
碩士學位論文

同位元素 質量分析機에 의한 植物體中
 ^{15}N 測定法 確立 및 온주밀감의
尿素 葉面吸收量 測定

濟州大學校 大學院

農化學科



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

吳 尙 昊

1997年 6月

同位元素 質量分析機에 의한 植物體中
 ^{15}N 測定法 確立 및 온주밀감의
尿素 葉面吸收量 測定

指導教授 柳 長 杰

吳 尙 昊

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1997年 6月

吳尙昊의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審查委員長

柳 基 中

委 員

玄 海 男

委 員

柳 長 杰

濟州大學校 大學院

1997年 6月

^{15}N Analysis by Isotope Ratio Mass Spectrometer
and Determination of Urea Uptake by Satsuma
mandarin(*Citrus unshiu*) Leaves

Sang-Ho Oh
(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

1997. 6.

목 차

Summary

I. 序論	1
II. 材料 및 方法	5
실험 1. 식물체 시료중의 ^{15}N 측정조건 확립	5
1) 표준시료	5
2) 식물체 분말시료의 조제	5
3) 식물체 시료중의 ^{15}N 측정조건	6
가) 원소분석기에 의한 전질소 측정	6
(1) 원소분석기(Fisons Instruments, EA1108, Italy)의 구성 및 측정 원리	6
(2) 표준물질과 식물체 시료중의 전질소 측정	8
나) 동위원소 질량분석기에 의한 ^{15}N 측정	8
(1) 동위원소 질량분석기(VG Isotech, SIRA II, England) 구성 및 측정원리	8
(2) 표준물질과 식물체 시료중의 ^{15}N 측정	10
4) 실험내용	10
가) Tin capsule 세척효과	10
나) 원소분석기의 질소 K-factor 재현성 조사	10
다) 질소분석 시료의 적정량 결정	10
라) ^{15}N 측정 시료의 적정량 결정	11
실험 2. 온주밀감나무의 요소염면 흡수량 조사	11
1) 식물재료	11

2) 표지요소의 엽면처리	11
3) 감귤엽 시료 채취 및 ^{15}N 측정	11
4) 요소 엽면 흡수량의 계산	11
5) 실험내용	12
가) 처리농도별 엽면흡수된 ^{15}N 함량	12
나) 엽면흡수된 질소의 경시적 변화	12
Ⅲ. 結果 및 考察	13
실험 1. 식물체 시료중의 ^{15}N 측정조건 확립	13
1) Tin capsule 세척효과	13
2) 원소분석기의 질소 K-factor 재현성 조사	16
3) 질소분석 시료의 적정량 결정	17
4) ^{15}N 측정 시료의 적정량 결정	18
실험 2. 온주밀감나무의 요소 엽면흡수량 조사	19
1) 처리농도별 엽면흡수된 ^{15}N 의 함량	19
2) 엽면흡수된 질소의 경시적 변화	19
Ⅳ. 摘 要	22
Ⅴ. 參 考 文 獻	23

Summary

This study was conducted to establish the analytical conditions for determining ^{15}N abundance ratio in plant leaves by the isotope ratio mass spectrometer. Effect of some factors related to the equipment performance such as tin capsule cleaning, ion source tuning, sample size and K-factor for total N analysis by the elemental analyzer were investigated using the standard reagents (urea and acetanilide), and citrus leaves.

In addition, urea uptake by citrus leaves was measured with 8 and 20-month old leaves were dipped in ^{15}N labelled urea solution (1.776 atom excess %) mixed with 0.05% surfactant and harvested 1, 2, 3, 10 and 17 days after ^{15}N labelled urea application.

1. The analytical conditions for determining ^{15}N isotope ratio in plant leaves
 - a. N-peak was observed from the blank sample of tin capsule which is not cleaned. However, N-peak disappeared after cleaning tin capsules with acetone.
 - b. K-factor for total N determination by the elemental analyzer was evaluated in terms of the instrument stability. The result showed that the coefficient of variation for K-factor was low enough to obtain a good reproducibility.
 - c. The optimal amount of standard reagents, (urea and acetanilide) and leaf sample for N analysis were in the range of 1 to 3 mg.
 - d. The optimal N amount for ^{15}N isotope ratio analysis was in the range of 0.359 to 0.424 mg.

2. The urea uptake by citrus leaves

- a. The amount of N absorbed by citrus leaves was increased by elevating the applied urea concentrations and had a maximum at 0.8~1.2% of urea concentrations.
- b. N amount contained in the leaves increased until 2 days after foliar application but thereafter decreased because N-translocation to the shoot became much more than N-uptake from leaf surface.
- c. N absorption by 8-month-old leaves was higher than 20-month-old leaves.



I. 서론

1913년 Hevesy와 Paneth가 납염의 용해도를 연구하기 위해 ^{210}Pb 를 사용하게된 이후 동위원소 추적자법은 농학, 생물학, 화학, 의학과 물리학의 연구에 있어서 유용한 실험방법의 하나로 발전되었고, 오늘날에도 동위원소 이용기술은 화학 실험 방법중에서 가장 예민한 방법으로 인정되고 있으며 자연과학 분야의 연구에서는 꼭 필요한 실험 수단으로 많이 활용되고 있다(Lannunziata 와 Legg, 1984).

질소에는 모두 6개의 동위원소(^{12}N , ^{13}N , ^{14}N , ^{15}N , ^{16}N , ^{17}N)가 있는데 그 중 ^{15}N 은 방사능 동위원소로써 일부의 화학 및 생물학 연구에서 추적자로 가끔 사용되고 있지만 반감기가 10.5분으로 매우 짧아 비료의 이용률 및 토양에서의 질소행동 등 장시간 관찰이 필요한 농학분야의 질소 관련 연구에는 사용하기가 매우 부적합하다.

질소의 안정 동위원소에는 ^{14}N 과 ^{15}N 이 있는데, 추적자로 사용되는 것은 상대적으로 함량이 낮은 ^{15}N ($0.3663 \pm 0.0004 \text{ atom\%}$)이다. 이러한 안정 동위원소를 추적자로 사용할 때의 장점은 인체에 대한 방사선 장애, 처리된 세포 또는 생물의 방사선에 의한 손상 우려, 그리고 실험기간의 제한성을 배제할 수 있다는 것이다(IAEA-TEC-DOC-288, 1993).

질소 동위원소 ^{15}N 존재비를 측정하는 방법으로는 강한 전기장과 자기장하에서 m/e 비 차이에 의해서 분리되는 것을 근거로 한 질량분석법과 N_2 의 근적외선의 발광분석법(Yasuhiro, 1981)이 있는데 측정의 정밀성면에서는 질량분석법이 훨씬 좋다. ^{15}N 측정을 위해서는 시료를 N_2 가스로 변형시켜야 하는 복잡한 과정과 분석경비가 많이 소요되는 단점이 있으나 공중질소의 고정, 질소의 무기화작용, 비료의 이용률 그리고 질소대사 등의 토양 및 작물연구에 있어서 기존의 어떠한 실험방법도 그 정확성과 예민성 면에서 이를 대체할 수 없다.

