

JASON SMILEQによるNMR定量分析:精度向上への新手法

Part 1. 不確かさ要因の評価

関連製品: 核磁気共鳴装置(NMR)

現在、JASON¹ SMILEQ²では定量分析結果を基にした2種類の分析レポートを作成することが可能です。これらのレポートは、定量分析結果に対して包括的な解析情報を提供します。このアプリケーションノートでは、NMR定量分析における不確かさ要因とその重要性、SMILEQレポートの概要、そして「不確かさレポート」の詳細について解説します。また、Part 2およびPart 3では、不確かさレポートから分散分析への展開や、不確かさ要因解析について具体例を交えながら紹介します。

NMR定量分析の不確かさ要因とその重要性

NMR定量分析結果に寄与する不確かさ要因は、3つのカテゴリーに分類されます (Figure 1)。これらの要因は、最終的な不確かさに大きく影響を与えるため、それぞれに注意を払い、評価や改善を継続的に進めることが重要です。

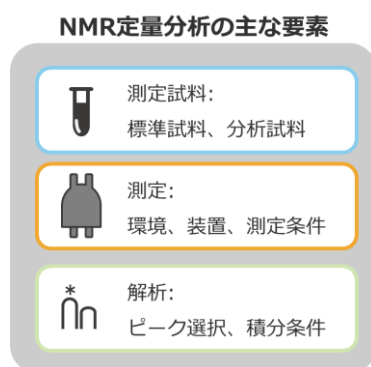


Figure 1. NMR定量分析の主な要素

不確かさ要因: それぞれのポイントについて

- 標準試料:** 試料の純度や安定性は直接的に不確かさの要因となるため注意が必要です。
- 分析試料:** 試料の調製方法、保存方法、物理特性 (均質性など) が不確かさに影響を及ぼします。これにより、信頼性や再現性の課題が発生する可能性があります。
- 環境:** 温度、湿度、振動などの外的条件が、測定結果に影響を与える場合があります。
- 装置:** 装置特有の誤差が、不確かさの要因となる可能性があります。
- 測定条件:** 実験手順の再現性や操作のばらつきが、不確かさに影響します。
- ピーク選択:** 選択するピークの正確性や一貫性が、分析結果に大きな影響を与えます。
- 積分条件:** 積分範囲やベースラインの設定が結果に影響を及ぼします。また、ノイズの影響を最小限に抑えるための考慮が必要です。

定量分析結果を包括的に評価できるSMILEQレポート

SMILEQでは、定量分析結果を評価するためのレポートとして、以下の2種類のレポートを提供しています (Figure 2)。

- 不確かさレポート:** ISO 24583「定量核磁気共鳴分光法 - 食品に利用される有機化合物の純度評価-1H NMR内標準法のための一般的要求事項」に準拠しています。このレポートは、測定プロセス全体に関わる不確かさを統合的に評価する、信頼性を重視した包括的な分析ツールです。
- ANOVAレポート:** 分散分析による分析結果を出力するものです。各要素 (Sample, Signal) のデータ全体に対する寄与を分離し、個々の影響を明確化する手法を提供しています。

