

单因素试验结合响应面分析法对黄连木叶片挥发性有机物萃取条件的优化

王亚英¹,张晋²,马子涵²,杨露露²,杨秀云^{2*}

(1. 山西省林业职业技术学院,山西 太原 030009;2. 山西农业大学林学院,山西 太谷 030801)

摘要:【目的】研究彩叶植物黄连木叶片挥发性有机化合物(VOCs)萃取的最佳试验条件。【方法】选取黄连木叶片作为试验材料,在单因素试验的基础上,采用中心组合(Box-Behnken)试验设计原理,设计了四因素三水平29个试验点的响应面分析模型,优化了顶空固相微萃取法的萃取温度、震荡时间、加样量和解吸附时间,随即采用SPME-GC-MS测定黄连木叶片挥发性有机物种类、相对含量及总峰面积。【结果】黄连木叶片挥发性有机物萃取的最佳试验条件为:萃取温度35℃、震荡时间30 min、加样量0.50 g、解吸附时间5 min,在最佳条件下结合GC-MS分析测得黄连木叶片中共有63种成分,其中萜烯类、醛类、烷烃类、酮类、醇类、酯类、炔类化合物的相对含量分别是89.87%、9.24%、0.54%、0.18%、0.14%、0.02%和0.01%。【结论】单因素试验结合响应面法优化的顶空固相微萃取条件适合快速测定黄连木叶片的挥发物,萜烯类化合物为主要挥发物。

关键词:黄连木;顶空固相微萃取;气相色谱-质谱联用;响应面分析法

中图分类号:S792.99 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)03-0164-14

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2024.03.020



黄连木(*Pistacia chinensis*)属漆树科(Anacardiaceae)黄连木属(*Pistacia*)优良树种,在我国分布较为广泛,遍布全国25个省、自治区和直辖市,主要分布在河南、山东、安徽、浙江、贵州、江西、广西和湖南等省,水平分布上呈现连续分布的规律,垂直分布上由西到东呈现逐渐降低的趋势^[1-2]。黄连木叶挥发油中含有大量的挥发性有机物质,具有一定的药用价值^[3],嫩芽和叶片也具有浓郁的芳香气味^[4]。目前,提取挥发性有机物成分的方法主要有溶剂萃取法、水蒸气蒸馏

法、超临界CO₂萃取法、顶空固相微萃取法等,其中顶空固相微萃取法利用带有聚合物涂层的细石英纤维从基体中提取有机化合物,并直接将它们转移到气相色谱仪的进样器中进行热解吸和分析^[5]。该方法具有操作简单、灵敏度高、有机溶剂需求小等优点,符合环境友好的化学分析标准,适用于植物挥发性有机物分析测定^[6-8]。吴英详等^[9]使用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱技术测定千层金叶片中的挥发性成分;李俊星等^[10]应用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱技术分析香芋南瓜叶片的香气物质;易紫容等^[11]应用顶空固相微萃取-气质联用法分析白术不同部位的挥发性成分;王安祥等^[12]使用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱测定空气芳香剂中的挥发性成分。依据前人研究结果,本研究选用顶空固相微萃取法来提取黄连木叶片中的挥发性有机物成分。

响应面法是20世纪90年代初兴起的一种试验统计方法。该方法利用多元二次回归模型对试验结果进行函数拟合,具有试验周期短、回归方程精度高以及可研究因素之间交互作用等优点^[13]。因此,响应面

收稿日期:2023-04-24;**修回日期:**2023-07-31

基金资助:山西省基础研究计划项目(202103021224144);
山西农业大学生物育种工程项目(YZGC138);
山西省林木种质资源普查项目(202103021224146)

作者简介:王亚英(1976-),女,山西太原人,硕士,讲师,主要从事园林植物生理方面的研究。

E-mail:1355984358@qq.com

*通信作者。E-mail:xyyang2002@yeah.net

法可用于优化黄连木叶片挥发性有机物的提取条件,考察各因素对挥发性有机物的影响。

目前,关于黄连木叶片挥发性有机物萃取条件的优化报道较少,本试验采用黄连木叶片作为研究对象,通过单因素试验及响应面 Box-Behnken 试验设计法优化了 HS-SPME 技术的萃取条件^[14]。以离子色谱图的总峰面积和挥发性有机物种类作为考察指标,分析了不同震荡时间、萃取温度、加样量和解吸附时间对黄连木叶片萃取效果的影响,以期后续进一步研究黄连木的开放利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验地概况及材料

本试验采用的样品为山西省襄汾县林业站黄连木树种的叶片,襄汾县介于 111°06′~111°40′ E, 35°40′~36°03′ N, 年均气温 11.5 °C, 年均降水量 550 mm, 属于温带季风性气候。叶片采集时间是 2021 年 6 月 25 日上午 11:00, 采集时选择健康无损、受光条件一致的叶片, 并进行多株混合取样, 确保试验结果的可比性。采集后立即用锡纸密封包裹放入液氮中保存, 随即带回实验室存放于 -80 °C 的冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 HS-SPME 法 采用顶空固相微萃取自动进样 (SPME), 取样前先将固相微萃取头 (50/30 μm 二乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷 DVB/CAR/PDMS, 美国 Thermo 公司) 在气相色谱进样口 250 °C 老化 2 h, 以确保脱去其可能吸附的挥发性成分, 随即称好的样品置于 20 mL 顶空样品瓶中, 老化后的萃取头插入进样瓶的顶空部分, 顶空萃取一段时间快速移出, 并立即插入设置好条件的 GC-MS 气相层析的进样口, 进行 GC-MS 检测^[15-16]。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为 TG-5 MS, 30 m×0.25 mm (ID)×0.25 μm, 美国 Thermo 公司, 色谱柱流量采用恒流模式, 设置为 1.0 mL/min; 载气采用高纯度氦气 (99.999%), 进样口温度设定为 250 °C; 进样方式为不分流进样; 升温程序: 初始温度 35 °C, 保持 2 min, 以 6 °C/min 的速率上升至 100 °C, 以 8 °C/min 的速率升至 140 °C, 再以 12 °C/min 的速率升至 250 °C, 保持 3 min。

1.2.3 质谱条件 电子倍增电压 (EMV) 为 1 435 V; 电子轰击能量为 70 eV; 传输线温度为 280 °C; EI 离子源温度为 280 °C; 四极杆温度为 150 °C, 扫描方式: 全扫描; 质谱扫描范围 m/z: 45~500 amu。

1.3 试验条件的筛选

当萃取温度过高时, 萃取头的萃取量呈现下降的趋势^[17-19], 故选择萃取温度为 30~50 °C; 由于不同样品到达平衡的时间有差异, 若震荡时间太短, 有可能会吸附不完全, 反之, 则可能会导致待测组分发生解吸, 根据反复预试验, 选取震荡时间为 10~30 min; 加样量的多少会直接影响挥发性有机物的含量, 若加样量过少, 会导致待测组分浓度较低, 部分物质无法检测出, 若加样量过多, 会超出仪器检测范围, 影响谱库的匹配结果^[18-19], 经过反复预试验, 选择加样量的范围为 0.50~2.50 g; 解吸附时间会直接影响待测物质的解吸程度, 从而影响到萃取效果, 综合考虑萃取头的性能, 可选择解吸附时间为 5~25 min。

试验选择萃取头 DVB/CAR/PDMS, 分别选取萃取温度、震荡时间、加样量和解吸附时间 4 个单因素进行试验, 以黄连木挥发性有机物的离子色谱总峰面积和挥发性有机物种类来表征不同萃取条件的萃取效果, 总峰面积越大, 挥发性有机物种类越多, 表明顶空固相微萃取效果越好^[20]。选定萃取温度 (30、35、40、45、50 °C), 震荡时间 (10、15、20、25、30 min), 加样量 (0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 g) 和解吸附时间 (5、10、15、20、25 min) 做单因素试验, 初步找到优化萃取条件 (表 1)。

