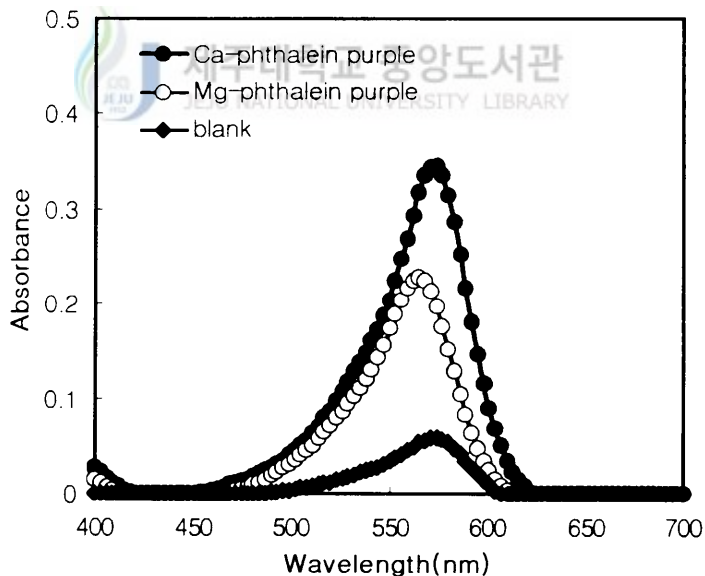


Fig. 4. Comparison of absorbance spectrum of blank and phthalein purple-calcium, phthalein purple-magnesium complex containing 40 mg L⁻¹.

(2) 8-quinolinol에 의한 방해제거

Fig. 5는 60 mg L^{-1} 마그네슘 표준용액에 8-quinolinol의 농도를 달리하였을 때의 흡광도 변화를 나타낸 것이다. (A)는 8-quinolinol을 첨가하지 않은 그림이며 (B), (C), (D)는 각각 0.5, 1.0, 2.0 g을 첨가하였을 때의 그림으로서 첨가량이 증가할수록 마그네슘의 흡광도는 점차 감소하였다. 8-quinolinol을 첨가하지 않은 (A)의 Mg 흡광도를 기준으로 평가하였을 때, Mg 흡광도 저해율은 0.5 g 일때는 60%의 마그네슘 방해물을 제거하였으며 1.0 g과 2.0 g을 첨가하였을 때는 각각 80%와 98%의 마그네슘 방해물을 제거하였다. 따라서, 2.0 g의 8-quinolinol을 첨가할 경우에 칼슘 침출시 동시에 침출되는 마그네슘의 방해물을 60 mg L^{-1} 까지는 거의 제거할 수 있으며, 60 mg L^{-1} 의 마그네슘 농도는 한국 토양의 평균함량의 2배 이상의 농도에 해당되므로 대부분의 경작지토양 분석 시 마그네슘의 방해물을 충분히 제거할 수 있을 것으로 판단된다.

Oguma 등(1985)의 보고에서 규산염 분석에서 Mg의 함량이 $30 \sim 50 \mu\text{g}$ 포함되었을 때 0.4%의 8-quinolinol을 첨가하여 Mg방해물을 완전히 배제할 수 있다고 보고하였다. Gitelman(1967)은 10 g L^{-1} 의 8-quinolinol을 첨가하였을 때 45 meq/L 의 마그네슘의 방해물을 제거할 수 있다고 보고하였다. Nyman과 Ivaska(1995)는 250mg의 8-quinolinol을 100mL에 녹여 조제할 경우 100 mg L^{-1} 까지는 마그네슘 방해가 관찰되지 않았다.

