

近赤外分光法による リアルタイム測定の実用と留意点

ブルカー・オプティクス(株)

笹倉大督

PATと近赤外分析計

- PATを実施するツールとしては、ラマン・赤外分光・レーザー回折計・粒度形・HPLCなど様々ある。
- 利用されるプロセス分光分析計（インライン、オンライン、アットライン分析）として**近赤外分析計（NIR）が汎用性が高い**として、評価され、注目を集めている。

The background of the slide is a close-up, slightly blurred photograph of several Bruker optical lenses or mirrors. The components are arranged in a stack, and the Bruker logo is visible on the surface of the lenses. The lighting is bright, creating a high-contrast, blue-tinted effect.

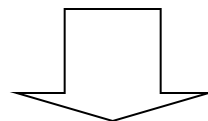
TOPICS.1

近赤外分光法の概要

近赤外分光法とは？

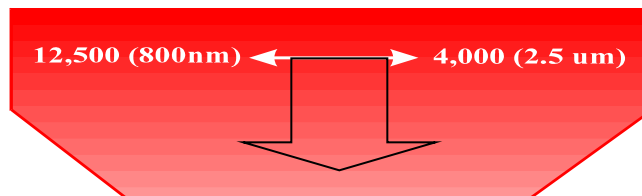


“近赤外分光法”

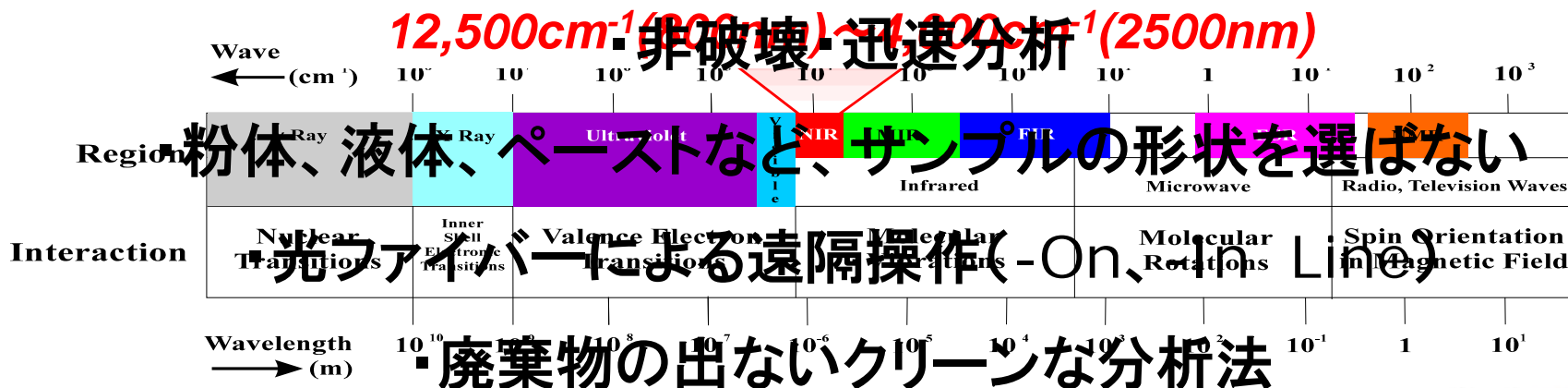


波長800nm～2500nm、波数12500cm⁻¹～4000cm⁻¹

上記の領域を用いた分光法



12,500cm⁻¹(800nm)～4,000cm⁻¹(2500nm)



近赤外分光分析法の食品・農業分野における応用例



測定品目例 ;

穀類 (小麦、大麦、米、米食味)

油糧類(大豆、なたね、ゴマ、ひまわり、パーム、オリーブ)

果物(りんご、みかん、モモ、メロン)

飼料(乾牧草、サイレージ、配合飼料、ペットフード)

麦芽、小麦粉、パン、ポテトチップス

コーンスターチ

食用油

シリアル

粉乳、牛乳、バター、チーズ、ヨーグルト、アイスクリーム

肉加工品(ハム・ソーセージ、ハンバーガーパテ)

醤油、調味料、みりん、味噌、マヨネーズ

日本酒、ビール、ウイスキー、ワイン

コーヒー、日本茶、紅茶、果実飲料

サトウキビ取引

タバコ、木材

アミノ酸発酵

測定項目例 ;

- 水分
- 蛋白分
- 脂肪分
- 澱粉
- 繊維分
- 総窒素分
- 糖分
- 固形分
- アミノ酸
- エキス分
- アルコール
- ヨウ素価
- 酸価
- ショ糖
- 乳糖
- ブドウ糖
- 灰分
- 食塩
- 硬度
- 平均粒度
- 分布
- 鮮度
- カロリー
- 日本酒度
- 熟度
- 米食味
- 推定消化率
- 加工特性
- 菌体量
-

TOPICS.2

近赤外分光法を用いた分析

今回発表のテーマ

定量分析

単回帰分析(ランバート・ベール
則)

多変量分析
(ケモメトリックス)

重回帰分析(MLR)

主成分回帰(PCR)

部分最少二乗法(PLSR)

定性分析

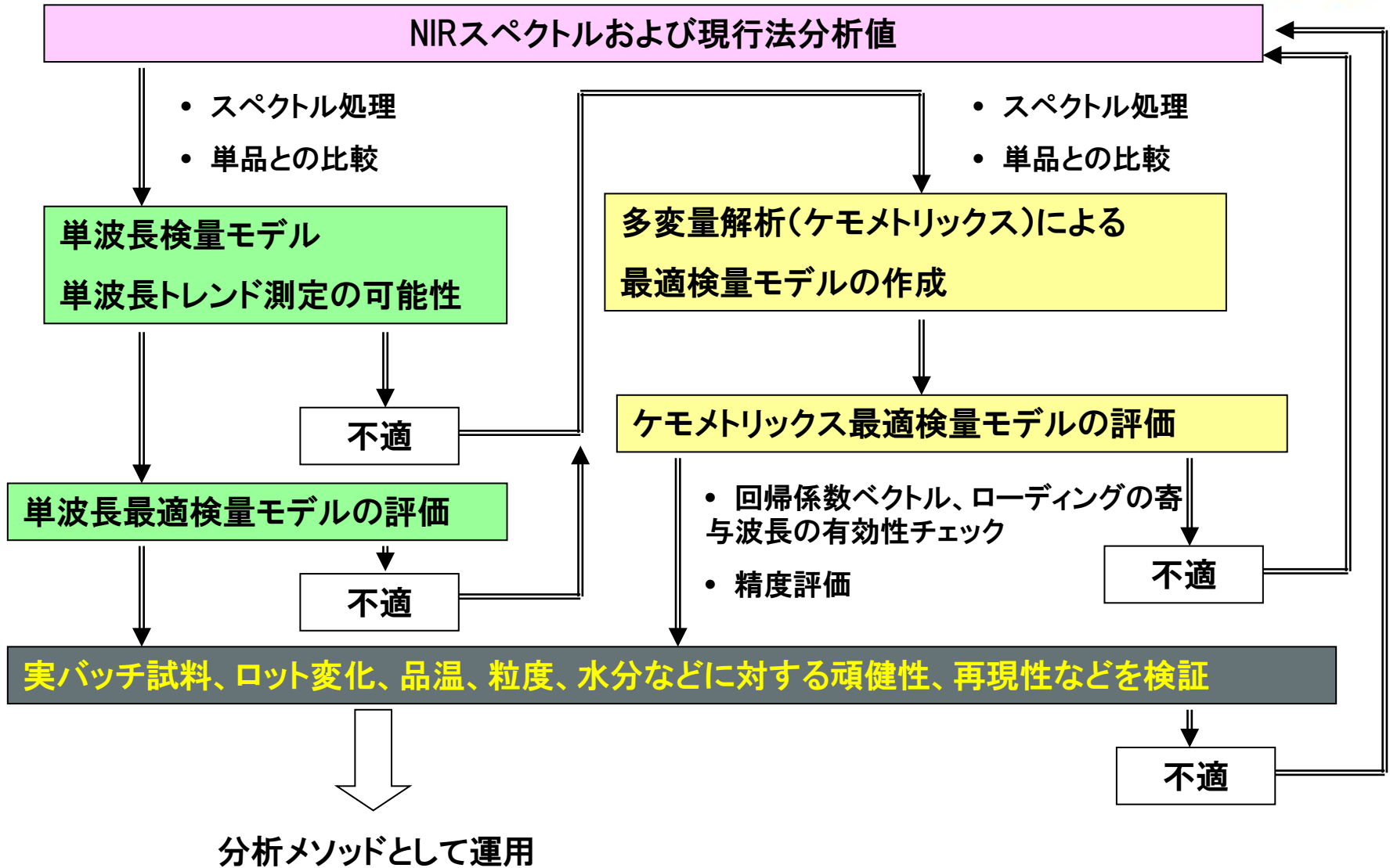
確認試験 (Identification)= 主成分分析・相関・ユークリッド距離

