大量植物樣本氮磷鉀的迅速測定法

（農業試驗所植物營養研究室經常分析法的介紹）

李　蘭　帝

序　言

多年來作農業研究的人常有一種感覺，就是用少數樣品作精細的分析不如採取多數的樣品作準確度較差的分析。這種要求常使我們覺得需要將過去的分析方法加以修改而使它更適合於我們的目的。一般將分析法微量化可減少操作上的一些負擔，但如能將分析法的部分操作簡化，在多數樣品分析工作上的幫助也同樣值得重視。本研究室多年來從事於植物體的分析工作，經屢次改良漸近乎理想而成一分析系統。現將彙編成文以供大家參考，並有不足之處請大家指教。

實驗方法

1　樣品之調製。

器具：

(1)烘乾箱：可調整溫度 80°C

(2)切草器。

(3)粉碎器。

方法：

樣品在 80°C 烘乾，經切斷及粉碎後裝於玻璃瓶以供化驗。

2　樣品之分解。

器具：

(1)分解瓶：Kjeldahl 分解瓶，50或 100cc. 均可。

(2)分解爐：電爐，煤氣爐，或酒精燈均可。如沒有通風室設備者可作玻璃試管長約 5cm，而恰能插入分解瓶。底穿幾個小洞。頸部以濾紙圈繞插入分解瓶可固定如栓。內裝濕綿以吸收分解時排出之氣體。

試藥：

(1)濃硫酸，化學用。以注射筒裝入分解瓶甚方便。如裝於附有滴管之試藥瓶時必有適當的防濕裝置。

(2)過氯酸60%，化學用。通常市面上的即可直接使用。

方法：

秤樣品 0.2g，放入分解瓶，加濃硫酸 4c.c. 順便將粘在分解瓶頸部的樣品也一同洗入。在分解爐加熱。開始有大量白煙冒出，後漸消失。此時可看見硫酸慢慢沸騰，顏色變爲棕色如醬油。原來的黑色已不存在。時間約須20分。取出後稍須等冷加 60% $HClO_4$ 3滴。將分解瓶垂直放，$HClO_4$ 可一直滴到底而不粘於頸部。不要把瓶口面向臉部。繼續加熱，分解物即很快變白色。如不能變白色可重複 $HClO_4$ 之處理。通常植物體在一次 $HClO_4$ 之處理即可變白，如不能變白大部理由爲前段硫酸分解不足之故。在硫酸分解不足之情況下加 $HClO_4$ 有氮損失之虞，最好再重複以核對爲宜。分解物移入 50c.c. 定容瓶，稀釋至標線。

3　氮之定量。

器具：

(1)培養皿 (Petri Dish)：直徑約 9cm。大量購買時可訂購同樣大的培養皿。通常大小成一對的可將大的和小的分開使用。互相蓋時接縫可用玻璃膠帶封密的才可使用。

(2)小玻璃杯：直徑約 4cm。圓底，形狀如蒸發皿。

(3)玻璃膠帶。

(4)保溫箱：35°C 保溫。夏天無須保溫箱，但冬天有保溫箱較方便。冬天常因過乾燥而使玻璃膠帶難剝開。保溫箱內宜放一杯水而防止之。

(5)微滴定管：10ml ，最小刻度爲 0.05ml。

試藥：

(1)NaOH 飽和液：可用工業用 NaOH。約 19N

(2)硼酸飽和液：約4%之硼酸液。加適當量之 Bromophenol Blue 爲指示劑。配好的硼酸液其 pH 應在指示劑之變色範圍。如呈藍色應以稀鹽酸調整使其呈綠色。

(3)0.01N 酸標準液：HCl 或 H_2SO_4 均可。先配 0.1N 以 Na_2CO_3 標定後稀釋至 0.01N。或取一定量之銨鹽依本文所述之擴散法做銨之滴定而算酸之濃度亦可。標準液裝於附有微滴定管之試藥瓶使用時較方便。

