

碩士學位論文

元素分析機(EA 1108, FISOONS)에 의한 植物體
試料中の 炭素와 窒素 分析

濟州大學校 大學院

農化學科



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

梁 相 互

1994年 12月

Analysis of Carbon and Nitrogen in Plants using
the Elemental Analyzer, EA 1108

Sang-Ho Yang

(Supervised by professor Zang-Kual U.)

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

1994. 12.

元素分析機(EA 1108, FISOONS)에 의한 植物體
試料中の 炭素와 窒素 分析

指導教授 柳 長 杰

梁 相 互

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1994年 12月

梁相互의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

유 기 항

委 員

柳 長 杰

委 員

김 찬 식

濟州大學校 大學院

1994年 12月

목 차

Abstract-----	1
I. 서 론-----	3
II. 재료 및 방법-----	6
1. 표준시료-----	6
2. 식물체 시료의 조제-----	6
3. 원소분석기(EA 1108)의 구성 및 분석원리-----	7
4. 표준시료에 의한 분석조건 검토-----	10
가) 공시료 시험 및 기기 안정성-----	10
나) 기기의 정확성 및 재현성-----	10
다) GC의 컬럼온도 조건 검토-----	11
5. 감글잎의 탄소와 질소 분석-----	11
가) 시료 분말도에 따른 함량 및 정밀도 검토-----	11
나) 적정 시료량 검토-----	11
다) Kjeldahl법과의 비교(질소)-----	11
라) Tyurin법과의 비교(탄소)-----	12
III. 결과 및 고찰-----	13
1. 표준시료의 탄소와 질소 분석-----	13
가. 공시료 중의 탄소와 질소 분석-----	13
나. 표준시료의 K-factor 재현성-----	13
다. 표준시료의 적정 시료량-----	16
라. Retention time 및 peak 분리도-----	18
2. 감글잎 시료의 탄소와 질소 분석-----	20
가. 시료 조제 방법-----	20
1) 시료의 입자크기 분포-----	20

2) 시료 입자크기가 탄소와 질소 분석치의 재현성에 미치는 영향----	21
나. 적정 시료의 양-----	24
다. Kjeldahl법과의 비교(질소)-----	26
라. Tyurin법과의 비교(탄소)-----	26
IV. 적 요 -----	28
V. 참고문헌-----	30



Abstract

The purpose of this study is to establish the analytical conditions of carbon and nitrogen for the elemental analyzer, EA 1108, Fisons which was introduced as a part of the isotope ratio determining system.

The accuracy and precision of the equipment and the method of sample preparation in aspect of the particle size and amount of sample were examined using the standard reagents, sulfanilamide and thiourea, and the citrus leaves(20 years old, Miyagawa).

1. Analytical conditions of the standards

a. The sample container, tin capsules, contained no nitrogen but varying amounts of carbon which however can not affect the results of carbon analysis.

b. The instrument stability figured out in terms of K-factor, the ratio of absolute element amount and its peak area, was good, giving low coefficient of variation: 2.119% for nitrogen and 2.036% for carbon.

c. The suitable amount of standard reagent for carbon analysis was in the range of 0.2 mg to 8.5 mg and for nitrogen 0.1 mg to 1.0 mg.

d. 40°C of oven temperature gave better peak separation between carbon and nitrogen than 70°C.

2. Analytical conditions of leaves

a. The method for grinding the fresh leaves in liquid nitrogen brought about better particle size distribution, and higher stability of elemental contents regardless of particle size than the conventional method, oven-dried and ground with a cutting mill.

b. The proper elemental content in plant samples and oven temperature found 0.02 mg to 0.3 mg nitrogen at 40°C oven temperature and 1.0 mg to 9.0 mg carbon at 70°C because stable analytical contents existed in those ranges.

c. The degree of analytical deviation between the elemental analyzer and the Kjeldahl method was 6.5% and in case of carbon(the Tyurin method) the difference was 14%. Therefore the factors causing this deviation should be investigated in more detail.



I. 서론

자연환경에 존재하는 토양, 식물 등과 같은 유기물질들은 여러 종류의 화합물로 구성되어 있으며 그 원소의 조성이 매우 다양하다. 이러한 다양한 조성적 특징은 각 물질에 대한 정보를 알아 내는데 유용하게 활용될 수 있기 때문에 여러 분야에 걸쳐 유기물질들에 대한 탄소와 질소 분석에 의해 그 화학조성 분석자료가 오래 전부터 널리 이용되어 왔다(장호완 등, 1991). 최근들어 분석기술의 발달로 인하여 원소분석기가 등장하여 유기물질의 탄소, 질소, 수소, 산소와 황 등의 성분 원소를 동시에 신속히 정량분석하는 것이 가능해졌다(Colombo and Baccanti, 1990; Colombo 등, 1988; Colombo 등; Debot 등, 1989; Debot and Sadek, 1987; Giorgi 등, 1989; Howarth and Belcher, 1977; Kirsten, 1983; Pella, 1990; Pella 등, 1989; Sadek and Debot, 1987).

유기물 분석방법중 탄소의 분석법으로서는 분석 목적에 따라 연소법, Tyurin법, Walkley-Black법과 중량법이 있다(박준규 등, 1988). 연소법은 특수한 장치를 필요로 하며 분석 소요시간이 많이 소요되는 단점이 있으며, 이 연소법은 Tyurin법을 개량한 방법을 주로 써 왔다. Tyurin법의 원리는 유기탄소를 농황산 조건에서 강력한 산화제인 $K_2Cr_2O_7$ 으로 산화시키고 산화를 위해 소모된 산화제의 양으로부터 탄소함량을 알아내고 그 탄소함량에 일정계수 1.724를 곱해서 humus량으로 하는 방법이다.

Walkley-Black법의 분석 원리는 Tyurin법과 같으며 계수로 사용하고 있는 1.724가 경험적 평균치로써 유기물 시료에 대해서는 상당한 오차가 함유되어 있기 때문에 Tyurin법 보다는 간이 적정법으로 널리 사용되고 있으며, 이 Walkley-Black법은 탄소의 분석법 가운데 간단한 방법의 하나이다. 중량법은 습식 연소법과 건식 연소법이 있다. 습식 연소법은 유기물 중의 탄소가 크롬산과 황산이 끓을 때 산화되어 탄산가스로 되는 원리를 이용하는 것으로써 시료가 무기탄소 또는 탄산염을 함유할 때에도 탄산가스가 되며 발생기체내 탄산가스 이외의 산성물질 및 물을 제거한 것을 소다 석회관에 유도됨으로서 탄산가스가 흡수되어 소다 석회관

의 중량 증감에 의해서 탄산가스의 양을 측정하여 시료중의 전탄소 함량, 즉 유기탄소를 정량하는 방법이다. 시료가 탄산염을 함유하지 않을 경우는 전탄소 즉 유기탄소이다. 건식 연소법은 탄소 정량법으로 가장 정확하고 정밀한 방법이지만, 특수한 장치가 필요하고 분석에 많은 시간이 필요하며 고도의 숙련을 요하는 등 통상의 분석에는 부적당하다.