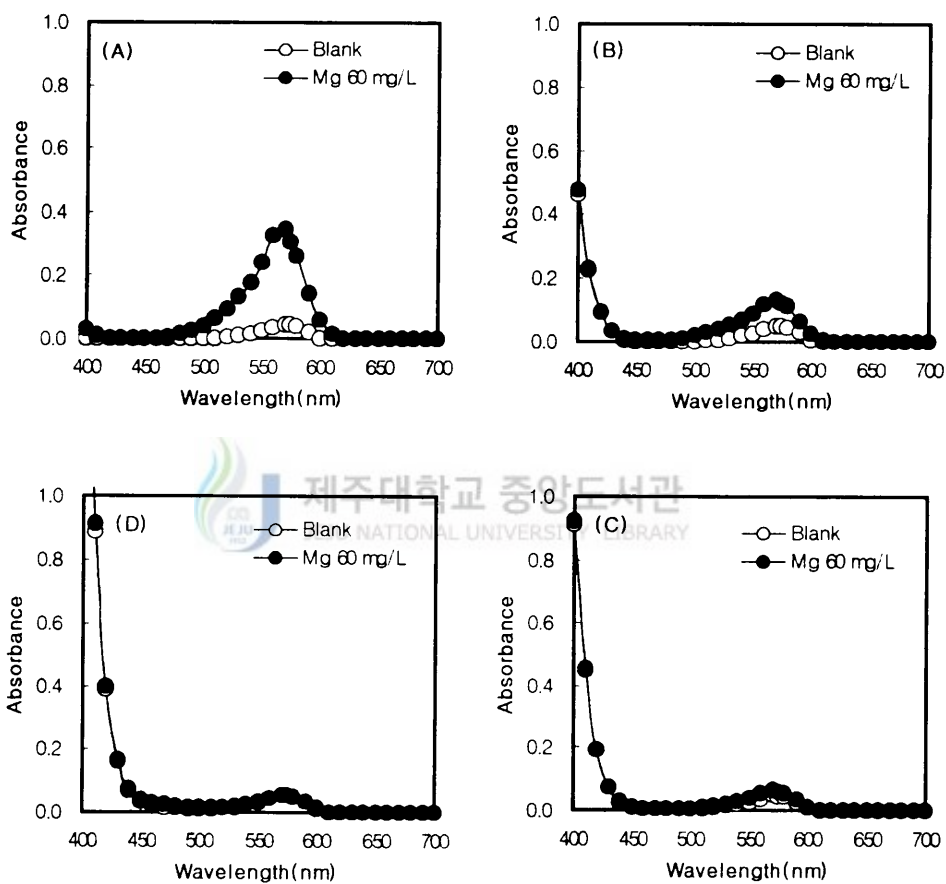


Fig. 5. Effect of 8-quinolinol addition on masking magnesium containing 60 mg L^{-1} .

5) Phthalein purple-Ca 착화합물의 특성

칼슘과 phthalein purple은 분홍색의 착화합물을 형성하며(Nyman과 Ivaska, 1995) phthalein purple 분자의 lactone ring 형성에 의해 Ca과 $\text{Ca}(\text{CPC})^4$, $\text{CaH}(\text{CPC})^3$, $\text{Ca}_2(\text{CPC})^2$ 등 강한 착화합물을 형성하고 (Anderegg 등, 1954) 그 중 주발색단은 $\text{Ca}_2(\text{CPC})^2$ 이라고 보고하였다(van Staden 과 van Rensburg, 1990 ; van Staden과 Malan, 1996). 따라서, Phthalein purple-Ca 착화합물의 흡광스펙트럼 특성과 발색안정도를 실험하여 최적과장과 발색 후 측정시간을 결정하였다.



(1) 흡광스펙트럼 특성

Fig. 6은 phthalein purple-Ca 복합체의 스펙트럼을 나타낸 그림이다. blank와 200 mg L⁻¹의 칼슘표준용액을 발색시켜 스캔한 다음 두 흡광도의 차를 나타낸 그림으로 440 ~ 630 nm 범위에서 흡광이 일어나며 574 nm에서 최대 흡광도를 나타내었기 때문에 분석법의 최적파장으로 결정하였다. Oguma 등(1985)은 칼슘은 pH 10.2에서 phthalein purple과 반응하여 575 nm에 최대 흡광도를 나타내는 착화합물을 형성한다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치하였다.

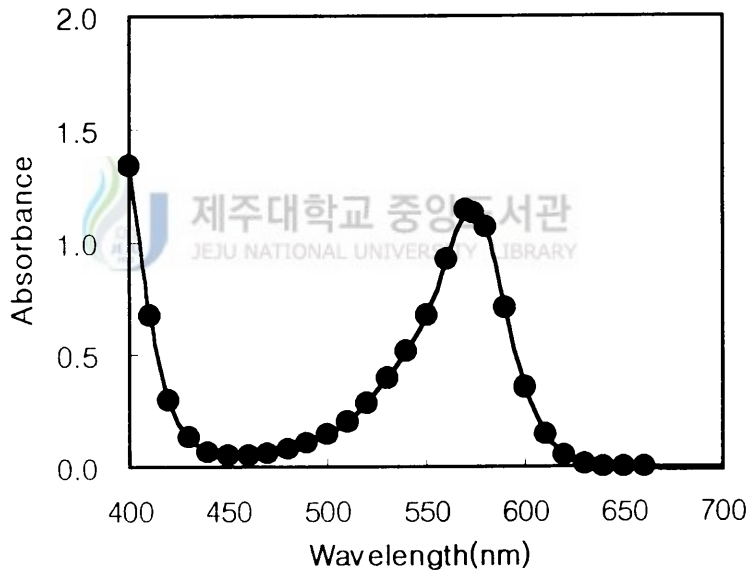


Fig. 6. Absorption spectrum of phthalein purple-Ca complex.