질소 동위원소 측정은 Rittenberg 등(1939)에 의해서 처음 개발되었는데, 이 방법은 Kjeldahl 방법으로 시료중의 ^{15}N 표지 질소를 황산분해하여 암모늄태 ^{15}N 표지 질소로 만든 뒤 이를 공기가 완전히 제거된 Rittenberg Y관에서 차아브롬산나트륨으로 산화시켜 질소가스로 만들고 질량분석기로 질소가스를 도입시킴으로써

^{15}N 을 측정하는 방법이다($2\text{NH}_3 + 3\text{NaOBr} = 3\text{NaBr} + 3\text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$). 이러한 실험과정은 수동으로 이루어지기 때문에 분석 시료수가 많을 경우 시간이 많이 소비되며 질소량이 1 mg 정도는 되어야 정상적인 질소 정량과 ^{15}N 분석이 가능하다. 따라서 McIneer와 Montoya(1981)는 Rittenberg 분석법을 자동화하여 매 시료마다 수동으로 해야 하는 실험조작의 번거로움을 줄였고 하루에 분석할 수 있는 시료량을 늘려 주었을 뿐만 아니라 질소량이 적을 때(25 μgN)에도 분석이 가능케 했다. 이처럼 최근 Rittenberg 분석법에 근거한 자동분석 장비가 개발(Mulvaney et al., 1990; Mulvaney and Liu, 1991)되어 과거보다 신속하게 많은 양의 액체시료 분석이 가능하게 되었지만, 식물이나 토양과 같은 고체시료를 분석하기 위해서는 황산분해법으로 장시간 분해하여 $\text{NH}_4\text{-N}$ 으로 전환하기 때문에 여전히 시간과 노력이 많이 드는 편이다. 또한, 분석의 재현성을 높이기 위해서는 질소가스 시료 중에 불순물(아민, 산소, 질소산화물)과 공기의 혼입을 방지하는 등 전처리 과정에 대한 숙련된 고도의 기술이 요청된다.

반면에, Dumas법은 유기물을 고온에서 산화시킨 뒤 발생된 가스의 부피를 측정하는 것인데, 이 방법의 원리를 이용하여 원소분석기가 제작되었다(Yang et al, 1994). 전자와 컴퓨터 공학의 발달로 원소분석기를 질량분석기에 직접 연결하여(Otsuki et al., 1983; Preston and Owend, 1983; Barrie and Workman, 1984; Marshall and Whiteway, 1985; Preston and McMillan, 1988; Barrie and Lemley, 1989; Barrie et al. 1989; Egsgaard et al. 1989; Harris and Paul, 1989; Schepers et al., 1989; Barrie, 1991; Craswell and Eskew, 1991; Jensen, 1991) 사용하는 방법이 고안됨으로써 기존의 Rittenberg법과 달리 복잡한 여러 실험단계를 줄일 수 있어 분석 방법이 간편해졌고, 표지 시료의 질소 정량과 존재비의 측정이 동시에 이루어지기 때문에 많은 양의 식물체나 토양시료를 분석할 때 매우 유리하다. 특히 Rittenberg 법에서와 같은 숙련된 기술이 크게 요구되지 않고 질소이외의 기화물질(H_2O , CO_2)을 제거하는 트랩과 N_2O 를 N_2 로 전환하는 환원관이 있어 순수한 N_2 발생이 가능하여 오염의 염려가 없고 실험실의 청결 상태에 따라서는 μg 이하 수준의 질소량도 분석이 가능하다는 장점(Owens and Rees, 1989)이 있다.

따라서 원소분석기가 연결된 질량분석기는 분석이 간편하고 신속하기 때문에 질소 동위원소 분석에 많이 활용되고 있으나 기기 자체가 매우 민감하고 극히 미

량의 양을 분석하는 장비이므로 측정치에 대한 신뢰성을 얻기 위해서는 숙련된 기술이 요구되고 있으며 각종 시료에 대한 분석조건을 확립하기 위한 연구가 매우 필요하다.

비료의 삼요소중 질소는 작물의 성장과 결실에 매우 큰 영향을 미친다(趙, 1996). 감귤나무에서도 질소과다는 과일의 숙기를 지연시키는 등 과일의 품질에 지대한 영향을 준다. 따라서 질소의 시비조절은 농업 생산성 측면뿐만 아니라 나아가 지하수 중의 질산성 질소 오염방지 측면에서도 간과해서는 안 될 일이다(申, 1996).

엽면시비는 토양시비를 통해 공급이 원활치 못한 양분, 특히 미량원소 등을 식물에 보충하여 주기 위한 방법에서 시도되기 시작하였으나, 최근의 질소 엽면시비는 환경오염방지 측면에서 기존 토양시비법의 대안으로 제시되고 있다(Lea-cox and Syvertsen, 1995). 질소질 비료에서 요소는 엽면흡수가 매우 잘 되는 비료종으로 알려져 있으며(趙, 1996), Embleton 과 John(1974)은 오렌지류의 감귤인 경우 년 3~6회 정도 요소의 엽면시비만으로도 질소공급이 충분하고 과일의 생산성을 유지할 수 있다고 보고했다.

그러므로, 질소 과다시비가 줄 곳 제기 되어온 본도에서도 합리적인 질소비료의 공급을 위한 한 방안으로 온주밀감에 대한 질소질 비료의 엽면살포 시도도 바람직하다. 일반적으로 엽면시비된 요소의 흡수율을 측정하기 위해서 micro-conway법(金, 1987)이 사용되고 있으나 요소 정량법의 검출한계 때문에 실험을 위해 처리하는 요소농도는 실제로 작물에 살포하는 엽면시비의 농도 범위보다 훨씬 높은 고농도(5%)로 처리하게 된다. 이때 고농도에 의해 엽이 손상되어 정상적인 엽면흡수가 이루어질 수 없게 되어 실제 살포농도의 흡수율과는 차이가 클 수 있다.

따라서 John등(1995)이 ^{15}N 표지 비료를 이용하여 grapefruit에 대한 질산칼륨과 요소의 엽면흡수율을 정확히 측정했다는 보고가 있었던 것처럼 온주밀감에 질소질 비료의 흡수율을 알기 위해서는 ^{15}N 분석법의 도입이 요청되고 있다.

특히, 본도의 감귤원에는 농약살포와 한발시 관수를 위해서 스프링클러 시설이 정부의 예산지원과 농민 자비부담에 의해 시설되어 있는 바, 이러한 시설을 비료의 엽면살포로 활용할 경우 비료를 적기에 적량을 공급할 수 있기 때문에 비료의 사용량을 효율적으로 조절할 수 있고 품질 좋은 감귤을 생산할 수 있을 뿐만 아니

라 시비에 따르는 노동력과 경비를 절감할 수 있어서 농업 부가가치 증진에도 기여하는 바가 클 것으로 기대된다. 또한, 수확 후 감귤나무의 질소 시비관리는 수세 회복, 봄의 신초생장, 착화, 동계기간의 내한성 증진, 이듬해의 결실에도 지대한 영향을 끼친다. 사과에서도 수확 후의 질소 엽면시비로 화아발육과 착과율(金, 1987)을 증가시킨다고 보고하고 있다.

따라서 본 연구의 목적은 표준시료와 감귤시료를 이용하여 원소분석기의 K-factor 재현성, 질소와 ^{15}N 측정용 시료의 적정량을 조사함으로써 원소분석기 (Fisons Instruments, EA1108, Italy)가 부착된 동위원소 질량분석기(VG Isotech, Sira II, England)를 이용한 식물체 중의 ^{15}N 동위원소 측정법을 확립하고, ^{15}N 표지 요소비료를 이용하여 감귤 수확 후 엽에 시비된 질소의 흡수량을 조사함으로써 질소시비 관리의 기초자료를 제공하는데 있다.