질소 분석법으로서는 습식 산화과정(wet oxidation procedure)인 Kjeldahl 법(Kjeldahl, 1883)과 건식 산화과정(dry oxidation technique)인 Dumas 법(Dumas, 1831)이 있다(박준규 등, 1988). Kjeldahl 법(Campbell, 1986; Devani 등, 1989; Fisher and Gurnsey, 1987; Grappin and Horwitz, 1988)은 진한 H_2SO_4 로 분해시켜 NH_4-N 형태로 전환하여 정량하는 방법으로 질소 분석법으로서는 가장 널리 쓰이는 방법중의 하나이지만, Kjeldahl 분해법에서는 분해온도가 중요한데, 분해온도가 $360^\circ C$ 이하일때는 불완전하여 분해시간이 지연되고 $410^\circ C$ 이상에서는 휘산에 의한 손실이 있다.

Dumas법(Bellomonte 등, 1987; Colombo and Baccanti, 1990; Colombo 등, 1988; Colombo 등; Debot 등, 1989; Debot and Sadek, 1987; Giorgi 등, 1989; Howarth and Belcher, 1977; Kirsten, 1983; Pella, 1990; Pella 등, 1989; Sadek and Debot, 1987; Watkins 등, 1987)은 N_2O 를 N_2 로 환원시켜 N_2 gas의 부피를 측정하여 정량하는 방법으로써 이는 약 $1800^\circ C$ 에서 유기물 시료를 순간적으로 연소하여 $N_2+N_xO_y$ 가 생성되고 이 생성된 가스는 이동상 기체에 의해 $1020^\circ C$ 가 되는 산화관으로 들어가 산화제(tungstic anhydride)에 의해 산화반응이 일어나 $N_2+N_xO_y$ 가 N_2+N_2O 로 산화되며 이 산화된 가스는 이동상 기체에 의해 환원관으로 들어가 환원제(copper)에 의해서 환원되어 N_2+N_2O 가 N_2 로 전환시켜 N_2 gas량을 측정하여 정량하는 방법이다. 원소분석기는 이러한 Dumas법의 원리를 이용하는 분석기기로서 탄소와 질소 등을 신속히 정량할 수 있다.

이와 같이 유기물중의 탄소와 질소 등을 기존 분석방법으로 분석하는데는 특수한 장치를 필요로 하며 분석 소요시간이 많이 걸리고 노동력이 많이 드는 단점이 있다.

본 연구에서는 탄소, 질소, 수소, 산소와 황 성분을 동시에 신속히 분석할 수 있는 원소분석기(EA 1108, FISO NS)의 신뢰성과 재현성을 검증하기 위하여 표준시료 중의 탄소와 질소를 분석하였다.

그리고 본 원소분석기를 이용하여 감글잎 시료의 분말도에 따른 입자크기에 대한 성분함량의 재현성 및 적정 시료량을 조사하여 감글잎 시료중의 탄소와 질소 분석법을 확립하고자 하며, 또한 본 기기를 안정 동위원소 질량분석기(SIRA II, VG Isotech)에 on-line으로 연결하여 탄소와 질소 등의 안정 동위원소비(Minagawa 등, 1984)를 결정하는데 기초가 되는 자료의 신뢰성과 유기물 전처리 장치로서의 기능을 다할 수 있도록 그 분석법을 확립하고자 한다.



II. 재료 및 방법

1. 표준시료

탄소와 질소를 분석하기 위하여 표준시료로써 sulfanilamide(Fisons Instruments S.P.A.)와 thiourea(Junsei Chemical Co., LTD, 98.0%) 두가지를 사용하였다(Table 1).

2. 식물체 시료의 조제

원소분석기와 Kjeldahl분석에 사용하기 위해서 제주대학교 감귤원(제주시 아라 일동)에서 재배되고 있는 20년생 조생온주(*Citrus Unshiu* Marc. var. Miyagawa)의 감귤잎을 채취하여 흐르는 수돗물에서 먼지등을 씻어낸 후 물기를 제거하고 잘게 잘라서 잘 혼합하였다. 이와 같이 준비한 시료를 다음의 두가지 방법에 의해서 분쇄하였다.

가) 방법 1

110 °C 건조기에서 하루 밤 건조시킨 다음 고속분쇄기(mill)로 갈아 가루로 만들어서 체로 입자의 크기별로 분류하여 다시 110°C 건조기에서 1시간 건조시켜 조제하였다.

나) 방법 2

막자사발에 시료를 넣고 액체질소를 소량씩 가하면서 갈아 가루로 만든 다음 80°C 건조기에서 하루 밤 건조시킨 후 덩어리를 막자사발에서 마쇄하여 체로 입자의 크기별로 분류한 시료를 110°C 건조기에서 1시간 건조시켜 조제하였다.

Table 1. Theoretical chemical composition of standard compounds

	C%	H%	N%	S%
Sulfanilamide	41.840	4.680	16.270	18.620
Thiourea	15.449	5.150	36.048	41.198

이상의 방법으로 조제된 감귤잎 시료를 이용해서 분쇄방법에 따른 분쇄효율 즉 입자크기의 분포를 조사하고 입자 크기별 탄소와 질소 함량 차이와 분석 재현성에 미치는 영향을 검토했다.

3. 원소분석기 EA 1108(Fisons Instruments, Italy)의 구성 및 분석 원리

원소분석기는 자동시료 공급장치, 산화관과 환원관 그리고 gas chromatography 용 oven과 column, TCD(thermal conductivity detector) 검출기로 구성되어 있으며 산화용 가스로는 순수한 산소를 사용하고 He 가스를 carrier로 사용한다 (Figure 1).

