

Article

<https://doi.org/10.7850/jkso.2020.25.4.081>
pISSN : 1226-2978 eISSN : 2671-8820

해수 중 용존 암모늄 분석방법 비교: 분광광도법과 형광법

손푸르나¹ · 박준성¹ · 노태근^{2*}

¹한국해양과학기술원 해양기기개발·운영센터 기술원, ²한국해양과학기술원 해양기기개발·운영센터 센터장

Comparison of Dissolved Ammonium Analytical Method in Seawater: Spectrophotometry and Fluorometry

PURENA SON¹, JOONSEONG PARK¹ AND TAEKEUN RHO^{2*}

¹Specialist, Instrumental Development and Management Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Busan 49111, Korea

²Deputy Director, Instrumental Development and Management Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Busan 49111, Korea

*Corresponding author: tkrho@kiost.ac.kr

Editor Gi Beum Kim

Received 6 October 2020; Revised 20 November 2020; Accepted 27 November 2020

ABSTRACT

해수 중 용존 암모늄 분석에는 Berthlot's 반응의 분광광도법이 일반적으로 사용되었으나, 최근에는 OPA (orthophthaldialdehyde-sulfite) 형광시약을 이용한 형광법이 국제적으로 활발하게 사용되고 있다. 본 연구에서는 2017년도 호주연구선 Investigator에서 수행된 국제 영양염 선상 상호비교 실험에서 두 기관(KIOST(분광광도법, 1차 선형 회귀식 기울기만 사용), 호주CSIRO(형광법, 2차 비선형 회귀식 사용))간의 영양염 표준물질과 현장 해수시료의 용존 암모늄 농도값 차이(약 0.31 μM)의 원인을 이해하기 위해 분석방법 간 검출한계, 분광광도법에 내재된 시약 굴절률, 검량선식 등에 의한 영향을 고찰하였다. 본 연구에서 측정된 분광광도법의 방법검출한계(0.063 μM)와 시약 굴절률 바탕값(0.054 μM)은 두 기관의 용존 암모늄 농도값 차이를 각각 20%, 17% 정도 설명할 수 있었다. 그러나 분광광도법의 검량선을 형광법과 동일한 2차식 또는 선형회귀식의 기울기와 절편으로 농도를 계산할 경우, 두 기관 간의 용존 암모늄 농도값 차이는 현장에서 측정된 분광광도법의 방법검출한계 이하로 줄었다. 따라서 국제 영양염 선상 상호비교 실험에서 영양염 표준물질과 해수 현장시료에서 나타난 두 기관 간의 용존 암모늄 농도값 차이는 분광광도법과 형광법의 분석방법 차이에 의한 영향보다는 두 방법에 사용된 상이한 검량선식 영향인 것으로 판단된다. 향후 해수시료의 용존 암모늄 자료를 비교할 때 분석방법의 차이보다는 분석에 사용된 기저선, 표준용액열 개수, 검량선식 등에 대한 정보에 유의할 것을 권장한다.

Berthlot's reaction spectrophotometric method is generally used for the analysis of dissolved ammonium in seawater, but in recent years, a fluorescence method using an orthophthaldialdehyde-sulfite (OPA) fluorescent reagent is actively used internationally. In this study, we investigated the effects of the detection limit between the analysis methods, the reagent refractive index inherent in the spectrophotometric method, and the use of different calibration curves to understand the cause of the difference in dissolved ammonium concentration (about 0.31 μM) observed in the seawater samples and a nutrient reference material between two institutions (KIOST (spectrophotometric method, one-order linear regression gradient only), Australia CSIRO (fluorescence method, quadratic formula)) conducted onboard the Australian R/V Investigator in 2017. The method detection limit (0.063 μM) and the reagent refractive index background value (0.054 μM) of the spectrophotometric method measured in this study could explain the difference in dissolved ammonium concentration values of the two institutes about 20% and 17%, respectively. However, when the concentration of the calibration curve of the spectrophotometric method was calculated using the same quadratic as the fluorescence method or the slope and intercept of linear regression, the difference in the dissolved ammonium concentration between the two institutions was reduced to less than the detection limit of the spectrophotometric method. Therefore, the difference in the concentration of dissolved ammonium between the two institutions, found in the nutrient reference materials and the seawater field sample during the international onboard nutrient inter-comparison experiment, may be attributed to be the effect of the different calibration curves used in the two methods rather than the effect of the difference in two analytical methods. When comparing the dissolved ammonium data from seawater samples in the future, it is recommended to pay attention to the information on the baseline, number of standard solutions, and calibration curve used in the analysis.

Keywords: Dissolved ammonium, Spectrophotometric method, Fluorescence method, Calibration curve, Refractive index blank, Method detection limit

1. 서론

해수 중 암모니아의 주요 존재 형태는 수화상태인 용존 암모니아 기체와 양이온의 용존 암모늄이다. 일반적인 해수 환경에서 용존 암모늄 형태가 약 94~98%를 차지한다. 용존 암모늄은 표층해양에서 식물플랑크톤이 광합성 과정에서 유기물을 합성할 때 질산염 및 아질산염과 함께 주요 질소 공급원으로 사용되고, 질산염이나 아질산염보다 활용 에너지가 적어 식물플랑크톤이 광합성 할 때 가장 선호하는 질소 형태이다(Wheeler and Kokkinakis, 1990; Harison *et al.*, 1996). Dugdale and Göering(1967)은 식물플랑크톤 광합성에 사용하는 질소형태(질산염, 암모늄)에 따라 신 생산(질산염)과 재생산(암모늄)으로 나누면서 용존 암모늄이 질산염과 함께 해양내부에서 탄소의 생지화화학적 순환을 이해하는 중요한 변수로 인식되어, 해수 중 용존 암모늄 농도에 관한 관심이 높아졌다. 일반적인 해양환경에서 용존 암모늄의 농도는 $1 \mu\text{M}$ 이하로 존재하기 때문에 용존 암모늄이 해양내부에서 탄소의 생지화화학적 순환에 미치는 영향을 이해하기 위해서는 정밀하고 정확한 용존 암모늄 분석이 중요하다(Willason and Johnson, 1986).

현재 해수 중 용존 암모늄을 정밀하게 분석하는 방법은 Berthlot's 반응을 이용한 분광광도법(Spectrophotometry)과 OPA (orthophthaldialdehyde) 형광시약을 이용한 형광법(Fluorometry)이 있다. 해수 중 용존 암모늄 분석에 가장 일반적으로 사용되는 분광광도법은 해수 중 용존 암모늄이 염기 환경에서 페놀과 차아염소산염의 반응으로 형성된 푸른색 착화합물(Indophenol blue)의 흡광도를 660 nm 파장에서 측정한다. 이 방법을 해수 중 용존 암모늄 분석에 적용하기 위해 해수의 마그네슘에 의한 간섭을 제거하여 반응의 선택성을 향상(Roskam and De Lange, 1964; Solorzano, 1969)하고 촉매사용을 통한 반응성을 향상(Patton and Crouch, 1977)하는 등 해수 중 용존 암모늄 분석을 위한 다양한 노력이 진행되었다. 최근에는 차아염소산염을 Sodium Dichloroisocyanurate (SDIC)로 대체(Grasshoff and Johannsen, 1972)하여 안정적으로 염소를 공급하거나 독성이 있는 페놀 대신 Sodium Salicylate로 대체(Krom, 1980)하는 등의 다양한 노력이 진행되었다.

그러나 이러한 노력들은 분광광도법을 사용하는 실험실 간에 해수 중 용존 암모늄 분석의 세부적인 차이를 일으켜, 해수 중 용존 암모늄 농도가 낮을 경우 실험실간 상호 비교성이 악화되어 보다 정밀한 용존 암모늄 분석방법의 필요성이 제기되었다. OPA (orthophthaldialdehyde) 형광시약을 이용하여 형광을 띠는 OPA-sulfite 유도체를 용존 암모늄과 결합시켜 형광감지기로 해수 중 용존 암모늄을 정량하는 형광법이 개발되었다(K erouel and Aminot, 1997). OPA-sulfite유도체는 다른 유기화합물의 간섭이 적고 용존 암모늄과의 반응 선택성이 클 뿐 아니라 염분에 의한 간섭이 적어 해수 대부분의 염분범위(0~35 psu)에서 염분에 의한 분석값의 차이가 3% 이내이다. 이 형광법의 용존 암모늄 검출한계는 용존 암모늄 농도가 nanomolar 범위에서는 $0.0015 \mu\text{M}$ 이고, micromolar 범위에서는 $0.007 \mu\text{M}$ 이다. 그리고 용존 암모늄 농도가 $0.5\sim 5 \mu\text{M}$ 범위인 해수시료의 반복성이 $0.01 \mu\text{M}$ 로 빈영양 해역을 포함한 해양시료의 용존 암모늄 자동분석법에 활발하게 적용되고 있다.