表 1 单因素试验设计

Table 1 Single-factor test design

编号	萃取温度 (A)/°C	震荡时间 (B)/min	加样量 (C)/g	解吸附时间 (D)/min
1	30	10	0.5	5
2	35	15	1.0	10
3	40	20	1.5	15
4	45	25	2.0	20
5	50	30	2.5	25

1.4 响应面法优化黄连木叶片挥发性有机物萃取最佳试验条件

综合考虑各因素对黄连木叶片挥发性有机物萃取条件的影响, 以总峰面积和挥发性有机物的种类作

为响应指标(Y_1 和 Y_2)^[21],选择震荡时间、萃取温度、加样量和解吸附时间4个因素,根据Box-Behnken试验设计原理,以各试验单因素最优取值点为中心,上下区域各取1个水平值作为响应面试验设计水平^[14],通过响应面法确定了最佳的萃取条件^[4],如表2所示。

表2 萃取条件优化响应面试验因素与水平

Table 2 Factor and levels of response surface experiments for extraction condition optimization

因素	水平		
	-1	0	1
萃取温度/°C	35	40	45
震荡时间/min	20	25	30
加样量/g	0.5	1.0	1.5
解吸附时间/min	5	10	15

1.5 数据分析

采用NIST谱库对采集到的质谱图进行检索,根据峰面积归一化法进行定性分析,得到每份挥发物样品中各类化学物质的相对含量^[22]。

计算公式为:

$$\text{相对含量} = \frac{\text{该物质峰面积}}{\text{样品所有气体峰面积之和}} \times 100\%$$

使用Origin 2018进行数据分析处理以及作图,根据软件Design-Expert进行响应面分析,通过检测到的挥发性有机物的总峰面积和挥发性有机物种类与回归方程计算的理论预测值进行比较,验证响应面得到的试验参数是否可靠,得出最终试验结果^[23-25]。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 萃取温度最适条件的确定 将震荡时间25 min,加样量2.00 g,解吸附时间5 min作为固定值,设计萃取温度30、35、40、45和50 °C进行单因素试验,结果如图1所示。随着萃取温度的升高,总峰面积和挥发性有机物的种类均呈现先增后减的趋势。当萃取温度为30 °C时,总峰面积最小,挥发性有机物的种类最少,当萃取温度上升到40 °C时,总峰面积最高,且挥发性有机物的种类最多,而随着温度的逐渐上升,萃取头的吸附能力明显减弱,总峰面积呈现下降的趋势,挥发性有机物的种类也相对减少,因此,综合考虑选择萃取温度为40 °C较为合适。

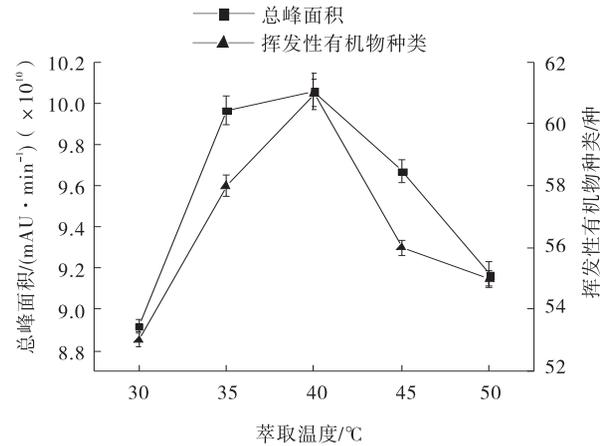


图1 不同萃取温度对黄连木叶片挥发性有机物总峰面积及种类测定的影响

Fig. 1 Effect of different extraction temperatures on the determination of total peak area and species of volatile organic compounds in leaves of *Pistacia chinensis*

2.1.2 震荡时间最适条件的确定 将萃取温度40 °C,加样量2.00 g,解吸附时间5 min作为固定值,设计震荡时间10、15、20、25和30 min进行单因素试验,结果如图2所示。随着震荡时间的不断增加,总峰面积和挥发性有机物种类均呈现“增—减—增—减”的趋势。在震荡时间为25 min时,总峰面积最大,且挥发性有机物种类最多。因此,综合考虑选择震荡时间25 min较为合适。

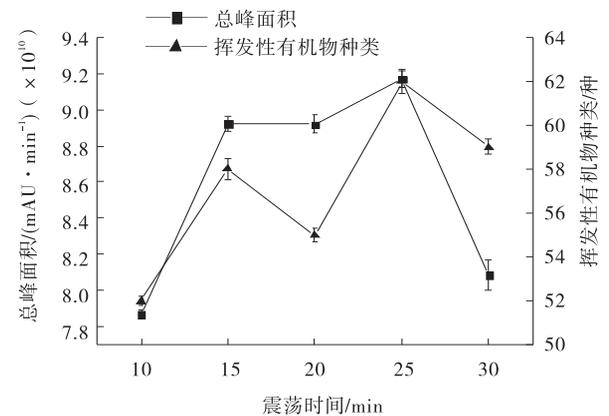


图2 不同震荡时间对黄连木叶片挥发性有机物总峰面积及种类测定的影响

Fig. 2 Effect of different concussion time on the determination of total peak area and species of volatile organic compounds in leaves of *Pistacia chinensis*

2.1.3 加样量最适条件的确定 将震荡时间25 min,萃取温度40 °C,解吸附时间5 min作为固定值,设计加样量0.50、1.00、1.50、2.00和2.50 g进行单因素试验,结果如图3所示。随着加样量的不断增加,总峰面积和挥发性有机物的种类呈现“增—减—增—减”的

趋势。当加样量为1.00 g时,总峰面积达到最大,此时挥发性有机物的种类最多。因此,综合考虑选择加样量为1.00 g较为合适。

2.1.4 解吸附时间最适条件的确定 将震荡时间25 min,萃取温度40 ℃,加样量2.00 g作为固定值,设计解吸附时间5、10、15、20和25 min进行单因素试验,结果如图4所示。随着解吸附时间的不断增加,总峰面积和挥发性有机物的种类均呈现先增后减的趋势。在解吸附时间为10 min时,总峰面积最大,且挥发性有机物的种类最多。因此,综合考虑选择解吸附时间为10 min较为合适。

2.2 响应面试验设计及结果验证

2.2.1 响应面优化试验 根据单因素试验的初筛结

果,以萃取温度、震荡时间、加样量和解吸附时间为自变量,以顶空固相微萃取—气相色谱—质谱联用法得出的总峰面积和挥发物有机物的种类分别作为因变量 Y_1 和 Y_2 ,再用 Design-Expert V8.0.6 软件的 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,设计4因素3水平29个试验点的响应面分析模型,具体方法及结果见表3。

通过对响应面试验数据进行多元回归拟合,得到总峰面积(Y_1)和挥发性有机物种类(Y_2)关于萃取温度(A)、震荡时间(B)、加样量(C)和解吸附时间(D)的二次多元回归方程为:

$$Y_1 = 7.174 \times 10^{10} + 4.283 \times 10^9 A + 3.750 \times 10^9 B - 2.425 \times 10^9 C - 5.833 \times 10^7 D - 5.350 \times$$

表3 Box-Behnken试验设计及结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken experiment