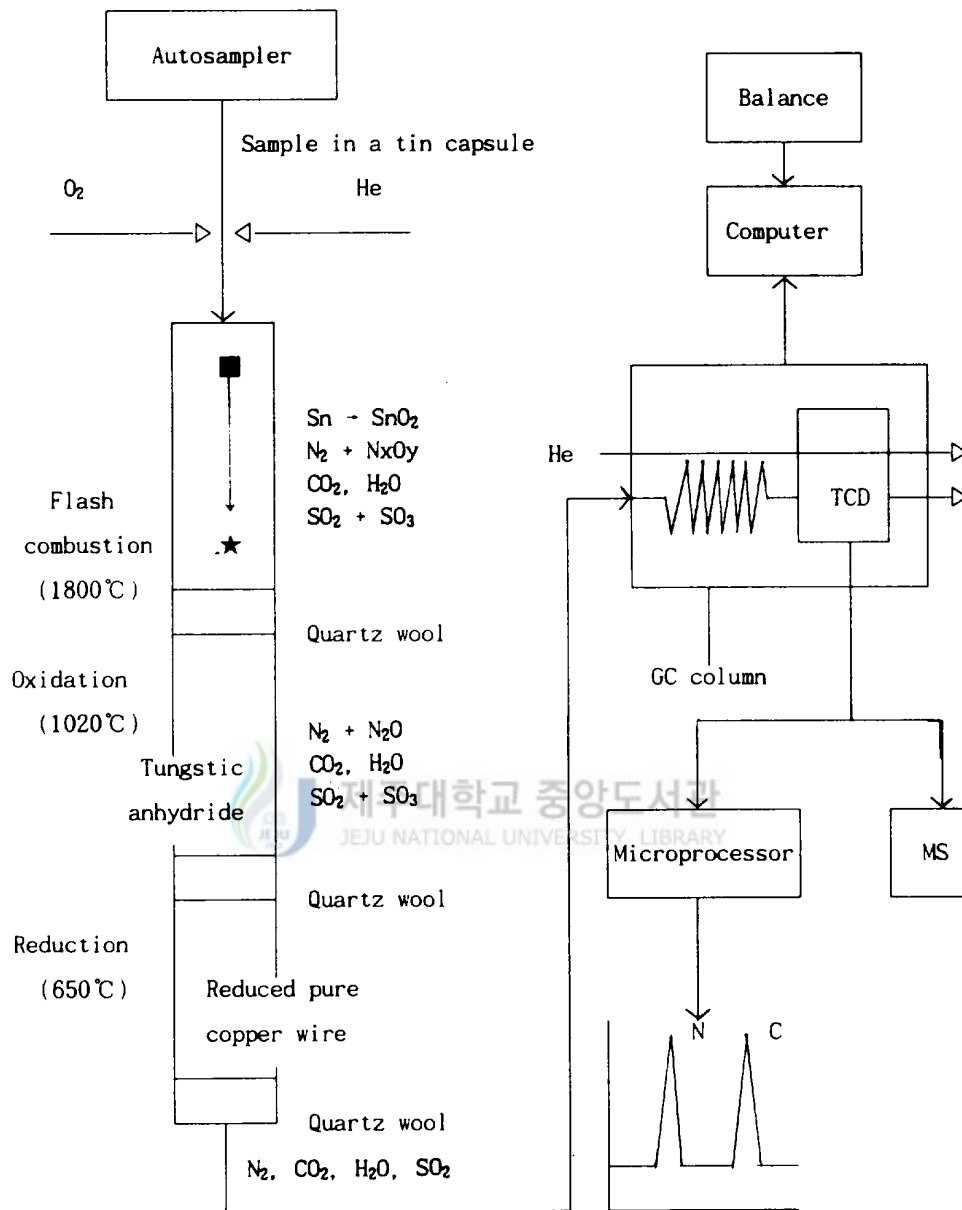


Figure 1. Flow-diagram of the elemental analyzer

분석원리는 Figure 1에서 보는 바와 같이 자동시료 공급장치에 의해 시료가 주입되며 동시에 산소의 공급으로 온도가 1800℃ 까지 올라가면 연소가 일어나 $N_2+N_xO_y$, CO_2 , H_2O 와 SO_2+SO_3 가스가 발생한다. 이때 발생한 가스는 He 가스에 의해 온도가 1020℃가 되는 산화관으로 이동되어 tungstic anhydride 등의 산화 촉매제에 의해 특히 $N_2+N_xO_y$ 가스가 N_2+N_2O 로 산화반응이 일어난다. 산화가 된 가스는 carrier 가스인 He에 의해 환원관으로 들어가 pure reduced copper wire 환원 촉매제에 의해 환원반응이 일어나 N_2+N_2O 가 N_2 로, SO_2+SO_3 는 SO_2 로 되어 결국, N_2 , CO_2 , H_2O , SO_2 가스로 된다. 환원된 가스는 GC oven에 내장된 컬럼에 의해 분리되어 TCD 검출기로 열전도도를 측정하여 K-factor에 의해 정량이 이루어진다. 원소 분석기 EA 1108에서 미지시료의 원소조성을 결정하기 위한 K-factor는 알고 있는 보정 factor를 이용한다. K-factor는 원소조성을 알고 있는 표준시료를 분석함으로써 결정이 되는데 그 K-factor는 다음 공식에 의해 계산된다.

$$K = \frac{\%t \cdot WS}{(I - B)}$$

%t : Theoretical percentage of the element in the standard

WS : Weight of the standard in mg

I : Integral area of the standard

B : Integral area of the blank

또한 원소함량(%)은 다음 식에 의하여 계산된다.

$$\% = \frac{K \cdot (I - B)}{W}$$

K : Average factor

I : Sample integral area

B : Blank integral area

W : Weight of sample in mg

산화관과 환원관에는 CHNS, CHN, O, S와 S trace 결정 mode인 5 종류가 있는데 본 실험에서는 CHNS 결정 mode를 사용했다.

기기의 분석조건은 별도의 언급이 없는 한 Table 2에 나타난 바와 같다.

Table 2. CHNS determination conditions

Carrier gas	: He, 80 ml/min.
Oxygen	: 20 ml/min.
Left furnace temp.	: 1020°C
Right furnace temp.	: 650°C
Filament	: 190°C
GC column	: Porapak QS, 2 mt.
GC oven temp.	: 60°C
Sample delay time	: 13 sec.
Total run time	: 600 sec.
Sample size	: 0.4 mg - 21.0 mg



4. 표준시료에 의한 분석조건 검토

가) 공시료 시험 및 기기 안정성

Blank로서 tin capsule만을 분석한 것과 tin capsule 없이(air) 분석한 탄소와 질소 chromatogram peak의 면적 변화를 조사하여 기기의 안정성을 검토하였다.

나) 기기의 정확성 및 재현성

Sulfanilamide를 2.0 - 4.0 mg의 시료량으로 분석하여 탄소와 질소 성분함량의 K-factor 재현성과 sulfanilamide를 0.580 - 20.231 mg (0.096 mg N -

3.292 mg N, 0.246 mg C - 8.465 mg C)의 시료량으로 분석하여 시료량의 증가에 따른 탄소와 질소 성분함량의 직선성을 조사하여 기기의 정확성 및 안정성을 검토하였다.

다) GC의 컬럼온도 조건 검토

Sulfanilamide를 2.0 - 4.0 mg의 시료량으로 Table 2의 분석조건중 컬럼온도를 40℃, 50℃, 60℃, 70℃로 달리 분석하여 컬럼온도 변화에 따른 탄소와 질소의 retention time의 변화를 조사하여 GC의 컬럼온도 조건을 검토하였다.

