

粒径对多类中药材 NIR 频谱区的检测研究

吴志生^{1 2 3}, 杜敏^{1 2 3}, 潘晓宁^{1 2 3}, 史新元^{1 2 3*}, 乔延江^{1 2 3*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 国家中医药管理局中药信息工程重点研究室, 北京 100102;
3. 北京市中药基础与新药研究重点实验室, 北京 100102)

[摘要] 采用近红外(NIR)光谱漫反射分析技术,提出基于频谱特征,分析粉末粒径对多类中药材近红外漫反射光谱检测影响。以多类中药材为载体,将其粉碎过60、80、100、120目筛,采集近红外光谱。以柴葛根、柴胡、山药为载体考察中药材装样过程所引入误差。结果表明近红外光谱不同波段受粒径的影响不同,在组合频区和一级倍频区的近红外光谱强度与粒径成正比,而且随着波长增大,受粒径的影响越大。而在二级倍频区,近红外光谱强度与粒径成反比。对于装样误差的考察结果表明,当粉碎目数大于60目时,装样误差较小。阐明了合适的粉碎粒径,保证中药近红外漫反射光谱分析技术的准确性。

[关键词] 中药材; 近红外漫反射; 粒径; 装样误差; 频谱特征

Detection analysis of particle size effects in overtone and combination region of NIR based on multi-types of Chinese material medica

WU Zhi-sheng^{1 2 3}, DU Min^{1 2 3}, PAN Xiao-ning^{1 2 3}, SHI Xin-yuan^{1 2 3*}, QIAO Yan-jiang^{1 2 3*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, 100102, China;

2. Key Laboratory of TCM-information Engineering of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

3. Beijing Key Laboratory for Basic and Development Research on Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Near-infrared (NIR) diffuse reflectance spectroscopy was used to analyze the impact of multi-class particle size of Chinese material medica (CMM) based on the spectral characteristics in overtone and combination region. Several types of CMM (60, 80, 100, 120 mesh) were subjected to NIR spectra analysis. Spectral reproducibility was examined after sample repackaging. The result showed that the effects of particle size on the NIR spectra were different according to different bands, in the combination region and first combination-overtone region. Spectroscopy intensity was proportional to the particle size and influence of particle size was greater as the wavelength increased. While in the second combination-overtone region, it was inversely proportional to particle size. To the sampling loading error, the result indicated that when the mesh number was larger than 60 mesh, the error was small. The appropriate particle size was clarified to guarantee the accuracy and reliability of NIR diffuse reflectance spectroscopy in CMM.

[Key words] Chinese material medica; NIR diffuse spectroscopy; particle size; repackaging; spectral characteristic

doi: 10.4268/cjcm20150223

近红外漫反射光谱法由于分析速度快、无破坏性、灵活性及无需或很少进行样品处理等优点而广泛应用于固体样品的质量分析,涉及制药、农业、烟草、食品和水果等诸多领域。在中药领域,近红外漫

反射光谱法主要应用于中药原料药的质量控制、生产过程控制及制剂的质量控制^[1-4]。

对于中药原料药的质量分析包括指标成分的定量分析和特定属性的鉴别。由于中药材多为不规

[收稿日期] 2014-09-18

[通信作者] * 乔延江 教授,研究方向为中药质量控制, Tel: (010) 84738621, E-mail: yjqiao@263.net; * 史新元 教授,研究方向为中药质量控制, Tel: (010) 84738620, E-mail: shixinyuan01@163.com

[作者简介] 吴志生 讲师,研究方向为中药质量控制, Tel: (010) 84738650, E-mail: wzs@bucm.edu.cn

则、质地不均匀样本,因此为尽量使样品均匀以减少误差,在分析中大多需要进行粉碎处理。对于固体粉末样本而言,样品的粒径不同时,样品的重装样的光谱重复性及所产生的噪音水平不同。而且不同粒径样品颗粒间的紧密度及表面积不同,这会严重影响近红外光在样品中的反射及吸收情况,并进而影响近红外光谱的形状。