국제 영양염 상호비교 실험에 참여한 64개의 연구실에서 Bertlot's Reaction에 기반한 분광광도법으로 해수 중 용존 암모늄을 분석하였다(ICES, 1995). 그리고 분광광도법에 의한 해수 중 용존 암모늄 분석의 정밀도를 향상하기 위해 (1) 사용되는 발색시약의 종류 및 발색시약 첨가순서와 반응조건, (2) 시약제조 시 신선하게 제조된 초순수 사용, (3) 염분효과를 최소화하기 위한 저영양염 해수 사용, (4) 시약 굴절률 영향의 최소화 등의 다양한 방법을 적용하였다(Aminot *et al.*, 1997).

국내에서도 분광광도법의 기체분질 자동 영양염 분석기를 사용하여 해수 중 용존 암모늄 분석의 정밀도와 정확도 향상을 위해 실험실 대기환경에 포함된 암모니아 영향을 최소화하기 위한 노력을 진행하여 $0.5\sim 6.6 \mu\text{M}$ 의 용존 암모늄 농도 범위에서 재현성과 검출한계는 각각 $0.035 \mu\text{M}$ 과 $0.02 \mu\text{M}$ 였고, 상대오차(RSD)는 7~11%이었다(Rho *et al.*, 2015). 이는 국제 상호비교 실험의 상대오차 결과(중간농도/고농도: 22~23%, 저농도: 56%)보다 정밀하게 해수 중의 용존 암모늄을 분석하였다.

최근 국제적으로 해수 중 용존 암모늄 분석에 형광법을 이용한 자동분석기 사용이 증가하는 추세이나, 국내의 해수 중 용존 암

모늄 분석은 아직 분광광도법 기체분질 자동 영양염분석기의 사용이 대다수이다. 본 연구에서는 국내에서 생산되는 해수 중 용존 암모늄 자료의 국제 상호 비교성을 확보하기 위해서 영양염 표준물질과 현장에서 직접 채수한 해수를 이용하여 분광광도법과 형광법 간의 비교실험을 수행하여, 두 방법으로 분석된 용존 암모늄 자료의 상호 비교성 향상을 위한 방안을 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료채취

분광광도법과 형광법의 상호비교 실험은 2017년 3월 17일부터 28일까지 호주 CSIRO 연구소의 연구선 Investigator에서 실시된 국제 선상 영양염 상호비교 실험에서 KANSO사의 3가지 영양염 표준물질(BW, CC, CD batches)과 현장에서 채수한 해수시료를 사용하여 진행하였다. 사용된 영양염 표준물질은 KANSO사의 BW, CC, CD batches였다. 사용된 해수시료는 정점(46°S, 142°E)에서 5000 m까지 36개 수심에서 2017년 3월 19일, 3월 25일, 3월 26일에 반복 채수하였다. 시료채취 시 발생할 수 있는 개별적인 오차를 최소화하기 위해 호주 CSIRO 소속 연구원이 일괄적으로 여과 없이 30 ml PP재질의 시료병에 채수하여 현장의 참여자들에게 배포하였으며, 채수 후 24시간 이내에 분석을 실시하였다. 시료채취부터 분석까지는 2~4°C 냉장고에 보관하여 분석 대기기간 동안 시료의 변질을 최소화하였다.

2.2 분석기기 및 조건

본 연구에 사용된 분석기와 분석방법은 Table 1에 요약되어 있다. 분광광도법을 이용한 해수 중 용존 암모늄 자동분석기기는 독일 Seal사의 QuAAtro System으로 660 nm LED광원을 사용하였다. 용존 암모늄 분석에 사용된 분석관은 제조사의 매뉴얼 Q-033-04 Rev.5 (multitest MT3B)에 따라 구성되었으며, Sodium dichloroisocyanurate (SDIC)와 Salicylate 시약법을 따랐다. 검량선 작성에 사용된 표준용액열은 CSIRO에서 저영양염 해수로 희석한 6개의 표준용액열(0~2 μM)을 사용하였으며, 흡광도는 초순수 기저선(baseline)을 기초로 계산하였다. 분광광도법의 검량선은 표준용액열 용존 암모늄 농도와 측정된 흡광도의 선형관계식에서 나온 기울기만 사용하여 표준용액열 희석용액에 포함된 용존 암모늄 불순물 영향을 최소화했다. 시료와 시료 사이의 세척은 인공해수를 사용하여 세척액과 시료의 굴절률 차이에 의한 피크모양의 변형(Schlieren effect)을 최소화하였다. 시료튜브가 시료 주입기에 대기하는 동안 공기와의 접촉에 의한 오염을 방지하기 위해 시료튜브를 플라스틱랩으로 밀봉하였고,

Table 1. KIOST and CSIRO setup parameters

	CSIRO	KIOST
Instrument	SEAL AA3HR, Jasco FP 2020 Fluorometer	SEAL QuAAtro
Software	AACE 6.1, HyPro	AACE 7.02
Calibration matrix	LNSW	LNSW
Wash matrix	LNSW	Artificial Seawater
Carrier matrix	LNSW	Artificial Seawater
Baseline method	UPW Ortho-phthaldialdehyde method	UPW Indophenol-blue method
Wavelength	460 nm	660 nm
Correction	Baseline, Carryover, Sensitivity (with Hypro)	Baseline (with AACE)
Calibration order	2 nd order	1 st order slope only
Sample bottle	50ml conical PP tube	15 ml PP tube
Wrapping	Aluminum foil	Plastic film (plastic wrap)
Calibration solution	6 ea (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μM)	

질소기체를 분석관에 주입하여 대기 중에 포함되어있는 암모니아에 의한 오염을 최소화하였다(Rho *et al.*, 2015).

CSIRO 연구진의 형광법 용존 암모늄 자동 분석기는 독일 Seal사 AA3HR System으로 Jasco Fluorometer를 형광감지기로 사용하였으며, 최대 흡수파장 460 nm에서 OPA-sulfite와 용존 암모늄 결합체의 형광강도를 측정했다. 검량선은 CSIRO 연구진이 저영양염 해수로 제작한 0~2 μM 범위 내 6개의 표준용액열을 사용하였으며(Table 1), 2차식의 검량선을 사용하였다. 시료의 형광강도는 초순수 기저선을 사용하여 계산하였다. 시료와 시료 사이의 세척은 저영양염 해수를 사용하였다. 시료주입기에 시료가 대기하는 동안 시료튜브를 알루미늄호일로 덮어 실험실 대기 중에 존재하는 암모니아의 영향을 최소화하였다.

2.3 굴절률 바탕값(Refractive Index Blank, RIB)측정

해수 중 용존 암모늄을 측정할 때 염분의 영향으로 해수시료의 시약 굴절률이 기저선으로 사용하는 초순수의 시약 굴절률과 다르기 때문에 측정값의 오차를 줄이기 위해 염분에 의한 시약 굴절률 바탕값을 보정해야 한다(Aminot *et al.*, 2009). 해수의 시약 굴절률 바탕값 측정은 발색에 핵심적인 시약만 제외한 발색시약을 초순수와 해수에 첨가한 후 각각의 흡광도를 측정하여 해수의 흡광도에서 초순수의 흡광도를 빼주어 계산한다(Fig. 1). 이에 대한 자세한 절차는 Hydes *et al.*(2010)과 Coverly *et al.*(2012)에 자세히 설명되어 있으며 아래에 실제 실험에 적용한 예와 이에 대한 자세한 설명이 있다.

해수시료의 굴절률 바탕값을 보정하는 절차는 다음과 같다(Fig. 1, Fig. 2).

- (1) 초순수를 기저선으로 하여 표준용액열을 분석하고 표준용액열 다음에 분석한 초순수 기저선의 피크가 분석 창에 나타날 때까지 대기한다. 기다리는 동안 시료와 시료 사이 세척용액으로 사용하는 인공해수나 저영양염 해수를 시료로 계속 분석한다.
- (2) 표준용액열 뒤 초순수 기저선 피크가 분석 창에 나타나면 용존 암모늄 분석 발색시약 중 발색반응에 핵심적인 역할을 하는 SDIC의 시약흡입관을 SDIC 시약병에서 50% triton-X를 희석한 용액(증류수 1 L에 50% triton-X 2 ml를 넣어 제조한 용액)병으로 옮긴다.
- (3) SDIC 시약을 제거하고 인공해수나 저영양염 해수 세척액을 시료로 계속 분석 진행하면 바탕값이 급격히 낮아지고 SDIC 제거 약 15분이 지난 후에는 분석관에서 SDIC의 영향이 완전히 사라져 바탕값이 안정된 상태가 된다(Fig. 1).
- (4) 바탕값이 안정화 된 후 초순수를 시료처럼 10번 분석하고, (5) 이어서 해수시료를 10번 분석한다.
- (6) 해수시료의 마지막 피크가 분석 창에 나타난 것을 확인한 후 SDIC 시약흡입관을 SDIC 시약병으로 다시 옮기고 인공해수나 저영양염 해수 세척액을 시료로 계속 분석한다.