SMILEQレポート

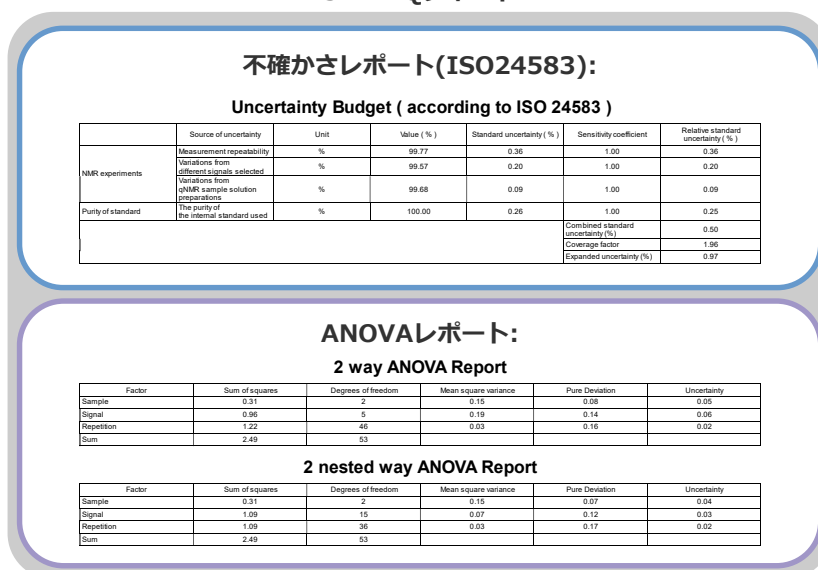


Figure 2. SMILEQレポート例

この資料に掲載した商品は、外国為替及び外国貿易法の安全輸出入管理の規制品に該当する場合がありますので、輸出するとき、または日本国外に持ち出すときは当社までお問い合わせください。

SMILEQレポートの主な特徴

SMILEQレポートについて、それぞれのレポートが定量値データを統計的にどのような視点で解析するか、またそれに伴う結果の違いについてTable 1にまとめました:

- ・ **不確かさレポート**: 測定プロセス全体における不確かさを統合的に評価します。信頼性を重視した包括的な視点から、全体の不確かさを明確化するツールです。
- ・ **ANOVAレポート**: 分散分析に基づき、個々の要素における不確かさを分離・抽出します。各要素 (Sample、Signal) の寄与を定量的に評価し、要因ごとの影響をさらに詳細にすることが可能です。

Table 1. 不確かさレポートとANOVAレポートの特徴

項目	不確かさレポート 	ANOVAレポート 
対象の要素	測定プロセス全体を対象	SampleやSignalなど、個々の要因
分解の詳細度	要因間の影響を 統合	各要因ごとに 分離
不確かさの視点	総合的な不確かさを評価	独立した要因の影響を明確化
適用の場面	測定全体の 不確かさを評価 する場合	要素ごとの 寄与を詳細に検討 する場合
結果の特徴	<ul style="list-style-type: none">● リスクを最小限に抑えるため、最悪のケースを想定した計算方法を採用。● 信頼性を最優先とする評価で、極端なケースにも敏感に対応。	<ul style="list-style-type: none">● SampleやSignalの寄与を分析し、不均衡や偏りを特定するための手法。● 要因ごとの影響を明確化。

補完的な活用の意義

これらのレポートを併用することで、以下の効果が期待できます:

- ・ 総合的不確かさを基にしたリスク評価の実現。
- ・ 分散分析を活用したデータ構造の深い理解。
- ・ 定量分析結果の包括的な評価を通じ、改善すべきポイントの明確化。

例えば、保存された不確かさレポートを拡張不確かさの値に基づき比較することで、実験の有効性を判断することが可能です。また、拡張不確かさに問題が生じた場合には、それぞれの分散分析結果を活用し、要因解析を行うことができます。このように、SMILEQ レポートはデータ解析の精度向上にとどまらず、実験プロセス全体の改善にも寄与する有用なツールです。

不確かさレポートの詳細

不確かさレポートでは、NMR定量分析における以下の要因ごとに、**Relative standard uncertainty (%) (相対標準不確かさ)**が出力されます。相対標準不確かさは、各要素が測定結果にどれだけ寄与するかを評価する指標です。

1. **Measurement repeatability (繰り返し誤差)**: 測定の再現性に基づく変動で、同一条件下での測定結果のばらつきを評価するための指標です。
2. **Variations from different signals selected (計算に用いられた信号による誤差)**: 選択した信号の違いに起因し、選択基準が結果に与える影響を評価する指標です。
3. **Variations from qNMR sample solution preparations (測定に使用された分析試料における誤差)**: サンプル溶液の調製条件や保存方法などに起因する変動を評価し、不確かさへの寄与を明確にするための指標です。
4. **The purity of the internal standard used (使用された標準試料の認証値)**: 標準試料の純度や安定性に基づく変動を反映します。信頼性の高い測定基準としての役割を評価する指標です。