品質評価試験 (Qualification) ; Conformity, Cluster etc.

トレンド分析

混合終点管理・反応終点管理

分光スペクトルデータ解析についての提案

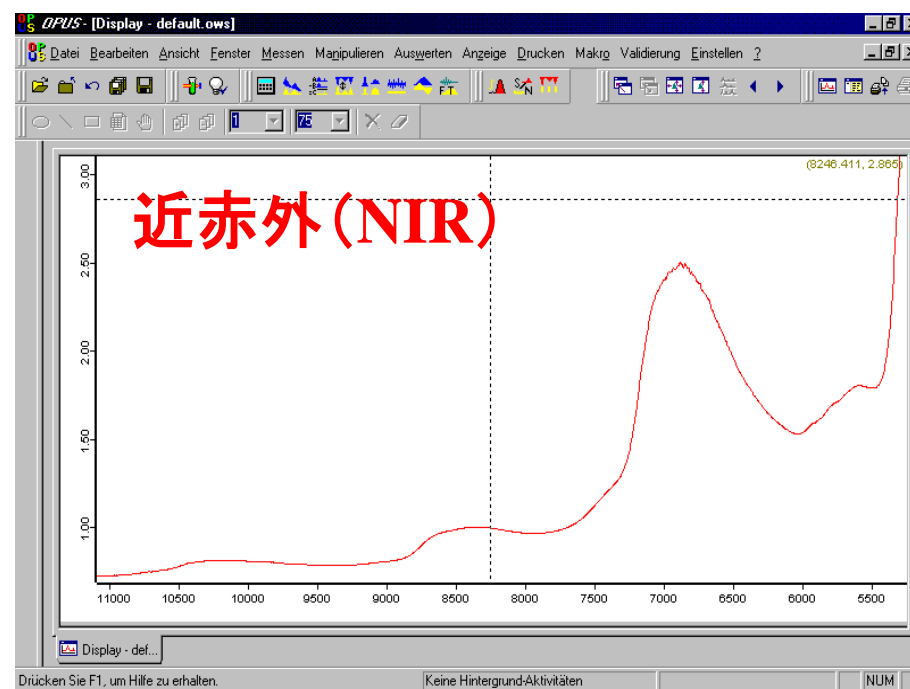
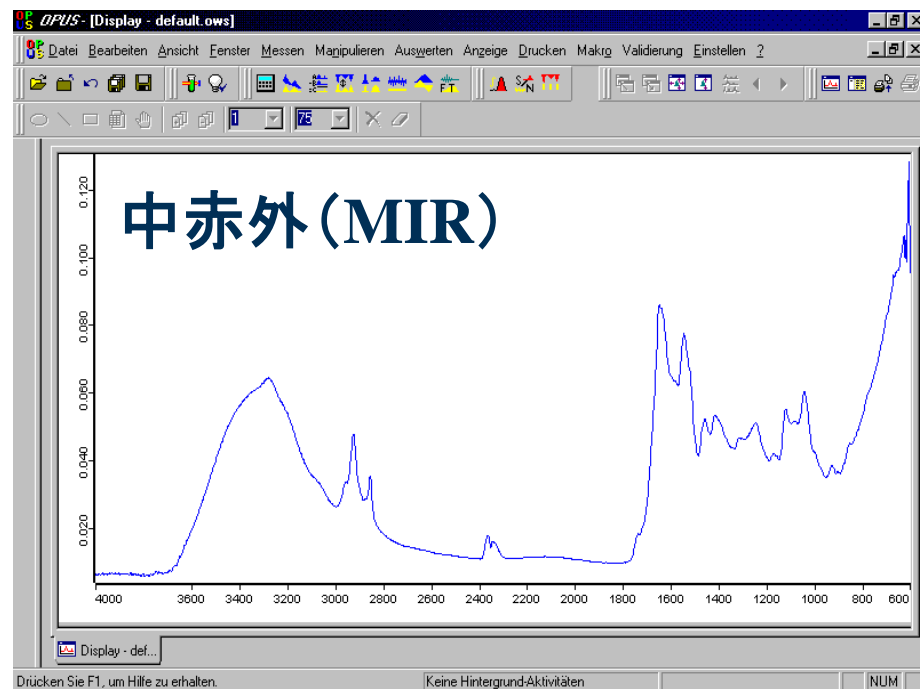


NIRを用いた定量メソッドのバリデーションで立証すべきパラメータ

- 標準誤差(Standard Error of Prediction)
- **特異性(Specificity)**
- 直線性(Linearity)
- 範囲(Range)
- 真度(Accuracy)
- 精度(Precision)
- **頑健性(堅牢性 Robustness)**

NIRの特異性に関する問題点

人の掌の中赤外 & 近赤外スペクトル



- NIRと比較して、MIRは特異的な吸収が観察されやすい
- 特異吸収がないNIRはスペクトルの帰属がはっきりしない



NIRは特異性がない??