II. 재료 및 방법

실험 1. 식물체 시료중의 ^{15}N 측정조건 확립

1) 표준시료

전질소와 질소동위원소 ^{15}N 을 분석하기 위한 표준시료로써 acetanilide(Fisons Instruments, S. P. A)와 urea(Yakuri Chemical Co., 98%)를 사용하였다.

Table 1. The N concentrations of standard compounds.

Standard chemicals	N(%)
Urea	45.69
Acetanilide	10.36

2) 식물체 분말 시료의 조제

원소분석기가 연결된 질량분석기의 ^{15}N 측정조건을 확립하기 위하여 제주대학교 부속감귤원에서 재배되고 있는 20년생 조생은주(*Citrus Unshiu* Marc. var. Miyagawa) 감귤나무의 엽을 채취하여 흐르는 수돗물에서 씻어낸 후 60°C로 조절된 건조기에서 48시간 동안 말렸다. 그 후 건조시료를 잘게 부수어 전량을 시료 마쇄병에 스테인레스봉과 함께 넣고 rolling machine을 이용하여 3일간 마쇄하여 균질한 미세분말 시료를 조제하였다.

3) 식물체 시료중의 ¹⁵N 측정

가) 원소분석기에 의한 질소 측정

(1) 원소분석기(Fisons Instruments, EA1108, Italy)의 구성 및 측정원리

원소분석기는 자동시료 공급장치, 산화관, 환원관, 가스크로마토그래피용 oven 및 칼럼, TCD(Thermal Conductivity Detector) 검출기 그리고 컴퓨터로 구성되어 있고, 산화용 가스로 산소(99.999%)를 사용하고 헬륨가스는(99.999%)을 운반체로 이용하였다.

분석원리는 그림 1에서와 같이 자동시료 공급장치에 의해 시료가 주입되면 동시에 산소가 공급되면서 유기화합물은 1,800℃의 고온에서 순간적으로 연소되어 연소생성물(N₂+N_xO_y, CO₂, H₂O와 SO₂+SO₃)을 형성한다. 이러한 연소가스들은 환원로를 거치게 되고 탈습과 탈탄소 과정을 거쳐 GC oven에 내장된 칼럼에 의해 분리가 되면서 N₂는 TCD검출기에서 열전도도로 측정되어 K-factor에 의해 정량이 이루어진다. K-factor는 원소조성을 알고 있는 표준시료를 분석함으로써 결정이 되고 다음과 같은 계산식에 의하여 산출되었다.

$$K = \frac{\%t \times WS}{I-B}$$

% t : Theoretical percentage of the element in the standard

WS : Weight of the standard in mg

I : Peak area for the standard

B : Peak area for the blank

그리고 질소함량은 아래와 같은 식에 의하여 산출되었다.

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

\bar{K} : Average of K-factor

B : Peak area for the blank

W : Weight of sample in mg

I : Peak area for the sample

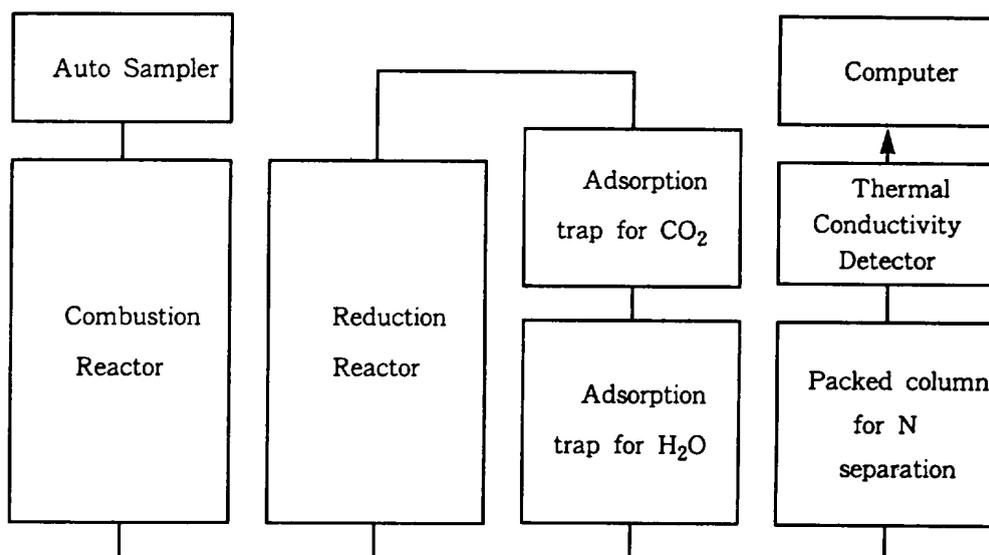


Fig 1. Block diagram of an elemental analyzer.

Table 2. N analysis conditions of the elemental analyzer.

Carrier gas(He)	80 ml / min
Oxygen	20 ml / min
Combustion reactor temperature	1020℃
Reduction reactor temperature	650℃
Filament temperature	190℃
GC column	Porapak QS, 2 m in length 6 mm x 4 mm in diameter
GC oven temperature	60℃
Total run time	240 sec
Sample size	1 ~ 3 mg

(2) 표준물질과 식물체 시료중의 질소 측정

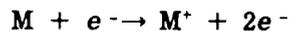
표준물질인 요소를 0.806 ~ 0.850 mg, 감글엽 시료는 14 ~ 16 mg을 각각 tin capsule에 취하여 밀봉한 뒤, 원소분석기의 자동시료 공급기에 넣어 표 2의 기기조건에 의해서 질소를 정량 하였다.

나) 동위원소 질량분석기에 의한 ^{15}N 측정

(1) 동위원소 질량분석기(VG Isotech, SIRA II, England) 구성 및 측정원리

질량분석기는 그림 2와 같이 구성되어 있으며, 장치상의 특징은 시료 도입부로부터 검출부에 이르기까지 고진공 상태를 유지하는 것이다. 이것은 이온화된 시료 분자가 공존하는 동종과 이종의 분자나 이온의 상호작용을 방지하는 것이다.

질소 동위원소비율의 분석원리는 그림 3에 나타냈는데, 원소분석기에 의해 분리된 N_2 가스는 고진공에서 전자충격에 의해 다음과 같은 메카니즘에 따라 분자이온이 형성된다.



이때 분자이온빔은 음전하의 전위차에 의해서 가속되어 60° 각도로 기울어진 강한 자기장을 통과하면서 질량과 전하의 비 즉, $\frac{m}{e}$ 의 값에 따라 양이온의 비행궤적 각도가 달라지게 되어 질량수에 따른 분자이온의 분리가 일어나 각각의 이온 수집기에 도달하게 된다.

질소의 경우는 $^{30}\text{N}_2^+(\frac{m}{e} 30) > ^{29}\text{N}_2^+(\frac{m}{e} 29) > ^{28}\text{N}_2^+(\frac{m}{e} 28)$ 순으로 자기장에서 굽어지는 정도가 감소한다.