编号	因素与水平				$Y_1/\text{mAU} \cdot \text{min}$	$Y_2/\text{种}$
	A/℃	B/min	C/g	D/min		
1	0	0	0	0	7.24×10^{10}	52
2	0	0	-1	1	7.37×10^{10}	58
3	0	1	1	0	6.04×10^{10}	50
4	0	0	0	0	7.29×10^{10}	52
5	-1	0	-1	0	7.33×10^{10}	52
6	1	0	0	1	7.89×10^{10}	51
7	-1	0	0	-1	6.97×10^{10}	50
8	1	0	0	-1	7.41×10^{10}	59
9	0	1	-1	0	6.86×10^{10}	60
10	0	0	0	0	7.24×10^{10}	58
11	-1	0	0	1	6.89×10^{10}	52
12	-1	0	1	0	5.28×10^{10}	44
13	-1	-1	0	0	5.97×10^{10}	50
14	0	0	1	1	6.26×10^{10}	52
15	0	-1	-1	0	5.58×10^{10}	46
16	0	-1	0	-1	6.28×10^{10}	53
17	0	-1	0	1	7.35×10^{10}	58
18	1	1	0	0	7.62×10^{10}	58
19	0	-1	1	0	6.63×10^{10}	53
20	0	0	0	0	7.55×10^{10}	58
21	1	0	1	0	7.88×10^{10}	59
22	0	0	1	-1	7.05×10^{10}	55
23	0	0	0	0	6.55×10^{10}	54
24	1	-1	0	0	7.84×10^{10}	57
25	0	1	0	1	7.85×10^{10}	57
26	0	1	0	-1	7.89×10^{10}	57
27	0	0	-1	-1	8.08×10^{10}	60
28	1	0	-1	0	6.83×10^{10}	52
29	-1	1	0	0	7.89×10^{10}	58

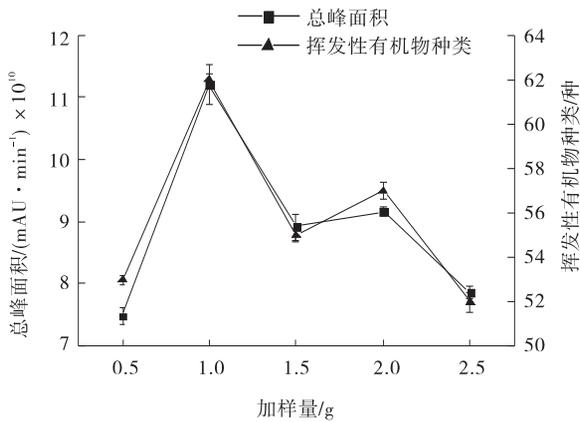


图3 不同加样量对黄连木叶片挥发性有机物总峰面积及种类测定的影响

Fig. 3 Effect of different sample volume on the determination of total peak area and species of volatile organic compounds in leaves of *Pistacia chinensis*

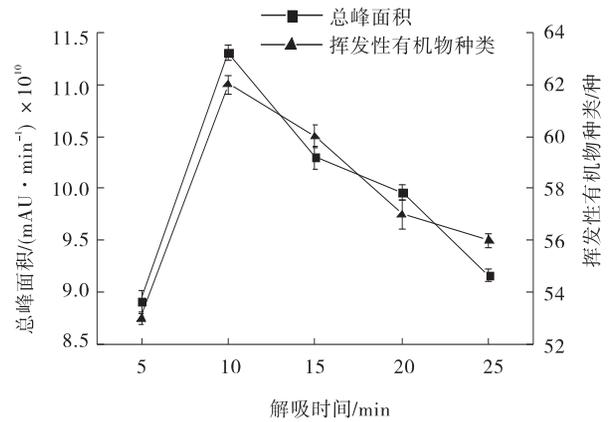


图4 不同解吸时间对黄连木叶片挥发性有机物总峰面积及种类测定的影响

Fig. 4 Effect of different desorption time on the determination of total peak area and species of volatile organic compounds in leaves of *Pistacia chinensis*

$$10^9AB + 7.750 \times 10^9AC + 1.400 \times 10^9AD - 4 - 675 \times 10^9BC - 2.775 \times 10^9BD - 2.000 \times 10^8CD + 9.467 \times 10^8A_2 - 1.553 \times 10^9B_2 - 4.816 \times 10^9C_2 + 2.809 \times 10^9D_2$$

$$Y_2 = 54.80 + 2.50A + 1.92B - 1.25C - 0.50D - 1.75AB + 3.75AC - 2.50AD - 4.25BC - 1.25BD -$$

$$0.25CD - 136A_2 + 0.52B_2 - 1.48C_2 + 1.14D_2$$

其中 A, B, C, D 系数的大小反映了该因素对黄连木叶片挥发性有机物影响的大小和方向。通过总峰面积和挥发性有机物种类的回归方程模型进行方差分析,回归模型方差及结果见表4和表5。

表4 总峰面积回归模型方差及结果

Table 4 Variance and results of total peak area regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1.209×10^{21}	14	8.636×10^{19}	3.58	0.0116	差异显著
A	2.202×10^{20}	1	2.202×10^{20}	9.12	0.0092	差异极显著
B	1.688×10^{20}	1	1.688×10^{20}	6.99	0.0192	差异显著
C	7.057×10^{19}	1	7.057×10^{19}	2.92	0.1093	
D	4.083×10^{16}	1	4.083×10^{16}	1.692×10^{-3}	0.9678	
AB	1.145×10^{20}	1	1.145×10^{20}	4.74	0.0470	
AC	2.403×10^{19}	1	2.403×10^{19}	9.96	0.0070	
AD	7.840×10^{18}	1	7.840×10^{18}	0.32	0.5777	
BC	8.742×10^{19}	1	8.742×10^{19}	3.62	0.0778	
BD	3.080×10^{19}	1	3.080×10^{19}	1.28	0.2775	
CD	1.600×10^{17}	1	1.600×10^{17}	6.630×10^{-3}	0.9363	
A ²	5.813×10^{18}	1	5.813×10^{18}	0.24	0.6312	
B ²	1.565×10^{19}	1	1.565×10^{19}	0.65	0.4341	
C ²	1.504×10^{20}	1	1.504×10^{20}	6.23	0.0256	
D ²	5.119×10^{19}	1	5.119×10^{19}	2.12	0.1673	
残差	3.378×10^{20}	14	2.413×10^{19}			
失拟项	2.825×10^{21}	10	2.825×10^{19}	2.04	0.2560	不显著
纯误项	5.529×10^{19}	4	1.382×10^{19}			
总离项	1.547×10^{21}	28				
R ²	0.7816					

注:差异显著(P<0.05),差异极显著(P<0.01)。

表5 挥发性有机物种类回归模型方差及结果

Table 5 Variance and results of regression model of volatile organic compounds

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	356.66	14	25.48	2.67	0.038 2	差异显著
A	75.00	1	75.00	7.86	0.014 1	差异显著
B	44.08	1	44.08	4.62	0.049 5	差异显著
C	18.75	1	18.75	1.97	0.182 7	
D	3.00	1	3.00	0.31	0.583 8	
AB	12.25	1	12.25	1.28	0.276 2	
AC	56.25	1	56.25	5.90	0.029 2	
AD	25.00	1	25.00	2.62	0.127 8	
BC	75.25	1	72.25	7.57	0.015 6	
BD	6.25	1	6.25	0.66	0.431 8	
CD	0.25	1	0.25	0.026	0.873 7	
A ²	11.97	1	11.97	1.25	0.281 5	
B ²	1.73	1	1.73	0.18	0.676 6	
C ²	14.27	1	14.27	1.50	0.241 5	
D ²	8.45	1	8.45	0.89	0.362 4	
残差	133.55	14	9.54			
失拟项	96.75	10	9.67	1.05	0.525 5	差异不显著
纯误项	36.80	4	9.20			
总离项	490.21	28				
R ²	0.7276					

注:差异显著($P < 0.05$),差异极显著($P < 0.01$)。

从表4中可以看出,该回归方程模型 $P = 0.0116 < 0.05$,说明拟合模型差异显著,失拟项 $P = 0.2560 > 0.05$,差异不显著,说明失拟项检验效果不显著,证实试验误差较小,此模型回归方程具有较好的拟合度和可信度^[26-27]。模型的矫正决定系数 $R^2 = 0.7816$,说明此模型可解释4个因素78.16%的变异性,可用于黄连木叶片挥发性有机物测定的预试验分析。回归模型系数显著性检验结果中可以看出,其中萃取温度(A)和震荡时间(B)差异性显著,其余两项均不显著^[28-29],由此可知,各影响因素对于黄连木叶片萃取条件的影响并不是简单的线性关系,结合F值和P值,萃取温度(A)、震荡时间(B)、加样量(C)、解吸附时间(D)对总峰面积的影响力强弱顺序为:A>B>C>D。