方法：

取供試液（此液無須澄清或過濾）10ml 於培養皿，另備小玻璃杯內裝硼酸飽和液 3ml（無須精確量取）。徐徐加入 NaOH 飽和液約 3c.c. 於培養皿。放入硼酸液之小杯並以培養皿蓋。接縫用玻璃膠帶封密。徐徐搖動使 NaOH 充分混合後移入保溫箱。因 NaOH 溶液較重加入培養皿之後在下層，如此銨不易逸出故操作無須慌張。應注意在未加 NaOH 之前不要把硼酸液放入培養皿內而施蓋，因常有氯氣逸出而使指示劑變黃。第二天取出培養皿，剝開膠帶取出硼酸液（因吸收銨顏色已變藍）。由微滴定管以 0.01N 酸標準液滴定至原來的綠色爲止。將近終點時應一滴一滴充分混合之後才加後一滴。以小玻璃棒攪拌爲宜。因小杯爲圓底須注意固定。由消耗之酸液計算氮量，0.01N 之酸液 1ml 相當於 0.14mg 之氮，如取供試液 10ml, 1ml 卽相當於 0.35%。

4 磷之定量

器具：

(1)光電比色計：具有 600~700mμ 之單色光裝置。

(2)試管：內徑約 1cm 長 10cm，並在 5ml 之處刻一標線。如用 Buusch & Lomb 的 Spectronic 20 比色計其標準比色管可直接使用

試藥：

(1) 2.4%鉬酸銨液：將鉬酸銨磨粉秤 24g 加水約 600c.c. 加熱至 60~70°C。徐徐加入 6N NH_4OH，充分攪拌使鉬酸銨溶解。如能直接溶解無須加入銨水。此溶液不應有銨的臭味，故銨水之用量須注意。目的只爲求溶解不能用多。用量超過有銨之臭味逸出時再以稀 H_2SO_4 中和至不聞臭味爲止。

(2)還原劑：1-Amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 秤取 0.25g 加 19g Na_2SO_3 結晶，再加水約 200ml，慢慢加 6N H_2SO_4 一面攪拌使其溶解，最後加至有亞硫酸氣體（刺鼻子之氣味）逸出爲止 pH 在 3~4。稀釋至 250c.c. 一旦溶解之溶液不久卽起沉澱，放一夜後取上澄液使用。此還原劑相當安定，有效期間 2 個月以上，實際上筆者尚未遇過不能使用之情形所以眞正的有效期間尚不知。通常密栓並放置暗處。

(3)磷標準液：P_2O_5 20ppm。秤取 KH_2PO_4 0.480g，另加 6 N H_2SO_4 1c.c.。稀釋至 500ml。此液爲 P_2O_5 500ppm 可作母液保存。取 20ml 另加 6 N H_2SO_4 1ml 再稀釋至 500ml 做爲 20ppm P_2O_5 溶液。

(4) 6N H_2SO_4：濃硫酸約 36N，稀釋至 6 倍容量。

方法：

取供試液 2ml（澄清之後取上澄液）於試管。通常供試液之酸度在 2.6N 左右。酸度在 1.8～3.3N 間無影響故酸度一般不會成問題，如有疑問可做滴定以求供試液之酸度而做適當的調整。加還原劑 0.5ml 稀釋至 5ml，由 1c.c. 注射筒打入 2.4% 鉬酸銨液 1c.c.，以手指按住試管口將它倒轉以求迅速的混合。如徐徐加鉬酸銨液，因此液比重較輕形成二層，在二層之間開始發色因其發色條件不同影響最後之發色濃度，上述方法可避免此影響。放30分以後以光電比色計測其透光率，並與標準相比較。

標準色之做法爲取 20ppm P_2O_5 溶液 0, 0.5, 1.0, 2.0ml 等，另加 6N H_2SO_4 0.8ml 後依上述之方法使其發色。因發色可適用 Beer 法則故在實用時僅 0 及 2.0ml 之二支標準色即够使用。但實驗者不妨先試標準序以求安全。