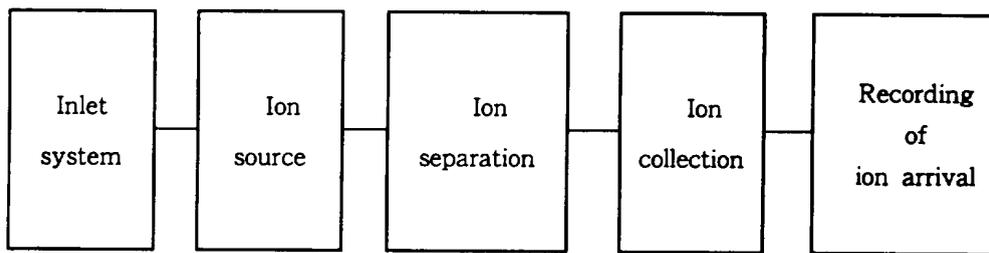


Fig 2. Block diagram of mass spectrometer. The whole system is maintained under vacuum.

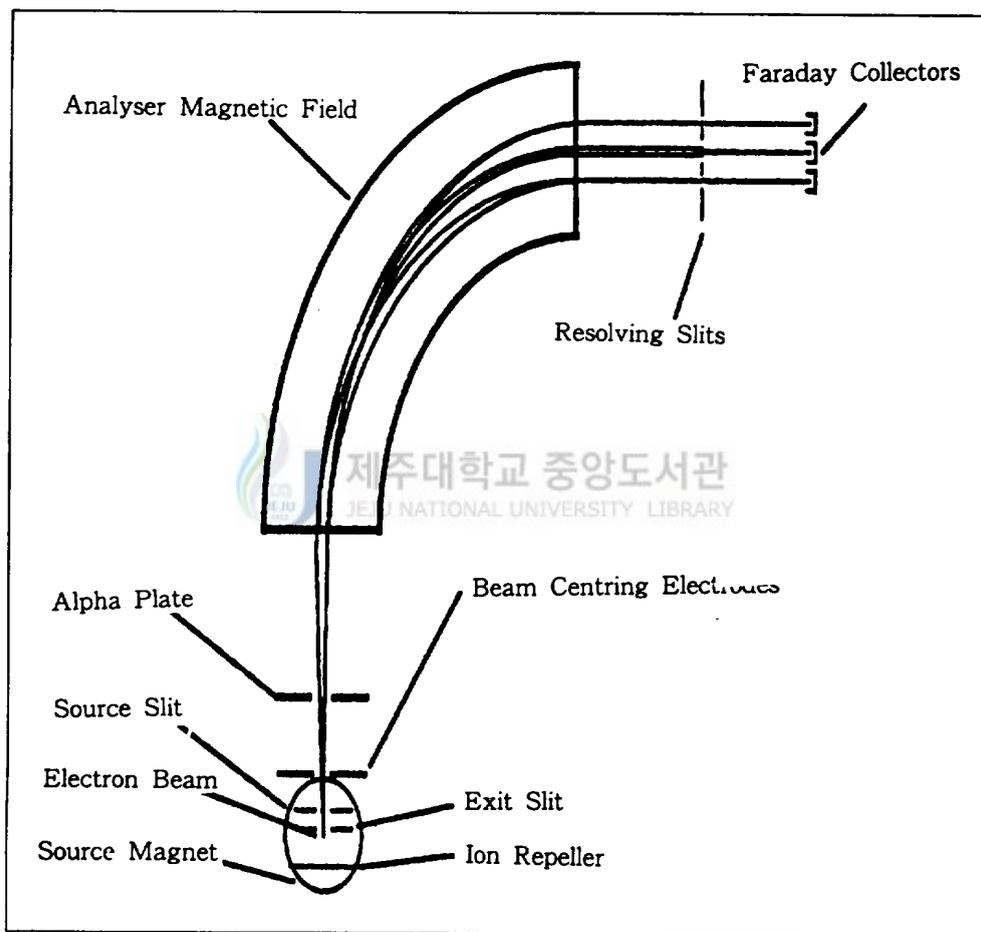


Fig 3. Mass Separation Diagram

Table 3. Optimal conditions of ion source tuning for ^{15}N mass spectrometer.

Parameters	Continuous Flow Mode
Source Current(mA)	0.8
Trap Current(μA)	0.2
Ion Repeller	-5 ~ -1
Electron Volts(V)	100 ~ 110
High Voltage(kV)	4,176 ~ 4,180
Half Plates(%)	25
δ Half Plates(%)	-1 ~ 0

(2) 표준물질과 식물체 시료중의 ^{15}N 측정

가)의 (2)에 의해서 분리된 N_2 는 질량분석기에 직접 도입되어 표 3의 조건에 의해서 ^{15}N 동위원소 존재비를 측정하였다.

4) 실험내용

가) Tin capsule 세척효과

tin capsule 세척 유무가 공시료 중의 N peak에 미치는 영향을 알아 보고자 아세톤에 2시간 동안 침지시켜 불순물을 제거한 후 1시간 동안 80°C 에서 건조한 tin capsule과 세척하지 않은 시료 사이에 N peak 양상을 비교하였다.

나) 원소분석기의 질소 K-factor 재현성 조사

2.0 mg 내외의 acetanilide를 15회 반복으로 취한 후 표 2의 조건으로 질소함량을 측정하여 K-factor를 구하였고 이에 대한 변이계수를 계산하였다.

다) 질소분석 시료의 적정량 결정

질소측정 시료의 적정량을 정하기 위해 요소와 acetanilide 그리고 감글엽 분말 시료를 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 mg을 취한 뒤 질소함량을 측정하여 이론치와 비교하였고 표준편차와 변이계수를 계산하였다.

라) ^{15}N 측정시료의 적정량 결정

^{15}N 측정시료의 적정량을 알아보기 위하여 요소와 감글엽 분말시료를 0.777 mg(0.359 mg N) ~ 0.932 mg(0.424 mg N) 범위에서 취한 뒤 ^{15}N 동위원소 존재비를 측정하였다.

실험 2. 온주밀감나무의 요소엽면 흡수량 조사

1) 식물재료

제주시 영평동 소재 감글농장(비화산회토)에서 재배되는 수세가 균일한 16년생 조생온주 감글나무인 궁천조생과 남제주군 남원읍 의귀리 소재 감글농장(화산회토)의 26년생 궁천조생을 공시식물 하였다.

2) 표지요소의 엽면처리

요소의 엽면처리는 감글 수확 후인 1996년 12월 11일에 한 그루당 15개의 8개월 된 성엽과 20개월 된 구엽을 0.05% 전착제와 ^{15}N -urea (1.776 atom excess %) 용액에 침지시켰다. 이때 처리된 양은 요소용액의 처리전·후의 무게차로 부터 계산하였다.

3) 감글엽 시료 채취 및 ^{15}N 측정

엽면처리된 감글엽을 채취하여 수돗물로 엽표면을 씻은 뒤 60℃에서 48시간 건조시켜 건물량을 측정하고 실험 1의 2) 방법으로 분쇄하여 실험 1의 3) 가)와 나)의 방법으로 질소함량과 ^{15}N 동위원소 존재비를 측정하였다.

4) 요소엽면 흡수량의 계산

살포된 비료로부터 유래한 ^{15}N 표지요소를 산정하고 이를 엽중 질소함량에 곱하여 엽면을 통해 흡수된 질소량을 계산했고 다시 침지된 요소용액의 질소량으로 나누어 요소의 엽면흡수량을 계산하였다.

$$\%NdfF = \frac{\% \text{ }^{15}\text{N atom excess in leaf sample}}{\% \text{ }^{15}\text{N atom excess in urea}} \times 100$$

* $\%NdfF$: Percentage of N derived from Fertilizer

5) 실험내용

가) 처리농도별 엽면 흡수된 ^{15}N 의 함량

^{15}N 표지요소의 농도를 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 및 2.4%로 상이하게 조제하여 실험 2의

2) 방법으로 감귤엽에 처리하고 2일 후 엽을 채취하여 ^{15}N 를 측정하였다.