5. 감귤잎의 탄소와 질소 분석

가) 시료 분말도에 따른 함량 및 정밀도 검토

감귤잎을 106 μm 이하, 106-212 μm, 212-300 μm, 300-425 μm, 425-500 μm, 500-600 μm의 6가지 단계로 조제하여 입자 크기에 대한 분포비율을 조사하고, 입자 크기별로 분석하여 탄소와 질소 성분함량 및 정밀도를 검토하였다.

나) 적정 시료량 검토

106 - 212 μm 입자크기를 갖는 시료를 0.541 mg 부터 20.459 mg 까지 13개단계로 나누어 채취하고 컬럼온도를 40℃와 70℃에서 달리 분석하여 탄소와 질소 성분함량을 분석하여 적정 시료량을 검토하였다.

다) Kjeldahl법과의 비교(질소)

감귤잎 분말시료와 thiourea를 가지고 원소분석기와 Kjeldahl법으로 분석하여 질소 성분함량의 변화 관계를 고찰하여 두 방법 간에 차이를 비교 검토하였다.

라) Tyurin법과의 비교(탄소)

감귤잎 분말시료와 thiourea 두가지를 사용해서 원소분석기와 Tyurin법으로 분석하여 탄소 성분함량의 변화 관계를 고찰하여 두 방법 간에 차이를 비교 검토하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 표준시료의 탄소와 질소 분석

유기화합물 구성성분을 결정할 수 있는 원소분석기의 분석조건을 Table 2와 같이 고정시키고 시료량을 달리하면서 분석한 결과에 대한 재현성 및 적정 시료량을 고찰하였다. Table 2의 분석조건 중에서 컬럼온도를 40℃, 50℃, 60℃, 70℃로 변화 하면서 분석한 결과에 대한 재현성 및 적정 시료량과 피크 분리도와 retention time 관계를 고찰하여 가장 좋은 컬럼온도 조건에서 감귤잎중의 탄소와 질소 분석법을 확립한 결과는 다음과 같다.

가. 공시료 중의 탄소와 질소 분석

Table 3은 컬럼온도 70℃에서 tin capsule만을 분석한 것과 tin capsule없이 10회 반복 분석한 것 간에 탄소와 질소의 면적을 비교해 본 결과이다. 질소인 경우는 tin capsule만을 분석한 것과 tin capsule없이 분석한 것 간에 질소 peak의 분석치가 같게 나와 tin capsule에는 질소 peak가 분석에 영향을 미칠 만한 질소가 없는 것으로 보인다. 또한 탄소인 경우는 tin capsule만을 분석한 것이 tin capsule없이 분석한 탄소 peak의 분석치가 크게 나와 그 차이가 tin capsule에서 오는 탄소 peak라고 보아지며, tin capsule만을 분석했을때의 탄소 peak의 변이 계수가 51.864%이다. 이는 tin capsule에 따라서 탄소 peak가 달라지는 것으로 보이지만 표준시료를 분석하였을때 그 탄소의 peak가 tin capsule만을 분석했을때의 탄소 peak보다 수백배 더 크기 때문에 분석하는데는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

나. 표준시료의 K-factor 재현성

Pella 등(1989)은 유기물의 성분함량을 결정하는데 K-factor calibration mode에 의해서 정확하게 결정할 수 있다고 보고된 바 있다. 따라서 본 분석에서도 K-factor calibration mode에 의한 방법을 이용하여 K-factor의 재현성 관계를

살펴보았다.

Table 3. Reproducibilities of nitrogen and carbon contents in blank samples
(tin capsule and without tin capsule)

	Tin capsule		Without tin capsule(Air)	
	Nitrogen	Carbon	Nitrogen	carbon
	19906	1379	21499	661
	19681	1476	19595	725
	18922	926	19633	719
	19328	2598	20236	760
	19187	2942	19653	725
	19257	2894	19689	739
	19875	3355	19584	764
	20194	848	19652	741
	19161	934	19669	747
	19128	936	19613	775
Mean	19464	1829	19882	736
SD	397.60	949	568.64	30.3
CV(%)	2.043	51.9	2.860	4.12

Table 4는 컬럼온도 70℃에서 표준시료 sulfanilamide를 2.0 - 4.0 mg (0.325 mg N, 0.837 mg C - 0.651 mg N, 1.674 mg C)의 시료량으로 25회 반복 분석하여 탄소와 질소의 K-factor 재현성을 살펴본 결과이다. 질소와 탄소는 변이계수가 각각 2.119%와 2.036%로 나와서 재현성이 좋았다.

Table 4. K-factor reproducibility of standard sample(sulfanilamide)

Nitrogen		Carbon	
3.65E-06		1.34E-06	
3.64E-06		1.34E-06	
3.59E-06		1.32E-06	
3.60E-06		1.32E-06	
3.59E-06		1.33E-06	
3.59E-06		1.32E-06	
3.49E-06		1.30E-06	
3.49E-06		1.29E-06	
3.42E-06		1.26E-06	
3.43E-06		1.26E-06	
3.41E-06		1.26E-06	
3.49E-06		1.29E-06	
3.48E-06		1.29E-06	
3.47E-06		1.29E-06	
3.38E-06		1.27E-06	
3.45E-06		1.27E-06	
3.43E-06		1.26E-06	
3.42E-06		1.27E-06	
3.46E-06		1.26E-06	
3.44E-06		1.26E-06	
3.43E-06		1.26E-06	
3.51E-06		1.28E-06	
3.50E-06		1.28E-06	
3.51E-06		1.28E-06	
3.54E-06		1.30E-06	
Mean	3.50E-06		1.29E-06
CV(%)	2.119		2.036

다. 표준시료의 적정 시료량

Table 5는 컬럼온도를 70℃에서 sulfanilamide 표준시료를 0.589 - 20.231 mg (0.096 mg N, 0.246 mg C - 3.292 mg N, 8.465 mg C)의 시료량으로 시료량을 달리하면서 13회 분석하여 탄소와 질소 성분함량의 변화에 대한 적정 시료량을 구한 결과이다. 질소와 탄소의 이론치가 16.270%와 41.849%로써 이 이론치를 기준으로 하여 허용오차를 5%로 보았을때 오차범위가 15.457 - 17.084%와 39.748 - 43.932% 범위로서 이 오차범위를 만족시키는 범위는 질소인 경우는 0.096 mg N - 1.027 mg N의 범위이고, 탄소인 경우는 0.246 mg C - 8.465 mg C의 범위이었다. 그런데 탄소인 경우 0.589 mg의 시료량 이하로 분석하는대는 시료가 미량이기 때문에 무게를 재는데 오차가 있을 것이고 20.231 mg의 시료량 이상으로 분석할때는 기기에 무리가 가기 때문에 0.589 - 20.231 mg의 시료량 즉, 0.246 mg C - 8.465 mg C의 범위에서 분석하는 것이 좋으리라 여겨진다.