Table A.3 Groups containing N-Atoms

Overtone, Combination	Frequency Range [cm ⁻¹]		Remarks
14) -NH₂ primary amines			
combination	5,080	4,980	NH-stretching + NH-bending
1 st overtone	6,580	6,490	1 st overtone of NH ₂ sym. stretching
	6,670	6,580	1 st overtone of NH ₂ anti-sym. stretching
	6,900	6,780	ArNH ₂
	9,800	9,620	2 nd overtone of NH ₂ sym. stretching
2 nd overtone	10,000	9,800	2 nd overtone of NH ₂ anti-sym. stretching
	10,200	9,800	ArNH ₂
	12,500	12,200	3 rd overtone of NH ₂ anti-sym. stretching
3 rd overtone	12,820	12,500	ArNH ₂
	12,990	12,660	3 rd overtone of NH ₂ sym. stretching
15) >NH secondary amine			
1 st overtone	6,710	6,470	
2 nd overtone	9,990	9,620	
16) -CONH₂ prim. amides			
combination	4,670	4,610	2x amide + amide
1 st overtone	4,760	4,690	NH-stretching + amide
	4,900	4,850	NH-stretching + amide
	5,130	5,080	NH-stretching + amide
	6,250	6,170	intermolecular hydrogen bond
	6,620	6,540	intermolecular hydrogen bond
2 nd overtone	6,710	6,620	1 st overtone of NH ₂ sym. stretching
	6,940	6,850	1 st overtone of NH ₂ anti-sym. stretching
	4,950	4,900	2 nd overtone of amide
	9,350	9,170	intermolecular hydrogen bond
	9,850	9,660	intermolecular hydrogen bond
	10,000	9,800	2 nd overtone of NH ₂ sym. stretching
10,310	10,100	2 nd overtone of NH ₂ anti-sym. stretching	
17) -CONH- second. amides			
combination	4,650	4,610	2x amide + amide
1 st overtone	4,760	4,720	NH-stretching + amide
	5,030	4,980	NH-stretching + amide
	6,540	5,990	intermolecular hydrogen bond
2 nd overtone	6,850	6,620	intermolecular hydrogen bond
	5,240	5,180	2 nd overtone of amide
	9,660	8,930	intermolecular hydrogen bond
	10,000	9,520	intermolecular hydrogen bond

Table A.4 Groups containing S- or P-Atoms

Overtone, Combination	Frequency Range [cm ⁻¹]		Remarks
18) -SH thiols			
1 st overtone	5,760	5,730	
19) P-OH			
1 st overtone	5,260	5,240	1 st overtone of OH stretching
20) -PH			
1 st overtone	5,290	5,260	

Table A.2 Groups containing O-Atoms

Overtone, Combination	Frequency Range [cm ⁻¹]		Remarks
7) H₂O			
combination	5,180	5,150	OH-stretching + OH-bending
1 st overtone	7,270	7,220	OH-anti-sym. stretch. + OH-sym. stretch.
	6,900	6,850	
	12,260	10,150	
2 nd overtone	12,260	10,150	
3 rd overtone	13,510	13,330	
8) free -OH alcohol			
combination	4,850	4,780	OH-stretching + OH-bending
1 st overtone	7,170	7,020	
2 nd overtone	4,220	4,180	2 nd overtone of OH-bending
3 rd overtone	10,640	10,470	2 nd overtone of OH-stretching
	13,700	13,420	
9) bound -OH alcohol			
1 st overtone	6,970	6,760	intermolecular hydrogen bond
2 nd overtone	6,670	6,270	intermolecular hydrogen bond
	10,200	10,100	intermolecular hydrogen bond
	9,660	9,570	intermolecular hydrogen bond
10) -COOH, -COOR			
2 nd overtone	5,290	5,210	2x C=O-stretching (carbox. acids)
	5,180	5,130	2x C=O-stretching (esters)
11) -C=O ketones			
2 nd overtone	5,130	5,110	
12) -CHO aldehydes			
combination	4,570	4,520	CH-stretching + C=O-stretching
13) -COC- epoxides			
1 st overtone	6,100	6,060	1 st overtone of CH-stretching

➤ 現在、NIR領域のかなりの数の官能基が帰属されている。

➤ 特異的な吸収を見出すのも困難ではない

堅牢な検量モデルの設計に向けて



- 検量線は外挿できない

- 目的許容幅より少し広めに設計

- 測定レンジを網羅していること

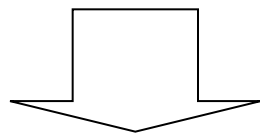
- 均一な濃度水準になるように設計

- 項目間に相関がないこと

- 『共線性』のないような設計が必須

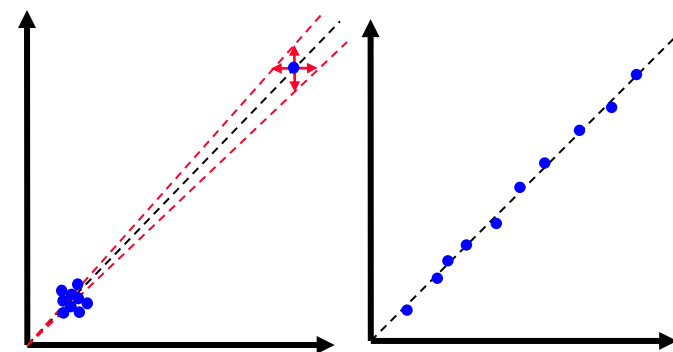
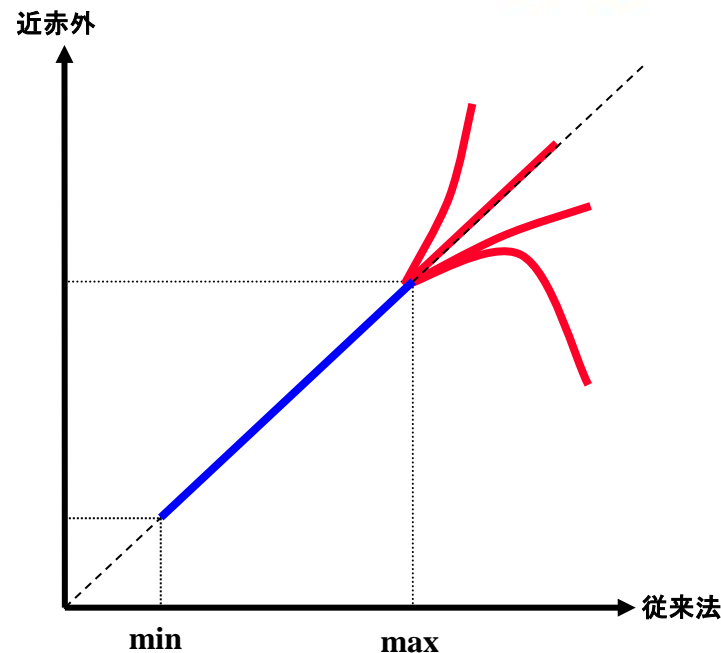
- 変動因子を網羅していること