나) 엽면 흡수된 질소의 경시적 변화

0.4% ^{15}N 표지요소를 실험 2의 2) 방법으로 감귤엽에 처리하고 1, 2, 3, 10 및 17일 후의 엽을 채취하여 ^{15}N 을 측정하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

실험 1. 식물체 시료중의 ^{15}N 측정조건 확립

1) Tin capsule 세척효과

표 4와 그림 4는 아세톤을 이용하여 tin capsule을 세척한 것과 세척하지 않았을 때 공시료 중의 N 검출유무를 조사한 결과이다.

tin capsule을 세척하지 않고 원소분석기로 측정한 공시료의 질소 평균 peak 면적은 $15,753(\mu\text{V} \times \text{sec})$ 이었으나, 세척한 경우는 peak가 검출되지 않았다. 한편, 질량 분석기에 의한 동위원소 존재비 측정에서는 ^{15}N peak가 tin capsule 세척유무에 관계없이 나타나지 않았다. 따라서, ^{15}N 추적자를 이용한 질소흡수 실험을 수행할 때 질소함량을 측정하는 것은 매우 기본적인 사항이므로 비록 ^{15}N 존재비 측정에서 tin capsule 세척유무가 영향을 주지 않았으나 원소분석기에 의한 질소분석시 공시료의 peak가 나타나고 있어 tin capsule의 아세톤 세척은 반드시 필요하다고 생각된다.

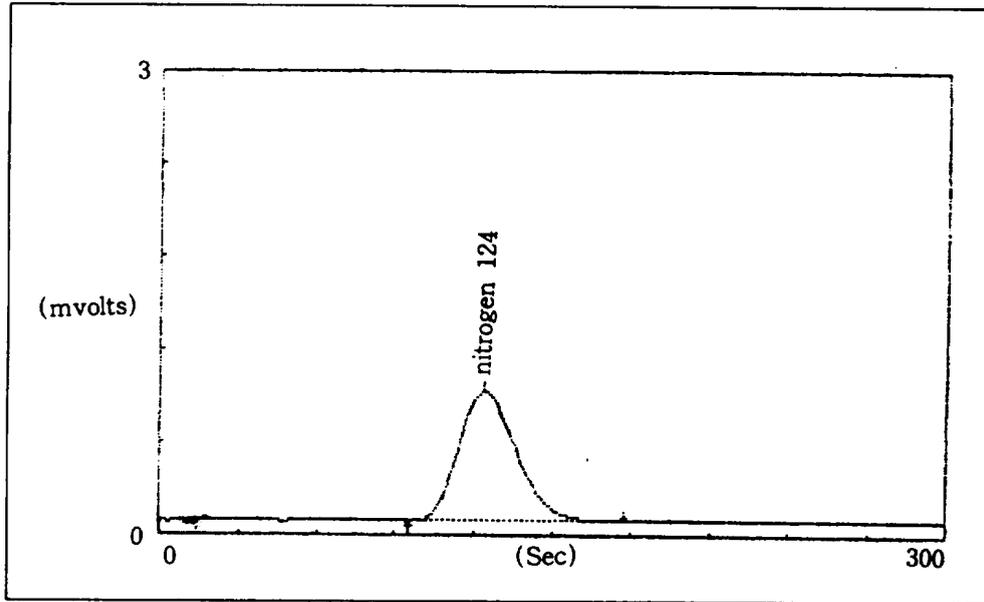


Table 4. Acetone-cleaning effect of tin capsule on N peak area of blank sample as measured by the elemental analyzer.

Replications	Non-cleaned tin capsule	Acetone-cleaned tin capsule
1	14,668	N.D
2	14,290	N.D
3	13,667	N.D
4	14,158	N.D
5	15,160	N.D
6	21,236	N.D
7	20,954	N.D
8	14,857	N.D
9	14,542	N.D
10	13,999	N.D
Aver.	15,753	N.D
S.D	2,848	N.D
C.V(%)	18	N.D



Non-cleaned tin capsule



Acetone-cleaned tin capsule

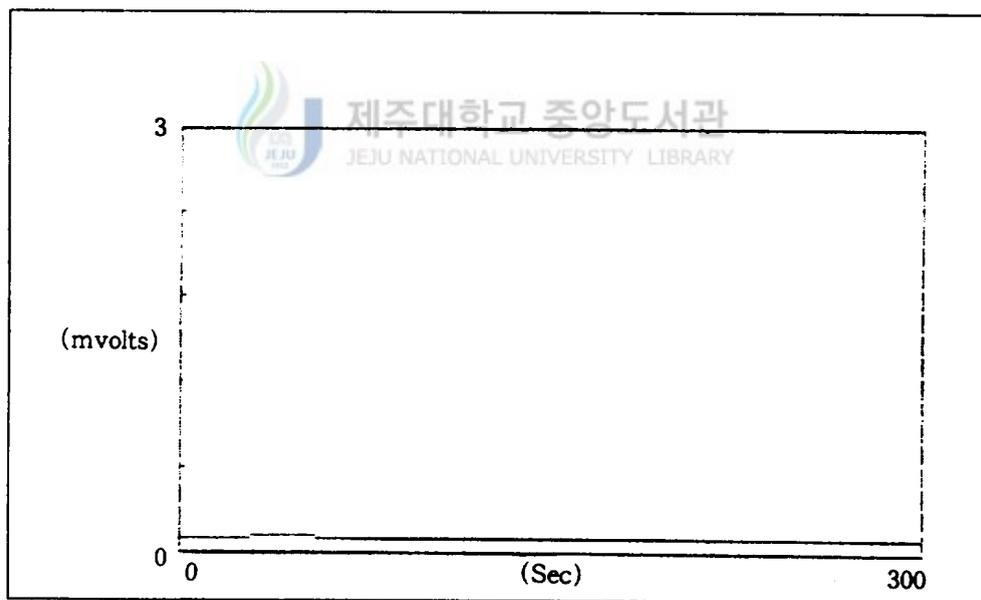


Fig 4. Acetone-cleaning effect of tin capsule on N peak area of blank sample as measured by the elemental analyzer.

2) 원소분석기의 질소 K-factor 재현성 조사

Pella(1989)와 양(1994) 등은 유기물의 성분 함량을 결정하는데 K-factor calibration mode에 의해 정확하게 결정할 수 있다고 하였다. 따라서 본 분석에서도 K-factor calibration mode에 의한 방법을 이용하여 K-factor의 재현성을 검토하고자 표준시료 acetanilide 2.0 mg 정도를 취하여 질소함량을 측정한 뒤 K-factor와 변이계수를 계산하여 표 5에 나타냈다. 측정된 K-factor는 반복치간에 유사하였고 낮은 변이계수값(1.49%)과 함께 양호한 재현성을 보였다.

Table 5. K-factor reproducibility for nitrogen.

Sample size (mg N)	K-factor for nitrogen($\times 10^{-6}$)
2.0 mg(0.207 mg N)	4.44
	4.38
	4.55
	4.51
	4.44
Ave. 4.46	
C.V.(%) 1.49	

* Acetanilide was used as standard for the measurement of nitrogen using the elemental analyzer.