Table 5. Optimum range of sample amount(sulfanilamide)

Sample size(mg) (Nmg, Cmg)	Nitrogen (%)	Carbon (%)
0.589(0.096Nmg, 0.246Cmg)	15.913	42.352
1.164(0.189Nmg, 0.487Cmg)	15.989	41.847
2.064(0.336Nmg, 0.864Cmg)	16.283	42.042
3.078(0.501Nmg, 1.288Cmg)	16.525	42.025
4.112(0.669Nmg, 1.720Cmg)	16.702	42.051
5.252(0.855Nmg, 2.197Cmg)	16.870	42.078
6.310(1.027Nmg, 2.640Cmg)	16.992	41.977
7.197(1.171Nmg, 3.011Cmg)	17.163	42.072
8.405(1.367Nmg, 3.517Cmg)	17.313	41.981
9.274(1.509Nmg, 3.880Cmg)	17.467	41.971
10.073(1.639Nmg, 4.215Cmg)	17.551	41.865
14.987(2.438Nmg, 6.271Cmg)	18.234	42.297
20.231(3.292Nmg, 8.465Cmg)	19.125	42.145
Mean	17.087	42.054
CV(%)	5.039	0.333
Real values	16.270	41.840

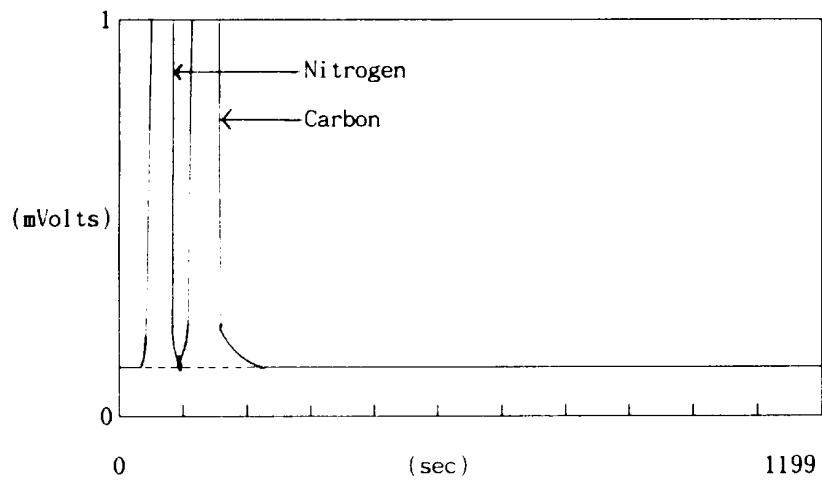
라. Retention time 및 peak 분리도

Table 6과 Figure 2는 표준시료 sulfanilamide를 2.0 - 4.0 mg의 시료량으로 해서 컬럼온도를 40℃, 50℃, 60℃, 70℃로 달리하여 각 컬럼온도에서 5회 반복 분석하여 평균한 retention time 및 peak 분리도를 살펴 본 결과이다. 질소는 oven 온도를 40℃에서 70℃로 올리면 retention time이 93 초에서 101 초로 길어지고 탄소는 oven 온도를 40℃에서 70℃로 올리면 retention time이 159 초에서 137 초로 짧아지기 때문에 Figure 2에서 보는 바와 같이 40℃가 peak 분리가 좋았다.

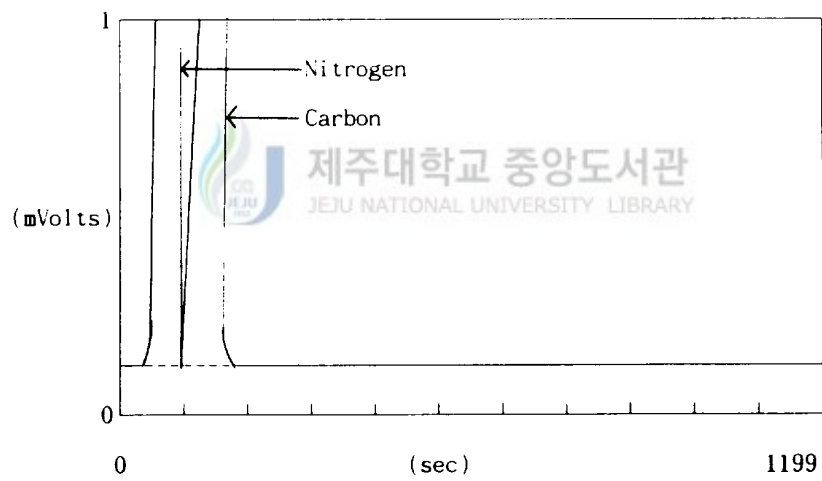
Table 6. Mean values of retention time for standard sample(sulfanilamide)

Column temp.	Nitrogen RT(sec)	Carbon RT(sec)
40℃	93	159
50℃	94	149
60℃	98	142
70℃	101	137

(5 replications)



Column temperature 40°C



Column temperature 70°C

Figure 2. Chromatograms of carbon and nitrogen at 40°C and 70°C column temperatures

2. 감귤잎 시료의 탄소와 질소 분석

감귤잎 시료를 Table 2의 분석조건 중 컬럼온도를 40℃로하여 분석하였다.

가. 시료 조제방법

1) 시료의 입자크기 분포

Figure 3에서 보는 바와 같이 건조기에서 말려 고속분쇄기(mill)로 분쇄한 것과 생체시료를 액체질소에 동결시켜 mortar로 분쇄한 것 간에 입자크기 분포를 비교한 결과이다. 건조기에서 말려 고속분쇄기(mill)로 분쇄한 것은 300 μm 이하의 입자크기가 75.629%이며 액체질소에 동결시켜 mortar에서 분쇄한 것은 300 μm 이하의 입자크기가 85.196%의 분포율을 보여 동결분쇄에 의해 시료를 조제했을때가 작은 입자가 많았다.