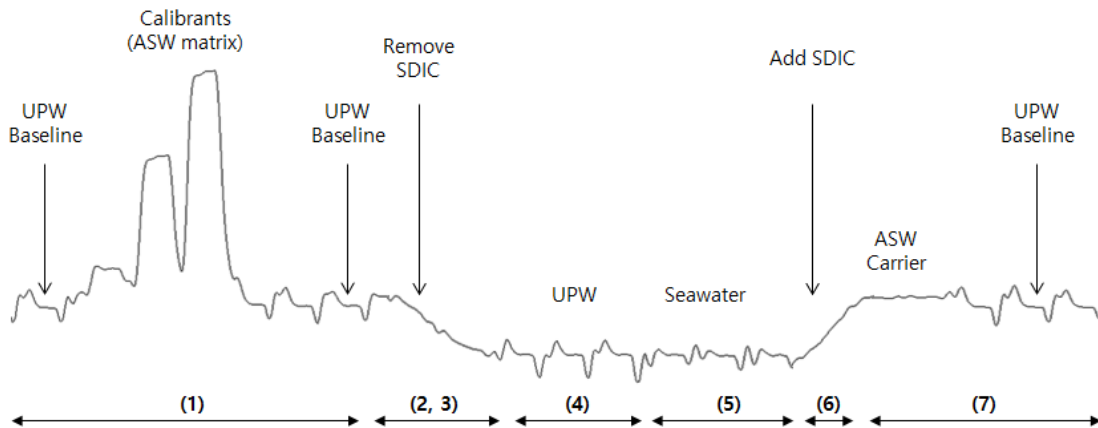


Fig. 1. Diagram showing the determination of seawater RIB with ultrapure water baseline. Numbers indicate each step in section 2.3 RIB measurement.

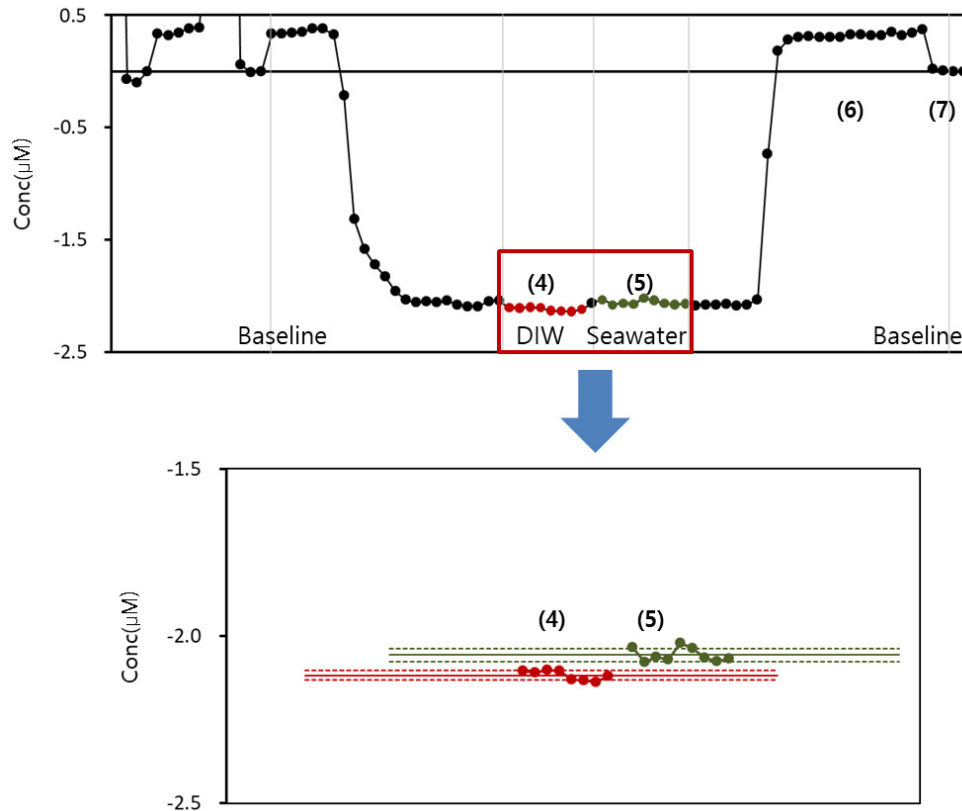


Fig. 2. Diagrams showing the process of RIB determination. Numbers indicate each step in section 2.3 RIB measurement.

- (7) SDIC 발색시약이 분석관에 유입되면서 바탕값이 급격히 높아지고 약 15분 경과하면 바탕값이 다시 안정된 상태로 되면 초순수 기저선을 분석한다.
- (8) SDIC 발색시약을 제거 후 바탕값이 안정된 상태에서 측정된 초순수와 해수시료의 흡광도 차이값이 염에 의한 해수시료의 굴절률 바탕값이다.

2.4 검출한계

본 연구에 사용된 독일 Seal사 QuAAtro System 영양염 자동 분석기의 제조사 매뉴얼에 따르면 0~10 μM 암모늄 범위에서 Q-033-04 Rev.5 방법의 검출한계는 0.03 μM이다. 시료를 분석할 때마다 검출한계 측정을 위해서 목표로 하는 검출한계 (0.03 μM)의 약 10배인 0.4 μM 암모늄 용액을 준비해서 7회 반복 분석한 후 표준편차(Ss)를 계산하고 신뢰도 99%의 t분포 값(student's t-values)을 이용하여 다음과 같이 방법검출한계(method detection limit, MDL)를 계산했다(USEPA, 2016).

$$MDLs = t(n-1, 1-\alpha=0.99) \times Ss$$

MDLs: the method detection limit based on spiked samples

t(n-1, 1-α=0.99): the Student's t-value appropriate for a single-tailed 99th percentile t statistic and a standard deviation estimate with n-1 degrees of freedom

Ss: sample standard deviation of the replicate spiked sample analyses

3. 결 과

3.1 영양염 표준물질 선상분석 결과

영양염 표준물질의 선상분석 결과는 분광광도법이 형광법보다 용존 암모늄 농도가 높았다(Fig. 3). 영양염 표준물질 CD, CC 그리고 BW에 대한 두 분석법 간 용존 암모늄 농도값 차이(분광광도법-형광법)는 각각 0.299 (± 0.151) μM , 0.338 (± 0.169) μM , 0.313 (± 0.203) μM 였으며, 두 분석법간의 용존 암모늄 농도값 차이의 전체평균은 0.313 (± 0.177) μM 이었다(Table 2).

3.2 해수시료 선상분석 결과

현장에서 채취한 해수시료를 분광광도법으로 분석한 용존 암모늄 농도는 표층 200 m 이내에서 0.2~1.0 μM 사이의 값이 나타났으며, 100 m 보다 깊은 수심에서 0.2~0.4 μM 사이의 일정한 값을 보였다. 현장에서 형광법으로 분석한 해수시료의 용존 암모늄 농도는 표층 100 m 이내에서 -0.02~0.53 μM 였으며, 100 m 보다 깊은 수심에서는 용존 암모늄이 거의 측정되지 않았다(Fig. 4). 2017년 3월 19일, 3월 25일, 3월 26일 채취한 해수시료의 분광광도법과 형광법의 용존 암모늄 농도차이(분광광도법-형광법)는 각각 0.297 (± 0.014) μM , 0.345 (± 0.035) μM , 0.306 (± 0.031) μM 였으며, 현장에서 분석된 해수시료의 용존 암모늄 농도 차이 값 전체평균은 0.312 (± 0.033) μM 으로 분광광도법으로 분석된 용존 암모늄의 농도가 형광법보다 높았다(Table 3).

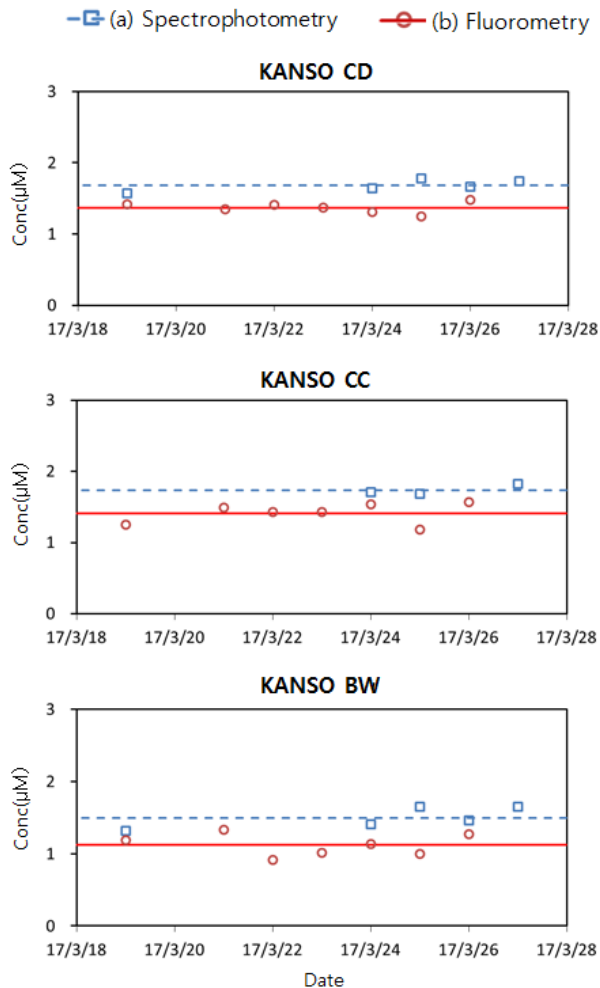


Fig. 3. Daily Ammonium concentrations of KANSO CRMs from (a) spectrophotometry (slope only) and (b) fluorometry (quadratic). Each line shows the mean value of results.