3) 질소분석 시료의 적정량 분석

질소분석에 사용될 시료의 적정량을 알아보기 위해 acetanilide, urea 및 감귤엽 시료의 양을 달리 취한 뒤 5반복으로 질소함량을 측정하여 그 결과를 나타냈다(표 6).

1.0~3.0 mg의 시료량의 범위에서 그 양에 관계없이 질소함량이 거의 동일하여 질소의 이론치와 측정치간의 오차가 매우 적었다. 그러나 1 mg 이하의 시료량을 취할 경우 미량이어서 무게를 칭량할 때 오차가 발생할 수 있고, 3 mg 이상의 시료를 취할 때에는 환원제와 산화제의 소모량이 많아지고, 시료를 tin capsule에 넣어 foiling 하기가 곤란하다. 따라서 1.5~2.5 mg 범위의 시료량을 취하는 것이 측정의 신뢰도를 높이고 또한 사용되는 시약의 소모량을 줄일 수 있다고 생각된다.

Table 6. Optimal range of sample amount for N measurement using the elemental analyzer.

Sample size (mg)	N content(%)		
	Urea	Acetanilide	Citrus leaf
1.0	46.430	10.360	2.660
1.5	46.520	10.380	2.680
2.0	46.690	10.370	2.660
2.5	46.480	10.350	2.580
3.0	46.460	10.380	2.680
Aver.	46.516	10.368	2.652
S.D	0.103	0.013	0.041
C.V(%)	0.221	0.126	1.564

4) ^{15}N 측정시료의 적정량 결정

urea양을 달리 취하여 ^{15}N 동위원소비를 측정하였는데, 취해진 시료량의 범위에서는 그 존재비의 편차 및 변이계수가 3% 보다 작았다. 따라서 질소함량이 0.359 ~ 0.424 mg N인 범위에서는 시료량에 따라 존재비의 차이가 거의 없었기 때문에 측정을 위해 취해지는 시료량이 다소 다르더라도 존재비 측정에 큰 문제가 없을 것으로 생각된다.

Table 7. Optimal range of sample size for ^{15}N measurement using the mass spectrometer.

Amount of Urea mg(mg N)	% ^{15}N atom
0.770(0.359 mg N)	0.36732
0.780(0.364 mg N)	0.36646
0.790(0.368 mg N)	0.36607
0.800(0.373 mg N)	0.36583
0.810(0.378 mg N)	0.36685
0.820(0.382 mg N)	0.36702
0.830(0.387 mg N)	0.36655
0.840(0.392 mg N)	0.36773
0.850(0.396 mg N)	0.36702
0.860(0.401 mg N)	0.36673
0.870(0.406 mg N)	0.36635
0.880(0.410 mg N)	0.36719
0.890(0.415 mg N)	0.36755
0.900(0.420 mg N)	0.36705
0.910(0.424 mg N)	0.36664
Aver.	0.36682
S.D	0.00055
C.V(%)	0.14907

실험 2. 온주밀감나무의 요소 엽면흡수량 조사

1) 처리농도별 엽면흡수된 ^{15}N 의 함량

흡수된 질소량은 영평과 남원감굴원 모두 농도가 높을수록 증가하다가 고농도에서는 감소하는 경향을 보였다. 남원감굴원의 0.8% 농도와 영평감굴원의 1.2% 농도에서 엽면흡수된 요소량이 최대치를 보였다(그림 5). 이는 영평감굴원의 수세가 남원보다 불량했다는 점을 감안할 때 지역별로 엽면 흡수량이 차이를 보인 것은 이들 감굴원 간의 수세차이에 기인된 것으로 사료된다.

2) 엽면흡수된 질소의 경시적 변화

0.4% 농도에서의 엽면흡수된 질소량의 경시적 변화 양상을 살펴보면, 남원 감굴원인 경우 8개월된 성엽의 엽면흡수된 질소량은 요소처리 1일 후에 1.5 mg N이었고 2일 후는 2.0 mg N이었으며 그 후에는 흡수량이 감소하는 경향을 보였다. 20개월된 구엽에서는 1일 후 1.3 mg N, 2일 후 1.6 mg N을 보여 8개월된 성엽보다 요소 흡수량이 적었다(그림 6).

한편, 영평 감굴원인 경우 8개월된 성엽의 요소 흡수량은 처리 1일후 1.2 mg N, 2일 후 1.6 mg N이고 그 후에는 흡수량이 감소하는 경향이였다. 20개월된 구엽에서는 1일 후 0.6 mg N, 2일 후 1.3 mg N이었다. 또한 남원 감굴원의 경우와 마찬가지로 8개월된 성엽이 20개월된 구엽에 비해 요소의 흡수량이 컸다(그림 6).

일반적으로 감굴나무에서는 엽면살포된 질소의 50%가 흡수된다고 알려져 있으며, Impey와 Jones(1960)는 워싱턴 네블 오렌지엽에 5%요소용액을 살포했을 때 살포된 요소용액의 70~80%가 30시간 내에 모두 흡수가 되며, 사과에서는 48시간 내에 80%가 흡수된다고 보고하고 있으며, 신엽의 이면에서의 요소흡수가 구엽보다 훨씬 더 많다고 하였다. 감굴나무의 엽면적당 ^{15}N 의 흡수는 구엽보다 신엽이 1.6~ 6배로 훨씬 더 흡수된다고 보고된 바 있는데(John D. Lea-cox and James P. Syvertsn), 본 실험에서도 2일내의 흡수량은 신엽이 높았다. 또한 岩 등(1991)은 오렌지엽에 의해 흡수된 요소의 상당량은 몇 시간 이내에 식물체의 다른 부분으로 轉移된다고 보고하였는데, 본 실험에서도 시간이 지나면서 흡수율이 떨어지는 경향을 보였는데 이는 질소 성분이 수체내로 전이가 이루어졌기 때문이라 생각된다.