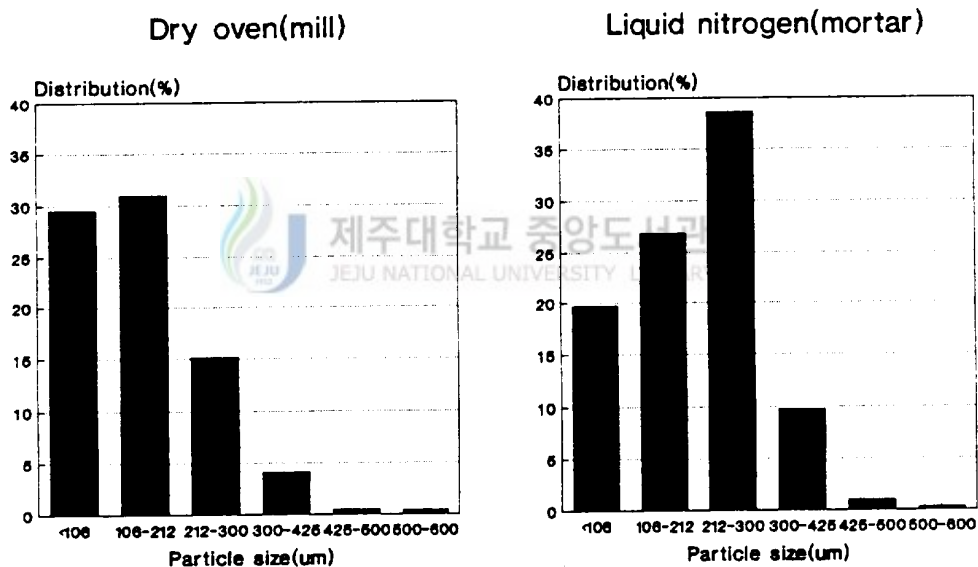


Figure 3. The particle size distribution of citrus leaves grind by two methods: milling after oven-dry and fresh leaf crushing in a mortar with liquid nitrogen

2) 시료 입자크기가 탄소와 질소 분석치의 재현성에 미치는 영향

Table 7과 8은 감귤잎을 건조기에서 말려 고속분쇄기(mill)로 분쇄한 것과 액체질소에 동결시켜 mortar에서 분쇄한 것을 106 μm 이하, 106-212 μm , 212-300 μm , 300-425 μm , 425-500 μm , 500-600 μm 의 입자크기별로 6가지 group으로 나누어서 탄소와 질소를 분석하여 재현성 및 함량을 비교한 결과이다.

Table 7과 8은 시료의 입자크기가 작을때가 표준편차와 변이계수가 작았고, 300 μm 이하의 입자크기에서는 대체로 표준편차와 변이계수가 작아 재현성이 좋았으며, 액체질소에 동결시켜 분쇄한 방법에서 작은 입자가 많아 이 방법에서 입자가 작을수록 표준편차와 변이계수가 작아 재현성이 좋았다.

Table 7. Influences of particle size of sample on reproducibility of carbon and nitrogen content when oven dried-citrus leaves were ground with a mill

	Nitrogen (%)	Carbon (%)	Nitrogen (%)	Carbon (%)
	Under 106 μ m		300-425 μ m	
	2.764	45.786	2.324	44.386
	2.762	45.797	2.367	44.385
	2.776	45.626	2.277	44.543
	2.747	45.660	2.326	44.554
	2.761	45.551	2.372	44.634
Mean	2.762	45.684	2.333	44.500
SD	0.009	0.095	0.034	0.099
CV(%)	0.334	0.207	1.478	0.222
	106-212 μ m		425-500 μ m	
	2.792	45.295	1.786	43.511
	2.746	45.201	1.703	44.259
	2.766	45.282	1.649	44.777
	2.773	45.169	1.297	44.907
	2.763	45.231	1.386	44.528
Mean	2.768	45.236	1.564	44.396
SD	0.015	0.048	0.189	0.495
CV(%)	0.539	0.105	12.09	1.115
	212-300 μ m		500-600 μ m	
	2.614	44.650	2.205	44.403
	2.570	44.978	1.611	44.488
	2.613	44.982	1.663	44.292
	2.663	43.703	1.845	44.656
	2.607	41.656	1.745	44.317
Mean	2.613	44.794	1.814	44.431
SD	0.030	0.153	0.211	0.132
CV(%)	1.133	0.342	11.63	0.297

Table 8. Influences of particle size of sample on reproducibility of carbon and nitrogen content when fresh-citrus leaves were ground in a mortar with liquid nitrogen

	Nitrogen (%)	Carbon (%)		Nitrogen (%)	Carbon (%)
	Under 106 μ m			300-425 μ m	
	3.288	46.303		3.313	48.101
	3.275	46.488		3.445	48.253
	3.274	46.615		3.518	48.136
	3.269	46.306		3.549	48.021
	3.287	46.369		3.613	47.777
Mean	3.279	46.416		3.488	48.058
SD	0.008	0.120		0.103	0.159
CV(%)	0.230	0.258		2.944	0.331
	106-212 μ m			425-500 μ m	
	3.613	47.653		3.270	46.365
	3.625	47.764		3.386	46.595
	3.605	47.593		3.428	46.403
	3.590	47.427		3.433	47.196
	3.650	47.725		3.463	46.426
Mean	3.617	47.632		3.396	46.597
SD	0.020	0.118		0.068	0.310
CV(%)	0.559	0.249		1.991	0.665
	212-300 μ m			500-600 μ m	
	3.359	46.350		3.461	46.004
	3.132	46.251		3.021	46.469
	3.288	46.248		3.390	46.147
	3.313	46.448		3.250	45.796
	3.187	46.320		3.078	46.109
Mean	3.256	46.323		3.240	46.105
SD	0.084	0.074		0.171	0.219
CV(%)	2.570	0.159		5.268	0.475

나. 적정 시료의 량

Figure 4는 액체질소에 동결시켜 분쇄한 106-212 μm 입자크기 시료를 가지고 0.541 - 20.459 mg의 시료량으로 시료량을 달리하면서 oven 온도를 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서와 70 $^{\circ}\text{C}$ 로 분석하여 시료의 적정 시료량을 살펴 본 결과이다.

Figure 4에서 알 수 있듯이 질소는 oven 온도 40 $^{\circ}\text{C}$ 가 0.541 - 8.127 mg의 시료량 사이에서 함량이 비슷하게 나와 이 시료량이 적정 시료량이었다. 이때의 질소량으로서는 0.020 mg N - 0.301 mg N 범위였다.

탄소인 경우는 oven 온도 70 $^{\circ}\text{C}$ 가 2.059 - 20.459 mg의 시료량 사이에서 함량이 비슷하게 나와 이 시료량 범위가 적정 시료량 이었고, 이때의 탄소량으로서는 0.949 mg C - 9.428 mg C 범위였다. 따라서 질소는 oven 온도를 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 분석하는 것이 좋고, 탄소는 oven 온도를 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 분석하는 것이 좋을 것으로 사료된다.



