

近赤外分析（NIRS）： ASTM E1655に準拠した定量分析

Alexander Kadenkin

近赤外分析（NIRS）は様々な産業の現場や研究室で広く使用されている定量的な分析手法になります。このホワイトペーパーではASTM E1655に準拠した定量分析のメソッド開発ワークフローについて述べたいと思います。

Metrohm White Paper

はじめに

近赤外分析（NIRS）は様々な産業分野において定性分析、定量分析の分析法として広く利用されています。製薬会社や化学会社の原料受入を行っている部門では、入荷原料の迅速な確認試験用途として近赤外分析（NIRS）が多く使われていて、サプライチェーンから入荷した原料が確かな品質な物であるかどうかの試験が行われています。しかしながら、近赤外分析（NIRS）は定量分析目的の用途の方が多いたと言えます。例えばポリマー、ガソリン、ディーゼルオイル、潤滑油などの最終製品や中間工程品の品質を左右する重要なパラメーターの定量的な分析手法として多く利用されています。機器の構成としては品質管理室でオフライン的に最終製品検査に使用するものやリアルタイムで製造工程中で重要パラメーターをモニタリングするオンラインやインライン的な機器構成もあります。

近赤外分析（NIRS）を行うにあたり1つのハードルとなるのがメソッド（検量線）をいかに開発にメンテナンスしていくか、ということだと思います。一見複雑な作業のように感じるかもしれませんが、従来の絶対的な分析法の管理を行うのと、この近赤外分析（NIRS）のような相対的な分析法の管理を行うことにはあまり差異はありません。ただ機器の管理に用いるサンプルが従来分析法で濃度（例：化学的成分：水分量、物理的成分：相対粘度、等）が既知のサンプルを用いるという違いだけです。このことは他の分析法であるガスクロ、X線回折、蛍光分析などと同じと言えます [1]。近赤外分析（NIRS）では濃度既知のサンプルを測定し、その吸光度と従来分析法の測定値の数学的モデル（検量線）を作成します。その数学的モデル（検量線）を登録しておくことにより、その後は未知のサンプルを近赤外分析（NIRS）を行い、その吸光度から目的とする項目値（多項目）を推測するという流れが日常分析になります。

しかしながら、近赤外（NIR）領域で得られるスペクトルは一般的に吸収ピークがオーバーラップしていてブロードな複雑なスペクトルとなり、従来の数学的回帰手法では解析できないという問題点があります [2]。そこでこの問題点を解決するのが多変量解析という回帰手法となります。この多変量回帰手法では、スペクトルに1つのピークの着目して回帰するのではなく、スペクトルの全波長域もしくはある波長範囲を解析に用います。この多変量を回帰に用いることで、同時多項目分析が可能になり、物理的な特性（例：相対粘度、重合度、粒子径、等）も測定可能というアプリケーションの幅を大きく広げることになります。

通常、多変量解析（ケモメトリックス）にはサンプル選択、波長域選択、スペクトル処理選択、回帰手法選択、バリデーション評価などがステップ化された専用のソフトウェアを用います。この場合、ほとんどケースで混乱を招きます。なぜなら多変量解析のソフトウェアは「何サンプル必要か」、「どの分析項目が重要か」などのアドバイスをしてくれることがないからです。多変量解析に関する標準法や文献の数はあまり多くなく、ASTM E1655が唯一、近赤外分析（NIRS）を用いて多変量解析を行う際のガイドラインになると言えると思います。ASTM E1655 «Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis» [3]。ASTM E1655の第二章の «underscores a general usage principle»（一般的な使用方法について）は近赤外分析（NIRS）や中赤外（MIR）分析に適用できると思います [4]。またこのワークフロー（図1）は様々なタイプの定量アプリケーションに適用でき、このホワイトペーパーでは、ASTM E1655に基づいた多変量解析メソッドの開発を成功させるために不可欠なさまざまな手順についてまとめています。