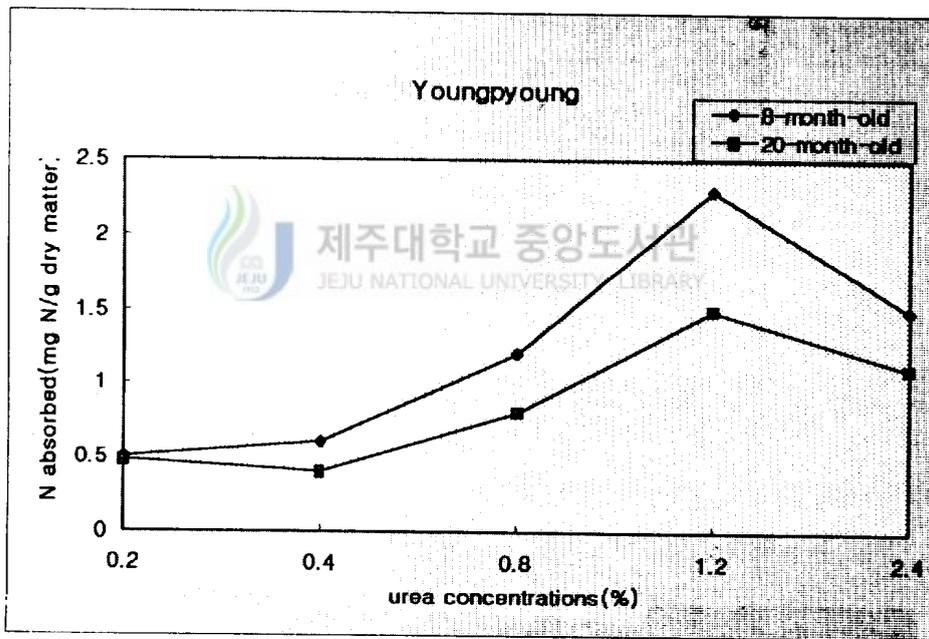
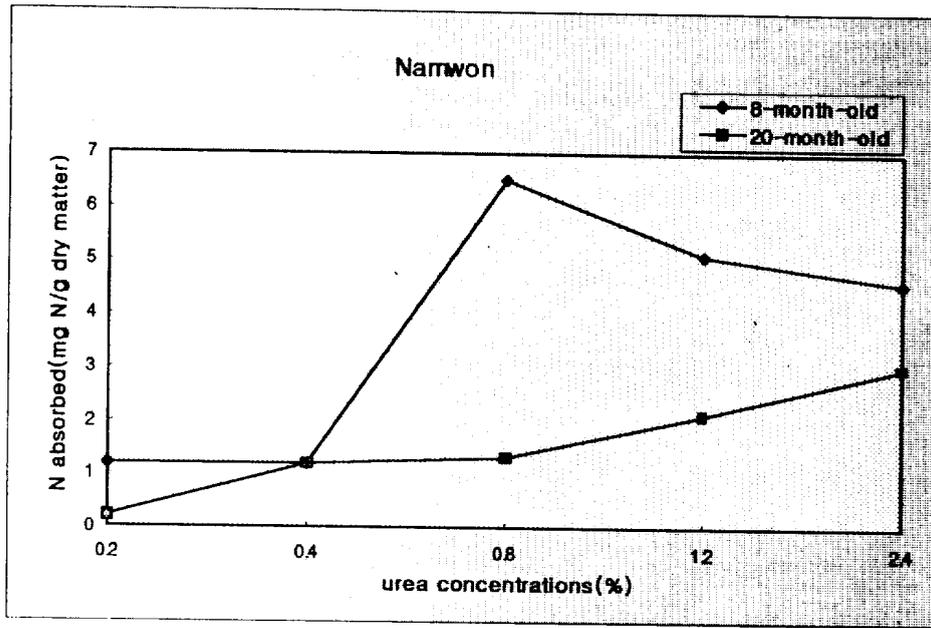


Fig 5. N absorbed by citrus leaves under the different concentrations of urea applied.

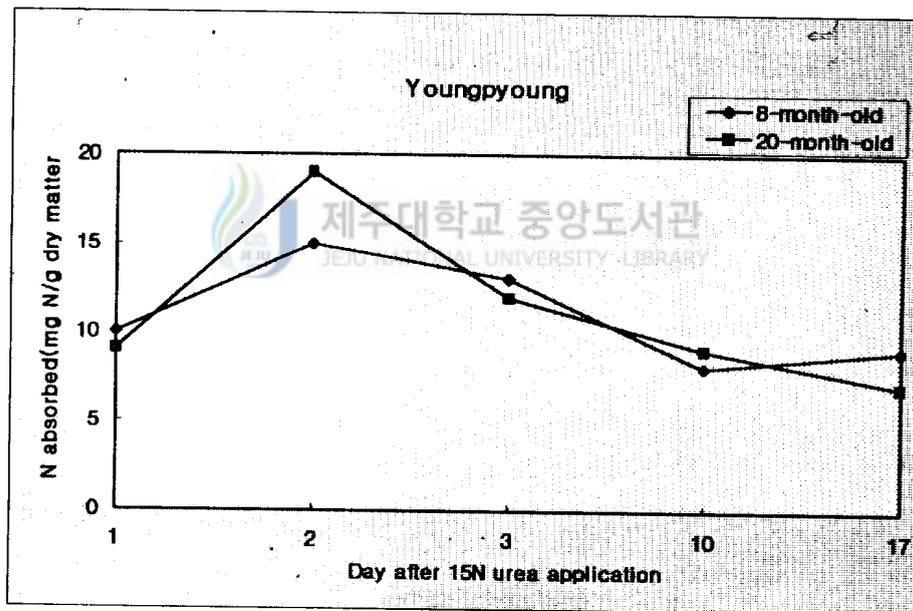
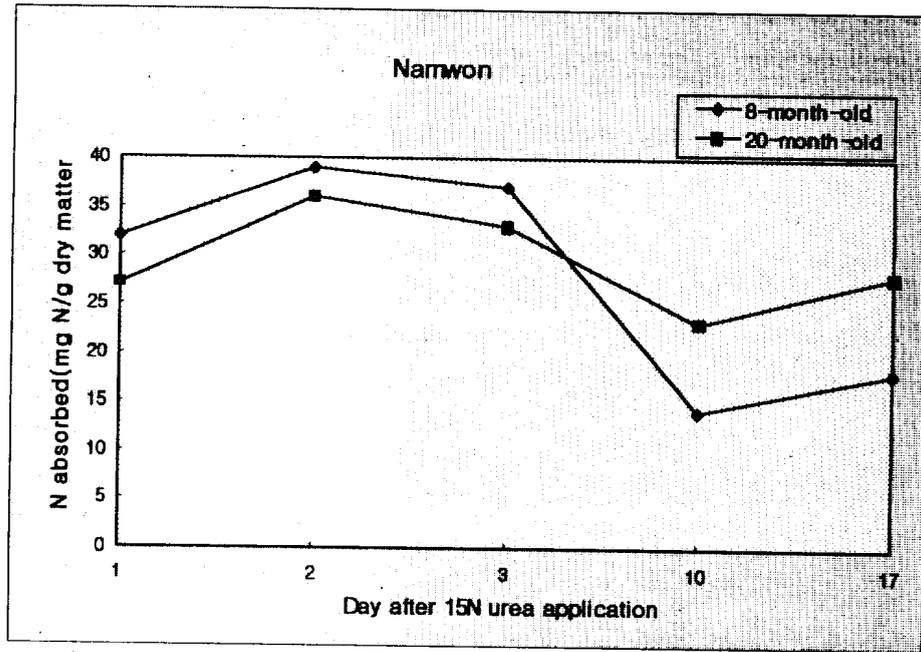


Fig 6. N absorbed by citrus leaves 1, 2, 3, 10 and 17 days after application of 0.4% ¹⁵N-urea.

IV. 적 요

1. 식물체 시료중의 ^{15}N 존재비 분석조건 확립

- 1) 원소분석기에 의한 질소분석시 세척하지 않은 tin capsule을 사용하면 질소 peak가 검출되었으나 아세톤으로 세척한 경우에는 질소 peak가 검출되지 않았다. 따라서 tin capsule의 세척이 필수적이다.
- 2) 질소에 대한 K-factor를 반복 측정된 결과 변이계수값(1.49%)이 낮아서 재현성이 양호하였다.
- 3) 총질소를 분석하기위한 urea, acetanilide 그리고 감글엽의 적정 시료량은 1 ~ 3 mg 이었다.
- 4) ^{15}N 분석을 하기 위한 질소의 적정 시료량은 0.359 ~ 0.424 mg N이었다.

2. 온주밀감의 요소 엽면흡수량 측정

- 1) 요소의 처리농도가 증가함에 따라 엽면흡수된 질소량도 증가했으며 0.8~1.2% 농도에서 최대의 엽면흡수량을 보였고 그 이상에서는 감소하는 경향을 보였다.
- 2) 엽면흡수되어 엽중에 존재하는 질소량은 처리 2일 후에 가장 높았고 그 후 감소하는 경향을 보였는데 이는 질소가 타부위로 轉移되기 때문인 것으로 생각된다.
- 3) 8개월된 신엽이 20개월된 구엽보다 엽면흡수된 질소량이 많았다.

