

# 基于偏最小二乘回归同时测定 阿莫西林和多四环素含量

区伟佳, 张新明, 李华兴, 王 荣, 高雅丽

(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**阿莫西林和多四环素在紫外光谱区间吸收峰附近有多重共线现象,紫外分光光度法难以准确测出2种物质各自含量.本文通过 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,采集200~250 nm波长混合样品吸收光谱,数据经标准化处理,建立偏最小二乘回归预报数学模型.结果显示,该法计算阿莫西林和多四环素的预测相对误差(RPE)分别为3.13%和6.42%,平均加标回收率分别为100.34%和100.71%.该法简便快捷,准确可靠,样品无需预先分离.

**关键词:**偏最小二乘回归;阿莫西林;多四环素;紫外分光光度法

中图分类号:S859.796;R917

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)02-0015-04

## Simultaneous Determination of Amoxicillin and Doxycycline with Partial Least-Square Regression

OU Wei-jia, ZHANG Xin-ming, LI Hua-xing, WANG Rong, GAO Ya-li

(College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The existence of colinear and overlapping phenomena in the ultraviolet absorption spectra of amoxicillin and doxycycline makes it difficult to use ultraviolet spectrophotometry to determine the respective contents in a mixture of both components.  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experimental design was applied in this study and absorption data from 200 to 250 nm of their mixture were obtained with UV scan procedure. Then a data normalization was made and a PLS (partial least square regression) predicting model was developed by using DPS 8.01 software. It was shown that this method was accurate and reliable, with the RPE% for both amoxicillin and doxycycline were 3.13% and 6.42%, respectively, and the average recovery rate were 100.34% and 100.71%, respectively. It was also simple and rapid without the necessity of separating the samples beforehand.

**Key words:** partial least-squares regression; amoxicillin; doxycycline; ultraviolet spectrophotometry

阿莫西林(Amoxicillin)和多四环素(Doxycycline)是具有广谱抗菌作用的常用抗生素<sup>[1-2]</sup>,而且是人畜共用药物.在我国的一些畜禽养殖场,由于抗生素的大剂量使用甚至滥用,常常导致畜禽粪便、土壤、废水中有不同程度的抗生素残留.这些抗生素不但影响环境中微生物群落生态,还会伴随食物链进入人体,影响人类健康,造成食品安全隐患.长期接

触抗生素,可能导致人体内致病菌群耐药性增强,发病时病情更难以控制.随着人们生活水平的提高,食品中抗生素残留已成为全社会关注的热点问题,抗生素残留快速检测技术的研究越来越受到重视.目前,国内外能同时测定阿莫西林、多四环素的研究还鲜见报道,已有的文献主要分为高效液相色谱法、紫外分光光度法、荧光分光光度法、旋光法<sup>[3-6]</sup>等几大

收稿日期:2009-03-05

作者简介:区伟佳(1983—),男,硕士研究生;通信作者:张新明(1965—),男,副教授,博士,E-mail: xmzhang@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(40571074)

类.常用的高效液相色谱法分析费用高,测定回收率低,不能准确测定组分中有关抗生素的含量<sup>[7]</sup>.本文采用偏最小二乘回归,通过改善峰形、分离重叠峰、扣除背景和消除噪音,旨在为同时测定阿莫西林和林可霉素2种组分混合样品提供一种可靠、准确和廉价的常规分析方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

阿莫西林标准品(85.5%,中国药品生物制品鉴定所);多四环素标准品(85.2%,中国药品生物制品鉴定所);pH 6.8磷酸缓冲溶液;试验用水为二次蒸馏水.UV-4000紫外可见分光光度计;雷磁PHS-3C pH计.

### 1.2 标准溶液配制

阿莫西林标准溶液配制:准确称取阿莫西林标准品0.5848 g,适量蒸馏水溶解后转移至500 mL容量瓶,并定容至刻度,摇匀,配制成 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 贮备液,避光冷藏备用.使用时用蒸馏水稀释成 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的工作液.

多四环素标准溶液配制:准确称取多四环素标准品0.5846 g,适量蒸馏水溶解后转移至500 mL容量瓶,并定容至刻度,摇匀,配制成 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 贮备液,避光冷藏备用.使用时用蒸馏水稀释成 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的工作液.