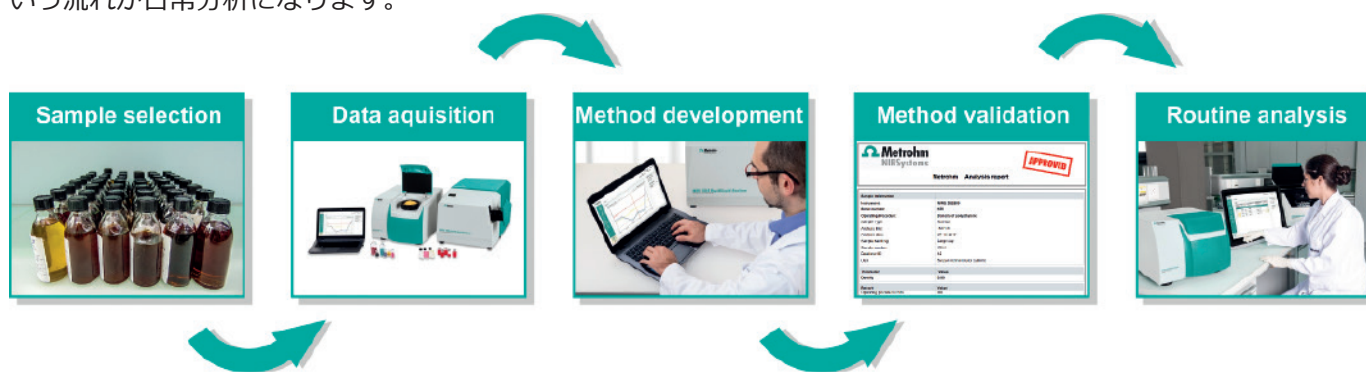


図 1: 多変量回帰メソッド開発のワークフロー

検量線モデル用サンプル選択

日常分析を行うにあたり、その分析のパフォーマンス（精度）は検量線モデルに使用するサンプルの特性に依存します。最もシンプルな場合は複数の成分をただ配合比率を変えて混合するだけのサンプル、例えばガソリン配合に使用されるエタノールに含まれる水分と変性剤の配合比率を任意に変化させるようなケースになります。

ガソリンやポリマーの品質管理となるともっと複雑になります。準備するサンプルは実際のサンプルということになりますが、最終製品に予測される様々な変動、例えばガソリンの場合は産油地に地理的な変動、ポリエチレンであればペレットの粒子サイズの変動なども考慮に入れて検量線モデル用のサンプルを準備しなければなりません。更に分析パフォーマンスに影響するファクター（要因）として考えられることを表 1. にまとめました。

近赤外（NIR）スペクトルはピークがブロードでオーバーラップしながら干渉し合っていますので、個別のケース毎で状況が異なります。以下にそれぞれのケースについて述べていきたいと思えます。ポリオールの水酸基価を測定する場合は、ASTM D6342で要求されているように、1380-1500nmと2000-2300nmの2つの領域を主に用いることとなります[5]。しかしながらこの領域は水の吸収バンド（1450nmと1930nm）の影響を受けますので、日常分析用の検量線を作成する際のサンプルセットには、水分量の変動したサンプルも含ませる必要があります。それは水分量が最終製品での品質管理項目でなくても必要となります。

サンプルの種類を限らず、ASTMでは近赤外分析（NIR）の初期の検量線モデル検討には30~50サンプルを用意して評価検討するように求めています。そして用意するサンプルのレンジ（目的項目値範囲）は従来分析の再現性の少なくとも5倍以上の範囲で用意するように要求しています。

一般的なアプリケーションでは、適切な近赤外分析（NIR）検量線の計算時には、潜在変数が3以下の場合で、アウトライヤー除去後で24サンプル以上必要であると言えます。「潜在変数」に関しては後で「検量線モデル開発」の章で詳しく述べます。より複雑なアプリケーション、つまり「潜在変数」が3以上の場合、例えば石油化学工程での品質管理などの場合は、ASTMでは $6 \times (\text{潜在変数} + 1)$ のサンプル数を推奨しています。またサンプルの範囲（レンジ）は日常分析時に出てくるサンプル範囲の少し広範囲のサンプルを理想的としています。