- 物理的・化学的影響を考慮してサンプリング



- 堅牢なモデルの構築には、レンジを全て網羅した多数のサンプルが必要

- 一般的には最低でも『20~30水準』必要

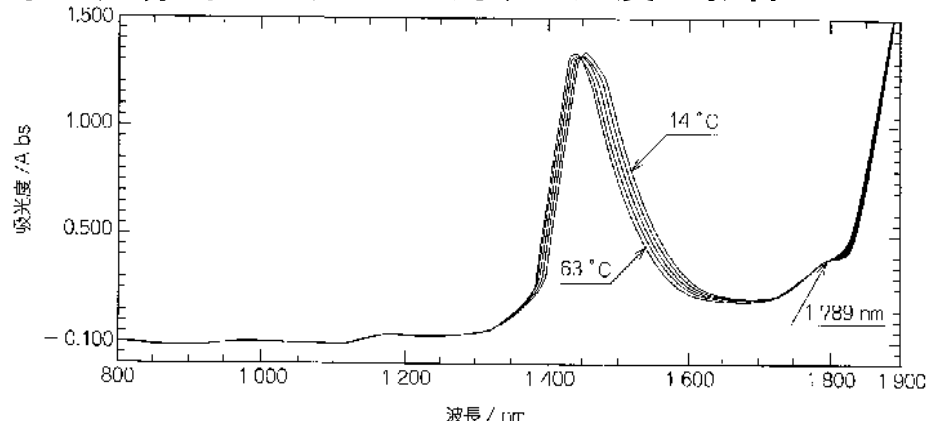


全レンジで均一な分布が望ましい

NIRスペクトルの物理的・化学的影響

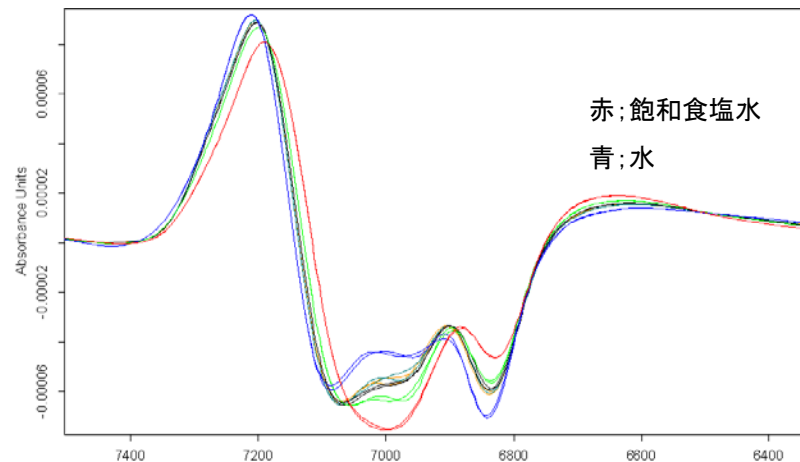


水の近赤外スペクトルに対する温度の影響・・・シフト

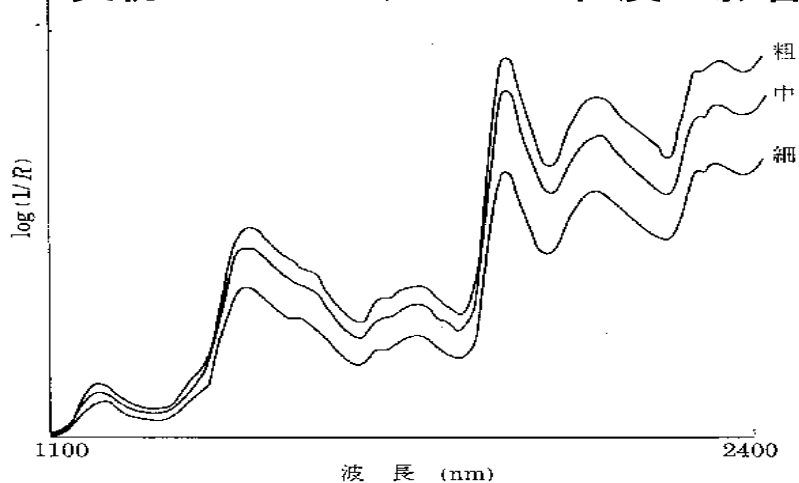


解説図18 水の近赤外吸収スペクトルに対する温度の影響
光路長：1 mm, 温度：14, 23, 36, 51, 63 °C

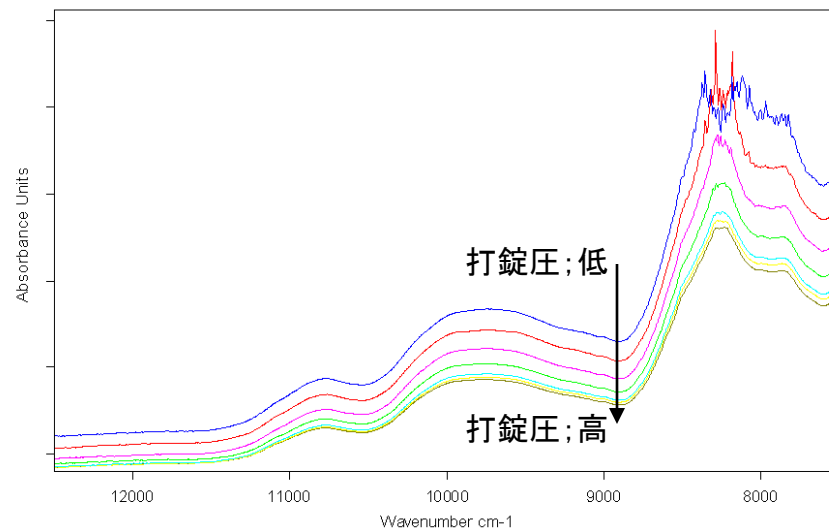
食塩添加による影響・・・シフト



小麦粉のNIRスペクトル・・・粒度の影響



錠剤の透過スペクトル・・・打錠圧に対する影響



共線性の問題



2成分系⇒問題なし(もともと共線性がある。)

0% A
100% B

30% A
70% B

50% A
50% B

3成分系⇒下記のような配合は問題あり

~~2% A
4% B
6% C~~

~~4% A
8% B
12% C~~

~~6% A
16% B
24% C~~

~~共線性有り!!!~~

1% A
33% B
66% C

A = ×3

33% A
66% B
1% C

A = ×2

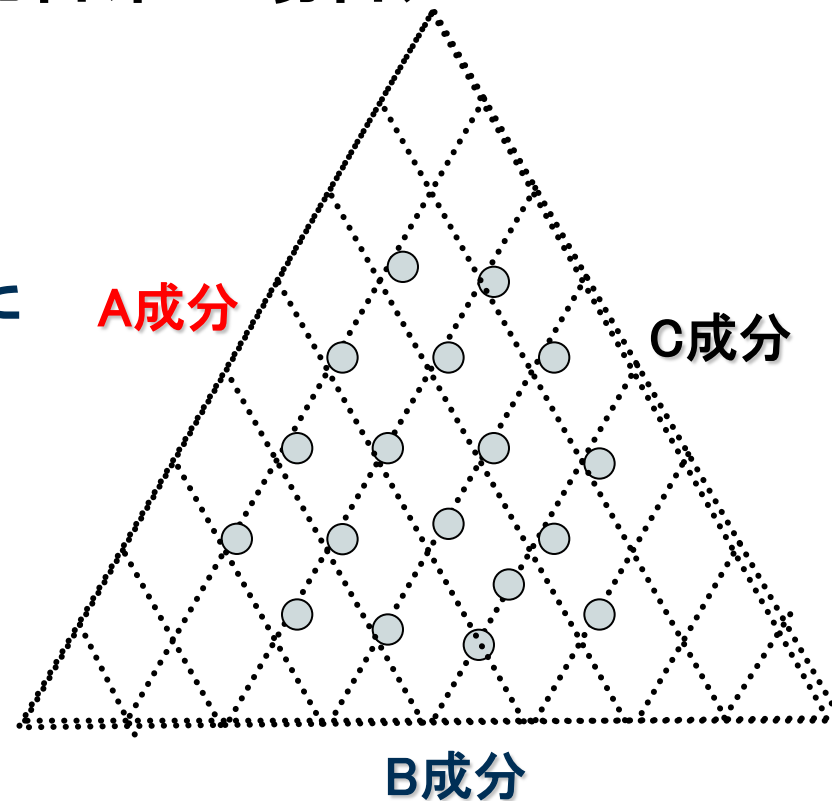
66% A
1% B
33% C

共線性無し!!!