### 1.3 偏最小二乘回归原理

偏最小二乘回归(PLS)是用以解决化学样品分析中存在的变量多重相关及解释变量多于样本点等实际问题<sup>[8]</sup>.由于偏最小二乘回归能解决许多以往用普通多元回归方法无法解决的问题,因而近年得到有关研究人员的重视,并应用到各学科领域.

当实验假设含有 $n$ 组分的标准混合液,其稀溶液光密度与浓度符合比耳定律,且各组分间的光密度具有良好加和性,则可用偏最小二乘回归计算.PLS是通过配制含有 $m$ 个组分的 $n$ 个标准混合物的浓度矩阵 $C$ ,这 $n$ 个标准混合物利用矩阵正交分解,建立数学模型,把扫描标准混合物在 $t$ 个波长处的光密度矩阵结果 $A$ 分解为列正交阵与行正交阵之积<sup>[9]</sup>.

本试验对测定的混合样品的光密度矩阵 $C$ 进行处理,所得标准混合样品校正集的光密度数据建立偏最小二乘数学模型,再建立正交预报集进行预报.以加入值和预报值结果为判据,确定预报性能.

### 1.4 试验方法

10 mL比色皿中加入单组分和按正交设计 $L_{16}(4^5)$

配制2种组分标准混合溶液(表2),pH6.8磷酸缓冲液2 mL,蒸馏水定容至刻度,摇匀.用1 cm光径石英比色皿比色,试剂空白作参比,190~300 nm波长扫描吸收光谱,间隔1 nm自动采集光密度值数据.数据采用化学计量学处理,DPS8.01程序做偏最小二乘回归分析<sup>[10]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 吸收光谱

在pH6.8磷酸缓冲液下,阿莫西林和多四环素在190~300 nm波长的吸收光谱见图1.由图1可见,二者最大吸收波长分别为204和208 nm,吸收光谱重叠严重,峰值波长相差很小.用经典的分光光度法难以直接进行2组分的定量分析.