同时样品颗粒度的这种差异会引起严重的光散射及光程差异^[5-6]。目前用于消除物理因素差异的数学方法主要有多元散射校正(multiplicative scatter correction, MSC)^[7],标准正则变换(standard normal variate, SNV),扩展多元散射校正(extended multiplicative scatter correction, EMSC),正交信号校正(orthogonal signal correction, OSC)^[8]以及 optical path length estimation and correction (OPLEC)^[9]。数学处理方法虽能一定程度上消除这种影响,但不能完全消除。

与此同时,研究表明样品的粒径影响近红外光谱的灵敏度及模型的稳健性及准确性^[10]。对于大粒径样品,其近红外光谱的吸光度较大,然而其样品均匀性较差且噪音水平较大。因此,探讨如何粉碎固体样品以保证高灵敏度、低噪音水平及良好的模型性能是非常有意义的。在中药领域已开展了一些相关研究,如郝贵奇^[11]等研究了中药材黄连颗粒度对近红外光谱及光谱采集重复性的影响。然而,很少有研究不同粒径对不同中药材近红外检测的影响。此外,未见有采用基于频谱特征和 Kubelka-Munk 方程对不同粒径不同中药材的近红外检测分析。频谱特征具体指近红外可被划分为:二级倍频区(SCOT, 7 100 ~ 1 万 cm^{-1}),一级倍频区(FCOT, 7 100 ~ 5 000 cm^{-1})和组合频区(CR, 5 000 ~ 4 000 cm^{-1})。

本文提出基于频谱特征,以多种中药材为研究载体,研究粒径对近红外光谱法的影响,以期对中药材近红外分析中样品前处理方面提供参考。

1 材料

Antaris I 傅里叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司)配备 RESULT3.0 光谱采集软件。多类中药材,包括根及根茎类(纤维性)药材柴葛根、黄芪、柴胡,根及根茎类(粉性)药材粉葛根、山药,皮类药材黄柏、合欢皮,果实类药材川楝子,花类药材槐花,全草类药材荆芥均由北京同仁堂中药研究所提供。

2 方法

2.1 不同种类中药材的样品制备 将每种中药材取约 60 g,首次粉碎过 20 目筛,将所得粉末混合均匀后按照“四分法”平均分成 4 份,然后将每份粉末再分别粉碎过 60, 80, 100, 120 目筛。

2.2 不同种类中药材和不同粒径的近红外光谱采集 从每种中药材的不同粒径样品中取出 3 份样本(体积相同)用于近红外分析。近红外光谱采集条件:积分球漫反射方式,以仪器内置背景为参比,扫描范围 4 000 ~ 10 000 cm^{-1} ,分辨率 8 cm^{-1} ,累计扫描次数 64 次,每个样本重复扫描 3 次,计算平均光谱用于进一步分析。

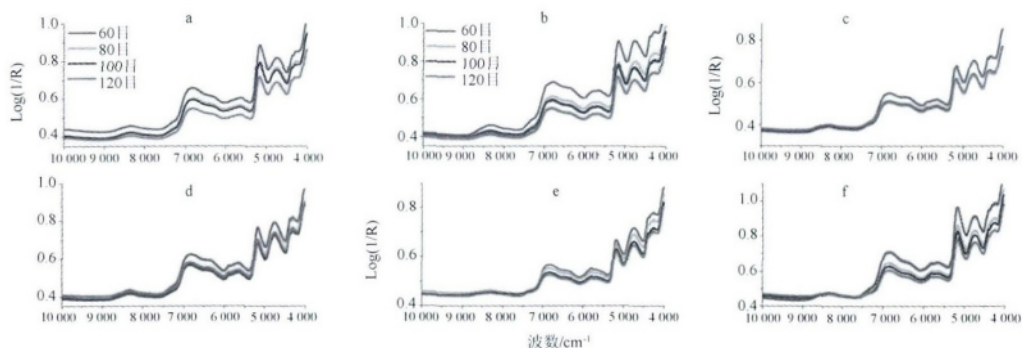
2.3 不同种类中药材和不同粒径的装样误差的测定 以柴葛根、柴胡、山药为载体,考察样品重装的光谱重复性。每个粒径平行取出 3 份样品,将每个样品采集完近红外光谱,倒出重新测定,共重复测定 6 次。计算 6 次测定光谱每个波长点下的相对标准偏差(RSD)。