既に述べましたように、近赤外分析（NIR）は相対分析法ですので、検量線モデルの作成の成否は検量線用に用意されたサンプルの従来分析値の値がいかにか正確が大きく左右します。またASTMのワークフローでは従来分析法の繰り返し精度（Repeatability）と再現精度（Reproducibility）も把握しておく必要があると述べています。例えば、ASTMにより確立されているASTM D2699-16e1 スパーク着火式エンジン用ガソリンのオクタン価測定「Standard Test Method for Research Octane Number of Spark-Ignition Engine Fuel」[6]、では従来分析法の繰り返し精度と再現精度の確認が既に含まれていて、近赤外分析（NIR）用の検量線モデル開発が行いやすいと言えます。

表 1: 主なアプリケーションで検量線モデルに影響を与える要因例

影響する要因	アプリケーション例
産油地等の地理的要因	原油、ガソリンのスクリーニング
製造者	潤滑油の品質管理
サンプルの粒子サイズ	ポリマーペレットの分析
サンプル温度	パームオイルなどの油脂や水溶液
水分量	水酸基価の分析
サンプルの状態	生薬などの天然物の分析
プロセス条件	アットライン、オンラインでの分析

スペクトルデータの収集

近赤外分析（NIR）の測定に用いる機器は機器メーカーの推奨する手順に従い設置、運用されていなければなりません。検量線モデル開発の標準手順には様々なタイプの近赤外分析計が述べられていますが、チャプター7には「走査（スキャン）型の近赤外分析（NIR）計はS/N比の良い、再現性に優れたスペクトル測定が可能なので、複雑なサンプルの定量分析に最も適している」と記載されています。走査（スキャン）型の近赤外分析計（NIR）計としては、メトローム社の回折格子型の近赤外分析計などがあります。

スペクトル測定に用いる機器のパフォーマンスに関しては定期的に管理、校正がされていなければなりません。その管理、校正手順に関してはASTM E275 [7]、USP Chapter <1119> [8]、European Pharmacopeia [9]などに詳しく記載されています。

標準手順にはスペクトル測定時の測定モードや設定変更可能なパラメーターについても記載されています。通常、液体サンプルであれば透過モードで測定、粉体&個体サンプルであれば拡散反射モードで測定を行います。検量線モデルを開発する際に重要なことは、検量線作成時、評価時、日常分析時で測定モード、サンプルの品温、測定条件（測定波長範囲や測定分解）などの測定値に影響を及ぼすような要因は同じにしなければならぬということです。

検量線モデル開発

次に検量線モデルの開発について述べたいと思いますが、通常この検量線モデルは多変量回帰手法を用いた定量分析になりますので、エンドユーザーの多くが頭を悩ませることになります。しかし、メトローム社のVision Air Completeソフトウェアを用いれば、エンドユーザーはガイドに従いStep by stepで進めていくことで、最良の検量線を作成することが可能です。

検量線モデルを計算（回帰）する前に、スペクトルのベースラインのような意味のない変動をスペクトル前処理を行って除去しなければなりません。これらのスペクトル処理は検量線モデルの精度を飛躍的に向上させます。通常、様々なスペクトル処理を反復的に適用し、スペクトル処理による分析精度の向上を統計値とプロット図を見比べながら評価し、最終的にベストなスペクトル処理を決定します。

次に検量線モデルに用いる波長範囲を選択します。通常、目的とする項目値の変動に応じてスペクトルの変動する波長範囲が見られますので、その波長範囲を選択した方が検量線の正確性、再現性、堅牢性も飛躍的に向上すると言えます。ASTM D6342ではポリオールの水酸基価を測定する際には全波長域を使用する代わりに、OHに起因する2つの波長範囲を選択する方が良いと推奨されています [5]。

検量線モデルを計算する際の回帰手法としては、重回帰（MLR）、主成分回帰（PCR）、PLS回帰（PLSR）の3つの回帰手法があります。近年では計算するコンピューターの計算速度も飛躍的に向上しましたので、PLS回帰で計算する方が重回帰、主成分回帰で計算するよりも高精度の検量線が得られるケースの方が多ようです [2]。