検量モデル作成のための標準試料の作成と準備 (単品原料混合系の場合)

■提言

- 全ての成分が、『共線性』をもたないようにする
- 実験計画法を用いて、化学成分量比の「設計」をする



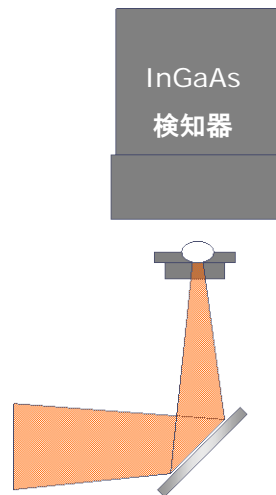
TOPICS.3

応用研究事例

■目的

➢従来、近赤外を用いる場合は、数多くのサンプル、多くの場合には20~30濃度水準を必要とされるとされてきた。

➢本研究では、テオフィリンを主薬とする固形製剤をモデル系とし、検量モデル構築に必要な実験計画、ならびに現実的に必要とされるサンプル数を検討したので報告する。



錠剤透過モジュール



■システム

Bruker Optics K.K. FT-NIR MPA

■測定法

透過測定モジュールによる透過測定

■測定パラメータ

-分解能 8 cm^{-1}

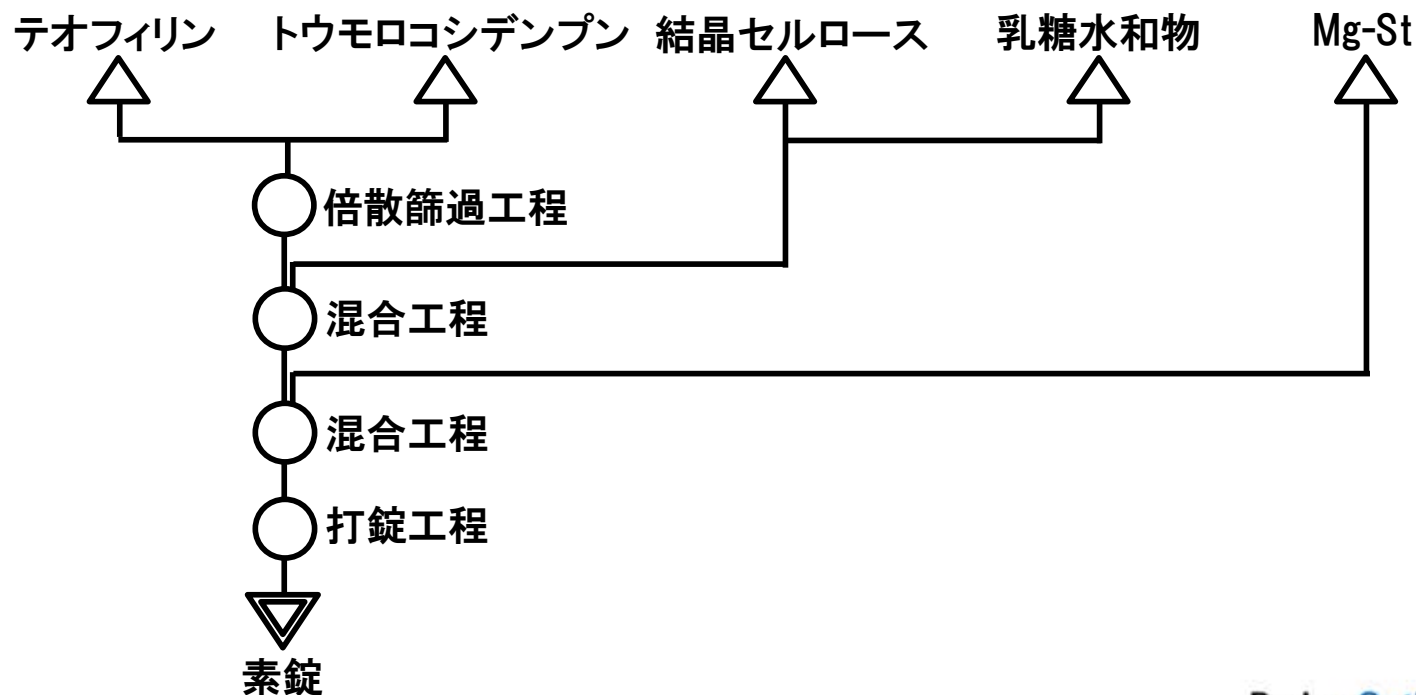
-積算回数 32 scan (15 sec)