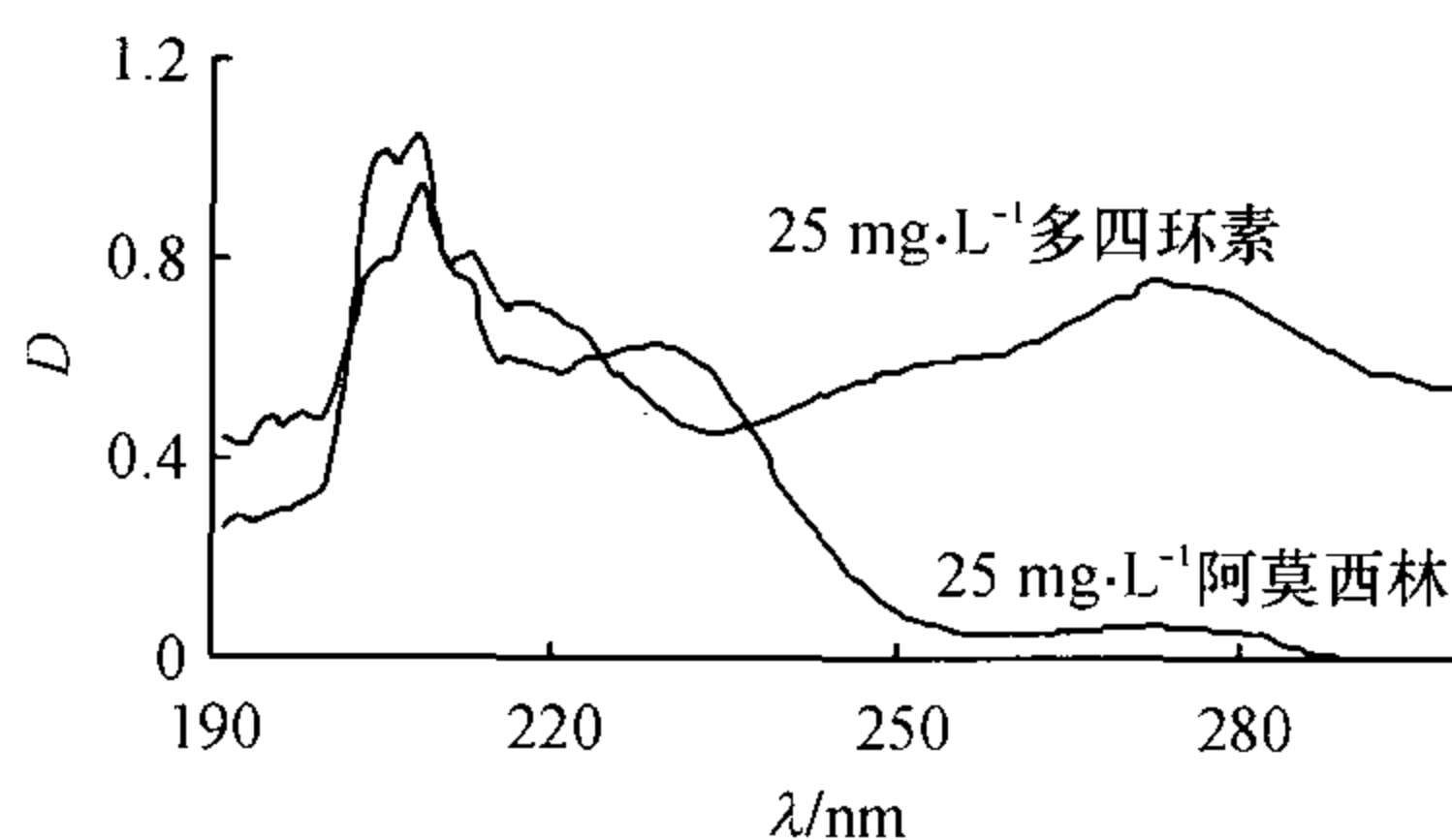


图1 阿莫西林和多四环素吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of amoxicillin and doxycycline

### 2.2 单组分线性范围

配制0、10、20、30、40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿莫西林和多四环素标准样品,以蒸馏水作参比,置1 cm石英吸收池中,阿莫西林在227 nm、多四环素在272 nm波长处测定 $D$ <sup>[11-12]</sup>.结果显示(图2),阿莫西林测定回归方程为 $y = 0.246x - 0.2436$  ( $R^2 = 0.9999^{**}$ ,  $P < 0.01$ );多四环素测定回归方程为 $y = 0.2979x - 0.2957$  ( $R^2 = 0.9999^{**}$ ,  $P < 0.01$ ),两者的光密度( $y$ )与质量浓度( $x$ )的线性关系均达到极显著水平.

### 2.3 单组分稳定性

在室温下,以标准曲线为待测液,放置0、30、60、90及120 min后测定光密度,结果显示(表1),试样放置2 h内光密度值未见明显变化.

### 2.4 光密度加和性

在190~300 nm范围内测定2种抗生素混合溶液的 $D$ ,同时计算二者单组分光密度加和值 $D'$ ,以 $D - D'$ 对波长作图.结果(图3)表明,加和值与测定值较为吻合.差值在0.000~0.035之间,表明阿莫西林和多四环素组成混合体系的光密度值有良好的加和性,属于线性体系,适合用偏最小二乘回归处理数据.