一般的にPLS回帰にはPLS1とPLS2という2つの回帰手法があります。PLS1は1つの項目値とスペクトルデータとの相関を回帰計算し、PLS2では複数の項目値とスペクトルデータを同時に回帰計算させます。ASTM E1655ではPLS1だけを使用することを推奨していて、日常分析時に複数の項目を同時測定する場合には、そのPLS1を項目毎に複数個測定手順に加えておくことを推奨しています。

PLS回帰はデータマトリックスの次元の圧縮と回帰を同時に行っています。図 2にPLS回帰における次元の圧縮について模式的に示しています。左の図はオリジナルの3次元のデータプロットを示していて、PLSアルゴリズムにより分散が最大になるよう最小二乗法により新しい因子の軸が計算されます。この新しい軸を因子（factor）と言ったり、潜在変数（latent variable）と呼んだりします。

右の図の新しい赤い横軸は第一因子（factor 1）軸と呼ばれ、それ以降に最小二乗法で計算されてくる軸は順次、第二因子、第三因子と呼ばれる新しい軸になっていきます。図 2 に示すデータ例ではPLSアルゴリズムにより3次元でのデータセットが2次元に圧縮されたこととなります。PLS回帰ではこの圧縮されたデータセットと目的とする項目の従来分析値の変動の関係を数学的に回帰計算を行います。

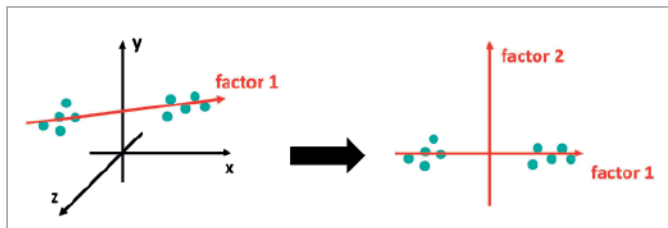


図 2: PLS回帰分析の概要

近赤外分析（NIRS）データの場合、オリジナルのデータは膨大になります。そのデータポイントはスペクトル数とそのスペクトル範囲により決まります。PLS解析を行うと数百、数千という次元のデータがほぼ10次元程度に圧縮されます。

これらのファクター（因子）で説明されないオリジナルデータの中の残差成分は無意味な情報ということになります。つまり分析しようとしている項目値とそのピークは無関係であるというデータマトリックスになります。

PLS解析後の新しい次元は潜在変数(latent variables)、潜在因子 (latent factors) で定義されます。因子の数は検量線の精度に影響しますので、オペレーターは最適なファクター数を決定する必要があります。この選択は非常に重要ですが、決まったルールがある訳ではありません。一般的には検量線に用いるファクター数が多くなる程、検量線標準誤差（SEC）は減少して行きます。

一方、ファクター数を多くして行くとモデル内のエラー成分が増加し、検量線としては汎用性（堅牢性）が減少して行きます、この現象をオーバーフィッティングと言います。

図 3 に水酸基価の検量線モデル計算時の例を示しますが、ファクター数の増加と分析相関の関係が良く表れていると思います。検量線標準誤差（SEC）はファクター数の増加と共に減少しますが、クロスバリデーション標準誤差（SECV）と評価用標準誤差（SEP）は異なる挙動を示します。ファクター数が増えるに連れて、SECとSECVの差、SECとSEPの差が広がることはデータ内のエラー成分が増加してしまっていることを表しています。

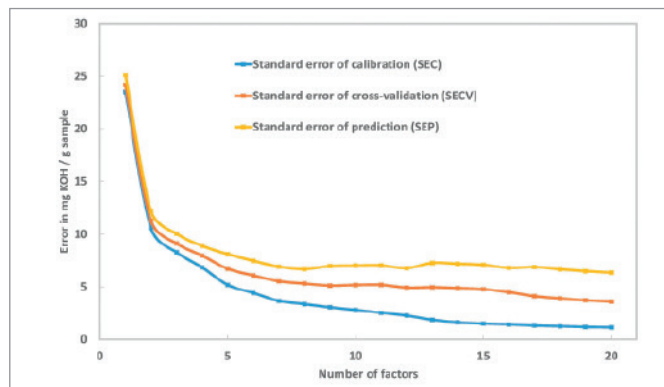


図 3: 水酸基価の検量線モデルのファクター数と各標準誤差の関係

ASTMではクロスバリデーション標準誤差（SECV）が最小になるモデルを推奨していて、もし同じくらいのSECVであれば、より因子数の少ないモデルを選択すべきだとしています。