V. 참고 문헌

- Barrie, A. 1991. New methodologies in stable isotope analysis. In "Stable Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility and Environmental Studies," pp. 3~25. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Barrie, A., J. E. Davies, A. J. Park, and C. T. Workman. 1989. Continuous-flow stable isotope analysis for biologists. *Spectroscopy* 4(7):pp. 42~52.
- Barrie, A., and C. T. Workman. 1984. An automated analytical system for nutritional investigations using ^{15}N tracers. *Spectrosc. Intl. J.* 3:pp.439~447.
- Barrie, A., and M. Lemley. 1989. Automated $^{15}\text{N}/^{13}\text{N}$ analysis of biological materials. *Am. Lab.* 21(8):pp. 54~63.
- Bellomote, G., A. Costantini, and S. Giammarioli. 1987. Compariso 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.
- Bremner, J. M., and C. S. Mulvancy. 1982. Nitrogen-Total in "Methods of Soil Analysis," *Agro. Monogr.* 9, pt. 2, 2nd ed.:pp. 595~624.
- 趙成鎮 등. 1995. 新稿 肥料學. 鄉文社, pp 201~217.
- Colombo, B., and M. Baccanati. 1990. Automatic modified dumas combustion as an alternative to the kjeldahl method. Poster presented at VII euroanalysis, 8/90, vienna.

- Craswell, E. T., and D. L. Eskew. 1991. Nitrogen and nitrogen-15 analysis using automated mass and emission spectrometers. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 55:pp. 750~756.
- Debot, S. A., F. S. sadek, M. Baccanti, and B. Colombo. 1989. Elemental gasoline analysis by automatic injection : characteriz- ation and heat value caculation. Reprinted from american labor- atory, 8/89.
- Egsgaard, H., E. Larsen, and E. S. Jensen. 1989. Evaluation of automated determination of nitrogen-15 by on-line combustion. *Anal. Chem. Acta* 226.:pp. 345~349.
- Embleton, T. W., and W. W. Jones,. 1974. Foliar-applied nitrogen for citrus fertilization. *California Agriculture.* 28:19.
- Harris, D., and E. A. Paul. 1989. Automated analysis of ¹⁵N and ¹⁴C in biological samples. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20:pp. 935~947.
- IAEA-TECDOC-288. 1983. A guide to the use of nitrogen-15 and radioisotopes in studies of plant nutrition :calculations and interpretation of data.:pp. 7~24.
- Impey, R. L. and W. W. Jones. 1960. Rate of absorption of urea by intact leaves of Washington navel orange. *Proc. Amer. Hort. Sci.* 76:181-185.
- John D. Lea-Cox and James P. Syvertsen. 1995 Nitrogen uptake by citrus leaves *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(3):505-509.
- 金榮龍. 1987. 溫州蜜柑 收穫後의 尿素 葉面施肥가 葉中成分, 內含性 및 結實에 미 치는 影響, 서울大學教大學院 農學博士 學位論文.
- Knowles, R., and T. H. Blackburn. 1997. *Nitrogen Isotope Techniques*:pp. 11~57.

Lanbanauskas, C. K., and R. E. Puffer. 1964. Effects of foliar applications of manganese, zinc, and urea on Valencia orange yield and foliage composition. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 84:158-164.

L'annunziata, M. F. and J. O. Legg. 1984. Isotopes and Radiation in Agriculture Science. Vol.(1):234.

Marshall, R. B., and J. N. Whiteway. 1985. Automation of an interface between a nitrogen analyser and an isotope ratio mass spectrometer. Analyst 110:pp.867~871.

McInteer, B. B., and J. G. Monotoya. 1981. Automation of a mass spectrometer for nitrogen isotope analysis. In "Recent Developments in Mass Spectrometer in Biochemistry, Medicine and Environment Research,". Vol.(7):pp 343-349.

Mulvaney, R. L., C. L. Fohringer, V. J. Bojan, M. M. Michlik, and L. F. Herzog. 1990. A commercial system for automated nitrogen isotope-ratio analysis by the Rittenberg technique. Rev. Sci. Instru. 61.:pp 897~903.

Mulvaney, R. L., and Y. P. Liu. 1991. Refinement and evaluation of an automated mass spectrometer for nitrogen isotope analysis by the Rittenberg technique. J. Automatic Chem. 13:pp 273~280.

Otsuki, A., Y. Ino., and T. Fujii. 1983. Simultaneous measurements and determinations of stable carbon and nitrogen isotope ratios, and organic carbon and nitrogen contents in biological samples by coupling of a small quadrupole mass spectrometer and modified carbon-nitrogen elemental analyzer. Intl. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 48:pp. 343~346.

Preston, T., and D. C. McMillan. 1988. Rapid sample throughput for biomedical stable isotope tracer studies. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16:pp. 229~235.

Rittenberg, D. 1948. The preparation of gas samples for mass spectrographic analysis. In "Preparation and Measurement of Isotopic Tracers":pp. 31-42.

Rittenberg, D., A. S. Keston, F. Rosebury, and R. Schoenheimer. 1939. Studies in protein metabolism I. The determination of nitrogen isotopes in organic compounds. *J. Biol. Chem.* 127:pp 291~299.

Schepers, J. S., D. D. Francis, and M. T. Thompson. 1989. Simultaneous determination of total C, total N, and ¹⁵N on soil and plant material. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20:pp. 949~959.

신찬기. 1996. 우리나라 지하수의 질산성질소 오염현황. 환경치환형 국제심포지움. 아열대원예산업연구센터. P67-69.

Sprinson, D. B., and D. Rittenberg. 1948. Preparation of gas samples for mass spectrometric analysis of isotope abundance. *U. S. Nav. Med. Bull.* March-April(Suppl.):pp. 82~93.

梁相互. 元素分析機(EA1108,FISONS)에 의한 植物體 試料中の 炭素와 窒素 分析. 1994. 濟州大學校 大學院 農學碩士學位論文.

岩切徹. 葉面撒布齊の 上手な使い方 センター . 1991. p10-13.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 편달을 하여 주신 유장걸교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 바쁘신 가운데에서도 본 논문의 심사를 맡아 주신 류기중교수님, 현해남교수님께도 감사 드립니다.

아울러 늘 깊은 관심을 가지고 지켜 보아 주신 강순선교수님, 고정삼교수님, 김찬식교수님께도 감사 드립니다.

또한 본 논문이 이루어지도록 지원을 아끼지 않으신 제주도농촌진흥원 이신찬계장님과 실험수행과 자료정리에 많은 도움을 주신 송성준박사님, 홍경애박사님, 황대중선배님, 양상호선배님 그리고 한승갑선배님께 감사 드립니다.

그리고 많은 격려와 성원을 보내주신 고정은선생님, 양철신선배님, 김권수선배님, 김권보선배님과 양석철, 김창신, 양윤호, 채현병, 오명협, 진성범, 전승엽, 강태우, 고광섭후배와 야간열람실 동료들에게 지면을 통해서나마 감사의 뜻을 전합니다.

끝으로 오늘이 있기까지 항상 곁에서 사랑으로 돌보아 주신 어머니님과 형님, 형수님과 친우 이휘성, 김수성, 김봉철, 오충훈과 함께 기쁨을 나누고 싶습니다.