从表5中可以看出,该回归方程模型 $P = 0.0382 < 0.05$,说明拟合模型差异显著,失拟项 $P = 0.5255 > 0.05$,差异不显著,说明失拟项检验效果不显著,证

实试验误差较小,此模型回归方程具有较好的拟合度和可信度^[27]。决定系数 $R^2 = 0.7276$,说明此模型可解释4个因素72.76%的变异性,可用于黄连木叶片挥发性有机物测定的预试验分析。结合F值和P值,萃取温度(A)、震荡时间(B)、加样量(C)、解吸附时间(D)对挥发性有机物种类的影响力强弱顺序为:A>B>C>D。

2.2.2 各因素交互作用分析 通过建立的数学模型分析,在萃取温度(A)、震荡时间(B)、加样量(C)、解吸附时间(D)4个条件中2个条件不变的时候,获得其他2个条件的三维响应面曲线(图5)。通过响应面曲线可直观的看出各因素之间交互作用的显著程度以及变化趋势,当交互作用显著时,等高线呈现椭圆形,响应面曲线越陡峭,当交互作用不显著时,等高线呈现圆形,响应面曲线越平缓^[29]。

图5—图10反映了萃取温度、震荡时间、加样量及解吸附时间两两交互作用对响应值总峰面积和挥发

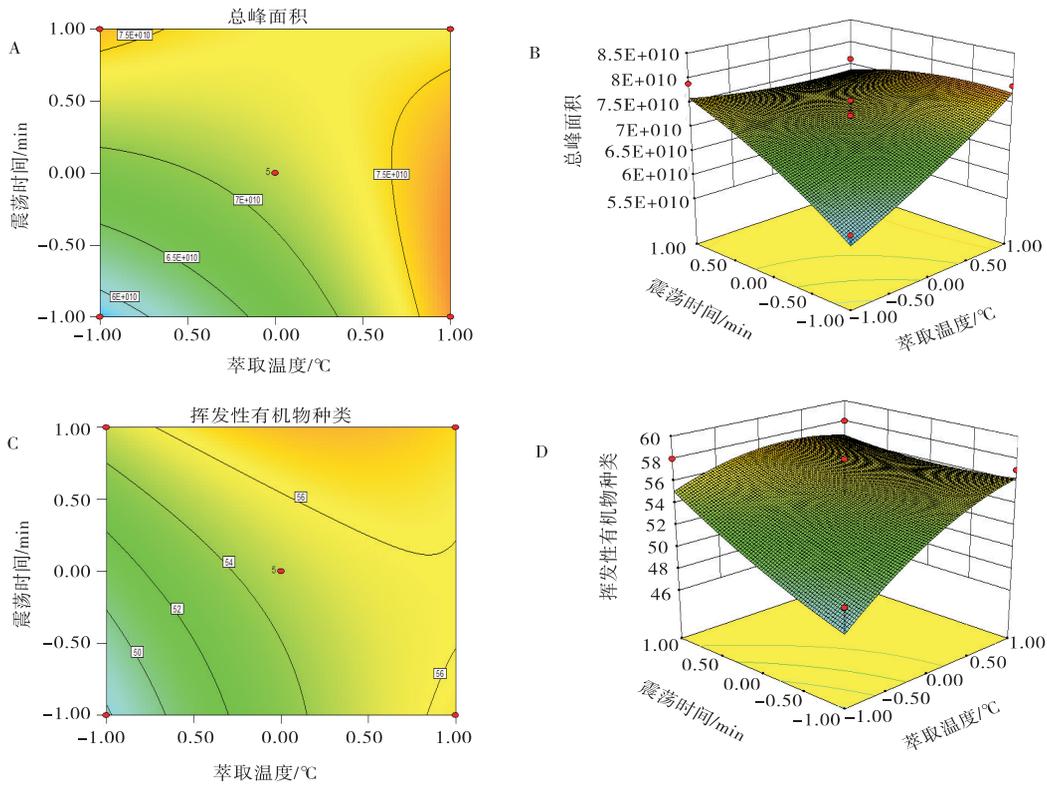


图 5 萃取温度与震荡时间对黄连木叶片总峰面积(A,B)和挥发性有机物种类(C,D)测定影响的等高线图和响应面曲线

Fig. 5 The effects of extraction temperature and coucussion time on the determination of total peak area (A, B) and volatile organic compounds (C, D) in leaves of *Pistacia chinensis*

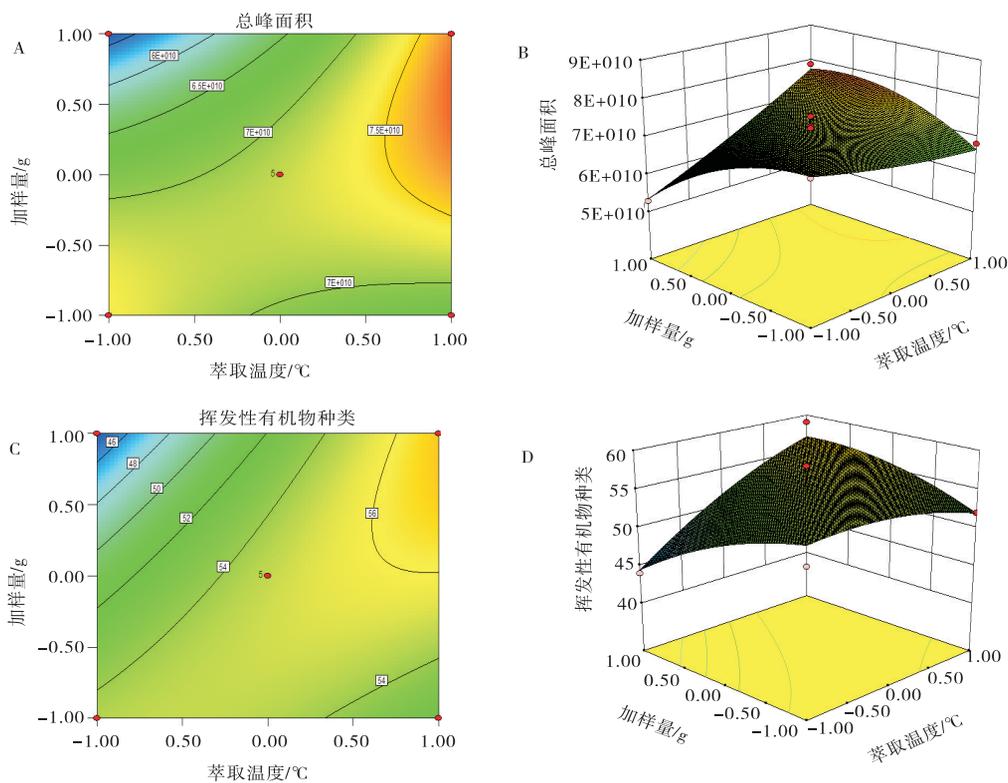


图 6 萃取温度与加样量对黄连木叶片总峰面积(A,B)和挥发性有机物种类(C,D)测定影响的等高线图和响应面曲线

Fig. 6 The effects of extraction temperature and sample volume on the determination of total peak area (A, B) and volatile organic compounds (C, D) in leaves of *Pistacia chinensis*

