

近赤外分光法によるモモ生葉中無機成分の 非破壊測定

高野 和夫・妹尾 知憲

Near Infrared Transmittance Spectroscopy of Mineral Contents in Fresh Peach Leaves

Kazuo Takano and Tomonori Senoo

緒 言

高品質な果実を安定して生産するためには、樹の栄養状態を適正に維持することが重要である。樹の栄養診断の一方法として葉分析があるが、従来の分析方法では技術と時間を要し迅速な対応が難しいのが現状である。

葉分析の簡易迅速化の一手法として、近年急速に各分野での成分分析に実用化されている近赤外分光分析があげられる。乾燥粉碎した葉の近赤外反射スペクトルから葉中の無機成分含有率を推定しようとする試みが、モモ⁹⁾、メロン²⁾、カキ⁸⁾、ミカン⁷⁾、水稻、牧草¹⁾などで行われ、窒素のみならず他の無機成分含有率の推定も可能であることが明らかになっている。

この乾燥粉碎葉の近赤外分光分析により、葉分析は従来に比べて格段に簡易迅速化されるが、さらに、圃場で生葉を直接計測できればリアルタイムな診断が可能となる。生葉の近赤外分光スペクトルからの葉中無機成分の推定は水稻^{3, 4, 10, 11)}で報告されているが、他の作物ではまだ報告されていない。そこで、モモ生葉の近赤外透過スペクトルから葉中無機成分含有率の推定を試みたので、その概要を報告する。

材料及び方法

1. 生葉の近赤外透過スペクトルの測定

試験は、場内で栽培されている白鳳、清水白桃、大和白桃、白桃、瀬戸内白桃、ゴールデンピーチから生育時

期別に採取した葉を用い、1994年から1996年に実施した。採取した葉は直ちに近赤外透過スペクトルをNIR Systems6500近赤外分光光度計で、葉の厚さを厚み計で測定した。近赤外透過スペクトルの測定は吉松¹¹⁾の方法に準じて、可動式の高油水分セルに6mm×60mmのスリットのあるスパーサーを設置して行った。測定時のリファレンスには厚さ0.7mmの白色セラミック板を用い、1測定当たりの走査回数は32回、Gainは10、測定波長は400～2500nmとした。

なお、慣行の葉分析は、近赤外スペクトルを測定した葉を70℃で一昼夜通風乾燥し、生葉中の水分含有率を測定するとともに、水野ら⁶⁾の方法により無機成分の分析を次のように行った。乾燥試料全量（50～150mg）を硫酸と過酸化水素を用いて分解し、窒素はセミアミクロ蒸留法、リンはバナドモリブデン法、カリウムは蛍光光度法、カルシウムとマグネシウムは原子吸光光度法で分析した。

2. 検量線の作成と評価

近赤外分光法による生葉の厚さ、水分含有率並びに葉中の乾物当たり無機成分含有率を推定する検量線を作成した。検量線は2次微分スペクトル並びに原スペクトルを用いて、変数増加法による重回帰分析で作成した。

検量線の作成には、各成分値の頻度分布が均等になるように、試料の中から任意に2つの試料群を抽出し、その一試料群を検量線作成用試料（Calibration Set）として用いた。もう一方の試料群は検量線評価用試料

Table 1 Composition of tested samples in peach leaves

| Constituents | unit | Calibration Set | | | | Prediction Set | | | |
|--------------|-------|-----------------|------|------|------|----------------|------|------|------|
| | | n | Min. | Max. | Mean | n | Min. | Max. | Mean |
| N | d.w.% | 91 | 2.12 | 4.06 | 3.22 | 83 | 2.43 | 4.13 | 3.22 |
| P | d.w.% | 69 | 0.14 | 0.37 | 0.21 | 61 | 0.15 | 0.26 | 0.20 |
| K | d.w.% | 70 | 1.56 | 3.56 | 2.62 | 77 | 1.77 | 3.52 | 2.56 |
| Ca | d.w.% | 74 | 0.34 | 2.19 | 1.27 | 72 | 0.50 | 2.33 | 1.26 |
| Mg | d.w.% | 95 | 0.21 | 0.53 | 0.36 | 96 | 0.22 | 0.51 | 0.35 |
| Moisture | f.w.% | 114 | 53.0 | 70.1 | 62.2 | 102 | 53.4 | 70.3 | 62.4 |
| Thickness | mm | 112 | 0.14 | 0.26 | 0.20 | 93 | 0.14 | 0.25 | 0.20 |

n : number of samples, d.w.% : dry weight %, f.w.% : fresh weight %.