此法之發色受時間之影響。30分後相當穩定。大量樣品應分批做，通常30個樣本做一批較安全。

2.0ml 之標準液相當於樣本的 0.5% P_2O_5。

5 鉀之定量。

器具：

火焰光度計：火焰光度計在市面有好多種型式。因其型式之差異可能使供試液調製法不同。應參照使用儀器說明書。本研究室所用者爲 Baird-Atomic 公司出品 Model K-Y-1。故本文僅說明定鉀之一例子而已。

試藥：

(1)2500ppm Li^+ 溶液：秤 $LiNO_3$ 25g 溶解於水做成 1*l*。標準與樣本應使用同一瓶溶液。

(2)鉀之標準液：秤取 KCl 0.477g 加 1ml 6N H_2SO_4 稀釋至 500ml 此液爲 500ppm 可做母液保存。取該液 50ml 加 1ml 6N H_2SO_4 再稀釋至 500ml。此液爲 50ppm。

方法：

取供試液含 K 50～150μg，通常水稻樣品爲 1 或 2ml 在 50ml 之定容瓶。加 2500ppm Li^+ 溶液 5ml 稀釋至 50ml 以供測定。標準取鉀之標準液 1，2，及 3ml 在 50ml 定容瓶。同樣加 Li 溶液 5ml 而稀釋至 50ml。在上述濃度範圍光度常與濃度成直線關係故由光度換算樣品之鉀百分率。如取供試液爲 1ml, 則 2ml 之標準液相當於 2.5%的 K。如欲求 K_2O 之百分率乘1,205 即可得。

討　　論

1 取樣問題：最後供化驗之植物體僅 0.2g，因此使人懷疑到該樣品之代表性問題。關於此點可利用統計理論來做檢討。換句話說，只好重複而重複到試驗者認爲滿意爲止。關於這問題因牽涉到其他問題，惟恐超出本文敍述之目的，僅在此提一下而已。

2 植物體之分解。本文所述之分解法爲濕式分解法在磷，鉀之定量上應不成問題，惟對氮恐怕會使人發生疑問。在氮之定量上 Kjeldahl 氏或 Gunning 氏分解法爲一般人使用，因有相當久之歷史其可靠性亦被公認。實事上迄今仍有人在檢討 Kjeldahl 氏分解法而提出幾點問題，這些問題在我們農業研究上尤其在土壤肥料研究上似乎無大影響。筆者開始嘗試以硫酸及過氯酸分解植物體仍以Gunning氏分解法爲核對的依據。依本文所述之方法在實驗誤差之範圍內可與Gunning氏法一致。惟有一點，筆者曾分解純粹的胺基酸 (P-Hydroxylphenylaminoacetic acid) 由其化學式算出氮之含量爲 7.95%。用硫酸過氯酸分解法得 8.00% 應極接近，但用 Gunning 氏法得 7.70%。可能爲誤差或有其他原因筆者尚不明。

3 銨態氮之定量。Conway 氏的擴散法爲本文特別强調之一點。試驗者應視自己的實驗環境而加以適當的修改。最要緊的爲核對。試驗者依自己的實驗條件，取一定量之銨態氮測其回收率，直到有滿意的結果方能大量開始做。