(2) 발색안정도

Phthalein purple-칼슘 착화합물의 발색안정도를 Fig. 7에 나타내었다. 단계별로 조제된 칼슘 표준용액을 phthalein purple로 발색시켜 시간의 경과에 따른 흡광도의 변화를 측정한 결과 칼슘의 농도가 높을수록 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 10분에서 40분 사이에는 5%이하의 감소를 나타내었다. 따라서 발색 후 최적 측정시간은 10 ~ 40분으로 결정하였다.

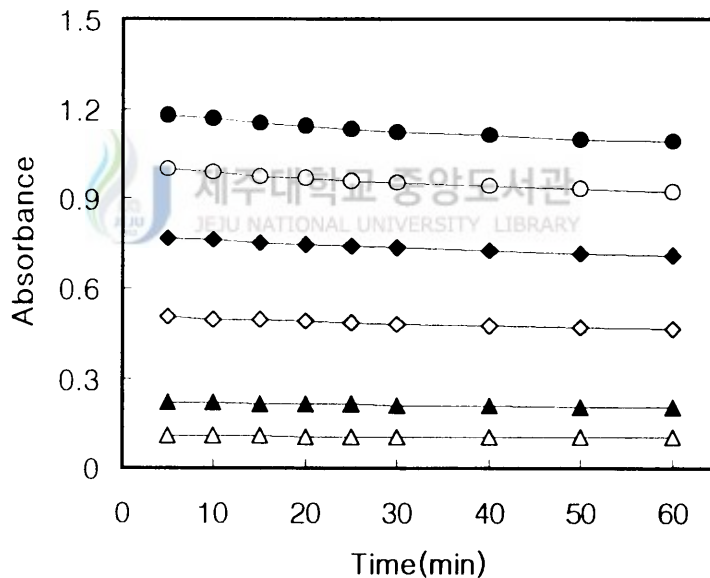


Fig. 7. Variation of absorbance at 574nm for phthalein purple-Ca complex with calcium concentration increasing in time (● : 200 mg L⁻¹, ○ : 160 mg L⁻¹, ◆ : 120 mg L⁻¹, ◇ : 80 mg L⁻¹, ▲ : 40 mg L⁻¹, △ : 20 mg L⁻¹).

이상과 같이 1N ammonium acetate로 침출한 토양치환성 칼슘을 측정하는데 화학적으로 영향을 미칠 것으로 고려되는 요소들에 대한 적정 조건을 칼슘표준용액을 사용하여 결정하였다. 결정된 조건은 Table 4와 같다.

Table 4. Optimum parameter values for determining soil exchangeable calcium using phthalein purple

Chemical parameter	Optimum condition
pH of AMP solution	11.0
Concentration of AMP	100 g L ⁻¹
pH of phthalein purple	1.37
Concentration of phthalein purple	0.05 g L ⁻¹
Volume of sample	0.2 mL
Concentration of 8-quinolinol	2.0 g L ⁻¹
Wavelength	574 nm

2. 원자흡광광도법과의 비교평가

지금까지 선택된 최적조건하에서 phthalein purple을 이용한 칼슘의 비색 측정은 토양에 적용하였다. 공시 토양은 밭토양, 논토양, 과수원토양 그리고 시설재배지 토양 56점이며 1N ammonium acetate로 치환성칼슘을 침출하여 원자흡광광도계와 phthalein purple method를 각각 3반복 측정하여 치환성 칼슘함량을 구하였다. 평가방법은 칼슘표준용액으로 직선성을 조사하여 검량선의 최대 농도를 관찰하고 각각 3반복으로 측정되어진 결과에 대한 정확성을 평가하기 위해 상관관계, 표준편차(SD) 그리고 변이계수(CV)를 사용하였다.

1) 직선성

0 ~ 250 mg L⁻¹로 조제된 칼슘표준용액을 phthalein purple로 발색시켜 표준용액 농도와 흡광도와의 관계를 Fig. 8에 나타내어 직선성을 분석하였다. 표준용액의 직선성은 200mg L⁻¹까지는 R²=0.9954***으로 매우 높은 직선성을 보였으며 250 mg L⁻¹는 직선성에서 벗어나 제외하였다. 이와 같은 경향은 칼슘농도가 일정농도 이상에서 plateau가 형성되었다(Corns과 Ludman, 1987)는 결과와 일치하였다. 따라서, 본 분석법의 검량선은 0 ~ 200 mg L⁻¹범위로 결정하였다.