(Prediction Set) として用いた (Table 1)。

作成した検量線の精度は従来法と近赤外法との相関係数、推定誤差、並びに水野ら⁵⁾が提唱した試料の成分値の幅に対する誤差の割合を示す評価指数 (EI) で評価した (Table 2)。

Table 2 Criterion based on evaluation index (EI) by Mizuno⁵⁾

| EI (%) | Rank | Accuracy | Practical usability |
|-----------|------|---------------|---------------------|
| <12.4 | A | very high | very good |
| 12.5-24.9 | B | high | good |
| 25.0-37.4 | C | slightly high | fair |
| 37.5-49.9 | D | low | poor |
| 50.0< | E | very low | poor |

$EI = (2 \times SDP / \text{Range}) \times 100 (\%)$.

結 果

各成分ともに検量線作成用試料を用いて数種類の検量線を作成し、その精度を検量線評価用試料で評価した。各成分の推定精度は原スペクトルよりも2次微分スペクトルから作成した検量線の方が優れた。この中で従来法による分析値と近赤外分析値との誤差の標準偏差 (SDP) が最も低かった検量線の選定波長と精度を Table 3 に、その定数を Table 4 に、従来法による分析値と近赤外分析値との相関図を Fig. 1 に示す。

得られた検量線の精度が最も優れたのは水分含有率で、次いで葉の厚さ、窒素含有率であり、従来法による分析値と近赤外分析値の相関係数 (r) はいずれも0.96以上であった。その次に精度が優れたのはカルシウム (r = 0.85)、リン (r = 0.84)、カリウム (r = 0.73) の順で、マグネシウム (r = 0.64) の精度が最も劣った。

また、水野らが提唱した試料の成分値の幅に対する誤差の割合を示すEI値を算出して、今回作成した検量線の実用性を Table 2 の基準によって評価すると、水分が

実用性の最も高いAランク、次いで厚さ、窒素及びカルシウムがBランクで、リン、カリウム及びマグネシウムはCランクであった。

検量線の作成において、生葉の厚さは1波長だけでも精度の高い推定が可能であった。2次微分スペクトルで葉の厚さと相関の高かった波長は、水の吸収に帰属する波長域の1920nm (r = -0.963)、1436nm (r = -0.970)、986nm (r = -0.961) と、単位面積当たりの乾物量との相関が高い波長域の1782nm (r = -0.951)、1172nm (r = -0.961) であった。一方、原スペクトルでは1922nm (r = 0.960) が高い相関を示した。

葉水分の検量線では、第1波長に相関スペクトル (相関係数に平均スペクトルをかけて得られる) で最大のピーク波長であり、水の吸収に帰属する1910nm (r = -0.320) をまず選定し、次いで1910nmとの組合せで最も相関の高くなる1910nm/2380nm (r = -0.958) を割算マス波長に選定した。この1910nm/2380nmと他の3波長で作成した検量線の精度が最も優れ、SDPは0.65%であった。一方、原スペクトルでも1930nm、2308nm、1986nm、1902nmの4波長でr = 0.973、SDP = 0.87%の精度の高い検量線が得られた。

窒素の検量線では、割算マス波長として葉厚と相関の高い1920nmを選定し、この波長との組合せで最も相関の高くなる2188nm/1920nm (r = 0.859) を第1波長に選定した。この2188nm/1920nmと他の3波長で作成した検量線の精度が最も優れ、SDPは0.109%であった。また、第1波長には蛋白の吸収波長である2050nm/1920nm (r = 0.605) を選定した検量線も高い精度を示し、SDPは0.118%であった。一方、原スペクトルの解析では、2180nm、2258nm、2146nm、1120nmの4波長でr = 0.884、SDP = 0.174%の検量線が得られた。

カルシウムの検量線では、窒素検量線作成時と同様に1920nmを割算マス波長として、この波長との組合せで正の相関が最も高くなる2004nm/1920nm (r = 0.627)