Table 2. Ammonium concentrations of KANSO CRMs from spectrophotometry (slope only) and fluorometry (quadratic) and the difference between two methods (* : Concentration, mean±standard deviation)

	KANSO Batch			Avg
	CD (n=4)	CC (n=2)	BW (n=4)	
Fluorometry* (μM)	1.365(± 0.104)	1.360(± 0.255)	1.147(± 0.113)	1.147~1.365
Spectrophotometry* (μM)	1.664(± 0.087)	1.698(± 0.015)	1.459(± 0.142)	1.459~1.698
Difference** (μM)	0.299(± 0.151)	0.338(± 0.169)	0.313(± 0.203)	0.313(± 0.177)

** : Difference = Spectrophotometry – Fluorometry, mean±standard deviation

Table 3. Ammonium concentrations of seawater from spectrophotometry (slope only) and fluorometry (quadratic) and the difference between two methods (* : Concentration)

	Date			Avg
	3/19/2017	3/25/2017	3/26/2017	
Fluorometry* (μM)	-0.010~0.470	-0.010~0.430	-0.020~0.530	-0.020~0.530
Spectrophotometry* (μM)	0.268~0.777	0.257~0.804	0.250~0.923	0.250~0.923
Difference** (μM)	0.297 (± 0.014)	0.345 (± 0.035)	0.306 (± 0.031)	0.312 (± 0.033)

** : Difference = Spectrophotometry – Fluorometry, mean±standard deviation

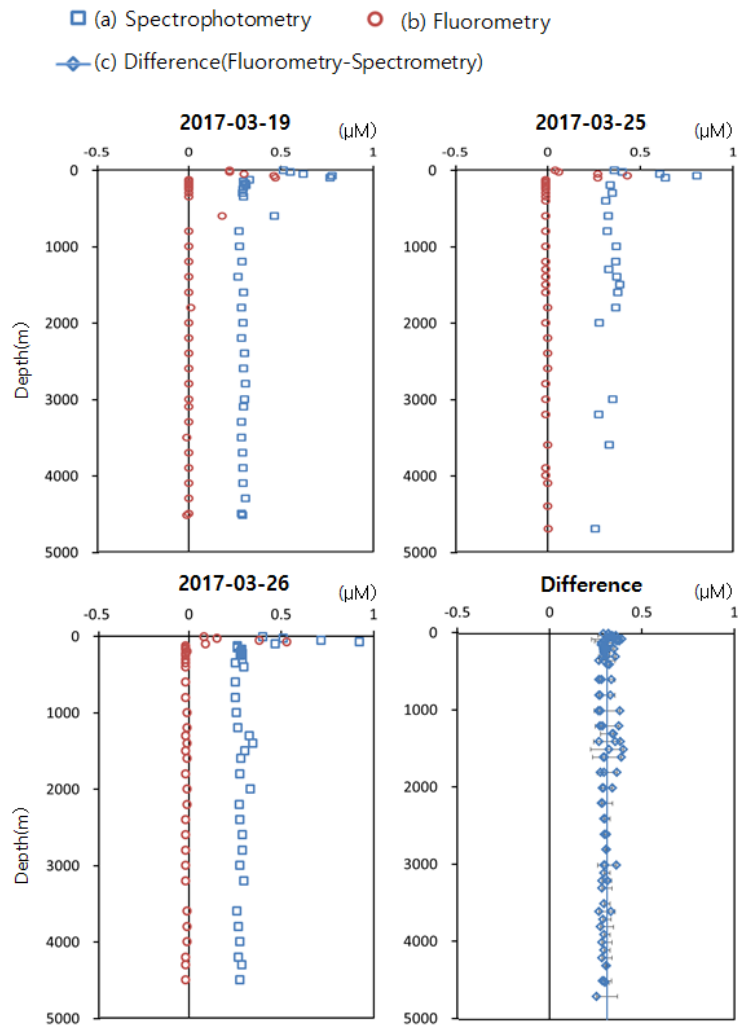


Fig. 4. Vertical profiles of ammonium concentrations of seawater from two methods ((a) spectrophotometry (slope only) and (b) fluorometry (quadratic)) and (c) difference (spectrophotometry - fluorometry).

4. 고찰

선상에서 분광광도법과 형광법으로 분석된 표준물질과 해수시료의 용존 암모늄 농도값 차이의 평균은 각각 $0.313 (\pm 0.177) \mu\text{M}$ 과 $0.312 (\pm 0.033) \mu\text{M}$ 로 95% 신뢰도 구간에서 유사하였다($p=0.987$, 이분산 양측분포 t-test). 두 방법으로 분석된 표준물질의 용존 암모늄 농도는 약 $1.1\sim 1.7 \mu\text{M}$ 의 범위였으며, 해수시료의 수심에 따른 용존 암모늄 농도 범위는 약 $0\sim 0.9 \mu\text{M}$ 이었다. 따라서 현장에서 분석된 표준물질과 해수시료의 용존 암모늄 농도가 2배정도 차이에도 불구하고 두 분석법 사이의 용존 암모늄 농도차이는 약 $0.31 \mu\text{M}$ 로 유사하였는데(Table 2, Table 3), 이는 측정된 두 분석법 사이의 용존 암모늄 농도차이는 시료의 농도와 상관없이 일정하게 존재함을 의미한다.

두 분석법 사이의 용존 암모늄 농도값 차이($0.31 \mu\text{M}$)는 분광광도법으로 분석된 해수시료의 용존 암모늄 농도가 최대 ($0.92 \mu\text{M}$)일 경우 약 34%를 차지하고, 해수시료의 용존 암모늄 농도가 최소($0.25 \mu\text{M}$)일 경우에는 124%에 해당한다. 일반적인 해양환경에서 용존 암모늄의 농도는 저농도로 존재하기 때문에 분석방법에 따른 농도값 차이는 해수 중 용존 암모늄 분석에서 큰 오차요인으로 작용할 수 있다. 따라서 두 분석방법에 따른 용존 암모늄 농도값 차이의 원인을 파악하고 개선하는 것이 향후 두 분석방법으로 분석된 해수시료의 용존 암모늄 농도의 상호 비교성을 확보하는데 중요한 요소로 판단된다. 두 방법으로 분석된 영양염 표준물질과 해수시료의 용존 암모늄 농도값 차이는 (1) 두 분석법의 방법검출한계의 차이, (2) 분광광도법 발색시약 굴절률 보정, (3) 두 분석방법의 농도계산에 사용된 검량선등에 기인한 것인지 고찰하였다.

4.1 방법검출한계(Method Detection Limit, MDL) 영향

현장에서 분석된 해수 중 용존 암모늄의 연직분포 특성은 전 수심에 걸쳐 분광광도법과 형광법 사이의 용존 암모늄 농도 차이가 약 $0.31 \mu\text{M}$ 로 일정하였고, 수심 100 m보다 깊은 수심에서는 형광법으로 측정된 용존 암모늄 농도가 거의 없는 반면 분광광도법에서는 일정한 값이 측정되어 두 분석법 사이의 농도값 차이가 더 뚜렷하였다(Fig. 4). 분광광도법과 형광법 사이의 용존 암모늄 농도값 차이($0.31 \mu\text{M}$)는 분광광도법의 MDL이 형광법의 MDL보다 상대적으로 높기 때문일 수 있다. 제조사의 매뉴얼인 Q-033-04 Rev.5에 따르면 분광광도법의 MDL은 $0\sim 10 \mu\text{M}$ 농도 범위에서 $0.03 \mu\text{M}$ 이고, Kerouel and Aminot(1997)에 의하면 형광법의 MDL은 micromolar 범위에서는 $0.007 \mu\text{M}$ 이다. 이처럼 제조사에서 제시한 분광광도법의 MDL이 형광법보다 약 4배 높았으나, 두 방법 사이의 용존 암모늄 농도 차이값($0.31 \mu\text{M}$)의 약 10% 정도였다.