各要因の相対標準不確かさから**Combined standard uncertainty (%) (合成標準不確かさ)**を算出し、さらに、信頼度に応じて設定された**Coverage factor (包括係数)**を使用して、最終的に**Expanded uncertainty (%) (拡張不確かさ)**が算出されます。包括係数は、不確かさを拡張して信頼区間を設定するために使用される統計的な係数です。例えば、信頼度95%の場合、包括係数は約1.96 に設定されます。Figure 3に、不確かさレポート結果に含まれる指標とそれぞれの説明を示します。

(a) Uncertainty Budget (according to ISO 24583)						
	Source of uncertainty	Unit	Value (%)	Standard uncertainty (%)	Sensitivity coefficient	Relative standard uncertainty (%)
NMR experiments	Measurement repeatability	%	99.77	0.36	1.00	0.36
	Variations from different signals selected	%	99.57	0.20	1.00	0.20
	Variations from qNMR sample solution preparations	%	99.68	0.09	1.00	0.09
Purity of standard	The purity of the internal standard used	%	100.00	0.26	1.00	0.25
						Combined standard uncertainty (%)
						0.50
						Coverage factor
						1.96
						Expanded uncertainty (%)
						0.97

(b)	指標と説明
カラム名	内容
Value (%)	計算から得られる定量値。
Standard uncertainty (%)	計算から得られる標準不確かさの値。
Sensitivity coefficient	感度係数。「入力値」の変動が「測定結果」にどの程度寄与するかを定量的に示す指標。
Relative standard uncertainty (%)	相対標準不確かさ。標準不確かさと感度係数を掛け合わせ、 各要素が測定結果にどれだけ寄与するかを評価 する指標。
Combined standard uncertainty (%)	合成標準不確かさ。さまざまな要因から生じる不確かさを統合し、 結果全体の不確かさを評価 した値。
Coverage factor	信頼度に応じて選択された包括係数 (例: 信頼度95%の場合は約1.96) 。
Expanded uncertainty (%)	拡張不確かさ。計算された 不確かさを一定の信頼度のもとで拡張した範囲 を示す値。

Figure3. 不確かさレポート: (a) 不確かさレポート結果例、(b) 不確かさレポート結果の指標とその説明

この資料に掲載した商品は、外国為替及び外国貿易法の安全輸出管理の規制品に該当する場合がありますので、輸出するとき、または日本国外に持ち出すときは当社までお問い合わせください。

拡張不確かさと信頼範囲

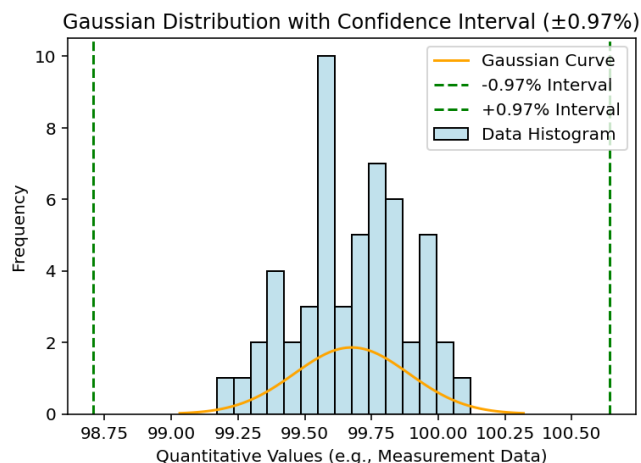


Figure4. 定量分析結果におけるガウス分布と信頼区間の関係

不確かさレポートで特に重要視されるのは、**拡張不確かさ**の値です。この値は、測定結果の信頼性を評価するうえで重要な指標であり、実験結果の妥当性を判断する際に用いられます。拡張不確かさは、測定全体の不確かさを包括的に評価した値です。例えば、Figure 3(a)で示された信頼度95%における拡張不確かさ0.97%の場合、測定値の平均が99.68%であるとき、真の値はこの値の $\pm 0.97\%$ の範囲内に存在すると解釈されます。Figure 4は、Figure 3(a)で参照したデータセットにおける定量値のデータ分布を信頼区間とともに示したものです。この解析では、レポートデータを用いてPythonで計算を行いました。オレンジ色の線は、データセットヒストグラムに基づいて描画されたガウス分布曲線を示しています。実験から得られた定量値が信頼区間内にすべて収まっていることが確認されました。さらに、データが正規分布に近い形状をしていることが明らかになり、これにより測定プロセスの再現性が良好であると推測されます。さらに、要因ごとの影響を分析することで、拡張不確かさを改善する可能性があります。