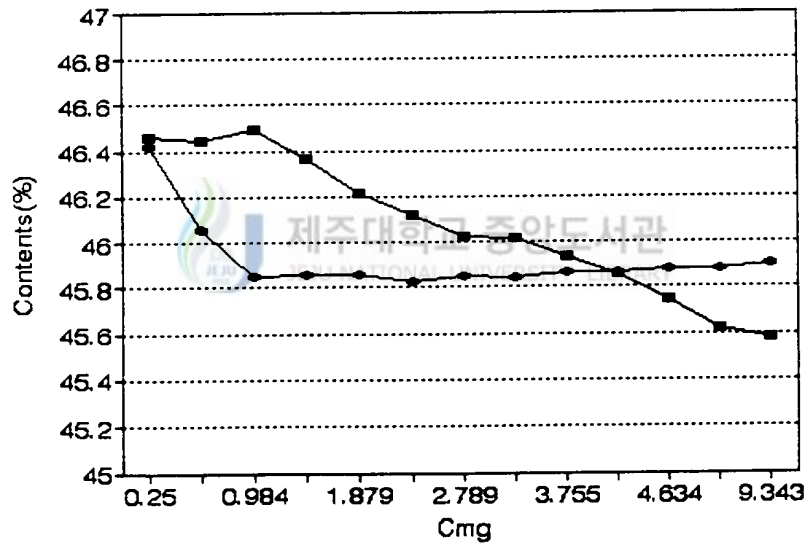
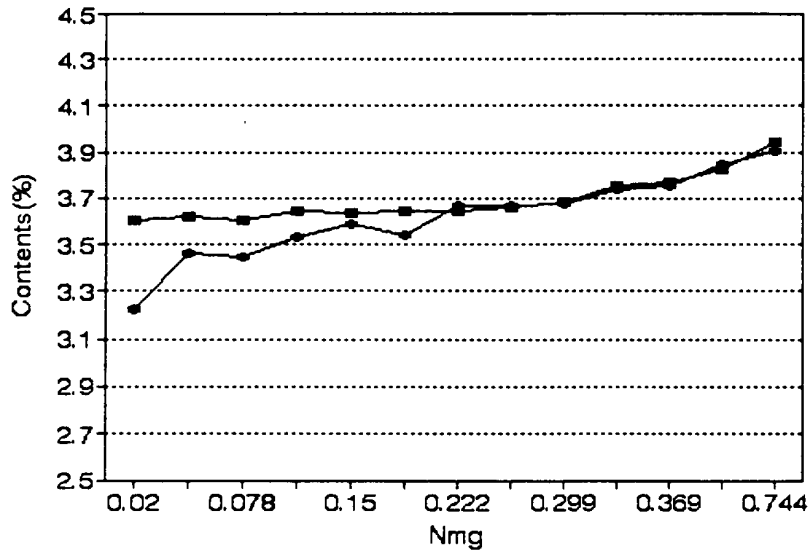


Figure 4. Changes of elemental contents depending on sample amounts at different oven temperatures

다. Kjeldahl법과의 비교(질소)

Table 9는 표준시료인 thiourea와 감귤잎을 액체질소에 동결시켜 고속분쇄기(mill)로 갈아 조제하여 212-300 μm 입자크기를 가지고 0.5 g의 시료량으로 켈달 방법에 의한 질소분석과 2.0 mg - 4.0 mg의 시료량으로 원소분석기에 의한 질소 분석간에 그 함량 차이를 비교한 결과이다. thiourea는 켈달법으로 분석하였을 때 질소가 36.837% 이었고, 원소분석기로 분석하였을 때 질소가 36.876%로서 분석치가 유사하였다. 감귤잎 시료는 두 방법간에 다소 차이를 보였는데, 켈달법에 의한 분석치는 질소가 3.515% 이었고, 원소분석기에 의한 분석치는 질소가 3.754%이었다. 켈달 분석방법이 원소분석기에 의한 방법보다 작은 함량이 나와 0.239%의 차이를 보여 6.5%의 오차를 보였다. 이는 시료의 불균질성 때문인 것으로 원소분석기에서는 미량의 시료를 취하기 때문에 더 높은 시료의 균질성을 요구함을 뜻하는 것으로 고분말도의 시료 조제방법이 필수적이라 생각되며, 시료 조제 및 시료를 취할때는 세심한 주의가 요망된다.

라. Tyurin법과의 비교(탄소)

Table 9는 표준시료인 thiourea와 감귤잎을 액체질소에 동결시켜 고속분쇄기(mill)로 갈아 조제하여 106 μm 입자크기를 가지고 0.5 g의 시료량으로 Tyurin법에 의한 탄소 분석과 2.0 - 4.0 mg의 시료량으로 원소분석기에 의한 탄소분석 간에 그 함량 차이를 비교한 결과이다. thiourea인 경우 Tyurin법에 의한 탄소의 분석치는 15.442% 이었고, 원소분석기에 의한 탄소의 분석치는 16.084%로서 함량이 비슷하였다. 감귤잎인 경우는 Tyurin법에 의한 탄소의 분석치는 40.188% 이었고, 원소분석기에 의한 탄소의 분석치가 46.416%로서 두 방법간에 6.228%의 차이를 보여 14%의 오차를 보였다. 이는 시료의 불균질성 차이로 생긴 것으로 고분말도의 시료 조제 및 시료를 취할때는 세심한 주의가 요망되며, 이와 같은 차이에 대한 원인을 밝히기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 9. Analytical reproducibility of the elemental analyzer and the Kjeldahl methods

	Nitrogen				Carbon			
	EA 1108		Kjeldahl		EA 1108		Tyurin	
	Thio. (%)	Cit. (LN) (%)	Thio. (%)	Cit. (LN) (%)	Thio. (%)	Cit. (M) (%)	Thio. (%)	Cit. (M) (%)
	36.701	3.694	36.609	3.543	16.043	46.303	15.475	40.266
	36.736	3.659	37.064	3.524	16.094	46.488	15.363	39.744
	36.745	3.630	37.064	3.524	16.080	46.615	15.594	39.566
	37.003	3.915	36.837	3.487	16.078	46.306	15.535	41.215
	37.197	3.870	36.609	3.496	16.144	46.363	15.244	40.149
Mean	36.876	3.754	36.837	3.515	16.084	46.416	15.442	40.188
SD	0.193	0.116	0.203	0.020	0.033	0.120	0.125	0.574
CV(%)	0.524	3.093	0.552	0.582	0.240	0.258	0.810	1.428

IV. 적 요

원소분석기(EA 1108, FISOONS))를 이용하여 표준시료 및 식물체(감귤잎) 시료 중의 탄소와 질소 분석법을 확립하였다.

1. 표준시료의 탄소와 질소 분석

가. 기기의 공시료 분석시 tin capsule에는 질소성분이 없고 탄소성분은 조금 있었지만 분석에는 영향을 주지 않았다.

나. 표준시료는 K-factor 재현성이 양호하였으며 변이계수가 질소는 2.119%, 탄소는 2.036% 이었다.