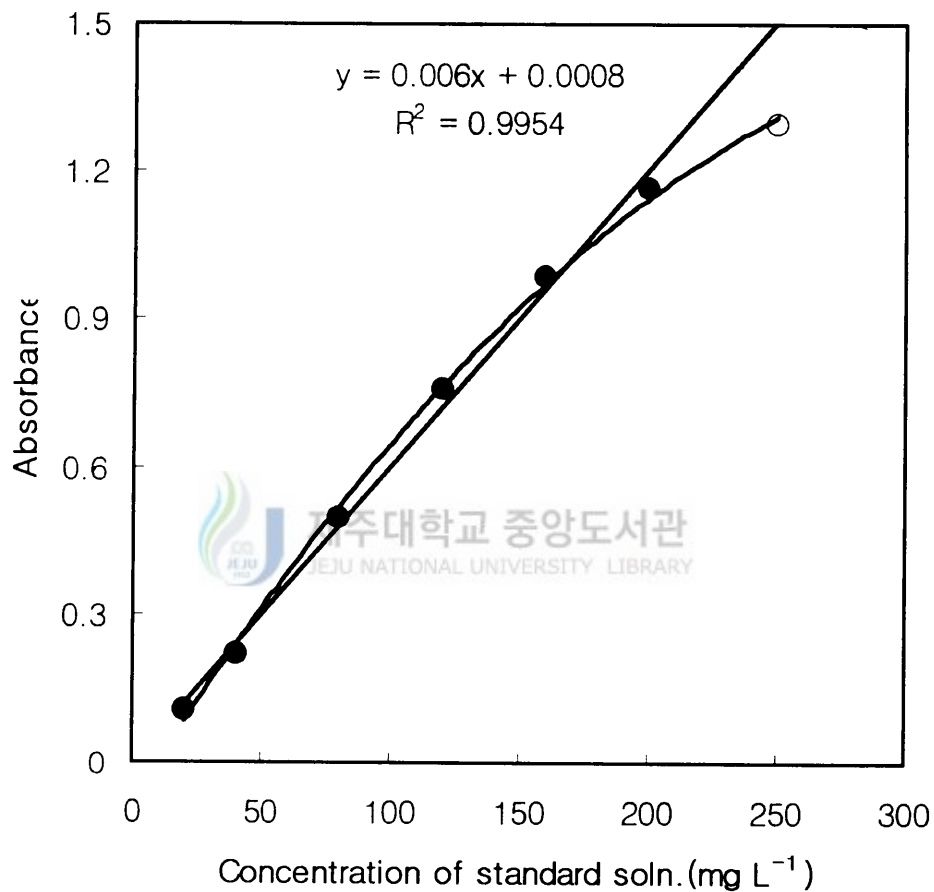
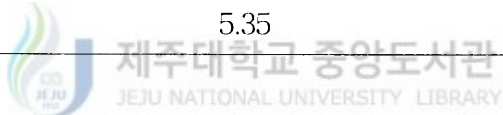


Fig. 8. Linearity of the calcium determination with phthalein purple at 574 nm.

Phthalein purple 법에 의해 측정된 치환성칼슘 함량은 1N ammonium acetate로 침출된 토양용액중의 칼슘을 phthalein purple과 반응시켜 흡광도를 측정하여 다음 위의 검량선에 적용하여 식 (1)과 같이 계산한 결과 Table 5와 같다. 최대값은 11.65 cmol kg⁻¹이고 최소값은 0.88 cmol kg⁻¹이며 평균값은 5.35 cmol kg⁻¹로서 원자흡광광도계로 측정된 방법과 차이가 없었다.

Table 5. Range of concentrations for soil exchangeable calcium

	Phthalein purple method	Atomic absorption spectrophotometry
	cmol Ca kg ⁻¹	cmol Ca kg ⁻¹
Maximum	11.65	11.81
Minimum	0.88	1.02
Average	5.35	5.66



Phthalein purple 법에 의한 토양칼슘함량(cmol/kg)

$$= \frac{\text{분광광도계에서 측정된 값 (mg/L)}}{\text{침출액의 양(mL)}} \times \frac{\text{토양의 무게(g)}}{\text{1L}} \times \frac{\text{1meq}}{\text{20.04mg}} \times 100 \quad \text{---(1)}$$

2) 정밀성

(1) 표준편차

Fig. 9는 각각 3반복으로 분석되어진 phthalein purple 법과 원자흡광광도계 분석결과에 대한 표준편차를 나타낸 그림이다. 두 방법간에는 큰 차이가 없어 모든 토양이 $\pm 0.2 \text{ cmol kg}^{-1}$ 의 범위에 속해 있으며 대부분의 토양은 $\pm 0.1 \text{ cmol kg}^{-1}$ 에 포함되어 있다. 따라서, Phthalein purple method는 원자흡광광도계와 비교하여 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. Basson과 van Staden(1978 ; 1979)은 동물사료와 우유중 칼슘측정에서 원자흡광광도법과 비교하여 표준편차가 1%이하로 나타났다고 보고하였다.