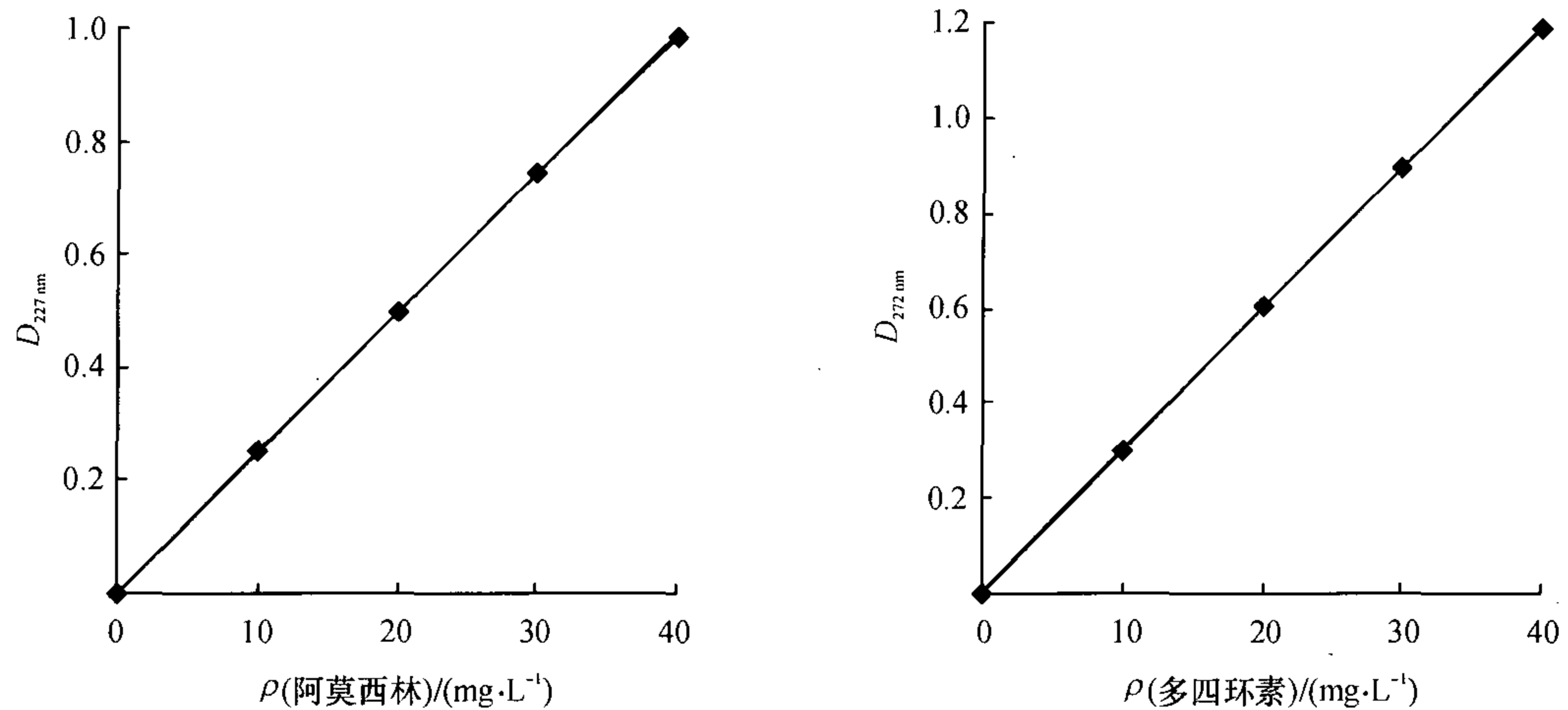


图 2 阿莫西林和多四环素质量浓度对光密度的标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of amoxicillin and doxycycline between concentration and absorbance

表 1 不同质量浓度阿莫西林和多四环素光密度值的动态变化

Tab. 1 Dynamics of absorbance with concentrations of amoxicillin and doxycycline

$t_{\text{放置}}/\text{min}$	$\rho(\text{阿莫西林})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$					$\rho(\text{多四环素})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$				
	0	10	20	30	40	0	10	20	30	40
0	0.045	0.294	0.541	0.790	1.027	0.039	0.337	0.644	0.936	1.229
30	0.045	0.295	0.541	0.792	1.028	0.038	0.337	0.645	0.934	1.225
60	0.044	0.292	0.539	0.796	1.031	0.037	0.335	0.641	0.929	1.217
90	0.044	0.294	0.542	0.795	1.029	0.038	0.335	0.640	0.931	1.221
120	0.045	0.296	0.544	0.799	1.036	0.039	0.334	0.637	0.926	1.216