-波数領域 $7000 \text{ cm}^{-1} \sim 12500 \text{ cm}^{-1}$

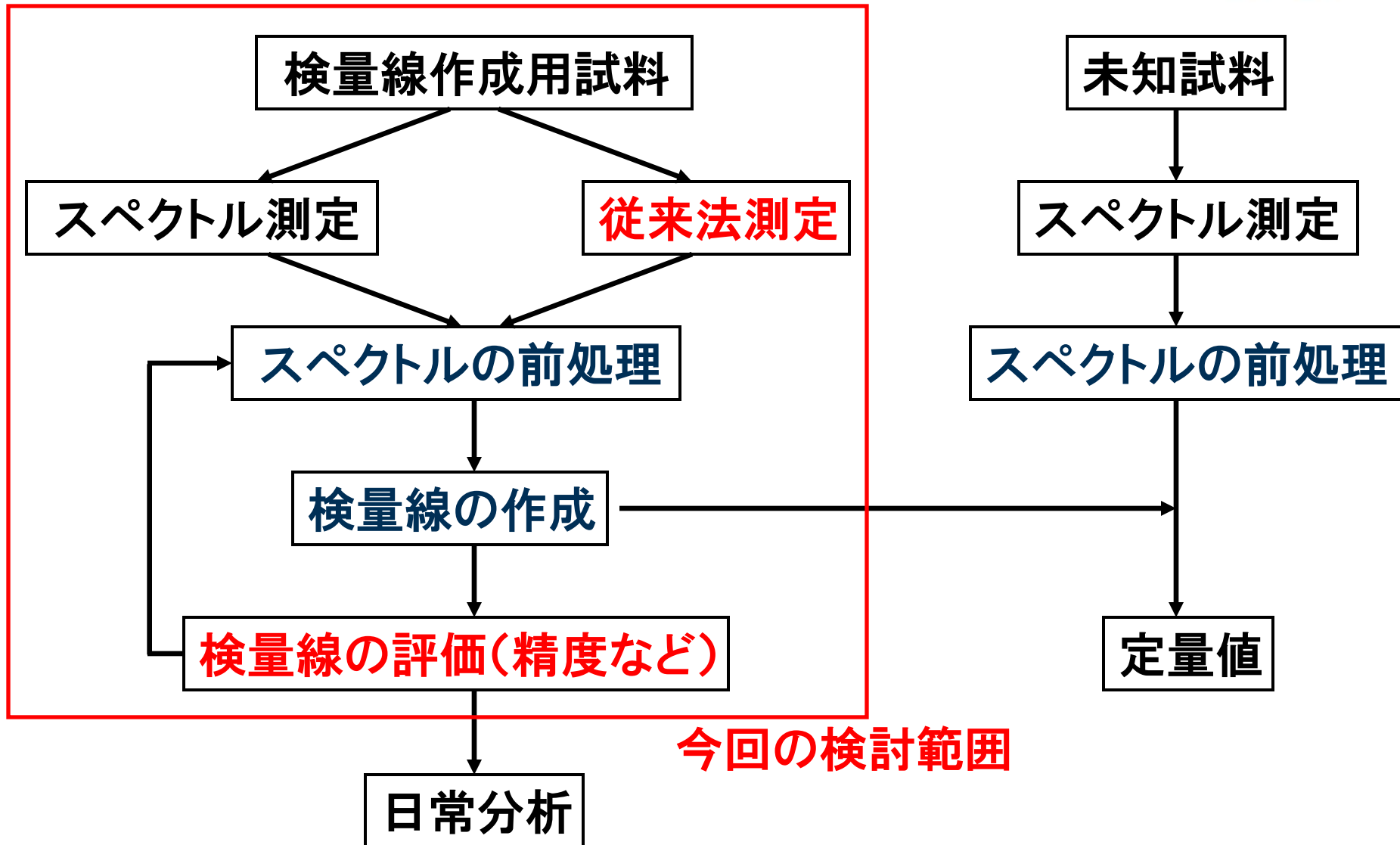
処方及び製造方法



	成分名	1錠あたり
有効成分	テオフィリン	10 mg
賦形剤	乳糖水和物	104 mg
賦形剤	トウモロコシデンプン	45 mg
結合剤	結晶セルロース	40 mg
滑沢剤	ステアリン酸マグネシウム	1 mg
	合計	200 mg



検量線作成の流れ



Step1;実験計画

- 賦形剤と主薬が各々共線性が生じない配合比を計画

Case1; 5濃度水準×1水準6検体=30サンプル

Case2; 30濃度水準×1水準1検体=30サンプル

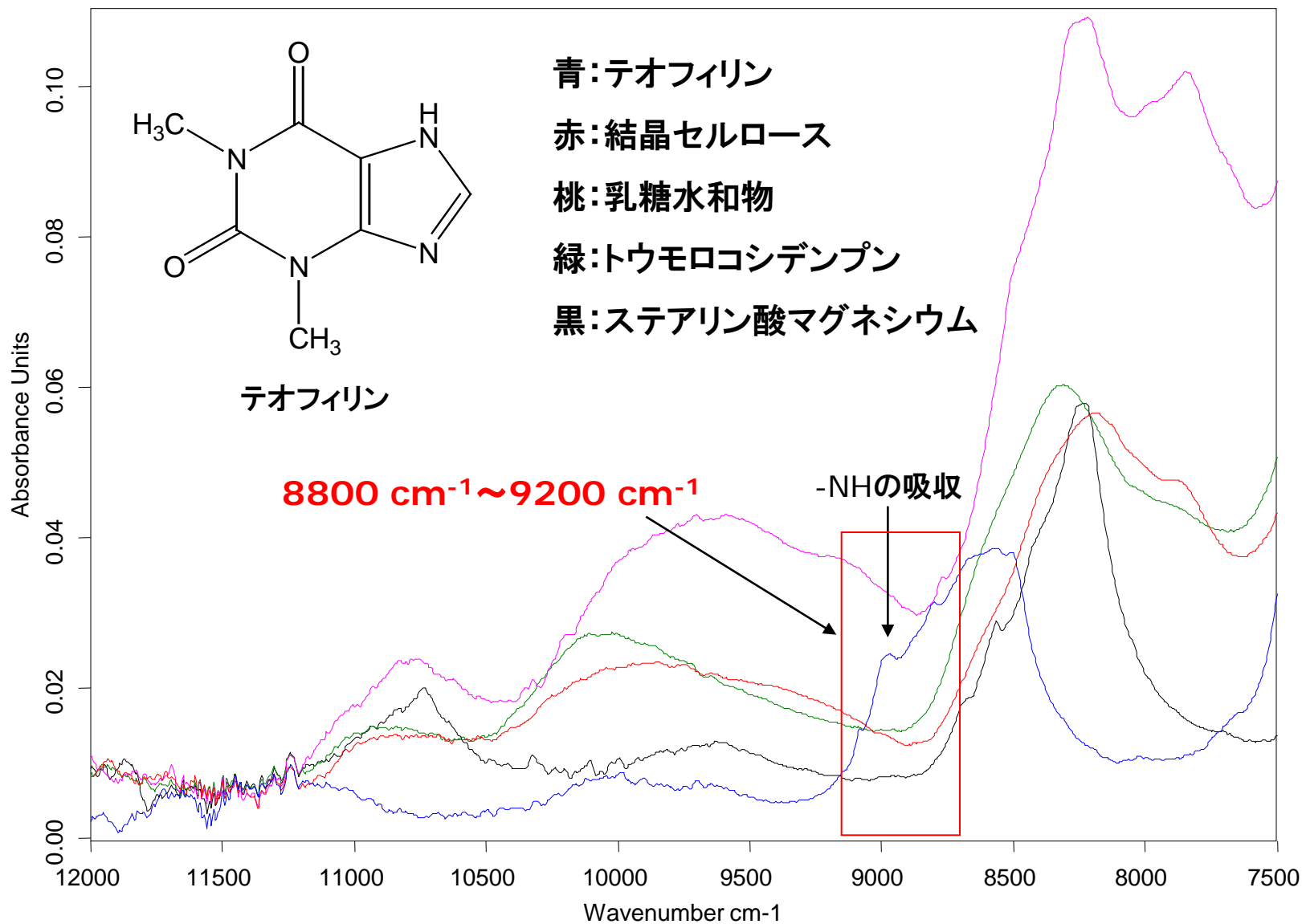
Step2;検量モデルの作成

- 1) 特異性-全原料のスペクトルを測定し、主薬の特異吸収を算出
- 2) 特異吸収体を検討した後、計算領域を限定し、各種スペクトル処理との関連を検討し、算出

Step3;検定試験

同じサンプルセットを別に測定し、後に破壊分析(HPLC)を実施。そのHPLCとの誤差を検討し、性能を評価する

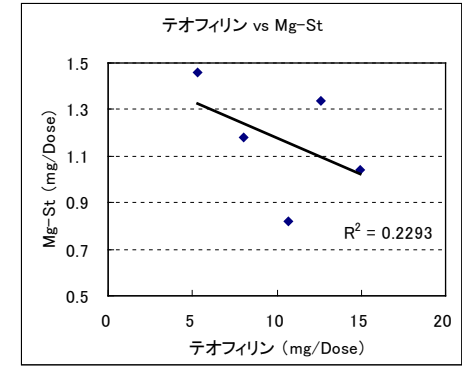
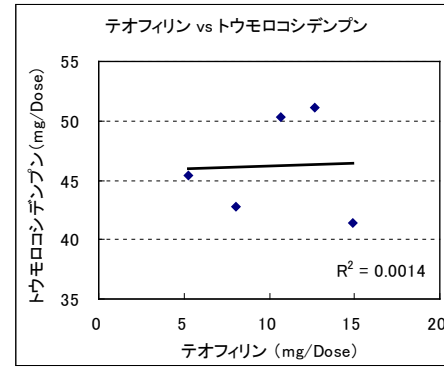
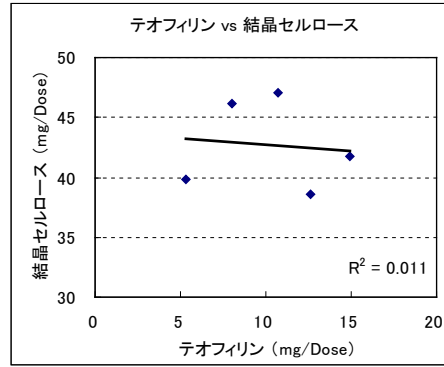
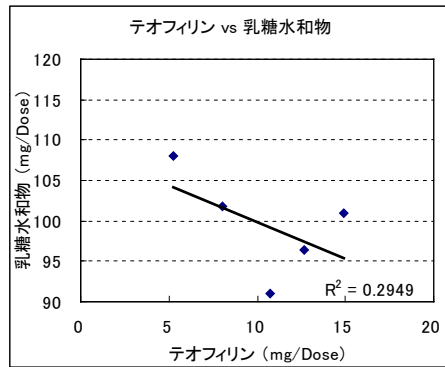
原料の各スペクトル: 波数領域の選択