제조사에서 제시한 MDL의 약 10배에 해당하는 시료($0.4 \mu\text{M}$)를 사용하여 EPA의 MDL 결정방법(USEPA, 2016)에 따라 실제 시료분석 시에 측정된 분광광도법의 MDL은 평균 $0.063 (\pm 0.015) \mu\text{M}$ 였다(Table 4). 현장에서 분석된 MDL값이 제조사에서 제시한 값($0.03 \mu\text{M}$)보다 두 배 정도 높았으나, 두 분석법으로 측정된 영양염 표준물질과 해수시료의 용존 암모늄 농도값 차이($0.31 \mu\text{M}$)의 약 20% 정도였다. 따라서 분석기기 제조사에서 제시한 분광광도법의 MDL과 실제 분석에서 측정된 분광광도법의 MDL값으로 보아 표준물질과 해수시료에서 나타난 분광광도법과 형광법의 용존 암모늄 농도값의 차이 ($0.31 \mu\text{M}$)는 두 분석방법 MDL만으로 설명하기 어려운 것으로 판단된다.

Table 4. Method detection limit (MDL) of spectrophotometry (slope only) (* : Mean value of 7 MDL samples)

	Date				Avg
	3/19/2017	3/24/2017	3/26/2017	3/27/2017	
Concentration* (μM)	0.916	0.657	0.895	0.898	0.842(± 0.107)
Standard deviation (μM)	0.020	0.017	0.027	0.016	0.020(± 0.004)
MDL** (μM)	0.064	0.053	0.084	0.050	0.063(± 0.015)

** : MDL = 3.143×standard deviation

4.2 해수시료의 굴절률(Refractive Index Blank, RIB)영향

해수시료에 포함된 염은 화학적인 반응, 염에 의한 빛의 흡수산란과 광학특성 변화 등으로 해수시료 영양염 분석오차의 원인이 될 수 있다. 분광광도법 자동분석기는 시료와 시약을 일정 비율로 분석관에 주입하여 시료와 시약의 반응에 의해 흡수되는 빛의 양을 검출기를 이용하여 연속 측정하는 것으로 분석물질이 없는 바탕용액(baseline, 기저선)을 기준으로 하여 시료의 흡광도를 측정한다. 측정된 시료의 흡광도는 농도를 알고 있는 표준용액의 농도와 흡광도의 관계식(검량선)을 사용하여 농도로 환산한다. 기저선 측정에 사용되는 용액에 영양염이 미량으로 포함된 경우 시료의 영양염 측정값에 영향을 끼치기 때문에 초순수 기저선 사용을 권장하고 있다(Hydes *et al.*, 2010). 그리고 형광법은 염분에 의한 굴절률 영향이 거의 없으나(Aminot *et al.*, 2001), 분광광도법으로 해수시료의 용존 암모늄 분석 시 염분에 의한 굴절률 영향이 크기 때문에 해수시료의 용존 암모늄 농도가 낮을 경우 염분에 의한 굴절률이 분석결과에 큰 영향을 미친다. 따라서 분광광도법으로 해수시료의 용존 암모늄 분석 시 초순수와 해수시료의 염분에 의한 시약 굴절률 바탕값 차이를 이용하여 해수시료의 용존 암모늄 농도 보정을 권장한다(Hydes *et al.*, 2010).

본 연구에서 분광광도법을 사용하는 용존 암모늄 자동분석법은 초순수를 기저선으로 사용하고 있어 해수시료의 용존 암모늄 분석 시 초순수와 해수시료의 염분에 의한 시약 굴절률 차이에 대한 보정이 필요하다. 앞서 방법 2.3절에서 설명한 굴절률 실험법 절차에 따라 계산된 해수시료의 시약 굴절률 바탕값은 초순수 굴절률 바탕값 보다 평균 0.054 μM 높았다(Table 5). 이러한 초순수와 해수시료의 굴절률 차이는 영양염 표준물질과 해수시료에 측정된 분광광도법과 형광법간의 용존 암모늄 농도 값 차이(0.31 μM)의 약 17% 정도만 기여하였다. 따라서 해수시료의 시약 굴절률 바탕값만으로 영양염 표준물질과 해수시료 용존 암모늄 분석에서 나타난 분광광도법과 형광법 사이의 용존 암모늄 농도 값 차이(0.31 μM)를 설명하기에는 충분하지 않다.

4.3 검량선 영향

검량선은 분석 대상 물질의 농도와 흡광도 사이의 정량적인 관계로 표준용액의 농도범위와 사용된 표준용액의 수, 표준용액 제조방법에 따라 최대 20% 정도의 오차가 발생하기 때문 검량선 작성에 주의해야 한다(Hydes *et al.*, 2010). 일반적으로 분석할 때 분석 대상 물질의 농도 증가에 따라 흡광도가 선형적으로 증가하는 것이 이상적이나 시료 중 분석 대상 물질의 농도나 첨가되는 발색시약의 양, 반응 시간 등의 다양한 요소에 따라 비선형적인 특성을 가질 수도 있다. 측정하는 시료의 분석 대상 물질 농도 범위 내에서 농도와 흡광도가 선형적인 관계인 경우는 검량선 작성에 표준용액 2개를 사용하여 선형관계의 검량선($y=ax+b$)으로 농도를 결정하는 것이 효과적이다. 검량선 작성에 사용되는 표준용액의 개수가 3개 이상일 경우에는 선형관계의 검량선 또는 2차함수의 검량선($y=ax^2+bx+c$)으로 시료의 농도를 결정할 수 있다. Hydes *et al.*(2010) 등에 의하면 동일한 시료에 대해 표준용액의 수가 많을수록 농도계산 결과가 보다 정확하였으며, 표준용액 수가 5개로 동일 할 경우, 2차함수의 검량선 결과가 선형관계의 검량선 결과보다 농도값이 더 정확하였다. 따라서 분석 장비에서 생산된 흡광도로 시료의 농도 계산 시 가장 적합한 검량선의 선택이 중요하다(Hydes *et al.*, 2010).

Table 5. Refractive index blank (RIB) of ultrapure water (UPW) and seawater using spectrophotometry (slope only) and difference between UPW RIB and seawater RIB (* : Mean value)

	RIB test		Avg
	1st	2nd	
Ultrapure water RIB* (μM)	-2.118	-2.192	-2.155
Seawater RIB* (μM)	-2.057	-2.144	-2.101
Difference** (μM)	0.060	0.048	0.054

* : Difference = Seawater RIB - UPW RIB

Coverly *et al.*(2012)은 저영양염 해수 또는 인공해수로 표준용액열을 희석할 경우 저영양염 해수 또는 인공해수에 포함된 용존 암모늄과 저영양염 해수의 굴절률 영향을 제거한 해수시료의 용존 암모늄 농도를 측정하기 위해서 (1) 초순수 기저선을 사용하여 저영양염 해수를 포함한 표준용액열로 선형관계식의 검량선을 구하고, (2) 선형 관계식의 기울기만 사용하여 해수 시료의 농도를 계산하고, (3) 해수시료의 시약 굴절률을 측정하여 보정하는 방법을 권장하였다(Fig. 5). 또한 제조사의 분석 방법 매뉴얼 역시 표준용액열을 희석할 때 사용되는 인공해수나 저영양염 해수에 포함된 분석 대상 물질을 완전히 제거할 수 없을 경우, 일반적으로 사용되는 선형관계식의 기울기와 절편을 검량선으로 사용하기보다는 선형관계식의 기울기만 사용하여 해수시료의 농도를 계산할 것을 권장하였다.

본 연구에 사용된 분광광도법의 용존 암모늄 자동 분석법도 인공해수 또는 저영양염 해수로 표준용액열을 제조하기 때문에 표준용액열 제조에 사용된 저영양염 해수에 포함된 용존 암모늄의 영향을 제거하기 위해서 선형관계 기울기만 사용하여 농도를 계산하였다(Rho *et al.*, 2015). 본 연구의 검량선 작성에 사용된 표준용액열은 호주 CSIRO에서 저영양염 해수로 희석한 6개 표준용액열(0~2 μM 범위)을 사용하였다. 표준용액열과 해수시료의 흡광도는 현장에서 제조된 초순수의 기저선으로부터 계산되었다. 따라서 두 분석법으로 분석된 해수시료의 용존 암모늄 농도값 차이는 검량선 작성에 사용된 표준용액 열 또는 피크높이를 결정에 사용되는 기저선의 영향이라고 보기는 어렵다.

반면 호주 CSIRO의 형광법은 농도계산에 2차식의 검량선(Fluorometry Quadratic)을 사용하였고, 분광광도법은 선형관계식의 기울기(Spectrophotometry Slope only)만 사용하여 농도를 계산하여 두 분석법 간 검량선 사용의 차이가 있었다. 이러한 검량선식 차이에 대한 영향을 알아보기 위해 분광광도법의 해수 중 용존 암모늄 농도를 선형관계식의 기울기(Spectrophotometry Slope only), 기울기와 절편(Spectrophotometry Linear), 비선형관계식인 2차함수(Spectrophotometry Quadratic)의 검량선으로 계산하여 2차식의 검량선을 사용한 형광법과 비교하였다.