(2) 변이계수

Phthalein purple 법과 원자흡광광도법으로 3반복 측정된 결과는 변이계수로 비교하였다. Fig. 10은 두 방법에 대한 변이계수를 나타낸 그림으로 경작지토양의 일반적인 칼슘함량인 3 cmol kg^{-1} 이상에서는 2.5%이하를 나타내는 반면, 그 이하에서는 변이계수가 10%이하를 나타내고 있다. 이러한 경향은 두 방법이 비슷하였으며 두 방법간에 차이가 없는 것을 나타낸다. Basson과 van Staden(1979)은 0.105 ~ 0.119%의 우유중 칼슘분석에서 변이계수는 0.41 ~ 0.73%로 분석되어 농도범위를 고려하였을 때 유사한 결과를 보였다.

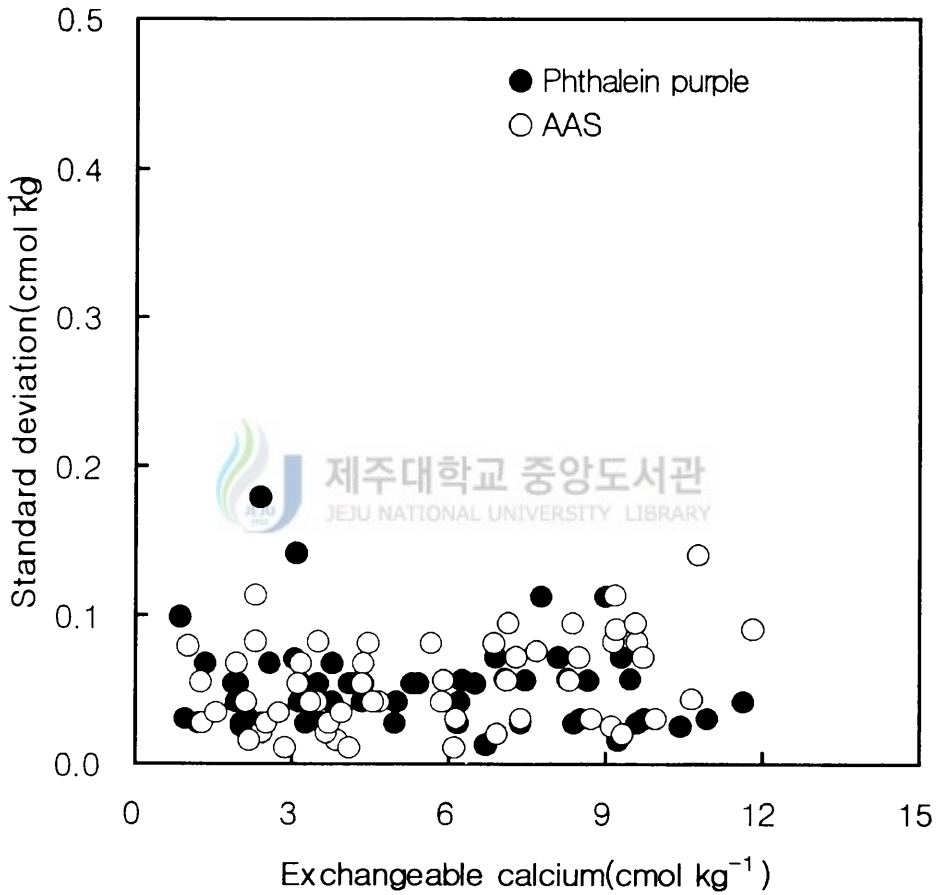


Fig. 9. Comparison of the standard deviations for calcium concentrations of 56 soil samples measured in triplicate between phthalein purple method and atomic absorption spectrophotometry.