加えて、因子数は検量線計算時のサンプル数と評価時のサンプル数に大きく影響されますので、オペレーターはそのサンプル数が十分であったかをダブルチェックする必要がありますと述べています。

アウト라이어検出

ASTM E1655では検量線モデル開発時のアウト라이어検出を重要視しています。これは検量線モデル開発時のみならず、日常運用時にも言えることだとしています。

検量線モデル開発時には大きく2つのタイプのアウト라이어があります。

1つはスペクトルアウト라이어と言い、サンプルスペクトルが原因で起こります。例としてはポリエチレン（PE）の検量線モデルセットの中にポリエチレンテレフタレート（PET）のサンプルが混ざっているとか、ジェット燃料を測定する際のバイアルの光路長が異なるサンプルデータが混ざっている場合とかです。このような場合はそのサンプルデータが検量線のモデル精度に大きく影響し、検量線の予測精度を大きく低下させます。メトローム社のVision Air Completeソフトウェアではこのスペクトルアウト라이어をマハラノビス汎距離を用いて検出する機能を備えています。

2つ目のアウト라이어は検量線予測値と従来分析値の差が著しく大きな場合です。ASTM E1655ではその誤差の許容値を設定しておいて、もしその許容値を越えた場合には従来分析値をもう一度やり直す、近赤外分析（NIRS）のスペクトル測定をもう一度行い、そのエラーの原因を明確にするように求めています。

バリデーション

次に計算した検量線モデルを別に用意したバリデーション用のサンプルセットを使い客観的に評価する必要があります。ASTM E1655ではそのバリデーション用のサンプルは検量線モデルのレンジの95%をカバーしている必要があると述べています。またサンプルは検量線モデルのレンジを考慮して、均一に分散されている必要があります、そのサンプル数は因子数が5以下であれば少なくとも20サンプル以上、ファクター数が5以上の場合には4x（ファクター数+1）のサンプルが必要であると述べています。加えて、そのサンプルは日常で出てくるサンプルの様々な品種を網羅している必要があります。

バリデーション時に重要視するのはその標準誤差であり、SEP（SEV、SEE）と呼ばれる統計値です。そのSEPが検量線モデル計算時のSEC、SECVと同等程度であり、平均バイアスもt検定を用いて評価される必要があります。

近赤外分析（NIRS）と従来分析の精度を検証することは重要で、95%の近赤外分析値がその範囲に入っていないければなりません。

$$[(\text{測定されたNIR値} - \text{再現性}) < \text{従来分析値} < (\text{測定されたNIR値} + \text{再現性})]$$

精密度を評価するサンプル数は検量線モデル計算に用いたファクター数と同じにすべきです。またその項目値レンジは検量線の全レンジの95%をカバーする範囲でなければなりません。それぞれのサンプルを少なくとも6回以上測定し、それぞれの平均値と標準偏差を計算し、その標準偏差からカイ二乗検定を行う必要があります。

日常分析（ルーチン分析）

バリデーション作業が完了するとそのメソッドを日常分析で使用することが可能となります。ただし、その際には定期的に近赤外分析（NIRS）計の適格性（パフォーマンス）と検量線モデルの適格性（パフォーマンス）の確認を行ってください。近赤外分析（NIRS）の適格性は分析メーカーの指示にしたがって評価し、検量線モデルの適格性はコントロールサンプルを使って評価してください。その際のコントロールサンプルは検量線モデル用のサンプルと同じ吸光度を示すようなサンプルで同じ条件で測定を行ってください。この適格性評価の手順はASTM Practice D6122 [10].に詳しく記載されています。