분광광도법에서 선형관계식 기울기와 절편(Spectrophotometry Linear)과 2차함수 검량선(Spectrophotometry Quadratic)을 사용하여 농도를 계산한 것과 형광법에서 2차함수 검량선(Fluorometry Quadratic)을 사용하여 계산한 해수시료의 용존 암모늄 연직분포는 분광광도법 선형관계식 기울기(Spectrophotometry Slope only)로 계산한 결과에 비해 연직분포 특성에서 분광광도법과 형광법간에 용존 암모늄 농도값 차이가 뚜렷하게 줄었다(Fig. 6). 분광광도법으로 측정된 해수시료의 용존 암모늄 농도를 서로 다른 검량선식으로 계산한 것과 형광법의 2차함수 검량선으로 계산한 해수시료의 용존 암모늄 농도와의

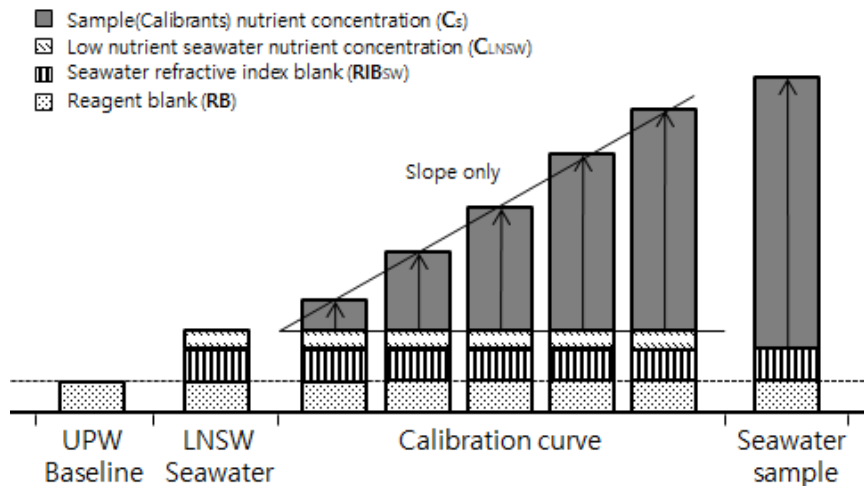


Fig. 5. Diagram showing various factors affecting the determination of calibration curve. Only slope of linear calibration curve is used for removing RIBsw and CLNSW in calibration solutions.

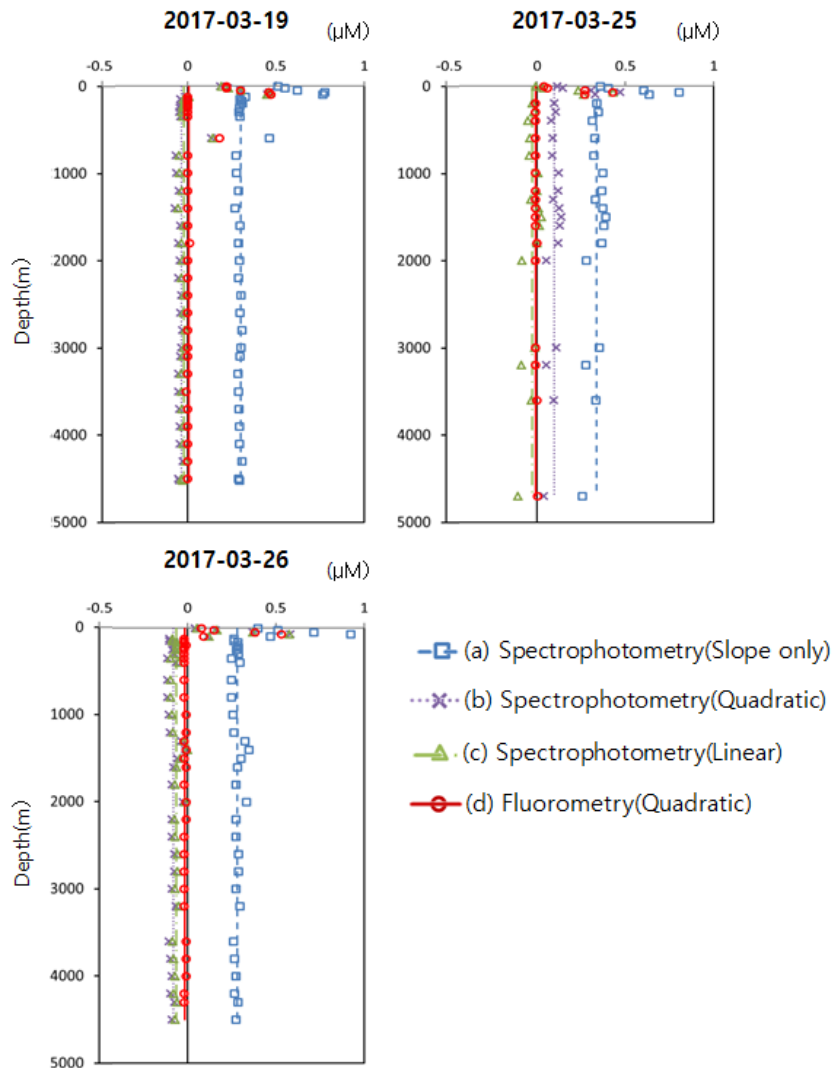


Fig. 6. Vertical profiles of ammonium concentrations from various calibration curves ((a) spectrophotometry slope only, (b) spectrophotometry quadratic, (c) spectrophotometry linear and (d) fluorometry quadratic). Each line shows the mean value of results below 100 m.

차이값은 분광광도법 선형관계식 기울기($0.312 \mu\text{M}$), 분광광도법 2차함수($0.058 \mu\text{M}$), 분광광도법 선형관계식 기울기와 절편 ($0.029 \mu\text{M}$)의 검량식 순으로 줄어들었다(Table 6, Fig. 7). 영양염 표준물질에 대한 결과도 해수시료의 결과와 유사하게 분광 광도법 선형관계식 기울기와 절편 검량선과 2차함수 검량선을 사용한 용존 암모늄 농도가 형광법 2차함수 검량선의 결과와 유사하였다(Fig. 8). 분광광도법으로 측정된 영양염 표준물질의 용존 암모늄 농도를 서로 다른 검량선식으로 계산한 것과 형 광법의 2차함수 검량선으로 계산한 영양염 표준물질의 용존 암모늄 농도와와의 차이값은 분광광도법 선형관계식 기울기($0.313 \mu\text{M}$), 분광광도법 선형관계식 기울기와 절편($0.031 \mu\text{M}$), 분광광도법 2차함수($0.032 \mu\text{M}$) 순으로 줄어들었다(Table 7). 동 일 시료에 대한 2차함수 검량선을 사용한 형광법에 비해 선형관계식 기울기와 절편 및 2차함수 검량선을 사용한 분광광도법 이 평균적으로 $0.032 \mu\text{M}$, $0.045 \mu\text{M}$ 높게 나타났다. 이러한 검량선 식에 따른 분광광도법과 형광법의 용존 암모늄 농도값 차이는 검량선 작성에 사용된 표준용액열의 명목상 농도와 다양한 검량선(선형관계식 기울기, 선형관계식 기울기와 절편, 2 차함수식)으로 계산된 표준용액열 결과 간 잔차의 평균 제곱근 편차(Root Mean Square Deviation, RMSD)와 유사하였다 (Table 8).

Table 6. Difference of seawater concentrations between fluorometry (quadratic) and various calibration curves of spectrophotometry (*: |Spectrophotometry - Fluorometry (Quadratic)| value, mean±standard deviation)

Spectrophotometry Calibration curves	Date			Avg
	3/19/2017	3/25/2017	3/26/2017	
Slope only* (μM)	0.297(±0.014)	0.345(±0.035)	0.306(±0.031)	0.312(±0.033)
Linear* (μM)	0.024(±0.014)	0.021(±0.034)	0.040(±0.031)	0.029(±0.028)
Quadratic* (μM)	0.037(±0.018)	0.095(±0.034)	0.054(±0.035)	0.058(±0.041)