3 结果与讨论

3.1 基于不同粒径根茎类及果实类药材的近红外光谱图 柴胡、柴葛根、黄芪、粉葛、山药、川楝子等中药材的原始光谱图,见图 1。这类药材的近红外光谱受样品粒径的影响大致相同。以柴胡为例,图 2 利用 RSD 值描述了不同近红外波段对粒径变化对吸光度的影响程度,其中组合频区 RSD 3.5% ~ 4.9%,一级倍频区 RSD 1.7% ~ 3.5%,二级倍频区 RSD 0.90% ~ 1.7%,表明波长越大,受粒径影响越大。

不同波长点下的吸光度与粒径信息的相关性,见图 2,结果表明了吸光度与粒径具有较强的相关性,其中 1 万 ~ 7 180, 7 000 ~ 4 000 cm^{-1} 波段范围内,相关系数绝对值大于 0.9,这也表明了测定化学成分含量时消除粒径因素干扰的重要性。同时研究表明,在一级倍频区和组合频区,吸光度与粒径成正相关;而在二级倍频区,吸光度与粒径成负相关。

3.2 基于不同粒径皮类药材的近红外光谱图 黄柏及合欢皮皮类中药材的原始光谱图,见图 3。以黄柏为例,黄柏及合欢皮的原始光谱图受粒径的影响与根茎类药材相似,且不同波段受粒径的影响均控制在 RSD < 5%,见图 2 A。与柴胡相似,在黄柏近红外光谱的一级倍频区和组合频区,吸光度与粒



a. 柴葛根; b. 黄芪; c. 粉葛根; d. 山药; e. 柴胡; f. 川楝子。

图 1 不同粒径根茎类及果实类药材的近红外原始光谱

Fig. 1 Raw spectra of Fructus and Rhizomatic of Chinese material medica with different granularity

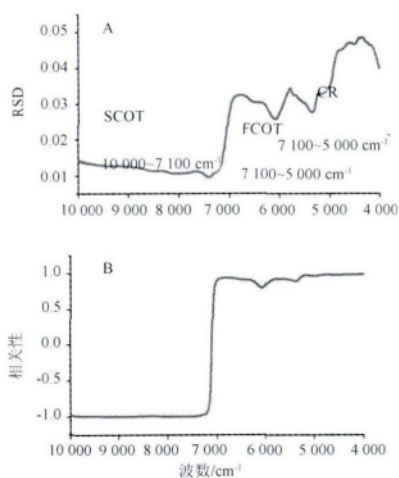


图 2 柴胡近红外光谱对粒径变化的敏感度 (RSD) (A) 和柴胡近红外光谱吸光度与粒径的相关性

Fig. 2 Raw spectra of *B. chinense* with different granularity (A) and difference of NIR frequency range to the granularity of *B. chinense* (B)

径成正相关关系;而在二级倍频区,吸光度与粒径成负相关关系。

3.3 基于不同粒径花类及全草类药材的近红外光谱图 图 5 与图 6 表明在一级倍频区和组合频区, 槐花与荆芥的近红外光谱图受粒径的影响与根茎类药材和皮类药材相似。而在二级倍频区,槐花与荆芥的近红外光谱图受粒径的影响与根茎类药材和皮类药材大不相同。二级倍频区,槐花对粒径变化的敏感度 (RSD 2.5% ~ 4%) 与组合频区 (RSD 3.4% ~ 4.3%) 相近,而一级倍频区 (RSD 1.8% ~ 2.5%) 受粒径变化的响应最小。

a. 黄柏; b. 合欢花。

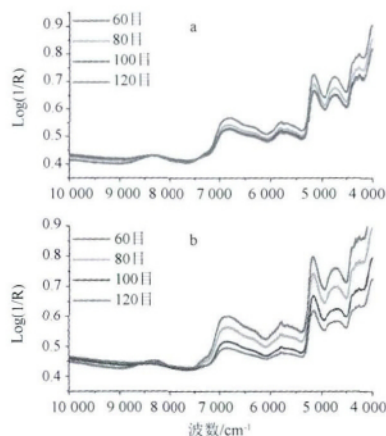


图 3 皮类药材的近红外光谱

Fig. 3 Raw spectra of Cortex of Chinese material medica with different granularity