Table 3 Statistical results from calibration and prediction procedure

| Constituents | Calibration | | | | R | SEC | Prediction | | | |
|--------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|------|-------|------------|-------|--------|----|
| | λ_1 | λ_2 | λ_3 | λ_4 | | | r | SDP | Bias | EI |
| N | 2188 /1920 | 2132/1920 | 1750/1920 | 2000/1920 | 0.97 | 0.118 | 0.96 | 0.109 | -0.004 | 13 |
| P | 2226 ^M /1920 | 2336/1920 | 2052/1920 | 1938/1920 | 0.88 | 0.020 | 0.84 | 0.016 | 0.007 | 27 |
| K | 1902 ^M /1920 | 1394/1920 | 2342/1920 | 1986/1920 | 0.85 | 0.287 | 0.73 | 0.295 | 0.060 | 34 |
| Ca | 2004 ^M /1920 | 2234/1920 | 1600/1920 | 1700/1920 | 0.93 | 0.154 | 0.85 | 0.193 | 0.007 | 21 |
| Mg | 2002 /1920 | 1896/1920 | 1734/1920 | | 0.68 | 0.057 | 0.64 | 0.046 | 0.001 | 32 |
| Moisture | 1910 ^M /2380 | 2074/2380 | 2298/2380 | 1636/2380 | 0.99 | 0.55 | 0.99 | 0.65 | 0.08 | 8 |
| Thickness | 1920 ^M | 2392 | | | 0.98 | 0.006 | 0.96 | 0.007 | 0.001 | 13 |

λ : wavelength selected (nm), ^M: selected manually, R: multiple correlation coefficient,

SEC: standard error of calibration, r: simple correlation coefficient, SDP: standard deviation of prediction,

EI: evaluation index (%).

Table 4 Constants of calibration

| Constituents | 2nd derivative | | Constants | | | | |
|--------------|----------------|-----|-----------|---------|----------|----------|---------|
| | Segment | Gap | K (0) | K (1) | K (2) | K (3) | K (4) |
| N | 20 | 0 | -0.101 | 124.092 | -116.567 | 94.457 | -20.353 |
| P | 20 | 0 | 0.308 | 3.979 | 9.342 | 5.812 | 0.982 |
| K | 20 | 0 | 7.346 | 3.557 | 42.431 | -112.496 | 38.569 |
| Ca | 20 | 0 | 18.343 | 135.785 | -48.700 | 267.777 | -83.378 |
| Mg | 20 | 0 | 3.232 | 20.791 | -2.037 | 15.824 | |
| Moisture | 20 | 0 | 52.883 | -0.218 | 24.876 | 4.974 | -23.798 |
| Thickness | 20 | 0 | -0.033 | -0.470 | 4.516 | | |

Constituent = K(0) + K(1) d²log(1/T(λ_1)) + K(n) d²log(1/(λ n))

λ : see Table 3.

を第1波長に選定した。この2004nm/1920nmと他の3波長で作成した検量線の精度が最も優れ、SDPは0.193%であった。一方、原スペクトルの解析では、2004nm、1984nm、2022nm、2434nmの4波長でr = 0.791、SDP = 0.216%の検量線が得られた。

考 察

モモ生葉での近赤外分光法による無機成分測定の可能性を、Fig. 1に示した従来法による分析値と近赤外分析値との相関図や、水野ら⁵⁾が提唱したEI値から評価すると、水分と窒素については精度の高い分析が可能であり、カルシウムについても比較的精度が高く十分に実用性を有するが、リン、カリウム並びにマグネシウムについては精度がやや劣り更に検討を要すると判断される。

今回作成した検量線の精度を吉松¹¹⁾が水稻生葉で作成した線量線の精度と比較すると、水稻生葉では窒素含有率の推定誤差がSEP = 0.20%であったのに対し、今回のモモ生葉ではSDP = 0.11%と水稻での試験よりも精度が良好である。一方、本試験結果をモモの乾燥粉碎した葉の近赤外反射スペクトルから作成した検量線の精度⁹⁾と

比較すると、乾燥葉では窒素含有率の推定誤差がSDP = 0.05%であり、生葉での測定の方が推定誤差が大きかった。生葉が乾燥葉に比べて精度が劣った原因としては、乾燥葉では微粉碎した均質な試料を測定対象にしているのに対し、生葉では測定対象が乾燥葉に比べ不均質であることと、近赤外スペクトルの測定面積が6mm × 60mmのスリットでは分析に供試した葉の面積の約1/4に過ぎない点などが挙げられる。

また、生葉の透過スペクトルから乾物当たりの成分含有率を求めようとする、葉の厚さや水分含有率の影響を受けるため、吸光度と成分含有率の相関は低くなり、何らかの補正を検量線の中で行う必要が生じる。この補正は、測定対象成分の帰属波長が判明している場合は、その波長を第1波長に選定して検量線を作成することにより、第2波長には自動的に補正波長を選出してくる場合が多い。今回の解析ではこの方法でも比較的良好的な精度を有する検量線の作成が可能であったが、厚さとの相関が高く水の吸収波長域である1920nmを補正波長として割算マスをを行うと精度はさらに向上した。割算マス波長としては1920nmが今回の解析では最も優れたが、最