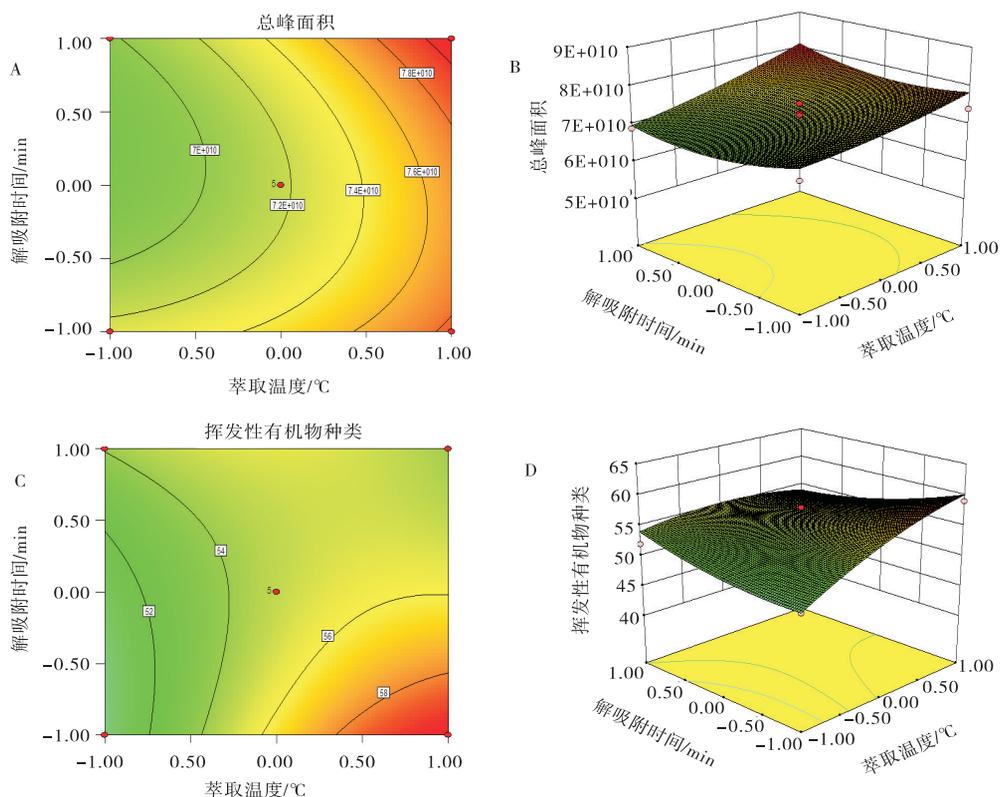


图 7 萃取温度与解吸附时间对黄连木叶片总峰面积(A, B)和挥发性有机物种类(C, D)测定影响的等高线和响应面曲线
 Fig. 7 The effects of extraction temperature and desorption time on the determination of total peak area (A, B) and volatile organic compounds (C, D) in leaves of *Pistacia chinensis*

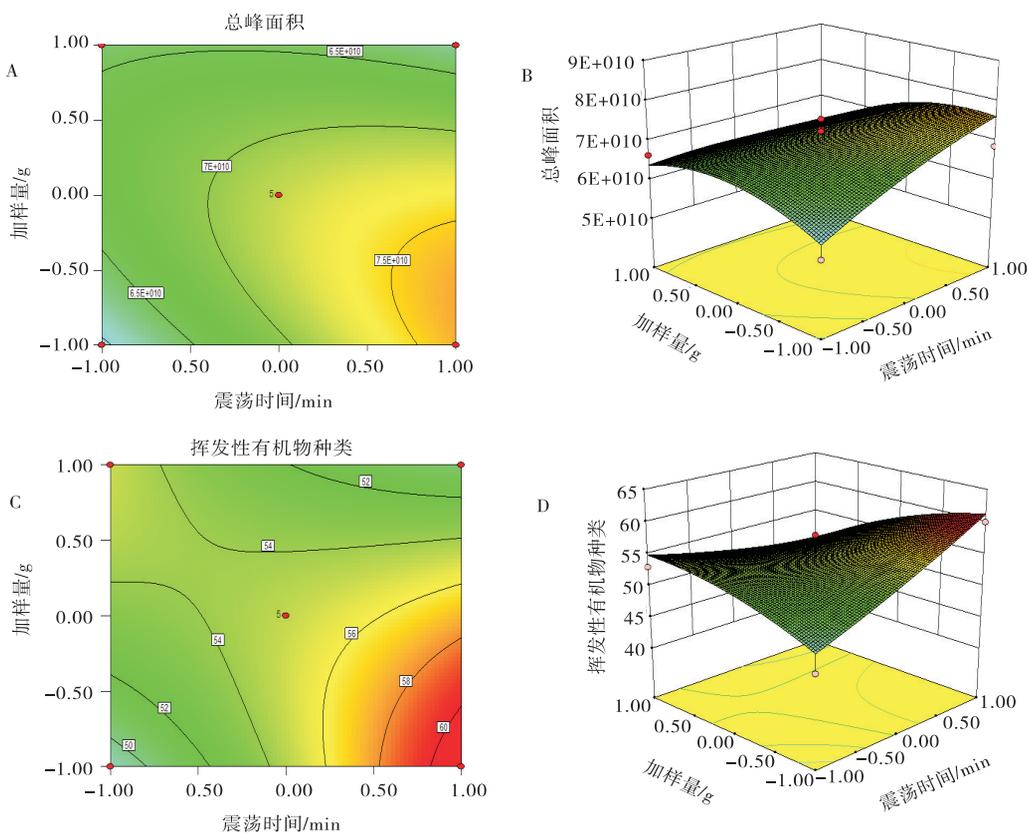


图 8 震荡时间与加样量对黄连木叶片总峰面积(A, B)和挥发性有机物种类(C, D)测定影响的等高线和响应面曲线
 Fig. 8 The effects of coucussion time and sample volume on the determination of total peak area (A, B) and volatile organic compounds (C, D) in leaves of *Pistacia chinensis*

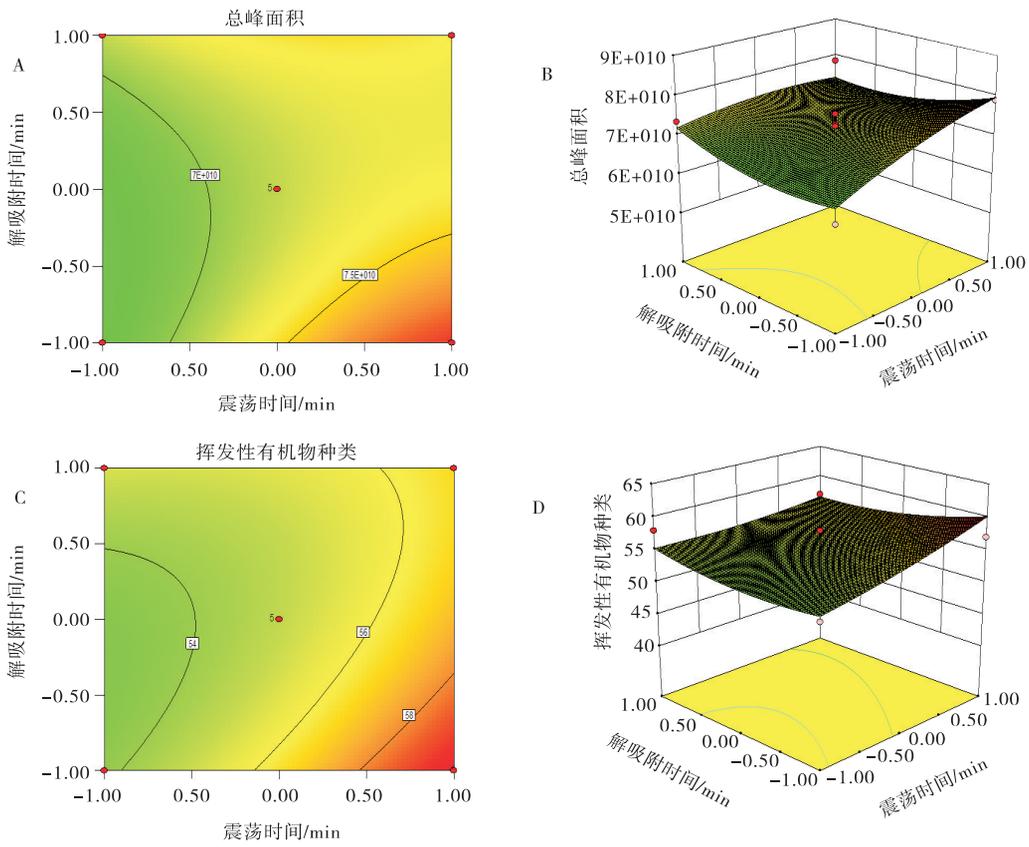


图9 震荡时间与解吸附时间对黄连木叶片总峰面积(A,B)和挥发性有机物种类(C,D)测定影响的等高线图和响应面曲线
 Fig. 9 The effects of coucussion time and desorption time on the determination of total peak area (A, B) and volatile organic compounds(C, D) in leaves of *Pistacia chinensis*