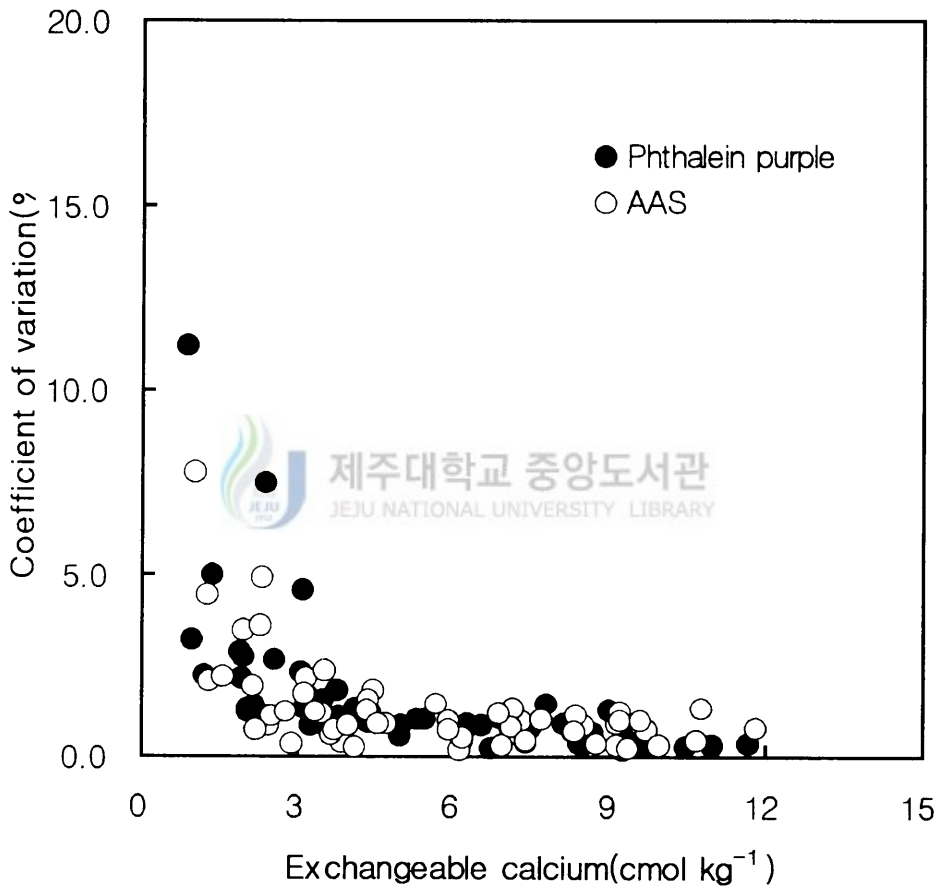


Fig. 10. Comparison of the coefficients of variation for calcium concentrations of 56 soil samples measured in triplicate between phthalein purple method and atomic absorption spectrophotometry.

3) 정확성

Fig. 11은 phthalein purple 법과 원자흡광광도법으로 3반복 측정한 결과의 평균함량사이의 상관관계를 나타내었다. 두 방법을 비교한 결과에서 결정계수(R^2)는 0.9859($P < 0.001$)로 고도의 유의성을 가지는 정의 상관관계를 보이고 있다. 또한 기울기가 1.0067로서 원자흡광광도법으로 측정한 값과 1:1의 관계를 보였다. 따라서, Phthalein purple 법으로 측정된 치환성칼슘 함량은 원자흡광광도계로 측정된 값과 일치하는 값을 가지는 것으로 평가되었다. Moorehead와 Biggs(1974)는 혈청의 분석에서 원자흡광광도계와 비교한 결과 $P < 0.05$ 로 큰 차이를 보이지 않는다고 보고하였으며, Rocha(1998)는 자동연속측정법으로 물, 식물체 우유, 비료, 석회암의 칼슘분석에서 원자흡광광도법과 비교하여 95%의 유의수준이었다고 보고하였다.

이상의 phthalein purple을 이용한 토양치환성 칼슘의 분광학적 측정을 토양에 적용하여 원자흡광광도계로 측정한 값과 비교한 결과는 정밀성과 정확성에서 두 방법간에 큰 차이가 없는 것으로 평가되어 토양치환성 칼슘함량은 원자흡광광도계를 대신하여 phthalein purple 법으로 측정이 가능한 것으로 판단된다.

