

Plant Analysis Methods for Evaluating Mineral Nutrient

Ye-Jin Lee*, Jwa-Kyung Sung, Seul-Bi Lee, Jung-Eun Lim, Yo-Sung Song, Deog-Bae Lee, and Suk-Young Hong
 Division of Soil & Fertilizer, National Institute of Agricultural Science, Wanju 55365, Korea

*Corresponding author: leeyj418@korea.kr

ABSTRACT

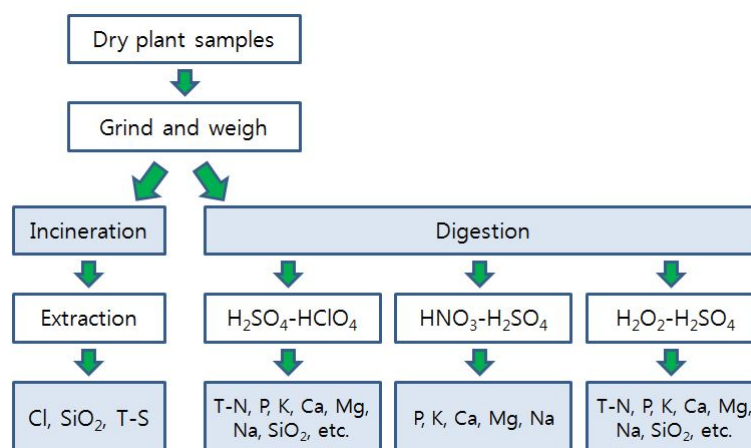
Received: February 8, 2017

Revised: March 2, 2017

Accepted: April 25, 2017

Analysis of mineral nutrients in plant is required for evaluating diagnosis of plant nutritional status. Pretreatment procedure for the analysis of plant can be varied depending on elements to be analyzed. Wet-digestion is suitable for total nitrogen, phosphate and cations, however, digestion solution including nitric acid is not suitable for nitrogen analysis. Incineration procedure is required to analyze chloride, silicate and total sulfur. After digestion, total nitrogen is analyzed by Kjeldahl method, and phosphate is detected at 470nm by colorimetric analysis with ammonium meta vanadate. Cations and micro elements are determined by titration or colorimetry, also, these elements can be measured by Atomic absorption spectrometer (AAS) or Inductively coupled plasma spectrometer (ICP).

Keywords: Plant, Mineral nutrient, Analysis, Digestion, Element



Plant sample preparation methods depending on elements to be analyzed.



Introduction

식물체를 구성하는 필수원소들은 대기, 토양, 수계 등 자연계를 통하여 흡수되고, 비료와 유기물 등의 인위적인 양분 투입은 원소들의 함량에 영향을 미친다. 필수원소는 식물체가 흡수하는 양에 따라서 다량원소와 미량원소로 구분되며, 이들의 함량은 작물이 정상적으로 양분을 흡수하는지 판단하는 지표가 된다.

식물체 무기성분 함량은 양분의 과부족 또는 재배환경이 양분 흡수에 미치는 영향을 분석하는데 기본적인 정보를 제공한다. 농업 분야에서는 비료 시용수준별 양분 흡수량을 분석하여 적정 비료 추천량을 설정하고, 식물체 부위별 적정 양분함량을 설정하여 영양진단에 활용한다 (Sung et al., 2010; Lee et al., 2008). 또한 식물체 무기성분 함량은 재배지역의 토양 특성이나 양분 수준에 따른 작물 생산성 및 품질을 평가하는데 적용될 수 있다 (Reuter, 1997).

식물체 분석은 그 목적에 따라 식물 전체 또는 부위별 성분함량을 분석한다. 작물의 전 생육기간 필요한 양분함량을 평가하기 위해서는 전체의 양분 흡수량을 산출해야 하며, 특정 부위의 양분 결핍 또는 과잉 증상을 판단하기 위해서는 부위별로 시료를 채취하여 분석한다 (Chapin, 1980).