不確かさレポートによる寄与率解析

寄与率は、各要素の相対標準不確かさが測定全体の合成標準不確かさに与える影響を定量化する指標です。この指標を用いることで、特定の要素が全体の不確かさにどの程度寄与しているかを明確に評価できます。寄与率は、相対標準不確かさと合成標準不確かさの平方の比率を求め、その結果に100を掛けることで算出されます。この方法により、各要素の寄与をパーセンテージで表すことができます。Figure 5は、不確かさレポートから算出した寄与率の結果を示しています。Figure 5の寄与率から以下の傾向が確認できます：

- **Measurement repeatability:** 繰り返し測定データにおける標準偏差が最も大きく抽出されており、不確かさの主な原因となっています。
- **Internal standard:** 標準試料の認証値に基づき、データ全体に一定の影響を与えています。
- **SignalおよびSample:** 寄与率は比較的小さいものの、改善の余地があり、その影響をさらに抑えることが可能です。

(a)

Uncertainty Budget (according to ISO 24583)

	Source of uncertainty	Sensitivity coefficient	Relative standard uncertainty (%)
NMR experiments	Measurement repeatability	1.00	0.36
	Variations from different signals selected	1.00	0.20
	Variations from qNMR sample solution preparations	1.00	0.09
Purity of standard	The purity of the internal standard used	1.00	0.25
Combined standard uncertainty (%)			0.50
Coverage factor			1.96
Expanded uncertainty (%)			0.97

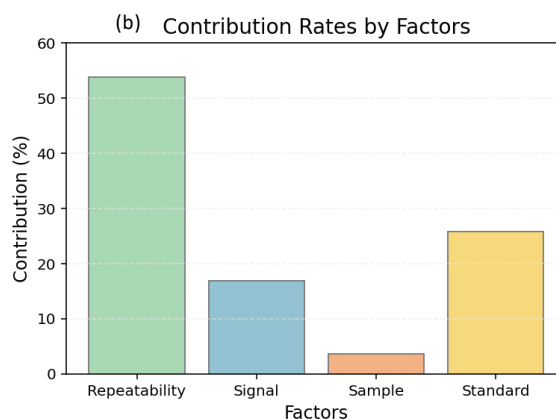


Figure5. 寄与率: (a) 不確かさレポート例、(b) 算出された要素ごとの寄与率

不確かさレポートから分散分析へ

不確かさレポートでは、各要素が測定プロセス全体に与える影響を統合的に反映した不確かさが算出されます。この手法では、各要素間の**相互作用やデータ全体の変動**を考慮するため、**不確かさが分離されていない状態**で算出される点が特徴です。これにより、測定全体の不確かさを包括的に評価することが可能となります。一方、**分散分析(ANOVA)**では、**各要素ごとの純粋な偏差を分離**して算出します。この手法では、要素間の相互作用を排除し、**個々の要因がどの程度誤差に寄与しているかを明確に特定**することが可能です。こうした分析に基づいて、特定の要因に対する改善策をより具体的に導き出すための指針を得ることができます。さらに、**ANOVAレポートの結果を活用**することで、誤差の要因や寄与率をより具体的に分析することが可能です。本解析については、「Part 2. 分散分析による要因の解析」にて詳しく解説します。

補足

定量NMRに関する最新のTopicsや詳細情報は、**NMRによる定量分析(qNMR) JEOL web ページ**をご参照ください。

https://www.jeol.co.jp/products/scientific/nmr/qnmr_index.html

また、**JASON NMRソフトウェア SMILEQ**については、アプリケーションノート「JASON NMRソフトウェアのSMILEQアドオンによる自動¹H定量NMRシステム NM220008」をご参照ください。

<https://www.jeol.co.jp/solutions/applications/details/nm-220008.html>

[1] JEOL Analytical Software Network

[2] Spectral Management Interface Launching Engine for Q-NMR