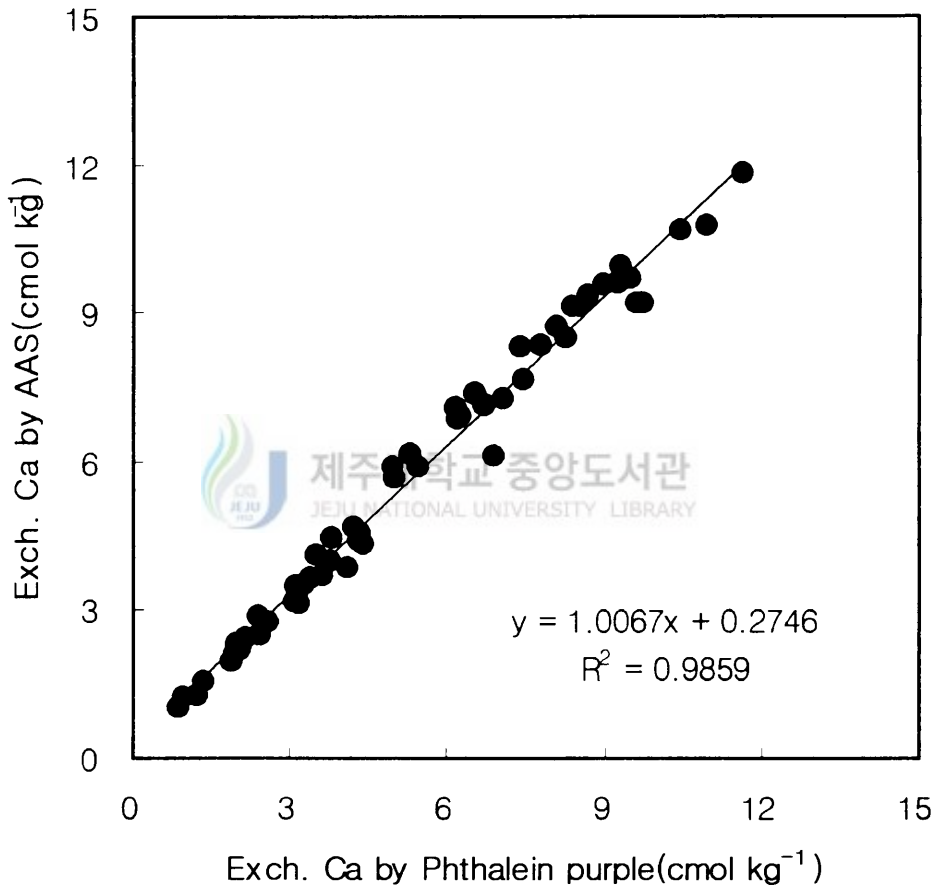


Fig. 11. Correlation of calcium concentrations of 56 soil samples between phthalein purple method and atomic absorption spectrophotometry.

IV. 요 약

Phthalein purple을 이용한 토양치환성 칼슘의 분광학적 측정은 칼슘표준 용액을 사용하여 최적조건을 결정한 다음 56점의 토양에 적용하여 직선성, 정밀성, 정확성을 평가하였다.

1. 완충용액인 AMP의 최적조건은 pH 11.0이며 100 g L^{-1} 의 농도로 결정하였다. 또한, phthalein purple 발색시약의 최적조건은 pH 1.37이며 0.05 g L^{-1} 의 농도로 결정하였다.

2. 시료용액의 첨가량은 0.2 mL로 결정하였으며 마그네슘에 의한 방해물 제거하는 가리움제인 8-quinolinol의 농도는 2.0 g L^{-1} 로 결정하였다.

3. 칼슘과 phthalein purple 착화합물은 최대파장이 574nm였으며 측정시간 10 ~ 40 분이었다.

4. 최적조건하에서 표준용액의 직선성은 200 mg L^{-1} 까지였으며 표준편차와 변이계수는 각각 $\pm 0.02 \text{ cmol/kg}$ 이하, 5% 이하로 원자흡광광도계로 측정된 결과와 차이가 없었다. 원자흡광광도계로 측정된 칼슘함량과 비교한 정확성은 고도의 유의성($P < 0.001$)을 가지며 1:1관계를 보였다.

V. 참고문헌

Anderegg G., H. Flaschka, R. Sallman, and G. Schwarzenback, 1954. Metal indicators. A phthalein responding to alkaline earth ions and its analytical applications. *Helv. Chim. Acta*, 37. 113-120.

Basson W.D. 1982. Consecutive determination of nitrogen, phosphorus and calcium in animal feeds on a single channel flow injection analyzer with a common analytical manifold. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 311, 23-26.

Basson W.D. and J.F. Van Staden, 1978. Use of non-segmented high-speed continuous flow analysis for the determination of calcium in animal feeds. *Analyst*. 103. 296-299.

Basson W.D. and J.F. van Staden. 1979. Direct determination of calcium in milk on a non-segmented continuous-flow system. *Analyst(London)*, 104, 419-424.

Chapoteau E., Czech B.P., Zazulak W. and Kumar A. 1993. New reagent for colorimetric assay of calcium in serum, *Clinical Chemistry*. 39(9) 1820-1824.

Corns C.M. and C.J. Ludman, 1987. Some observations on the nature of the calcium-cresolphthalein complexone reaction and its relevance to

clinical laboratory. *Ann. Clin. Biochem.*, 24. 345.

Cowley D.M., B.M. Mottram, N.B. Hailing, and T.J. Sinton, 1986. Improved Linearity of the calcium-cresolphthalein complexone reaction with sodium acetate. *Clin. Chem.*, 32. 894-895.