식물체 원소 분석을 위해서는 식물체를 건조하여 분쇄하는 시료 조제 과정이 필요하며, 식물체 분해 방법은 분쇄한 식물체를 고열로 태운 뒤 재를 분석하는 건식분해법과 강산을 이용하여 분해하는 습식분해법으로 구분된다. 건식분해법은 약 500~600°C 까지 올라가는 회화로가 반드시 필요하지만 지속적으로 시료 상태를 확인할 필요는 없다. 습식분해법은 열판과 흡후드 시설이 있으면 분해가 가능하지만, 분해시간이 길고 주기적으로 시료를 관찰해야 하며 분해액의 종류에 따라 분석 가능한 원소가 다르다 (Parr et al., 2001; Novozamsky et al., 1983; Thomas et al., 1967). 그러므로 분석하고자 하는 원소의 특성에 따라서 건식분해법과 습식분해법 가능 여부를 선택할 수 있다 (Fig. 1). 습식분해법은 분해 과정에서 휘발성 금속들이 대부분 손실되고, 오염될 우려가 있어 미량원소를 분석하고자 할 때는 마이크로파 분해장치를 이용하여 분해하기도 한다 (Nam et al., 1998).

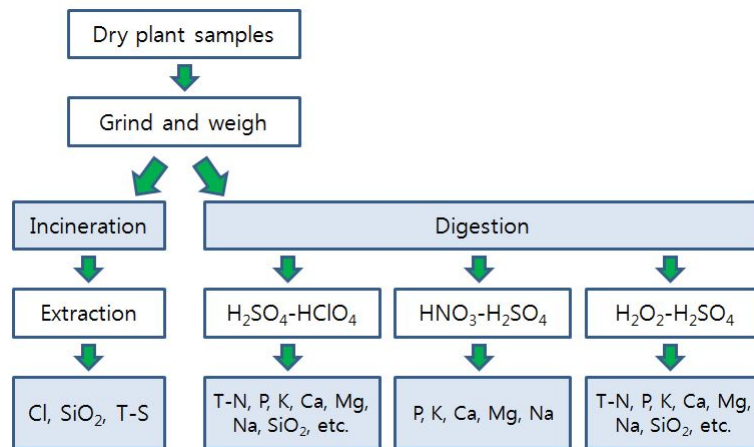


Fig. 1. Plant sample preparation by type of element.

식물체 분해액의 원소별 분석은 pH 변화에 의한 적정법, 비색 정량법으로 측정하여 함량을 구하고, 규산과 총 유허은 잔사 또는 침전물을 정량한다. 이 방법은 원소 종류별로 각각 분석해야 번거로움이 있어 K, Ca, Mg 등 양이온은

Inductively coupled plasma spectrometer (ICP)로 동시 분석한다.

농촌진흥청 국립농업과학원 (NIAST, 2000) 에서 제시한 식물체 분해방법과 원소별 분석방법은 다음과 같다.

식물체 습식분해법 (Wet digestion)

H₂SO₄-HClO₄ 법 40 mesh 정도로 분쇄된 건조시료 0.5 g 을 분해용 삼각플라스크에 칭량하여 conc. H₂SO₄ 1 mL 와 50% HClO₄ 용액 10 mL 를 가한다. 흡후드 내 열판에 놓고 처음에는 낮은 온도에서 가열한 후 점차 온도를 높이며, 분해온도는 310~410°C 정도가 알맞다. 분해가 끝나면 냉각시켜 No. 6 여과지를 사용하여 100 mL 메스플라스크에 여과하고 증류수를 넣어 여과액을 100 mL 로 맞춘다. 여과지에 남아있는 잔여물은 SiO₂ 정량에 사용하고 여과액은 T-N, P, K, Ca, Mg, Na 등의 정량에 사용한다.

HNO₃-H₂SO₄ 법 40 mesh 정도로 분쇄된 건조시료 2 g을 분해용 삼각플라스크에 20 mL HNO₃-H₂SO₄ (1 : 1) 용액을 가한다. 열판에서 NO₂의 붉은 가스가 모두 날아갈 때까지 서서히 낮은 온도로 가열하다가 차츰 고온으로 약 1시간 분해를 계속하여 맑은 분해액을 얻는다. 분해액을 식힌 다음 2~3 mL의 conc. HCl을 넣고 약 50 mL의 증류수를 넣은 다음 약간 가열한다. 잠시 후 식혀서 No. 6 여과지를 사용하여 여과하고 증류수를 넣어 여과액을 250 mL로 맞춘다.