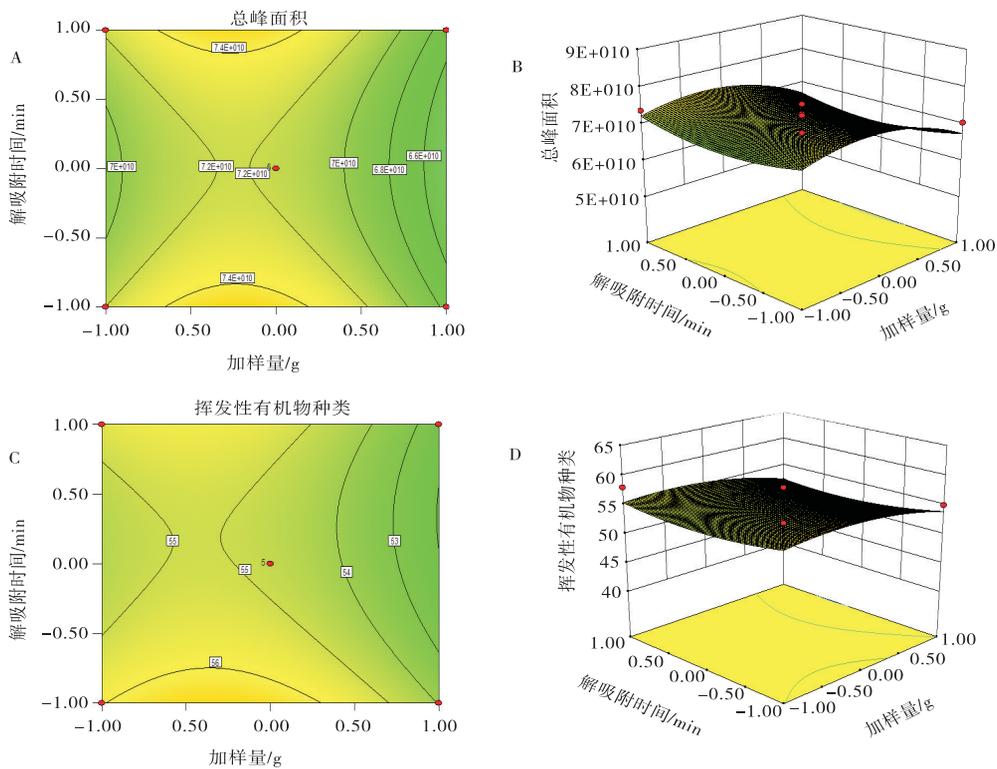


图10 加样量与解吸附时间对黄连木叶片总峰面积(A,B)和挥发性有机物种类(C,D)测定影响的等高线图和响应面曲线
 Fig. 10 The effects of sample volume and desorption time on the determination of total peak area (A, B) and volatile organic compounds(C, D) in leaves of *Pistacia chinensis*

性有机物种类的影响,由图5中可以看出,萃取温度和震荡时间对总峰面积和挥发性有机物种类的影响最大,表现为等高线呈现圆形,响应曲面比较陡峭,这与方差分析的结果一致。由图6(萃取温度和加样量)、图7(萃取温度和解吸附时间)、图8(震荡时间和加样量)、图9(震荡时间和解吸附时间)和图10(加样量和解吸附时间)的响应曲面可看出,对总峰面积和挥发性有机物种类影响最大的因素均是萃取温度,其次是震荡时间,然后是加样量,最后是解吸附时间,这也符合表4和表5中得出的方差分析结果,结合响应面分析图和方差分析表所得出最大响应值 Y_1 和 Y_2 所对应的萃取条件即为最佳的萃取条件。

2.2.3 最佳萃取条件方案确定及模型验证 采用 Design-Expert V8.0.6 软件预测黄连木叶片总峰面积和挥发性有机物种类,对模型进行优化以及考虑实际的操作情况,得出响应面分析优化试验设计的最佳

萃取方案为:吸附时间 30 min,萃取温度 35 ℃,震荡时间 30 min,加样量 0.50 g,解吸附时间 5 min。预测黄连木叶片挥发性有机物提取的总峰面积为 9.28×10^{10} mAU*min,挥发性有机物的种类可达 64 种^[30]。

调整最佳条件为吸附时间 30 min,萃取温度 35 ℃,震荡时间 30 min,加样量 0.50 g,解吸附时间 5 min 进行模型验证。取 3 份黄连木叶片按照上述最优的萃取方法进行萃取,黄连木叶片挥发性有机物的总离子流图如图 11 所示,挥发性有机物种类、相对含量及总峰面积如表 6 所示。根据分析可知,总峰面积为 9.14×10^{10} mAU*min,挥发性有机物的种类可达 63 种:42 种萜烯类化合物、8 种醛类化合物,5 种醇类化合物,3 种烷烃类化合物,2 种酮类化合物,2 种酯类化合物和 1 种炔类化合物。与模型预测值的相对误差为 1.53% 和 1.59%,可能是由于仪器状态造成的,但差异不大,说明该数学模型具有良好的预测性和准确性。

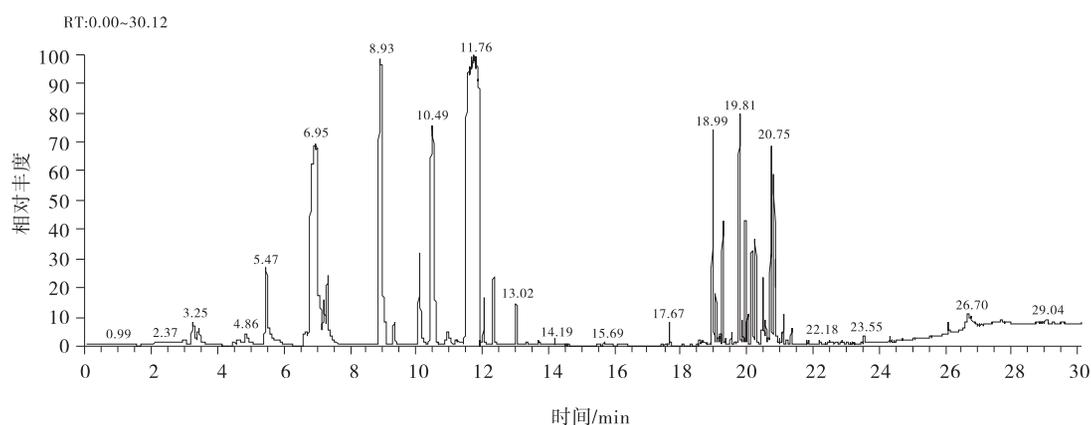


图 11 黄连木叶片挥发性有机物 GC-MS 总离子流图

Fig. 11 GC-MS total ion flow diagram of volatile organic compounds in the leaves of *Pistacia chinensis*

表 6 黄连木叶片挥发性有机物种类、相对含量及峰面积

Table 6 Types, relative contents and peak area of volatile organic compounds in leaves of *Pistacia chinensis*