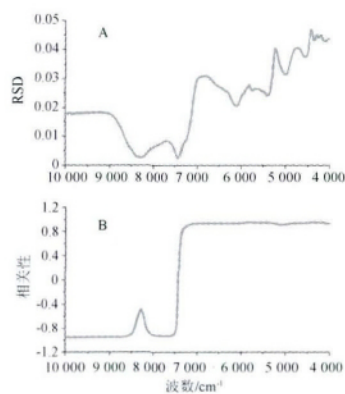
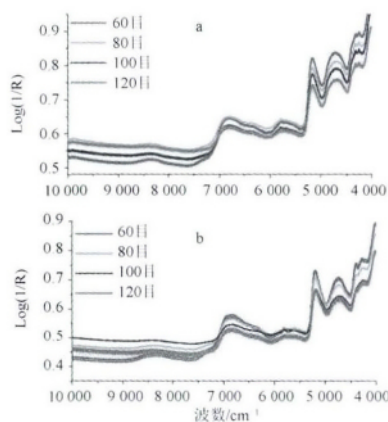


图 4 黄柏近红外光谱对粒径变化的敏感度 (RSD) (A) 及黄柏近红外光谱吸光度与粒径的相关性 (B)

Fig. 4 Raw spectra of *C. phellodendri* with different granularity (A) and difference of NIR frequency range to the granularity of *C. phellodendri* (B)



a. 槐花; b. 荆芥。

图5 花类及全草类药材的近红外光谱

Fig. 5 Raw spectra of Flower and grasses of Chinese material medica with different granularity

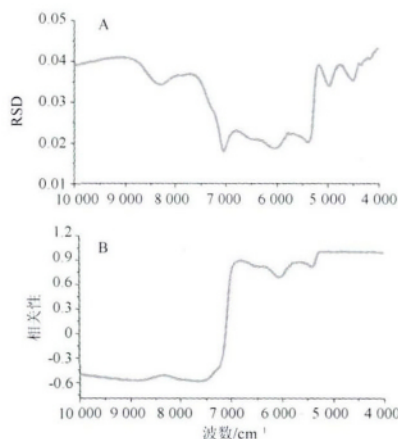


图6 槐花近红外光谱对粒径变化的敏感度(RSD) (A) 及槐花近红外光谱吸光度与粒径的相关性(B)

Fig. 6 Raw spectra of *Sophora japonica* with different granularity (RSD) (A) and difference of NIR frequency range to the granularity of *S. japonica* (B)

根据 Kubelka-Munk 方程, 反射率与样品的散射系数 S 成反比。又有研究表明散射系数 S 与样品的粒径成反比。因此, 推断 $\text{Log}(1/R)$ 应正比于样品粒径。然而, 不同种类中药材不同粒径样本的近红外光谱图, 上述结论仅适用于一级倍频区和组合频区。而在二级倍频区, $\text{Log}(1/R)$ 反比于样品粒径, 且不同药材的吸光度受粒径变化的影响程度各不相同。

对于不同类型的药材, 粒径对其近红外光谱的影响是不同的, 这主要是由于药材质地的不同造成的。对于密度较大的根茎类药材及果实类药材, 其样品相对紧密。而对于槐花和荆芥等质地较轻的药材

其样品颗粒间有很大空隙, 且容易产生静电, 对近红外光谱造成极大干扰。

因此, 对于任一类型的中药材, 粒径对近红外光谱的影响均与波段有关, 在组合频区、一级倍频区和二级倍频区均各有不同。

3.4 不同种类中药材和不同粒径的装样误差 山药、柴胡和柴葛根样品的重装样的光谱重复性见图 7~9。可以看出, 所有样品重装样的 RSD 小于 3%, 说明当粉碎目数大于 60 目, 装样误差较小。此外, 对于不同的药材以及对于同一药材不同装样的样品, 重装样光谱差异性有所不同。

图中可以明显看出样品粒径越小, 重装样光谱差异性越小, 对于过 100 目及 120 目的样品, RSD 小于 1%。但是对于大颗粒样品, 不同次数的重装样光谱差异性有较大不同, 这主要是由于大颗粒样品在混合时难以保证均匀。而且, 光谱重复性因波段而异, 这主要是由于不同的波段对粒径变化的响应不同。