H₂O₂-H₂SO₄ 법 건조시료 0.5 g을 micro-Kjeldahl flask에 취한 다음 conc. H₂SO₄ 5 mL를 가한다. 흡후드 내 열판에 놓고 처음에는 저온으로 가열하고 점차 고온으로 가열하면서 H₂O₂ 0.5mL 씩 넣는다. 분해액이 투명하게 될 때까지 H₂O₂를 첨가하면서 가열한다. 분해액은 No.6 여과지를 사용하여 여과하고 증류수를 넣어 여과액은 100 mL로 맞춘다.

총 질소 (Total nitrogen)

Kjeldahl 법 NH₄⁺를 받을 수기에 2% 붕산용액 10~20 mL 를 준비해둔다. 분해액 10 mL 을 취하여 Kjeldahl flask 에 넣고 45% NaOH 용액 10~20 mL 를 넣어 액성을 알카리화하여 증류를 시작하고, 수기의 증류액이 약 70 mL 정도 되면 증류를 멈춘다. Blank 시료의 내용물을 0.01N-H₂SO₄ 로 적정한 후, 분해액을 증류한 내용물을 0.01N-H₂SO₄ 로 적정한다. 청색에서 분홍색이 나타나는 점을 종말점으로 한다 (Baethgen and Alley, 1989). 유의할 점은 Kjeldahl 증류관의 수증기가 새지 않도록 하고, 증류액의 온도가 50°C 를 초과하면 안 된다.

$$N (\%) = (T-B) \times f \times \text{황산농도} (0.01) \times 14 \times 100 / \text{시료무게} (g)$$

T : 시료적정에 소요된 황산표준용액의 ml

B : Blank의 적정에 소요된 황산표준용액의 ml

f : 황산표준용액의 보정치

인산 (Phosphate)

Vanadate 법 분해액 10 mL 를 50 mL 메스플라스크에 취하고 10 mL ammonium meta vanadate 용액을 넣어 혼합한 후 30°C 항온기에 15 분 정도 반응시켜 발색시킨 후 470 nm 에서 흡광도를 측정한다 (Cavell, 1955). 전처리 과정에서 분해한 식물체 시료 무게에 대하여 분해 후 여과하여 맞춘 분해액의 양이 희석배수가 된다.

$$P_2O_5 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{측정치 (mg kg}^{-1}\text{)} \times \text{희석배수} \times 2.29$$

양이온 및 미량원소

칼슘 (Calcium)

EDTA 적정법 분해액 5 mL를 100 mL 삼각플라스크에 넣고 증류수 20 mL를 넣은 다음 8M NaOH 5mL를 넣고 10% KCN을 1mL 정도 넣고 잘 흔든 다음 2-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthylazo)-3-naphthoic acid 0.5 g 과 K_2SO_4 50 g을 혼합한 지시약을 약 0.1 g 넣고 0.005N EDTA로 푸른색이 될 때까지 적정한다.

$$Ca \text{ (\%)} = EDTA \text{ (mL)} \times Normality \text{ (0.005)} \times 20.04 \times 100/5 \times 1000/1 \times 100/\text{시료무게 (g)} \times 1.4$$

20.04 : Ca 1당량에 해당되는 무게

100/5 : 100 ml 표선한 분해액 전량 중 적정시 취한 5 ml

1.4 : CaO/Ca (56/40)

마그네슘 (Magnesium)

EDTA 적정법 분해액 5 mL를 100 mL 삼각플라스크에 넣고 증류수 20 mL를 넣은 다음 NH_4Cl-NH_4OH 완충용액을 5 mL 가한다. 10% $Na_2OH \cdot HCl$ 또는 10% KCN을 1mL 정도 넣은 다음 1-(hydroxy-2-naphthylazo-6-nitro-2-naphthol-4-sulfonate) 0.5 g과 K_2SO_4 50 g을 혼합한 지시약을 약 0.1 g 넣고 0.005N EDTA로 푸른색이 될 때까지 적정한다. 여기서 적정치는 Ca + Mg 이며, Ca의 적정치를 뺀 수치로 계산한다 (Barrows and Simpson, 1962).

$$Mg \text{ (\%)} = EDTA \text{ (mL)} \times Normality \text{ (0.005)} \times 12.15 \times 100/5 \times 1000/1 \times 100/\text{시료무게 (g)} \times 1.66$$

20.04 : Mg 1당량에 해당되는 무게

100/5 : 100 ml 표선한 분해액 전량 중 적정시 취한 5 ml

1.66 : MgO/Mg (40/24)