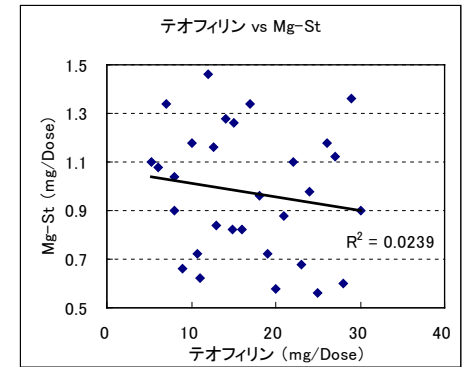
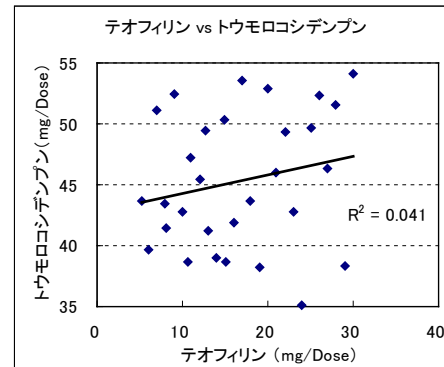
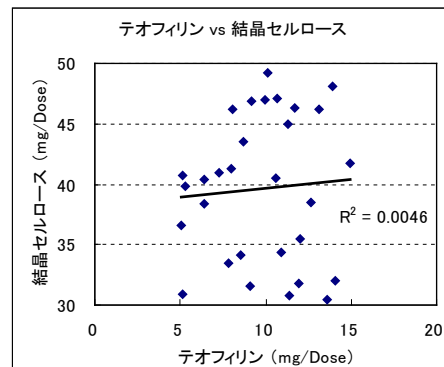
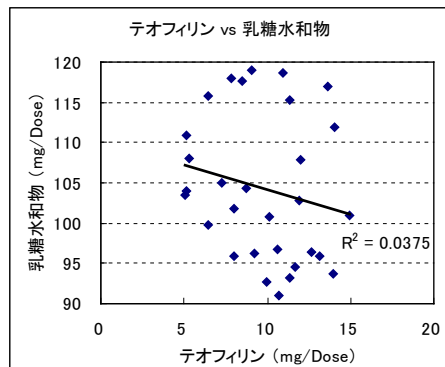
検量モデルの配合比の設計



Case1 5水準×6サンプル



Case2 30水準×1サンプル



PLS検量モデル作成結果(Case1)

検討No	RMSECV	PLS因子数	R2	スペクトル処理
1	0.129	2	99.9	一次微分+SNV処理
2	0.154	4	99.9	一次微分
3	0.154	2	99.9	SLS処理
4	0.165	4	99.9	オフセット処理
5	0.19	3	99.8	一次微分+SLS処理
6	0.19	4	99.8	Min-Max処理
7	0.204	3	99.8	二次微分
8	0.259	4	99.4	SNV処理

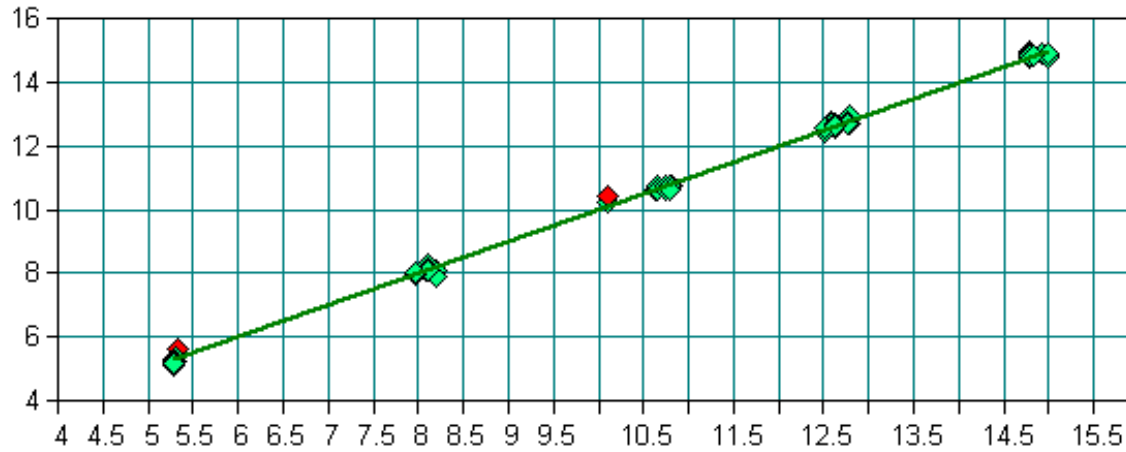
PLS検量モデル作成結果(Case2)

検討No	RMSECV	PLS因子数	R2	スペクトル処理
1	0.112	2	99.9	一次微分+SLS処理
2	0.113	2	99.9	一次微分+SNV処理
3	0.116	4	99.9	一次微分
4	0.119	3	99.9	SLS処理
5	0.12	4	99.8	オフセット処理
6	0.122	2	99.8	二次微分
7	0.167	4	99.8	Min-Max処理
8	0.192	3	99.4	SNV処理

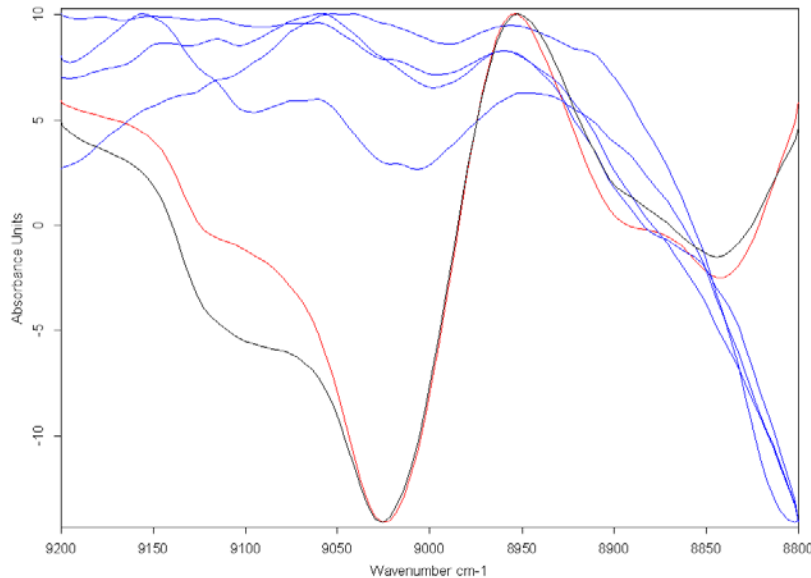
回帰係数ベクトルによる検量線の確認-Case1



Prediction vs True / Comp. 1 [mg] / Cross Validation



Rank: 2 $R^2 = 99.89$ RMSECV = 0.112 Bias: -0.000459 RPD: 30.1
Validation No 2 + Case1-Cal.α2