もしコントロールサンプルで検量線モデルのバイアス補正、スロープ補正が必要になった場合は検量線モデルの改善を行い、再バリデーション作業が必要になります。

もし、新しいサンプルデータを追加して検量線モデルの更新が必要になった場合や、新たにサンプルを追加して検量線モデルのレンジを拡げるような場合には、先に述べた手順に従い再度モデル作成を行い、同様のアウトライヤー検出と再バリデーション作業を行わなければなりません。

Metrohm White Paper

まとめ

このホワイトペーパーではASTM E1655に準拠した近赤外分析（NIRS）の検量線モデル開発を成功させるための手順をステップ毎に述べています（図 4）。

メトローム社の各国の担当がASTM E1655に準拠した検量線モデル開発と日常分析の運用をサポートさせていただきます。

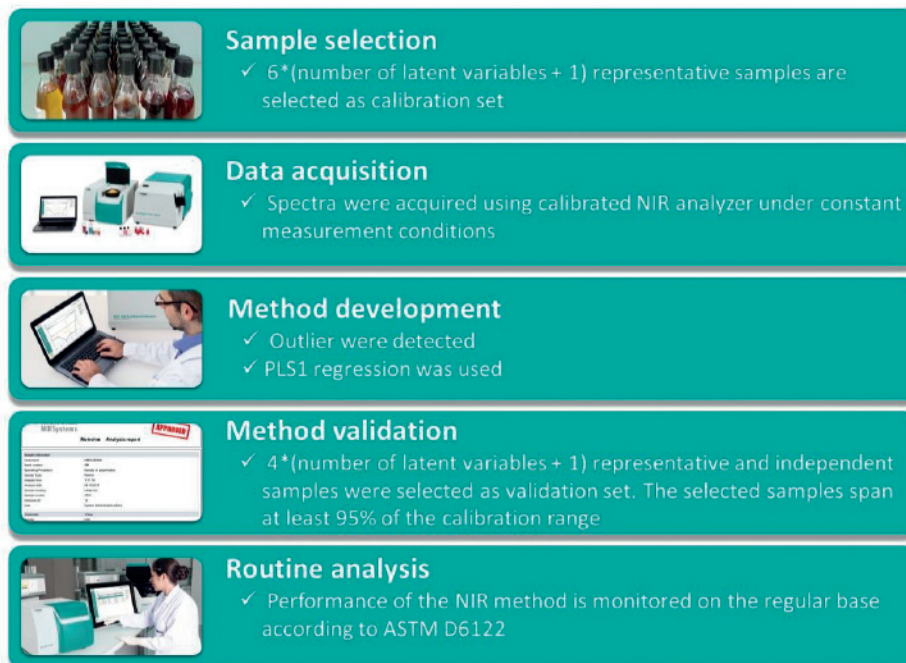


図 4: ASTM E1655に準拠した近赤外分析（NIRS）のモデル作成における必要な分析ステップ

参考文献

- [1] Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, 2014.
- [2] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, Handbook of Near-Infrared Analysis, CRC Press, 2007.
- [3] ASTM E1655-05(2012), Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012, www.astm.org
- [4] R. Wilhelm, «Know your type of standards», ASTM, 2000.
- [5] ASTM D6342-12(2017)e1, Standard Practice for Polyurethane Raw Materials: Determining Hydroxyl Number of Polyols by Near Infrared (NIR) Spectroscopy, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2017, www.astm.org
- [6] ASTM D2699-16e1, Standard Test Method for Research Octane Number of Spark-Ignition Engine Fuel, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016, www.astm.org
- [7] ASTM E275-08(2013), Standard Practice for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet and Visible Spectro-photometers, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013, www.astm.org
- [8] United States Pharmacopeia 39, 2016.
- [9] European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 9th Edition, 2016.
- [10] ASTM D6122-15, Standard Practice for Validation of the Performance of Multivariate Online, At-Line, and Laboratory Infrared Spectrophotometer Based Analyzer Systems, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2015, www.astm.org

Contact: Alexander Kadenkin: alexander.kadenkin@metrohm.com

 **Metrohm**