철 (Iron)

o-phenanthroline법 분해액 25 mL을 메스플라스크에 넣은 후 1 mL hydroquinone과 2 mL o-phenanthroline을 넣고 pH 3.5로 조절하는데 필요한 양의 sodium citrate 용액을 가한다. 20°C 이상에서 1시간 정도 방치한 후 510nm에서 흡광도를 측정한다 (Saywell and Cunningham, 1937).

$$Fe \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{측정치 (mg kg}^{-1}\text{)} \times 100/\text{시료무게 (g)} \times \text{희석배수}$$

망간 (Manganese)

Ammonium persulfate법 분해액 20~25 mL를 150 mL 비커에 취하고 열판에서 증발시킨 다음 냉각시켜 $HgSO_4$ 와 conc. HNO_3 , 3N- $NH_4H_2PO_4$, $AgNO_3$ 를 혼합한 용액을 넣은 후 액량이 약 90 mL 정도 되게 희석한다. 여기에 $(NH_4)_2S_2O_8$ 1g을 넣고 약 2분 동안 끓여 충분히 발색시킨 후 냉각시키고 100mL 메스플라스크에 옮겨 표선까지 채

은 후 잘 섞어 파장 540nm에서 측정한다.

$$\text{Mn (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{측정치 (mg kg}^{-1}\text{)} \times 100/\text{시료무게 (g)} \times \text{회석배수}$$

붕소 (Boron)

Curcumin법 건조 시료 0.2 g을 50 mL polyethylene 원심분리관에 취하고 0.5N HCl 10 mL를 넣고 마개를 막아 2시간 동안 진탕 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한다. 상등액 1 mL을 증발접시에 취하고 4 mL curcumin 수산액을 넣고 55°C 수조에서 증발 건조시킨 후 15분간 방치하고 25 mL의 95% ethanol로 잘 녹여 No. 2 여과지로 여과한다. 이때 처음 나오는 용액 수 mL를 버리고 그 다음에 나오는 용액을 파장 540nm에서 측정한다 (Dible et al., 1954).

$$\text{B (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{측정치 (mg kg}^{-1}\text{)} \times \text{HCl (mL)/시료무게 (g)}$$

염소 (Chloride)

Calcium oxide법 건조 시료 1 g을 증발접시에 담아 시료무게의 1/4 정도 되는 calcium oxide와 증류수를 넣어 불과 같이 될 때까지 잘 젓는다. 이 시료를 550°C 전기로에서 90분간 회화시킨 후 방냉하여 물 15 mL를 넣고 열판이나 끓는 수조에서 가온한 후 잔사는 유리봉을 사용하여 삼각플라스크에 No.1 여과지로 여과한다. 증발접시에 남아있는 시료는 뜨거운 물 10 mL를 가해 완전히 여과한다. 여액에 acetic acid를 넣어 용액의 pH가 6~7 정도 되게 한 후 potassium chromate 5방울을 첨가하고 0.05N AgNO₃를 사용하여 붉은 갈색이 될 때까지 적정한다.

$$\text{Cl (\%)} = 0.05\text{N AgNO}_3 \text{ (mL)} \times 1.77/10$$

1.77 : 0.05N AgNO₃ 1 mL 당 1.77 mL Cl
10 : 시료 여과액 량

규산 (Silicate)

중량법 H₂SO₄-HClO₄ 또는 H₂O₂-H₂SO₄ 분해법으로 분해할 때 여과지상에 남아있는 잔사를 자기 Crucible에 담아 후드 내에서 전기로로 1차 탄화시킨 다음 전기로에 넣어 600°C에서 2시간 정도 태워 칭량한다.

총 유황 (Total sulfur)

MgNO₃ 회화법 건조 시료 1g을 증발접시에 취하여 7.5 mL MgNO₃을 넣고 180°C 열판에서 건조시킨 후 500~600°C 전기로에서 2시간 정도 회화 후 냉각시킨다. 건조물은 열판에서 1:1 HCl 용액으로 노란색이 나타날 때까지 용해시킨 후 No.5B 여과지로 여과하여 잔사는 버리고, 여액은 20% BaCl₂·2H₂O 용액 20~25 mL를 넣은 후 5분간 끓인 다음 5시간 방치하면 BaSO₄ 침전물이 생성된다. 생성된 침전물을 따뜻한 증류수로 3~5회 No.5C 여과지로 여과하여 여과지 위의 침전물을 500~600°C 전기로에서 2시간 회화한 후 desiccator에서 1시간 냉각 후 평량한다. SO₄ 함량이 미량일 때는 일정량의 분해액에 BaCl₂을 넣은 다음 0.25% gum-acacia를 넣은 후 진탕한 다음 2~10분 사이에 470 nm에서 비탁도를 측정한다 (Blanchar et al., 1965).