Gitelman, H.J. 1967. An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* 18. 521-531.

Hansen E.H., J. Ruzicka, and A.K. ghose, 1978. Flow injection analysis for calcium in serum, water and wastes by spectrophotometry and by ion-selective electrode. *Analytica Chimica Acta.* 100. 151-165.

Kessler, G. and Wolfman, M., 1964. An automated procedure for the simultaneous determination of calcium and phosphorus. *Clin. Chem.*, 10, 686.

Lin J., J.M. Idee, M. Port, A. Diai, C. Berthommier, M. Robert, I. Raynal, L. Devoldere, and C. Corot, 1999, Interference of magnetic resonance imaging contrast agents with the serum calcium measurement technique using colorimetric reagents, *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 931-943.

Moorehead W.R. and H.G. Biggs. 1974. 2-amino-2-methyl-1-propanol as

the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. *Clin. Chem.* 20(11) : 1458-1460.

Nyman J. and A. Ivaska, 1995. Spectrophotometric determination of calcium in paper machine white water by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta.* 308. 286-292.

Nyman J. and A. Ivaska. 1993. Potentiometric and spectrophotometric determination of calcium in the wet end of paper machines by flow injection analysis. *Talanta.* 40(1) 95-99.

Oguma K., Y. Kato, and R. Kuroda. 1985. Continuous spectrophotometric determination of calcium in silicates by flow injection method of analysis. *Bunseki Kagaku.* 34. 98-103.

Olansky A.S., L.R. Parker, Jr., S.L. Morgan, and S.N. Deming. 1977. Automated development of analytical chemical methods: The determination of serum calcium by the cresolphthalein complexone method. *Anal. Chim. Acta.* 95 : 107-133.

Oliveira C.C., R.P. Sartini, and E.A.G. Zagatto, 2000, Microwave-assisted sample preparation in sequential injection : spectrophotometric determination of magnesium, calcium and iron in food, *Analytica Chimica Acta.* 413, 41-48.

Ringbom A., 1963. Complexation in Analytical Chemistry, J. Willey, New York, p. 91.

Roach, A.G., in "Automation in Analytical Chemistry" Technicon symposia, 1965, Mediad, New York, 1966, pp. 137-141.

Rocha F.R.P., P.B. Martelli, F.M. Frizzarin and B.F. Reis. 1998. Automatic multicommutation flow system for wide range spectrophotometric calcium determination. *Analytica Chimica Acta*. 366. 45-53.

Rosa M. Ortega, Rosa M. Martinez, M. Elena Quintas, Ana M. Lopez-Sobaler and Pedro Andres, 1998. Calcium Levels in maternal milk : relationships with calcium intake during the third trimester of pregnancy, *British journal of nutrition*, 79, 6, 501-507.

van Staden J.F. and A. van Rensburg. 1990. Simultaneous determination of total and free calcium in milk by flow injection. *Analyst*, 115. 605-608.

van Staden J.F. and D. Malan. 1996. Non-linearity with metal-metal indicator complex reactions in flow-injection analysis. *Talanta*. 43. 881-888.

van. Staden J.F. and R.E. Taljaard, 1996. Determination of calcium in water, urine and pharmaceutical samples by sequential injection analysis. *Analytical Chimica Acta*. 323. 75-85.

Wanninen E. in Bishop, E., Editor, "Indicators." Pergamon Press, Oxford, 1972, pp. 252 and 340.

농업기술연구소. 1988. 토양화학분석법.

제주도농업기술원. 2000. 흙살리기운동사업 종합보고서(1996-1999). pp. 55-56.



감사의 글

본 논문이 완성되기까지 세심한 학문적 배려와 지도를 해주신 현해남 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 일정에도 불구하고 시간을 내어 많은 조언과 비평을 주신 류기중 교수님과 김찬식 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한 평소 많은 가르침을 주신 김형욱 교수님, 강순선 교수님, 유장걸 교수님, 고정삼 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

본 논문을 완성하기까지 귀중한 조언을 아끼지 않으시고 항상 옆에서 도와주신 임한철 연구관님, 오상실 박사님, 문두경 선배님, 고승학 선배님, 좌재호 선배님, 오명협 선배님, 강지한 선배님께 감사드립니다. 언제나 걱정해 주시고 조언해주신 김태선 부장님께 감사드립니다. 그리고 본 논문이 무사히 끝날 수 있도록 옆에서 묵묵히 도와준 공만, 명의, 희성 후배에게도 감사드립니다. 대학원과정을 함께했던 선배님들과 동기들, 조교 선생님들, 후배들께도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 오늘이 있기까지 저를 키워주신 부모님과 형님, 형수님과 함께 기쁨을 나누고 싶습니다.