銨之吸收用硼酸可省去鹼標準液，無須精量吸收液，計算的方便等優點，但亦須注意：(1)硼酸液之吸收能仍是有限。3ml 的飽和液可吸收至 3mg 左右之銨態氮。在本文所述之方法其安全度相當大，在普通植物體樣本自不會成問題。(2)在硼酸存在下用强酸直接滴定銨所用指示劑應不爲硼酸所影響。硼酸之飽和液其酸度在 pH 3.8 左右，如用變色區域之 pH 更低之指示劑，如用 0.01N 之酸標準液其滴定該誤差將加大。硼酸飽和液之 pH 在 Bromphenol blue 之變色區域內，可見採用此指示劑較爲理想。但仍有一點，因滴定時加入酸液無意中稀釋了硼酸之濃度。硼酸液被稀釋其 pH 提高，如滴定之終點定於飽和液之 pH（如本文所述滴定以原來的吸收液之指示劑顏色爲對照），這中間就產生由稀釋而起的滴定誤差。此種誤差如標準液之酸濃度愈低則愈大。如用 0.01N 在 5ml 之滴定有 0.1ml 之誤差。故在 5ml 以下之滴定可忽視。如試驗者，需要可做空白試驗以補正。其法爲加入與滴定量同量之水於吸收液再以酸標準液滴定至原來的顏色，所耗之酸應視爲稀釋所致，而做矯正的依據。除使用 Bromophenol blue 或類似之 pH 指示劑之外尚可用 Methyl red（甲基紅）。其變色區域之 pH 較高故滴定時變色較明顯。惟甲基紅受硼酸之影響。此影響可用稀釋法除去。將硼酸飽和液稀釋至約 6 倍之後滴定可得明顯的終點。此時稀釋效果更小而可忽視，故仍爲優良之方法。

4 磷之定量。雖磷之比色法多用鉬藍法或鉬黃法，其實鉬藍法亦有多種，各有長短。本文採用此法之原因爲：(1)酸度無須再調整且可用之酸度範圍亦較寬。(2)磷之濃度範圍適宜於植物體。(3)三價鐵之影響可無須考慮，因其容許濃度很高。(4)分解時由 $HClO_4$ 轉變而來的少量氯氣無影響。

(5) 鉀之定量。鉀之測定以火焰法爲最迅速，但因需特殊儀器爲其缺點。筆者在未有火焰光度計之前曾試 Dipicryl amine 之間接比色法，惟比不上火焰法那麼簡便，但如無火焰光度計時也許唯一尚可行之方法。其方法之要點爲取含有 100～400μg K_2O 之供試液（須中性或微鹼性）於玻璃小杯在熱板上烘乾（在烘乾箱亦可）。加 0.12% Na-dipicryl amine 溶液 2ml（需以 K-dipicryl amine 飽和）以溶解其乾固物。溶解後移入小試管並放入一小玻璃珠而振盪。（因 K-dipicryl amine 容易形成過飽和故以此法使其沉澱）。振盪約 5 分開始起沉澱。放一夜之後取上澄液 0.50ml 稀釋至 25ml 後做比色。（試管內塞入乾綿以避免沉澱之浮起較方便）。如想用此法供試液之調製不宜使用濕式法。將植物體灰化後用水抽出或植物體直接用 0.2N HCl 抽出後將酸蒸發乾涸亦可。因將來火焰法勢必普遍故僅在此提一下。

本實驗室所用之火焰光度計雖爲双光束 (Double beam) 之型式但亦可做單光束 (Single beam) 儀器使用。如此可免用 Li 而使操作較方便。

參 考 文 獻

1. 植物榮養學實驗，編集委員會編，1959，朝倉書店，氮之擴散定量法在99頁有實驗例。
2. Jackson, M. L., Soil Chemical Analysis, 1958. Chap 7. 本文所用磷之比色法大致與該書所列者相同。
3. Snell F.D., and C.T. Snell, colorimetric Method of Analysis 1948. 鉀之比色法即從該書原法修改而得。

RAPID CHEMICAL METHOD OF ANALYSIS FOR NITROGEN, PHOSPHORUS AND POTASSIUM IN PLANT TISSUE

by

L. T. LI

Summery

The paper describes the mothod for the determination of nitrogen, phosphorus and potassium in plant tissue which is adapted by Plant Nutrition Laboratory (TARI) in its routine analysis The method is suitable for handling large samples and has some advantages over other conventional methods so far as simplicity and minimum of cost are concerned. In principle, the method uses sulfuric perchloric acid digestion and subsequent determination of nitrogen phosphorus and potassium by Conway's micro-diffusion acid titration, molybdate blue spectrophotometry and flamephotometry, respectively, Precautions in using this method are carefully described and explanations given to make the experimenter understand the basic principles involved.