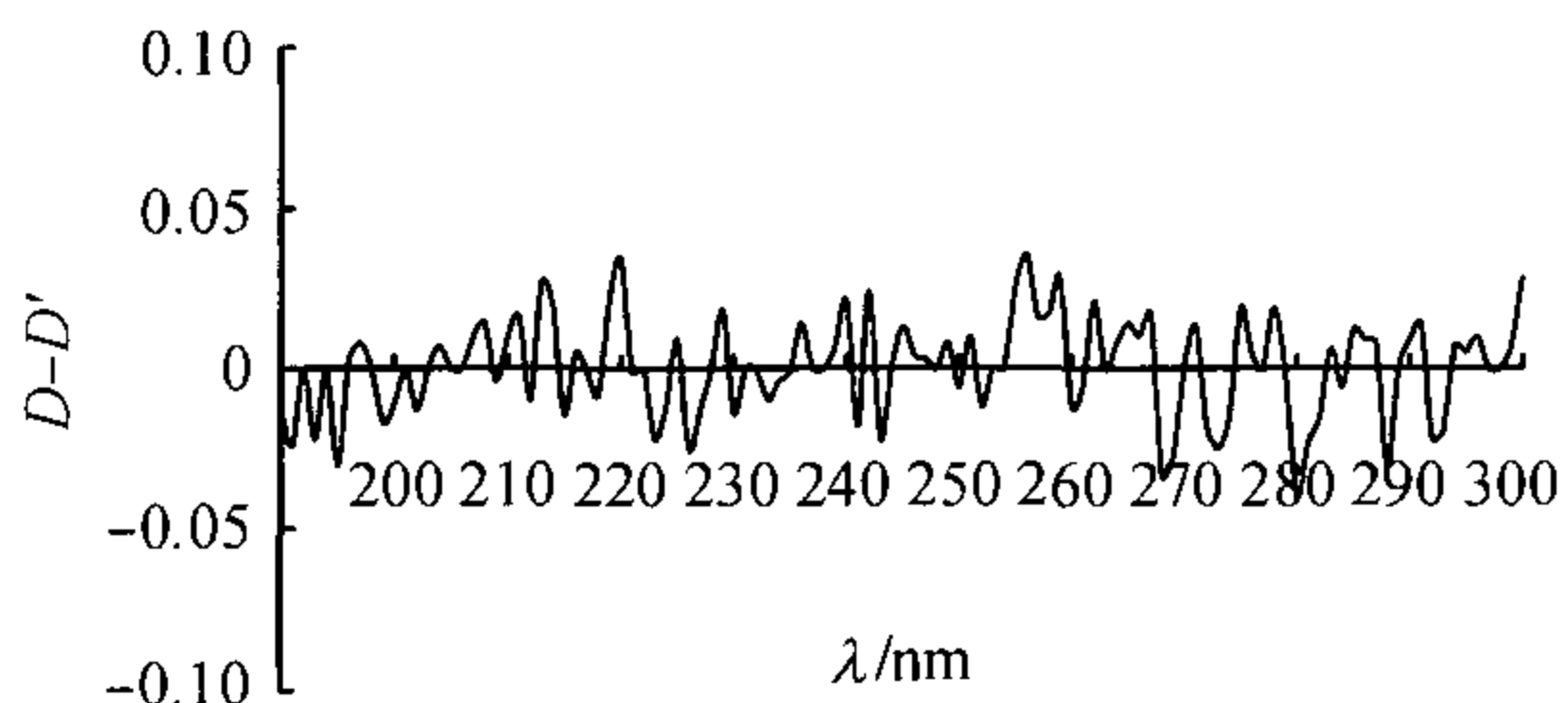


图 3 阿莫西林和多四环素的光密度加和图谱

Fig. 3 Addition absorbance spectra of amoxicillin and doxycycline

### 2.5 偏最小二乘回归模型建立

2.5.1 校正集的建立 按正交设计  $L_{16}(4^5)$  配制 16 组标准混合溶液, 建立校正模型(表 2), 在 200 ~ 300 nm 波长范围内, 每隔 2 nm 进行多波段扫描, 构成校正集光密度值矩阵. 所得数据输入计算机, 有关

表 2 阿莫西林、多四环素标准混合液质量浓度

Tab. 2 Concentration of standard solutions for amoxicillin and doxycycline  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

序号	阿莫西林	多四环素	序号	阿莫西林	多四环素
1	5	5	9	15	5
2	5	10	10	15	10
3	5	15	11	15	15
4	5	20	12	15	20
5	10	5	13	20	5
6	10	10	14	20	10
7	10	15	15	20	15
8	10	20	16	20	20

算法通过统计软件 DPS8.01 编制的程序实现.

2.5.2 主成分数的确定 偏最小二乘回归的主成分数确定对预测结果的准确性起至关重要作用. 本试验采用交换验证法建立模型, 为了避免过度拟合, 提高模型精度, 通过  $F$  检验, 剔除未能通过检验的自变量, 最终确定当预报残差平方和 (PRESS) 达到极小值时的主成分数, 即为最佳主成分数. 各组分的 PRESS 随主成分数变化如图 4 所示, 当模型主成分数为 2 时, PRESS 已达到极小值, 并且正好与混合溶液组分数一致.