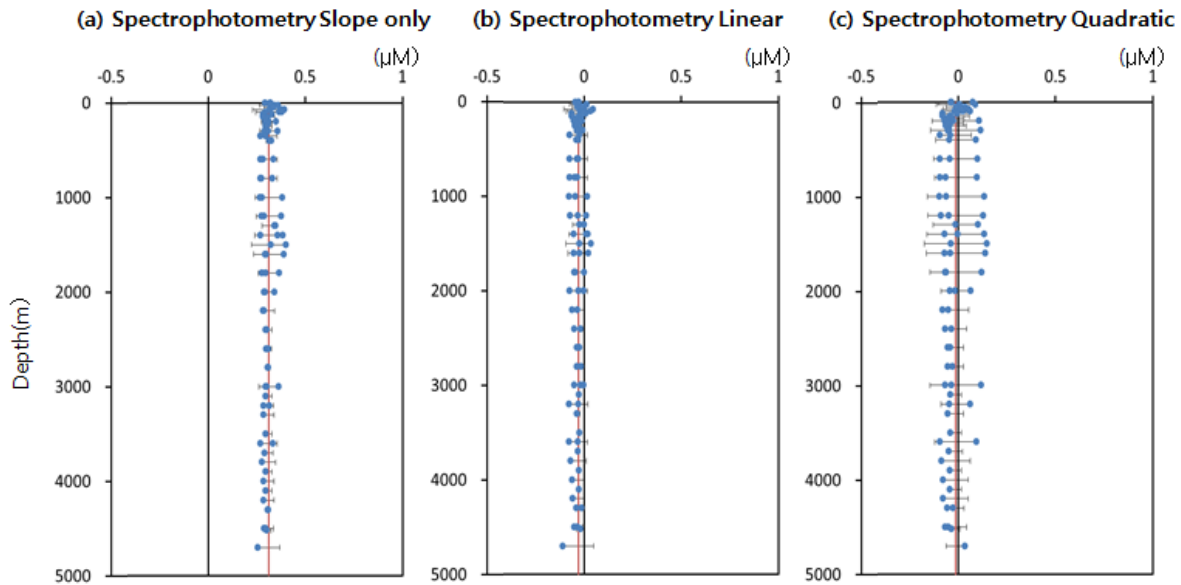


Fig. 7. Vertical profiles of ammonium concentration differences between fluorometry (quadratic) and various spectrophotometry calibration curves ((a) spectrophotometry slope only, (b) spectrophotometry linear, (c) spectrophotometry quadratic) in seawater (Table 7).

Table 7. Difference of KANSO CRMs concentrations between fluorometry (quadratic) and various calibration curves of spectrophotometry (*: |Spectrophotometry - Fluorometry (Quadratic)| value, mean±standard deviation)

Spectrophotometry Calibration curves	KANSO CRM batch			Avg
	CD	CC	BW	
Slope only* (μM)	0.299(±0.151)	0.338(±0.169)	0.313(±0.203)	0.313(±0.177)
Linear* (μM)	0.044(±0.136)	0.021(±0.168)	0.031(±0.191)	0.034(±0.166)
Quadratic* (μM)	0.041(±0.126)	0.026(±0.153)	0.027(±0.177)	0.032(±0.153)

Hydes *et al.* (2010)에 의하면 3개 이상의 표준용액열을 사용할 경우에 2차함수의 검량선으로 계산된 농도값이 선형관계식의 기울기와 절편으로 계산된 농도값보다 일관성 있는 결과가 나타났으나, 본 연구에서는 분광광도법 2차함수로 계산된 결과보다 분광광도법 선형관계식 기울기와 절편을 이용하여 계산된 결과가 형광법 2차함수의 결과와의 차이가 더 작고(평균 0.032 μM) 일관성 있는 것으로 판단된다(Fig. 7). 분광광도법 분석에서 선형관계식 기울기, 기울기와 절편, 그리고 2차함수 검량선식으로 계산된 표준용액열 농도 중에서 기울기와 절편으로 계산된 표준용액열의 농도와 표준용액열의 명목상 농도 사이의 잔차 RMSD가 가장 낮았다(Table 8, Fig. 9). 이는 해수시료의 용존 암모늄 농도가 1 μM 이하인 해수시료를 분광광도법으로 분석할 경우에 검량선 작성에 사용된 표준용액열 농도 범위 내에서 첨가된 암모늄과 흡광도 사이의 선형관계가 뚜렷하기 때문에 비선형특성을 고려하는 2차함수 검량선보다는 선형관계식의 기울기와 절편을 사용하여 농도를 계산하는 것이 더 일관성 있는 결과를 보인 것으로 판단된다.

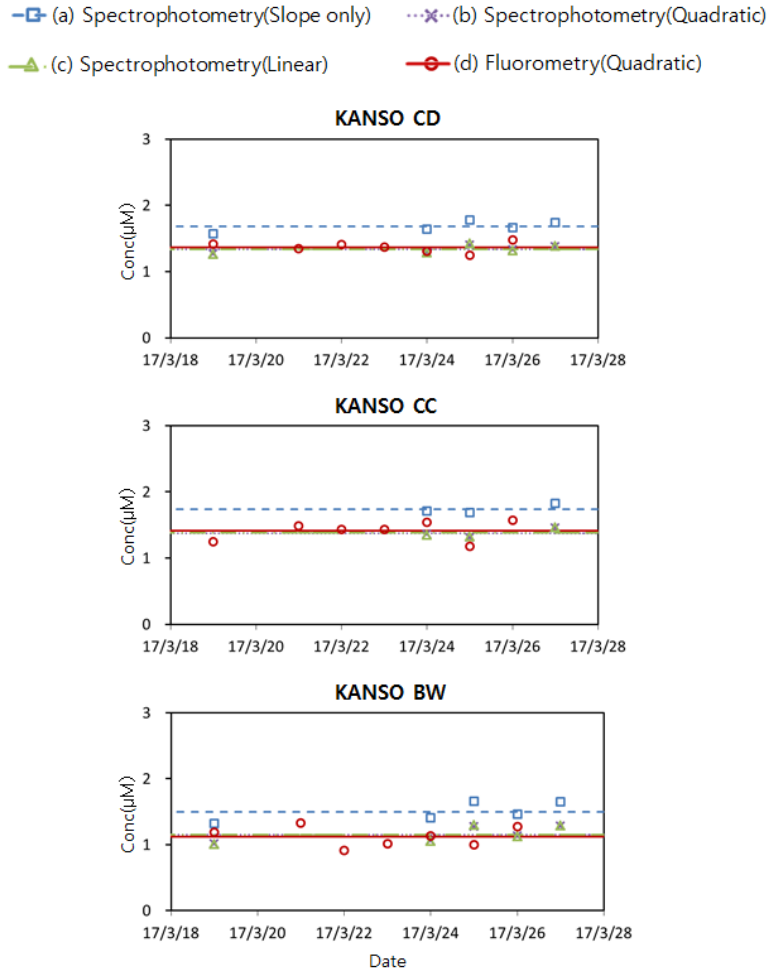


Fig. 8. Ammonium concentrations in KANSO CRMs from various calibration curves ((a) spectrophotometry slope only, (b) spectrophotometry quadratic, (c) spectrophotometry linear and (d) fluorometry quadratic). Each line shows the mean value of results.

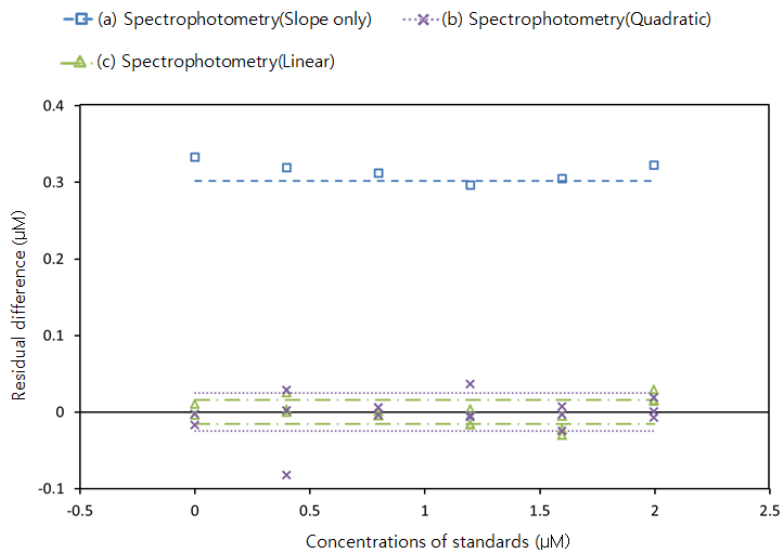


Fig. 9. Plot of residual difference between the measured ammonium concentrations of standards with diverse calibration curves ((a) spectrophotometry slope only, (b) spectrophotometry quadratic and (c) spectrophotometry linear) and the concentrations of standards.