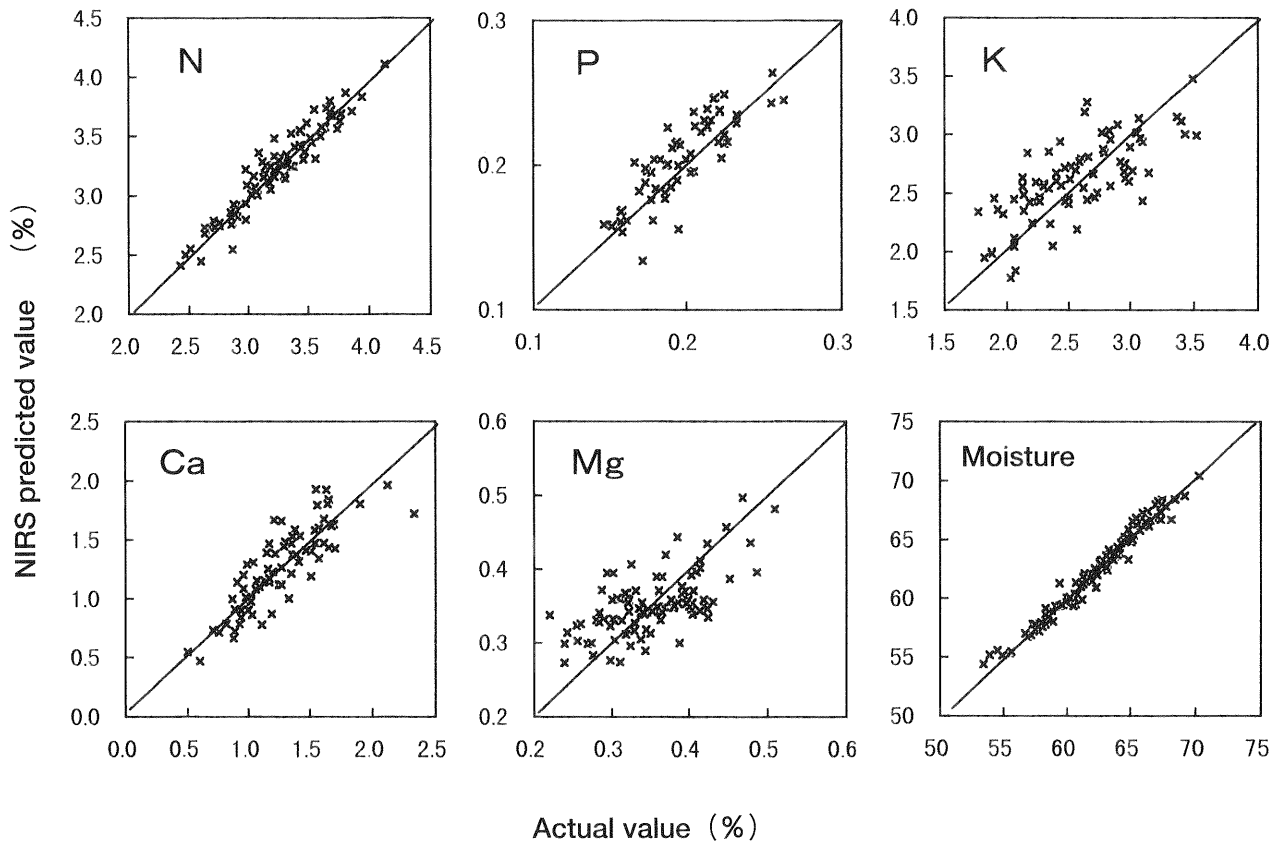


Fig. 1 Actual and NIRS predicted values of mineral contents of the prediction samples in fresh peach leaves

適な割算マス波長については更に検討を要する。

モモ生葉での窒素の測定においては、モモ乾燥葉での解析と同様に、タンパク質の吸収領域である2180nmから2050nm近辺の波長を第1波長に選定した検量線の精度が最も優れた。吉松¹⁰が水稻生葉の反射スペクトルから作成した窒素検量線の第1波長にも2058nmが選定されており、2050nm、2180nm近辺の波長域が葉中窒素測定のキー波長になると推察する。