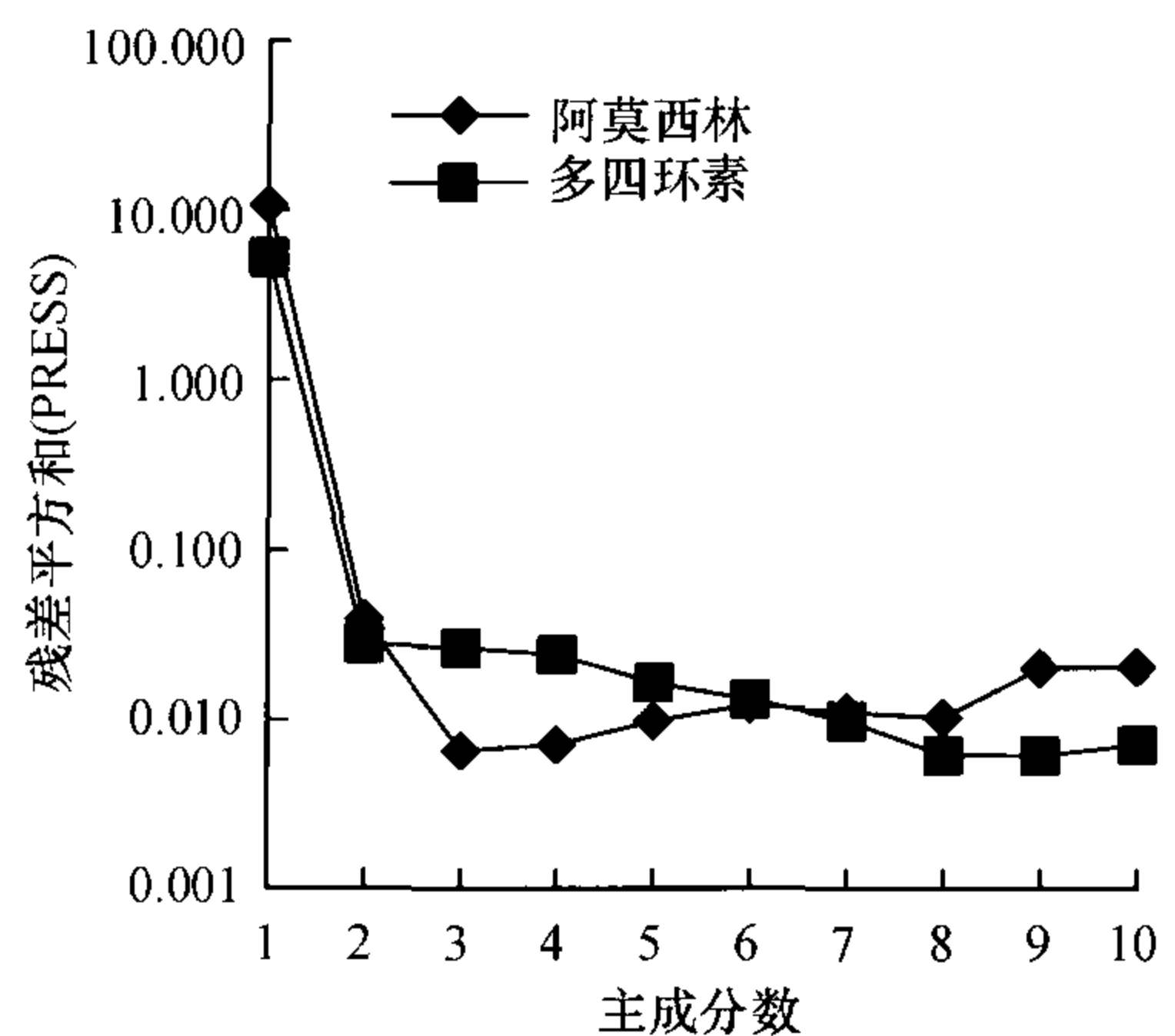


图 4 预报残差平方和随主成分数的变化

Fig. 4 Change of PRESS with factor number

2.5.3 波长点数的确定 对16组校正集样品测定结果以相对预报误差(RPE)为判据,当以波长200 nm为起点,间隔2 nm取25个测量点,即当校正集数为16,主成分数为2,波长点数为25时,各组分均取得令人满意的结果.故确定波长点数为25.

2.5.4 模型预测性能检验 按正交设计 $L_9(3^4)$ 配制9组混合溶液作预测集(表3),检验所建立模型的预测能力,测得的光密度值输入模型,分别计算出2种组分含量.以预测集各样品中阿莫西林和多四环素的预测值与加入值作分析.结果(表4)表明,模型对2种抗生素具有很好的同时预测性能.