Table 8. Residual difference between the measured ammonium concentrations of standards with diverse calibration curves ((a) spectrophotometry slope only, (b) spectrophotometry quadratic and (c) spectrophotometry linear) and the concentrations of standards (* : Concentration of standard (μM))

Date	Std*	Measured Conc (μM)			Residual difference (μM)		
		Slope only	Linear	Quadratic	Slope only	Linear	Quadratic
3/19/2017	0	0.332	0.010	-0.003	0.332	0.010	-0.003
	0.4	0.718	0.400	0.402	0.318	0.000	0.002
	0.8	1.111	0.796	0.806	0.311	-0.004	0.006
	1.2	1.495	1.183	1.193	0.295	-0.017	-0.007
	1.6	1.904	1.595	1.597	0.304	-0.005	-0.003
	2	2.321	2.015	2.001	0.321	0.015	0.001
	0.4	0.613	0.403	0.318	0.213	0.003	-0.082
3/21/2017	0.8	1.011	0.801	0.796	0.211	0.001	-0.004
	1.2	1.414	1.204	1.236	0.214	0.004	0.036
	1.6	1.788	1.578	1.607	0.188	-0.022	0.007
	2	2.224	2.014	1.993	0.224	0.014	-0.007
	0	0.352	-0.013	0.110	0.352	-0.013	0.110
3/25/2017	1.2	1.611	1.225	1.204	0.411	0.025	0.004
	1.6	2.001	1.609	1.600	0.401	0.009	0.000
	2	2.375	1.976	2.004	0.375	-0.024	0.004
3/26/2017	0	0.341	-0.004	-0.017	0.341	-0.004	-0.017
	0.4	0.772	0.426	0.429	0.372	0.026	0.029
	0.8	1.143	0.796	0.806	0.343	-0.004	0.006
	1.2	1.533	1.184	1.195	0.333	-0.016	-0.005
	1.6	1.920	1.570	1.575	0.320	-0.030	-0.025
	2	2.380	2.029	2.019	0.380	0.029	0.019
RMSD** (μM)				0.319	0.016	0.033	

** : Root Mean Square Deviation (RMSD) = $\sqrt{Mean((Residual\ difference)^2)}$

본 연구결과는 선형관계식의 기울기만 사용하여 첨가된 용존 암모늄과 흡광도의 관계만 적용하여 저영양염 해수와 인공 해수에 포함된 용존 암모늄 불순물 영향을 제거하고, 초순수와 인공해수/저영양염 해수 간 굴절률 바탕값 차이로 해수시료/인공해수에 포함된 염분이 발색시약의 반응에 미치는 영향을 보정하여 보다 정확한 농도를 측정하는 기존 연구(Coverly *et al.*, 2012)와 상이하였다. 선형관계식의 기울기는 첨가된 용존 암모늄에 비례하기 때문에 기존 연구와 본 연구결과가 상이한 원인으로 판단되지 않는다. 하지만 2.3절에 설명한 바와 같이 용존 암모늄 발색에 핵심인 SDIC를 제거하여 초순수와 해수시료의 시약 굴절률 바탕값을 측정하였으나, 제거된 SDIC가 초순수와 해수시료의 염과의 작용에 의해 발생하는 굴절률 영향이 시약 굴절률 보정에 적절하게 반영되지 않았을 가능성이 있다. 향후 이에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

5. 결론

선상에서 상이한 기관의 서로 다른 분석법(분광광도법과 형광법)으로 분석한 영양염 표준물질과 현장 해수시료의 결과에 따르면 분광광도법으로 분석된 용존 암모늄 농도값이 형광법 보다 약 0.31 μM 높게 나타났다. 일반적으로 형광법은 분광광도법에 비해 방법검출한계가 낮고, 해수시료의 시약 굴절률 영향이 적은 것으로 알려져 있어, 두 기관의 용존 암모늄 농도값

차이의 원인을 분광광도법 분석방법검출한계, 분광광도법에 내재된 해수시료의 시약 굴절률 영향, 그리고 두 분석 방법에 사용된 상이한 검량선 사용의 영향 등에서 기인한 것인지 살펴보았다. 현장에서 측정된 분광광도법 방법검출한계($0.063 \mu\text{M}$)는 제조사의 매뉴얼에서 제시한 방법검출한계($0.03 \mu\text{M}$)에 비해 2배 정도 높았고, 형광법의 방법검출한계($0.007 \mu\text{M}$)보다 9배 높았으나, 분광광도법과 형광법으로 측정된 영양염 표준물질과 해수시료의 용존 암모늄 농도 차이값($0.31 \mu\text{M}$)의 20% 정도였다. 그리고 분광광도법으로 해수의 용존 암모늄을 분석할 때 해수시료의 시약 굴절률 바탕값은 $0.054 \mu\text{M}$ 였으며, 두 분석법에 의한 용존 암모늄 농도값 차이의 17% 정도였다. 반면 분광광도법의 검량선을 선형관계식 기울기와 절편과 2차함수를 적용하여 계산한 용존 암모늄 농도와 형광법 결과와의 차이(각각 $0.032 \mu\text{M}$, $0.045 \mu\text{M}$)는 분광광도법의 검량선을 선형관계식 기울기만 사용하여 계산한 결과와 형광법 결과 간 차이(약 $0.31 \mu\text{M}$)의 10~15%로 감소하였다. 본 연구결과는 서로 다른 기관에서 상이한 방법으로 분석된 용존 암모늄의 농도값 차이는 두 기관에서 사용된 분석 방법에 내재된 오차보다는 농도를 계산하는데 상이한 검량선식 사용에 의한 영향이 큰 요인으로 작용한 것으로 판단된다. 향후 다양한 실험실에서 분석된 용존 암모늄 자료의 상호 비교성 확보를 위해 분석방법과 검량선 식에 대한 정보를 사전에 검토할 것을 권고한다.

사 사

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원사업 ‘관할해역 해양 정보 공동 활용 체계구축(2단계)’의 ‘사전 예방적 품질관리체계 구축 연구(PM61920)’ 사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 논문 원고의 내용이 개선될 수 있도록 해주신 두 분의 심사위원님께 감사드립니다.

참고문헌(References)

- Aminot, A., R. K erouel and D.S. Kirkwood, 1997. Determination of ammonia in seawater by the indophenol method: evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire. *Mar. Chem.*, **56**: 59-75.
- Aminot, A., R. K erouel and D. Birot, 2001. A flow injection-fluorometric method for the determination of ammonium in fresh and saline waters with a view to in situ analyses. *Water Res.*, **35**(7): 1777-1785.
- Aminot, A., R. K erouel and S. Coverly, 2009. Nutrients in seawater using segmented flow analysis. In: *Practical Guidelines for the Analysis of Seawater*, edited by Wurl, O., CRC Press, London, pp. 143-178.
- Coverly, S., R. K erouel and A. Aminot, 2012. A re-examination of matrix effects in the segmented-flow analysis of nutrients in sea and estuarine water. *Anal. Chim. Acta*, **712**: 94-100.
- Dugdale, R.C. and J.J. G ering, 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 196-202.
- Grasshoff, K. and H. Johannsen, 1972. A new sensitive and direct method for the automatic determination of ammonia in sea water. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, **34**(3): 516-521.
- Harrison, W.G., L.R. Harris and B.D. Irwin, 1996. The kinetics of nitrogen utilization in the oceanic mixed layer: nitrate and ammonium interactions at nanomolar concentrations. *Limnol. Oceanogr.*, **41**(1): 16-32.
- Hydes D.J., M. Aoyama, A. Aminot, K. Bakker, S. Becker, S. Coverly, A. Daniel, A.G. Dickson, O. Grosso, R. Kerouel, J.V. Ooijen, K. Sato, T. Tanhua, E.M.S Woodward and J.Z. Zhang, 2010. Determination of dissolved nutrients(N, P, Si) in seawater with high precision and inter-comparability using das-segmented continuous flow analysers. In: *The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: a Collection of Expert Reports and Guidelines*, edited by Hood E.M., C.L. Sabine and B.M. Sloyan, UNESCO-IOC, Paris, pp. 1-88.

- ICES, 1995. Report on the results of the fifth ICES intercomparison exercise for nutrients in seawater.
- Krom, M.D., 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst*, **105**: 305-316.
- K erouel, R. and A. Aminot, 1997. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flows analysis. *Mar. Chem.*, **17**: 265-275.
- Patton, C.J. and S.R. Crouch, 1977. Spectrophotometric and kinetics investigation of the berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem.*, **49**(3): 464-469.
- Rho T.K., S. Coverly, E.S. Kim, D.J. Kang, S.H. Kahng, T.H. Na, S.R. Cho, J.M. Lee and C.R. Moon, 2015. Practical considerations for the segmented-flow analysis of nitrate and ammonium in seawater and the avoidance of matrix effects. *Ocean sci. J.*, **50**(4): 709-720.
- Roskam, R.T. and D.D. Langen, 1964. A simple colorimetric method for the determination of ammonia in seawater. *Anal. chim. Acta*, **30**: 56-59.
- Solorzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, **14**(5): 799-801.
- USEPA, 2016. Definition and procedure for the determination of the method detection limit (revision 2).
- Wheeler, P.A. and S.A. Kokkinakis, 1990. Ammonium recycling limits nitrate use in the oceanic Subarctic Pacific. *Limnol. Oceanogr.*, **35**(6): 1267-1278.
- Willason, S.W. and K.S. Johnson, 1986. A rapid, highly sensitive technique for the determination of ammonia in seawater. *Mar. Biol.*, **91**: 285-290.