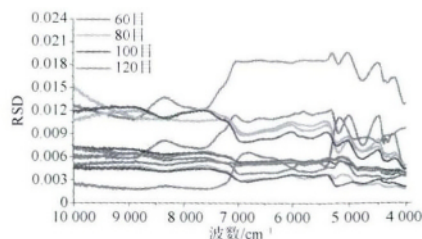


图7 山药样品重装样光谱重复性

Fig. 7 Spectra reproducibility after sample repackaging of Chinese yam

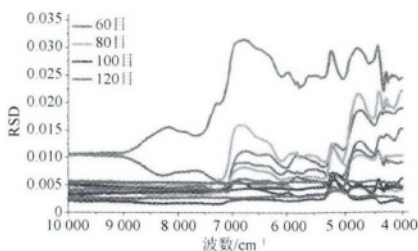


图8 柴胡样品重装样光谱重复性

Fig. 8 Spectra reproducibility after sample repackaging of *Bupleurum chinense*

4 结论

本文提出了基于频谱特征, 考察粒径因素对不

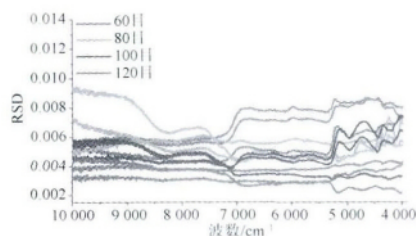


图9 柴葛根样品重装样光谱重复性

Fig. 9 Spectra reproducibility after sample repackaging of *Pueraria lobata*

同种类中药材近红外光谱的影响,并阐明不同粒径样品的重装样光谱重复性特征。结果表明了根茎类、果实类、皮类和花类药材,其组合频区和一级倍频区的近红外光谱强度与粒径成正比,而且随着波长增大,受粒径的影响越大。而在二级倍频区,近红外光谱强度与粒径成反比。不同类型药材中,对于根茎类、果实类和皮类药材,其二级倍频区受粒径的影响相对较小。而槐花和荆芥等中药材近红外光谱的二级倍频区受粒径影响较大,这主要是由于这类药材质地较轻,无法充分混匀,而且静电作用的存在也对近红外光谱存在严重干扰。这些现象也表明在实际应用中,应充分考虑到不同药材的具体特点选择合适的处理方法。

进一步对不同样品重装样光谱重复性的考察发现,当粉碎目数大于60目时,装样误差较小($RSD < 3\%$),且不同波段有较大差异。当粉碎目数大于100目时,所有波段的装样误差变小(均小于1%),且基本无差异。

[参考文献]

[1] Wu Z, Xu B, Du M, et al. Validation of a NIR quantification

method for the determination of chlorogenic acid in *Lonicera japonica* solution in ethanol precipitation process[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62: 1.

- [2] Wu Z, Sui C, Xu B, et al. Multivariate detection limits of on-line NIR model for extraction process of chlorogenic acid from *Lonicera japonica* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 77: 16.
- [3] Wu Z, Tao O, Dai X, et al. Monitoring of a pharmaceutical blending process using near infrared chemical imaging [J]. *Vib Spectrosc*, 2012, 63: 371.
- [4] Magali Laasonen. Near Infrared spectroscopy, a quality control tool for the different steps in the manufacture of herbal medicinal products [D]. Helsinki: University of Helsinki, 2003.
- [5] Blanco M, Peguero A. Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(1): 59.
- [6] Leger M N. Alleviating the effects of light scattering in multivariate calibration of near-infrared spectra by path length distribution correction [J]. *Appl Spectrosc*, 2010, 64(3): 245.
- [7] Helland I S, Naes T, Isaksson T. Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic data [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 1995, 29(2): 233.
- [8] Wold S, Antti H, Lindgren F, et al. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 1998, 44(1-2): 175.
- [9] Jin J W, Chen Z P, Li L M, et al. Quantitative spectroscopic analysis of heterogeneous mixtures: the correction of multiplicative effects caused by variations in physical properties of samples [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(1): 320.
- [10] Cozzolino D, Morón A. Influence of soil particle size on the measurement of sodium by near-infrared reflectance spectroscopy [J]. *Commun Soil Sci Plan*, 2010(41): 2330.
- [11] 郝贵奇, 马群, 张卓勇, 等. 中药材黄连颗粒度对近红外光谱的影响 [J]. *现代仪器*, 2006(5): 27.

[责任编辑 丁广治]