表3 阿莫西林、多四环素混合液质量浓度

Tab.3 Concentration of solutions for amoxicillin and doxycycline

序号	阿莫西林			多四环素		
	$\rho_{加入}/$ ( $mg \cdot L^{-1}$ )	$\rho_{预测}/$ ( $mg \cdot L^{-1}$ )	回收 率/%	$\rho_{加入}/$ ( $mg \cdot L^{-1}$ )	$\rho_{预测}/$ ( $mg \cdot L^{-1}$ )	回收 率/%
1	6	5.65	94.18	6	5.57	92.81
2	6	6.02	100.41	12	12.37	103.06
3	6	6.05	100.88	18	18.18	100.99
4	12	11.98	99.87	6	6.38	106.40
5	12	12.11	100.93	12	11.66	97.20
6	12	12.11	100.90	18	17.82	99.02
7	18	18.08	100.44	6	6.07	101.10
8	18	18.40	102.20	12	12.46	103.83
9	18	18.60	103.31	18	18.36	102.03

表4 阿莫西林、多四环素校正模型的相关指标

Tab.4 Mathematical statistics results of calibration models of amoxicillin and doxycycline

组分	主成分数	复相关系数	残差平方和(PRESS)	预测相对误差(RPE)/%	均方根误差(RMSE)/%	平均回收率/%
阿莫西林	2	0.998 2	0.039 0	3.13	0.86	100.34
多四环素	2	0.998 6	0.027 9	6.42	1.70	100.71

### 3 小结

本文利用阿莫西林和多四环素在紫外区间的吸收特性,通过对同时测定方法的研究和试验条件的优化,使2种抗生素相互重叠的吸收光谱得以较好分辨,建立了快速、可同时测定阿莫西林和多四环素的数学模型.该方法简便快速,当条件确定后,只需测定条件波长范围内的光密度,与计算机联用,边扫描边保存数据,稍作数据处理便可获得满意的预测

结果,为环境中抗生素残留提供可选检测方法<sup>[13]</sup>.试验结果可知偏最小二乘建模能对重叠严重的紫外光谱进行解析并能给出较准确的浓度预报,使光谱消除了噪音及背景的干扰,提高了波谱的分辨率,减小了测定的误差.与近期同类研究结果<sup>[14]</sup>相比较,该法更为简便快捷,预测结果准确可靠,是解决实际问题,实现自动分析的一种新途径.

#### 参考文献:

- [1] RICHARD E R, ROBER F B, BORA G. Manual of Antibiotics[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2001.
- [2] 顾觉奋. 抗生素的合理应用[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004.
- [3] WIBAWA J I D, FOWKES D, SHAW P N. Measurement of amoxicillin in plasma and gastric samples using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection[J]. Journal of Chromatography: B, 2002, 774(2): 141-148.
- [4] 卢海波,李航,杨莲芝. 紫外分光光度法快速测定阿莫西林含量[J]. 四川医学,2002,21(4):344-345.
- [5] 任乃林. 荧光光度法测定阿莫西林胶囊的含量[J]. 广东化工,2005,12:32-34.
- [6] 许桢灿,彭秋明,代金玉. 旋光法测定盐酸强力霉素[J]. 中国医药学杂志,1986,4(11):505-507.
- [7] 李彦文,莫测辉,赵娜. 高效液相色谱法测定水和土壤中磺胺类抗生素[J]. 分析化学,2008,36(7):954-958.
- [8] 王惠文,吴载斌,孟洁. 偏最小二乘回归的线性与非线性方法[M]. 北京:国防工业出版社,2006.
- [9] 刘民武,田敏,李华. 偏最小二乘-分光光度法同时测定铋、铜、钴和镍[J]. 长安大学学报,2003,25(2):73-76.
- [10] 唐启义,唐洁. 偏最小二乘回归分析在均匀设计试验建模分析中的应用[J]. 数理统计与管理,2005,25(5):45-50.
- [11] 刘秋英,王菊荣. 紫外分光光度法测定阿莫西林胶囊含量[J]. 青岛医药卫生,2001,33(3):229-230.
- [12] 任青海,曹林静,张凤花. 紫外分光光度法测定强力霉素水溶性粉的含量[J]. 中国兽药杂志,1994,28(4):20-21.
- [13] 倪永年,葛成相. 多元校正分光光度法同时测定兔血清中内的 $\beta$ -内酰胺类抗生素[J]. 光谱学与光谱分析,2007,27(2):355-359.
- [14] 高红,赵一兵,郭祥群. 一种测定四环素类抗生素的光谱新方法[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(3):488-490.

【责任编辑 周志红】