种类	序号	化合物英文名	化合物名称	相对含量/%	峰面积/mAU*min
	1	β -Lauroylene	β -月桂烯	7.71	7843706542.74
	2	(-)-Limonene	(-)-柠檬烯	3.73	4909054644.37
	3	Isostigmene	异石竹烯	19.24	17793929252.87
	4	β -Schistocene	β -石竹烯	0.16	146645274.10
	5	trans- β -basilene	反式- β -罗勒烯	0.10	98456228.77
	6	3-carene	3-萜烯	21.36	21852155264.21
萜烯类	7	δ -Guaiacolene	δ -愈创木烯	2.96	3894903926.10
	8	1R- α -pinene	1R- α -蒎烯	0.88	1804385573.77
	9	cis- β -basilene	顺式- β -罗勒烯	11.06	10293869736.65
	10	D-limonene	D-柠檬烯	0.35	399905644.37
	11	α -Humulene	α -葎草烯	2.64	2705562237.1
	12	α -Guaiacolene	α -愈创木烯	0.03	296791964.81
	13	Terpinolene	萜品油烯	6.82	5845856403.34

续表 6

种类	序号	化合物英文名	化合物名称	相对含量/%	峰面积/mAU*min
	14	β -Basilene	β -罗勒烯	1.96	2178659736.65
	15	β -Cineole	β -芹子烯	0.01	96542525.55
	16	β -Elmene	β -榄香烯	0.84	1667131285.24
	17	α -Cineole	α -芹子烯	2.51	2695541486.58
	18	β -Pinene	β -蒎烯	0.03	237295307.68
	19	(-)- α -pinene	(-)- α -蒎烯	0.82	1749916423.31
	20	alloparaffinene	别罗勒烯	3.36	4271591234.56
	21	α -Ginsengene	α -人参烯	0.30	324360702.67
	22	γ -pinene	γ -松油烯	0.38	429113248.21
	23	2,2-dimethyl-4-pentene	2,2-二甲基-4-戊烯	0.39	466531447.58
	24	δ -Thujene	δ -杜松烯	0.18	187492931.73
	25	camphene	莰烯	0.04	402055909.29
	26	Boswellinterpene	波斯菊萜	0.34	355753252.58
	27	β -Siderocarpene	β -侧柏烯	0.08	79327174.46
	28	(+)-Bornylene	(+)-莰烯	0.06	598435484.55
	29	(-)- β -pinene	(-)- β -蒎烯	0.35	388956307.68
	30	gamma-cumene	γ -古芸烯	0.09	81263725.86
	31	1-tert-butylpropadiene	1-叔丁基丙二烯	0.09	82027402.14
	32	α -Wickeroilene	α -葎澄茄油烯	0.06	62984811.59
	33	Butyrylene	丁香烯	0.28	255498425.62
	34	Ylang-ylangolene	依兰油烯	0.18	178802249.12
	35	α -Laurethene	α -月桂烯	0.14	127230382.56
	36	Selina-3,7(11)-diene	Selina-3,7(11)-二烯	0.08	76360702.67
	37	exo-7-(trans-1-propenyl)bicyclo [4.2.0]oct-1(2)-ene	exo-7-(反式-1-丙烯基)双环[4.2.0] oct-1(2)-烯	0.10	91430382.56
	38	Juniperine	桉脑	0.01	95054782.45
	39	1,3,5,5-tetramethyl-1,3-cyclohexadi- ene	1,3,5,5-四甲基-1,3-环己二烯	0.05	549806103.46
	40	delta-Celeryne	δ -芹子烯	0.04	428162882.67
	41	1-Bromo-3,7-dimethyl-2,6-octadiene	1-溴-3,7-二甲基-2,6-辛二烯	0.04	364552358.85
	42	Aromaticdiene	芳香二烯	0.02	210233200.17
醛类	43	cis-2-hexenal	顺式-2-己烯醛	7.49	7473318870.23
	44	2-Hexenal	2-己烯醛	0.23	210316598.52
	45	Hexanal	己醛	1.33	1654515858.25
	46	trans-2-Pentenal	反式-2-戊烯醛	0.06	605816882.67
	47	Nonylaldehyde	壬醛	0.06	625821625.73
	48	Decanal	十醛	0.03	235755413.54
	49	trans-2-heptanal	反式-2-庚醛	0.03	258485429.85
	50	β -cyclicitral	β -环柠檬醛	0.01	95144996.60
醇类	51	3-Hexen-1-ol	3-己烯-1-醇	0.01	98060103.46
	52	Bluegumol	蓝桉醇	0.05	572636289.38
	53	cis-veratrol	顺式-马鞭草醇	0.01	95868689.88
	54	cis-3-Hexen-1-ol	顺式-3-己烯-1-醇	0.05	440801203.46
	55	3-Methyl-4-penten-1-ol	3-甲基-4-戊烯-1-醇	0.02	235441787.75
烷烃类	56	2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl- bicyclo[5.2.0]nonane	2-亚甲基-4,8,8-三甲基-4-乙烯基-双 环[5.2.0]壬烷	0.17	63428513.65
	57	Diocetadecane	二十七烷	0.08	73224149.35
	58	Hexadecane	十六烷	0.29	265577980.76
酯类	59	cis-3-Hexenyl-pentanoate	正戊酸顺-3-己烯基酯	0.01	99684133.24
	60	Benzylhydrazinocarboxylate	胍基甲酸苄酯	0.01	98568689.88
酮类	61	1-Penten-3-one	1-戊烯-3-酮	0.16	158489704.10
	62	Piperone	胡椒酮	0.02	214224852.81
炔类	63	1,9-Decadiyne	1,9-癸二炔	0.01	98422653.82

3 讨论

目前,植物挥发性有机物提取的方法较多,试验中常规提取方法多为顶空固相微萃取法,它克服了其他传统方法的不足。例如,溶剂萃取法利用“相似相溶”的原理^[23],需要使用大量的有机溶剂,可能会造成资源的浪费;水蒸气蒸馏法具有一定的局限性,仅能萃取出与水难溶或者是不溶的成分;超临界CO₂萃取法性价比高,但是设备较昂贵且需要在特定条件下才能完成萃取,而顶空固相微萃取法集采样、萃取、浓缩、进样于一体,操作更加简单快捷^[24]。

根据顶空固相微萃取的原理,影响其效果的因素主要有加样量、萃取温度、震荡时间和解吸附时间,且各因素之间存在一定的影响^[25]。李倩等^[16]研究发现,影响花椒香气成分的萃取条件是萃取温度>加样量>萃取时间;张小俊等^[15]研究表明,影响艾叶挥发性成分最关键的因素是萃取温度,其次是萃取时间,最后是样品质量,梁艳琼等^[26]研究发现 *Bacillus subtilis* Czk1 的萃取条件的影响因素是萃取温度>萃取时间>解吸附时间>升温程序,与本研究结果一致,表明优化萃取条件对挥发性有机物的种类和总峰面积具有至关重要的作用。

利用响应面法能精确分析各个因素以及各个因素之间是否存在互作效应^[27]。本试验基于单因素试验分析结合响应面法,选取萃取温度、震荡时间、加样量、解吸附时间4个因素设计 Box-Behnken 试验,探究顶空固相微萃取对黄连木叶片挥发性有机物成分的最佳萃取条件^[28],该方法与传统的正交试验相比,具有试验次数少、回归方程精度高等特点^[29]。本研究采用总离子流图的峰面积与挥发性有机物种类2个指标优化黄连木叶片的萃取条件,相较于单一的使用单个指标具有显著优势^[30]。

植物挥发性有机物的种类有萜烯类、醇类、酯类、烷烃类、醛类和酮类等物质,本研究表明,黄连木叶片释放最多的挥发性物质是萜烯类化合物,与王荣^[31]、余倩等^[32]的研究结果一致,而萜烯类化合物具有很强的生物活性,起到抗虫、吸尘、净化空气的功效。且黄连木的观赏性极强,园林绿化中种植黄连木不仅能够提高植物景观的生态价值,而且可作为天然的空气清洗剂 and 抗菌类药物,具有很高的应用价值。