赤; 各種賦形剤

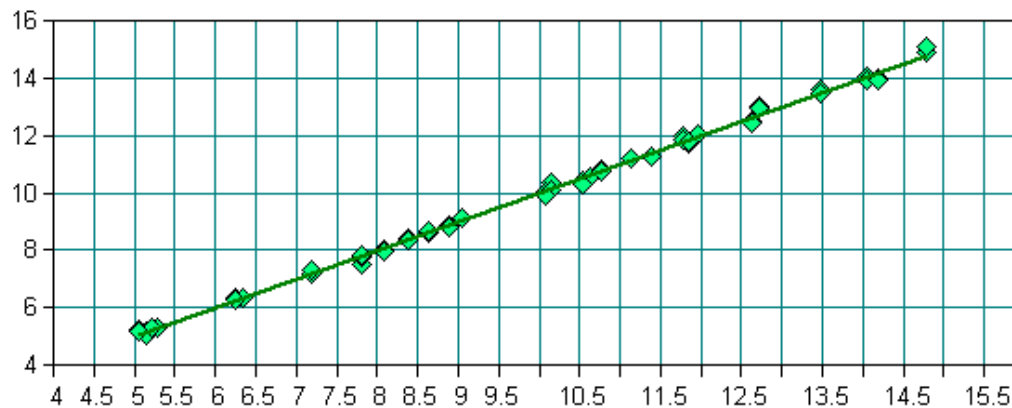
青; API(1次微分)

黒; 検量線の回帰係数ベクトル

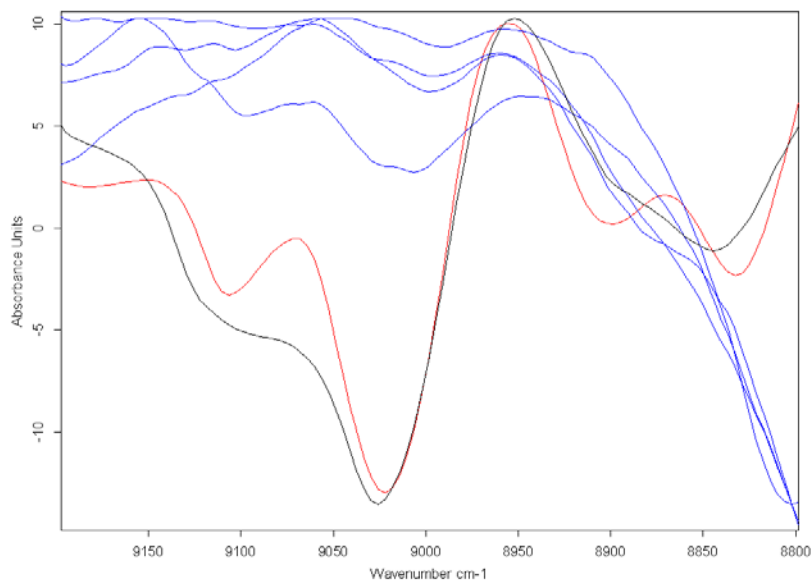
回帰係数ベクトルによる検量線の確認-Case2



Prediction vs True / Comp. 1 [mg] / Cross Validation



Rank: 2 $R^2 = 99.8$ RMSECV = 0.129 Bias: 6.36E-007 RPD: 22.2
Validation No 2 Case2-Cal.α2



青;各種賦形剤

黒;API(1次微分)

赤;検量線の回帰係数ベクトル

テストサンプルによる検定



Case1

サンプル番号	HPLC	NIR値	誤差
1	9.99	9.94	0.05
2	9.95	9.86	0.09
3	9.78	9.71	0.07
4	9.95	9.93	0.02
5	9.99	9.99	0.00
		標準偏差	0.04

Case2

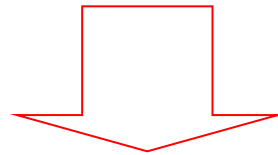
サンプル名	HPLC	NIR値	誤差
1	9.99	10.08	-0.09
2	9.95	9.94	0.01
3	9.78	9.90	-0.12
4	9.95	10.05	-0.10
5	9.99	10.17	-0.18
		標準偏差	0.07

■ 検量モデルの作成

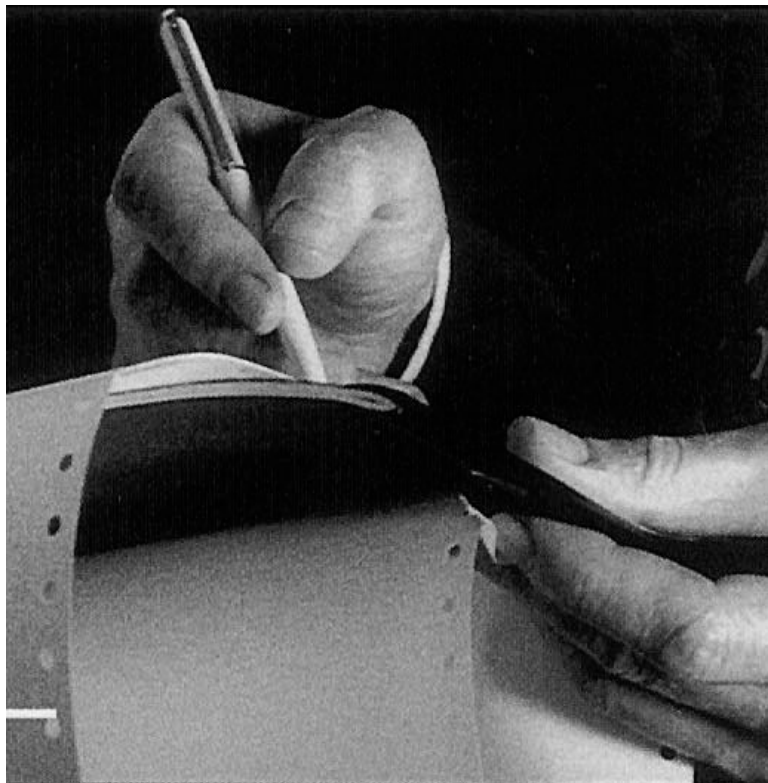
Case1とCase2ともに精度の高い検量モデルが作成できた。

■ 検量モデルの検定試験

Case1とCase2の性能を、他のサンプルセットで検討した結果、両者の検量性能はほぼ変わらず、また、検量モデルの予測誤差(SEP)範囲内の誤差を示した。



以上の結果から、検量モデルの作成に供するサンプルは、必ずしも多くの水準違いを集める必要がなく、また、適切な混合比を設計・作成すれば、水準数を多くする必要はないことが示せた。



- NIRは非破壊分析であり、物理的・化学的影響を受けやすいため、それらの影響を考慮した検量モデルを作成する必要がある。
- そのためには、製造条件などのパラメータを考慮したモデルを作成する必要がある。
- NIRは決して特殊ではなく、特異的帰属も可能な、一般化できる分光法である。
- 目的に応じた適切なマトリクスと解析手法を用いれば、堅牢な検量モデルを作成することが可能である。

Thank you for your Attention!!