カルシウムは窒素に次いで精度が高かったが、生葉での測定で第1波長に選定した2004nmは、モモ乾燥葉での解析においてカルシウムと相関が非常に高かった波長域と一致する。2000nm近辺の吸収が何に由来するかは明らかでないが、この波長域がカルシウム測定のキー波長域となるのではないかと推測する。

リン、カリウム、マグネシウムに関してはキー波長を特定することはできず、今後更に検討を要するが、乾燥葉と生葉の検量線で重複した波長を捜すと、リンでは2340nm、カリウムでは1400nm近辺の波長が存在した。

摘 要

モモ生葉の近赤外透過スペクトルから、葉中の無機成分含有率を推定する線量線を作成した。

1. 2次微分スペクトルを用いて重回帰分析により作成した検量線の精度は、生葉中の水分含有率が最も高く、次いで葉の厚さ、窒素含有率であり、従来法による分析値と近赤外分析値との相関係数はいずれも0.96以上であった。次に精度が優れたのはカルシウム、リンであり、カリウムとマグネシウムの精度は劣った。
2. 作成した検量線は、従来法による分析値と近赤外分析値の相関図やEI値などから、水分、窒素、カルシウムについては実用性が高いと判断された。一方、リン、カリウム、マグネシウムについては精度が劣り、更に検討が必要である。
3. 検量線の精度は、厚さとの相関が高く水の吸収波長域である1920nmで割算マスを行うことにより、向上した。
4. 窒素ではタンパク質の吸収に帰属する2180nm、2050nm近辺の波長、カルシウムでは2000nm近辺の波長を第1波長に選定した検量線の精度が優れた。

引用文献

1. Pavlov, D., S. Atanassova and A. Ilchev (1996) Possibilities for near infrared reflectance spectroscopy prediction of mineral content in perennial legumes by using multivariate calibrations. *Analytical Laboratory*, 5 (4): 245-250.
2. 堀内正美・佐藤克昭・佐藤展之・鈴木義彦 (1991) 近赤外分光分析法による温室メロンの生育中の葉中成分含有率及び果実糖度の簡易測定. *静岡農試研報*, 36: 47-55.
3. 池田彰弘 (1997) 土壌・栄養診断に基づいた水稻の合理的施肥管理. *農業および園芸*, 72 (9): 999-1005.
4. 今井克彦・日置雅之 (1996) セロハンテープを貼付した水稻生葉の近赤外分光計による栄養診断. *愛知農総試研報*, 28: 43-46.
5. 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司 (1988) 近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定 I 成分および栄養価の推定精度とその評価. *草地試研報*, 38: 35-47.
6. 水野直治・南 松雄 (1980) 硫酸-過酸化水素による農作物中 N、K、Mg、Ca、Fe、Mn 定量のための迅速前処理法. *土肥誌*, 51 (5): 418-420.
7. 夏秋道俊・柴田 萬・末次信行・藤田博行 (1991) カンキツ樹体管理のための近赤外分光法の利用 (第 1 報) 温州ミカンの葉中チッソ濃度の推定. *園学雑*, 60 別 2: 42-43.
8. 新川 猛・松村博行 (1995) 近赤外分光分析法によるカキの葉中窒素含有量の推定. *岐阜農総研セ研報*, 8: 51-58.
9. 高野和夫・妹尾知憲・村西久美・海野孝章 (1998) 近赤外分光法によるモモ葉中無機成分の迅速測定. *近畿中国農研*, 96: 26-30.
10. 吉川年彦・永井耕介・須藤健一 (1991) 近赤外分光法による水稻葉の窒素、マグネシウム、カリウムの非破壊分析. *土肥誌*, 62 (6): 641-642.
11. 吉松敬祐 (1993) 生葉の近赤外分光スペクトルによる稲体栄養診断. 第 9 回非破壊計測シンポジウム要旨集, 90-95.

Summary

We estimated mineral contents in fresh peach leaves by the near infrared transmittance spectrum method.

1. The calibration equation was made by the multiple regression analysis with 2nd differential spectrums. The precision value was high in leaf, moisture, thickness, and nitrogen, successively. Coefficients of the correlation between actual and the near infrared analysis values were more than 0.96. The precision was excellent in calcium and phosphorus, but was poor in potassium and magnesium.
2. The precision of the calibration equations was improved with division mass by 1920nm. As for 1920nm, the correlation with leaf thickness was high.
3. The precision was excellent at wavelength of 2180nm or 2050nm in nitrogen and 2004nm in calcium, when selected as the 1st wavelengths.