4 结论

研究表明,影响黄连木叶片挥发性物质释放最大因素是萃取温度,其次是震荡时间,然后是加样量,最后是解吸附时间。综上所述,黄连木叶片的最佳萃取条件为:萃取温度 35 °C、震荡时间 30 min、加样量 0.50 g、解吸附时间 5 min。经验证,此萃取条件简单可行,基于此条件得到的黄连木叶片的挥发性有机物种类有 63 种,萜烯类化合物的相对含量占总挥发性有机物种类的 89.87%,主要特征香气成分有 3-萜烯、异石竹烯和顺式-β-罗勒烯。

参考文献:

- [1] 王祎琛,毛俊俨,陈星京,等. 应用最大熵模型预测黄连木在中国的潜在分布[J]. 东北林业大学学报, 2021, 49(7): 61-65.
- [2] 侯新村,左海涛,牟洪香. 能源植物黄连木在我国的地理分布规律[J]. 生态环境学报, 2010, 19(5): 1160-1164.
- [3] 袁冬梅,杨玲娟,闫世才. 黄连木叶挥发油化学成分研究[J]. 西北植物学报, 2005(12): 2539-2542.
- [4] 王志辉,张树宇,陆思华,等. 北京地区植物 VOCs 排放速率的测定[J]. 环境科学, 2003(2): 7-12.
- [5] Aati H Y, Perveen S, Aati S, et al. Headspace solid-phase microextraction method for extracting volatile constituents from the different parts of Saudi *Anethum graveolens* L. and their antimicrobial activity[J]. Heliyon, 2022, 8(3): 1025-1033.
- [6] 张欣达,王翠翠,姚凯,等. 固相微萃取装置形式的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(3): 55-58+62.
- [7] Rouhollah K, Ramin M, Mojtab A, et al. Comparison Between Head-Space SPME and Hydrodistillation-GC-MS of the Volatiles of *Thymus daenensis*[J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2015, 18(4): 925-930.
- [8] Limmer M A, Burken J G. Phytoscreening with SPME: Variability Analysis[J]. International journal of phytoremediation, 2015, 17(11): 1115-1122.
- [9] 吴英详,叶征美,王文婷,等. 顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱技术分析千层金叶片的挥发性成分[J]. 中国农学通报, 2020, 36(2): 53-63.
- [10] 李俊星,钟玉娟,罗剑宁,等. 基于顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱技术分析香芋南瓜叶片的香气物质成分及特征[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2019, 45(2): 175-180.

- [11] 易紫容,张睿胤,王佳玲,等. 顶空固相微萃取—气质联用法测定白术不同部位挥发性成分[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(10):1690—1698.
- [12] 王安祥,沈伟,蒋炜. 顶空固相微萃取—气相色谱—质谱测定空气芳香剂中的挥发性成分[J]. 河南预防医学杂志,2022,33(6):425—430.
- [13] 蔡恩博,张崇禧,朱启光,等. 星点设计—效应面法优选暴马丁香树皮中紫丁香苷的提取工艺[J]. 药物分析杂志,2011,31(9):1808—1811.
- [14] 栾庆祥,赵杨,周欣,等. 单因素试验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺[J]. 药物分析杂志,2013,33(5):859—865.
- [15] 张小俊,赵志鸿,张壮丽,等. HS—SPME—GC—MS测定艾叶挥发性成分方法优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):66—71.
- [16] 李倩,蒲彪. 响应面法优化花椒香气成分的HS—SPME萃取条件的研究[J]. 食品工业科技,2012,33(2):334—337+341.
- [17] 陈焱芳,张雁,邓媛元,等. 挤压膨化糙米香气物质的顶空固相微萃取条件优化[J]. 食品研究与开发,2020,41(12):117—125.
- [18] 尤梦晨,杨平,宋焕禄,等. 固相微萃取法优化沙琪玛气味物质的萃取条件[J]. 中国食品学报,2019,19(7):119—127.
- [19] 毕淑峰,程雪翔,陈静雯,等. 顶空—固相微萃取—气相色谱—质谱联用分析黄山野菊花的挥发性成分[J]. 北京联合大学学报(自然科学版),2016,30(2):88—92.
- [20] 刘凤辰,田娜,程小琴. 油松植物挥发性有机物释放动态及其抑菌作用[J]. 北京林业大学学报,2022,44(9):72—82.
- [21] 白泽珍,杨美红,赵祥. 2种方法收集3种豆科植物挥发物的成分分析[J]. 草原与草坪,2021,41(2):84—91.
- [22] 林榕燕,钟淮钦,黄敏玲,等. 晚香玉花香成分时空动态变化的研究[J]. 核农学报,2017,31(12):2434—2442.
- [23] 李品月,张威明,陶俊,等. 应用响应面法优化芍药花瓣多酚超声提取工艺[J]. 北方园艺,2022(23):112—119.
- [24] Lord H, Pawliszyn J. Evolution of solid—phase microextraction technology [J]. Journal of Chromatography A, 2000,885(1—2):153—193.
- [25] 彭帮柱,岳田利,袁亚宏. 固相微萃取技术及其在酒类风味成分分析上的应用[J]. 食品科学,2006(8):266—270.
- [26] 梁艳琼,李锐,吴伟怀,等. 基于HS—SPME—GC—MS的Bacillus subtilis Czk1挥发性物质的萃取条件优化[J]. 中国农学通报,2021,37(11):24—31.
- [27] 罗学平,李丽霞,练学燕,等. 响应面法优化顶空固相微萃取条件结合气相色谱—质谱法测定四川红茶挥发性成分[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(16):6472—6479.
- [28] 刘飞,夏振远,杨跃华,等. 响应面法优化烟草节杆菌K9培养基[J]. 西南农业学报,2013,26(2):617—622.
- [29] 陶晓倩,张强,付慧敏,等. 基于Box—Behnken响应面法优化紫苏叶挥发油提取工艺的研究[J]. 中南药学,2023,21(2):369—374.
- [30] 黄子彧,刘昭伟,周毅,等. 响应面法分析烟草花药胚状体诱导的最佳条件[J]. 湖南农业科学,2020(12):5—9.
- [31] 王荣,胡静静,王超,等. 黄连木叶片挥发性物质动态变化分析[J]. 林业科学,2015,51(1):150—156.
- [32] 余倩,宋双红,李翠芹. SPME—GC—MS结合保留指数分析黄连木挥发性成分[J]. 中药材,2014,37(11):2022—2025.

Optimization of extraction conditions of *Pistacia chinensis* leaves by response surface method

WANG Ya-ying¹, ZHANG Jin², MA Zi-han², YANG Lu-lu², YANG Xiu-yun^{2*}

(1. Shanxi Forestry Vocational Technical College, Taiyuan 030002, China; 2. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taiyu 030801, China)

Abstract: 【Objective】 To determine the optimal extraction conditions of volatile organic compounds (VOCs) from leaves of *Pistacia chinensis*. 【Method】 Based on single factor and Box—Behnken design principles, a response

surface analysis model of 29 test sites, including four factors and three levels, was designed to optimize the extraction temperature, concussion time, sample volume and desorption time of headspace solid phase microextraction. The species, relative content and total peak area of volatile organic compounds (VOCs) were determined by SPME—GC—MS. 【Results】 The optimal conditions for the extraction of volatile organic compounds from the leaves of *P. chinensis* were as follows: The extraction temperature was 35 °C; the concussion time was 30 min; the sample volume was 0.50 g; and the desorption time was 5 min. Under the optimal conditions combined with GC—MS analysis, 63 components were observed in the leaves of *P. chinensis*. The relative contents of terpenes, aldehydes, alkanes, ketones, alcohols, esters and acetylenes were 89.87%, 9.24%, 0.54%, 0.18%, 0.14%, 0.02% and 0.01%, respectively. 【Conclusion】 The headspace solid phase microextraction conditions optimized using combined single factor test and response surface method were suitable for the rapid determination of volatile compounds in the leaves of *P. chinensis*, and terpenes were the main volatile compounds.

Key words: *Pistacia chinensis*; HS—SPME; GC—MS; response surface analysis

(责任编辑 康宇坤)