다. 표준시료의 적정 시료량은 질소의 경우 0.1 mg N - 1.0 mg N이었고, 탄소의 경우는 0.2 mg C - 8.5 mg C 이었다.

라. Oven 온도 40℃에서 질소의 retention time은 93 초이었으며, 탄소는 159 초인데 oven 온도를 70℃로 올리면 질소의 retention time이 101 초로 늘어나는 반면 탄소는 137 초로 짧아졌다. 따라서 컬럼온도를 40℃로 할때 peak 분리도가 좋았다.

2. 감귤잎 시료의 탄소와 질소 분석

가. 감귤잎 시료의 입자가 작을수록 탄소와 질소의 분석 재현성이 좋았다. 시료 조제 방법으로는 액체 질소에 동결하여 분쇄하는 것이 작은 입자의 분포가 많았기 때문에 동결건조 분쇄법이 건조기에 건조하여 분석하는 방법보다 더 양호하였다.

나. 분석시료의 적정 시료량은 질소가 0.02 mg N - 0.3 mg N 이었고 탄소는 1.0 mg C - 9.0 mg C이었다.

다. Kjeldahl법과 비교했을때는 thiourea의 경우는 원소분석기와 Kjeldahl법 간에 함량과 정밀도가 비슷하였으나 감귤잎의 경우는 원소분석기의 표준편차가 조금 더 컸다. 이는 원소분석기에서 미량의 시료를 취하기 때문에 더 높은 시료

의 균질성을 요구함을 뜻하는 것으로 고분말도의 시료 조제방법이 필수적이라 생각된다.

라. Tyurin법과 비교했을때는 thiourea의 함량은 두 방법 간에 비슷하였으나 감글잎의 경우는 두 방법 간의 차이가 14% 이었다. 이 같은 차이에 대한 원인을 밝히기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다고 생각되어진다.

V. 참고문헌

Bellomonte, G., A. Costantini and S. Giammarioli. 1987. Comparison of modified automatic dumas method and the traditional Kjeldahl method for nitrogen determination in infant food. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 70, No. 2, pp. 227-229.

Campbell, D. C. 1986. Micro-Kjeldahl analysis using 40-tube block digester and steam distillation. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 69, No. 6, pp. 1013-1016.

Colombo, B. and M. Baccanti. 1990. Automatic modified dumas combustion as an alternative to the Kjeldahl method. Poster presented at VII euroanalysis, 8/90, vienna.

Colombo, B., M. Baccanti and B. Dutko. 1988. Calculation of the heat value of solid and liquid fuels. Reprinted from international laboratory.

Colombo, B., M. Baccanti and J. Theobald. The simultaneous determination of carbon, hydrogen, nitrogen and sulphur using a new elemental analyser the EA 1108. Reprinted from international labmate XIII, issue 7.

Debot, S. A., F. S. Sadek, M. Baccanti and B. Colombo. 1989. Elemental gasoline analysis by automatic injection: characterization and heat value caculation. Reprinted from american laboratory, 8/89.

Debot, S. A. and F. S. Sadek. 1987. Elemental analysis of liquid fuels, Proceedings of the 6th international coal testing conference, 179, Charleston, WV.

Devani, M. B., C. J. Shishoo, S. A. Shah and B. N. Suhagia. 1989. Spectrophotometric method for microdetermination of nitrogen in Kjeldahl digest. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 72, No 6, pp. 953-956.

장호완 등. 1991. 도입 첨단 연구기기의 성능 평가 및 활용도 제고에 대한 기초 연구(1)-지구과학 관련 연구기기에 관하여. 기초과학연구센터. pp. 1-128.

Fisher, M. T. and C. Gurnsey. 1987. Scheme for validation of an analytical protocol: semiautomated Kjeldahl nitrogen determination. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 70, No. 3, pp. 405-409.

Giorgi, C., M. Natale, M. Baccanti and B. Colombo. 1989. Gunpowder characterization an innovative method by elemental analysis. Poster presented at the 11th international symposium on microchemical techniques, Wiesbaden, 28/ - 1/11.

Grappin, R. and W. Horwitz. 1988. Determination of nitrogen content in milk by the Kjeldahl method using copper sulfate: interlaboratory study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 71, No. 5, pp. 893-898.

Howarth, C. J. and R. Belcher. 1977. Instrumental organic elemental analysis. Academic Press, New York, NY, pp. 75-117.

Kirsten, W. J., 1983. Organic elemental analysis. Academic Press, New York, NY.

Minagawa, M., D. A. Winter and I. R. Kaplan. 1984. Comparison of Kjeldahl and combustion method for measurement of nitrogen isotope ratios in organic matter. Anal. Chem., 56, pp. 1859-1861.

농촌진흥원 농업기술연구소. 1988. 토양화학분석법-토양, 식물체, 토양미생물. pp. 38-70, 219-226.

Pella, E. 1990. Elemental organic analysis: historical developments. Reprinted from American laboratory.

Pella, E., B. Colombo and M. Baccanti. 1989 Processing analytical data using a new elemental analyser. Poster presented at the 11th international symposium on microchemical techniques, Wiesbaden, 28/8 - 1/11.

Sadek, F. S. and S. A. Debot. 1987. Rapid automated methods for coal ultimate analysis. Proceedings of the 6th international coal testing conference, p. 97 Charleston WV.

Watkins, K. L., T. L. Veum and G. F. Krause. 1987. Total nitrogen determination of various sample types: a comparison of the hach, combustion and Kjeldahl methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 70, No. 3, pp. 410-412.

감사의 글

본 논문이 나오기까지 시종 지도와 격려를 아끼지 않으신 유장걸 교수님께 마음 깊이 감사드립니다.

바쁘신 중에도 본 논문의 심사를 맡아 주신 류기중 교수님, 김찬식 교수님께도 심심한 감사를 드립니다.

아울러 늘 깊은 관심과 조언을 아끼지 않으신 강순선 교수님, 고정삼 교수님, 현해남 교수님, 그리고 이옥영 박사님께 감사드립니다.

특히 실험여건 및 화학분석기기의 사용에 협조하여 주신 제주대학교 공동실험실습관장 고정삼 교수님, 고정은 선생님 그리고 실험수행과 자료정리에 도움을 아끼지 않은 송성준 선생님, 홍경애 선생님과 안성웅, 오상호 후배와 송상철, 박명임, 김현희 학생에게 감사드립니다.

오늘이 있기 까지 염려하여 주시고 보살피 주신 부모님, 장인, 장모님, 친지들 그리고 어려운 여건에서도 성심으로 뒷바라지를 다한 아내 강인보에게 고마움을 전하며 사랑스런 아이 수아와 함께 이 기쁨을 나누고자 합니다.