$$S(g) = \text{침전물 무게}(g) \times 0.1374$$

0.1374 : S 원자량 / BaSO₄ 분자량

원자흡광도 또는 유도결합플라즈마 분광광도계 측정법 분해액 일정량을 취하여 Atomic absorption spectrometer (AAS) 또는 Inductively coupled plasma spectrometer (ICP)를 이용하여 측정한다 (Huang and Schulte, 1985). 원소별 함량이 높은 경우에는 희석하여 표준용액의 검량선에 포함될 수 있도록 한다.

(해당원소 : Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn 등)

Conclusion

식물체 무기성분 분석을 위한 분해방법과 식물체 분해액 중 원소별 분석 방법을 기술하였다. 총 질소는 Kjeldahl 증류 및 적정법, 인산은 비색 측정법으로 분석하고, 양이온 및 미량원소는 적정법 또는 비색 측정법으로 분석하거나 AAS 및 ICP 로 분석할 수 있다. 염소, 규산, 총 유황은 회화법으로 탄화시켜 측정한다.

Acknowledgement

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01086704)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Baethgen, W. E. and M. M. Alley. 1989. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20(9-10):961-969.
- Barrows, H. L. and E. C. Simpson. 1962. An EDTA method for the direct routine determination of calcium and magnesium in soils and plant tissue. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 26(5):443-445.
- Blanchar, R. W., G. Rehm, and A. C. Caldwell. 1965. Sulfur in plant materials by digestion with nitric and perchloric acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 29(1):71-72.
- Cavell, A. J. 1955. The colorimetric determination of phosphorus in plant materials. *J. Sci. Food Agric.* 6(8):479-480.
- Chapin, F. S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 11: 233-260.
- Dible, W., E. Truog, and K. Berger. 1954. Boron determination in soils and plants. Simplified curcumin procedure. *Anal. Chem.* 26:418-421.
- Huang, C. Y. L. and E. E. Schulte. 1985. Digestion of plant tissue for analysis by ICP emission spectroscopy. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 16(9):943-958.
- Lee, J. Y., J. H. Park, B. C. Jang, K. S. Lee, B. K. Hyun, S. W. Hwang, W. S. Yoon, and B. H. Song. 2008. Establishment of critical ranges of inorganic nutrition contents in leaves of watermelon (*Cucurbita citrullus* L.) in protected cultivation. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 41(3):158-163.
- Nam, J. J., N. J. Cho, Y. G. Jeong, and S. H. Lee. 1998. Comparison of microwave with conventional wet-digestion methods for the element analysis of plant and compost. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 31(3):253-258.
- National Institute of Agricultural Science and Technology (NIAST). 2000. Method of Soil and Plant Analysis. National

- Institute of Agricultural Science and Technology, RDA. Korea.
- Novozamsky, I., V. J. G. Houba, R. Van Eck, and W. Van Vark. 1983. A novel digestion technique for multi-element plant analysis. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 14(3):239-248.
- Parr, J. F., V. Dolic, G. Lancaster, and W. E. Boyd. 2001. A microwave digestion method for the extraction of phytoliths from herbarium specimens. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 116(3): 203-212.
- Reuter, D. 1997. *Plant Analysis: An Interpretation Manual*. CSIRO publishing.
- Saywell, L. G. and B. B. Cunningham. 1937. Determination of iron: colorimetric o-phenanthroline method. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 9(2): 67-69.
- Sung, J. K., S.Y. Park, S. Y. Lee, Y. J. Lee, J. Y. Lee, B. C. Jang, H. G. Goh, Y. S. Ok, T. W. Kim, and B. H. Song. 2010. Influence of nutrient supply on growth, mineral nutrients and carbohydrates in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean J. Soil Sci. Fert.* 43(1):83-89.
- Thomas, R. L., R. W. Sheard, and J. R. Moyer. 1967. Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digestion. *Agron. J.* 59(3): 240-243.