

响应面法在仪器分析实验教学中的应用 ——以响应面法优化 HPLC 测定饮料苯甲酸的条件为例

加列西·马那甫, 贾娜尔·吐尔逊, 万越, 马福东*

新疆农业大学化学工程学院, 乌鲁木齐 830052

摘要: 仪器分析课程是理论与实验相结合的专业基础课之一。为提高学生的科研创新能力, 以“响应面法优化 HPLC 测定饮料中苯甲酸的条件”实验为例, 从仪器分析实验课程现状出发, 研究了响应面分析法所用数据处理软件在实验教学中的应用, 让学生了解并熟练响应面法的实验设计及软件, 并直接应用于实验教学中。

关键词: 响应面; 仪器分析; 实验教学

中图分类号: G64; O6

Application of Response Surface Method in the Teaching of Instrumental Analysis Experiment: Taking the Optimization of HPLC Conditions for Determination of Benzoic Acid in Beverages as an Example

Jialiexi·Manafu, Janaer·Tuerxun, Yue Wan, Fudong Ma *

School of Chemical Engineering, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China.

Abstract: The instrumental analysis course is one of the professional basic courses that combine theory and experiment. In order to improve students' scientific research and innovation ability, "the application of response surface method to the optimization of HPLC conditions for determination of benzoic acid in beverages" is taken as an example. Based on the current situation of the experimental course of "instrumental analysis", the data processing software used in response surface analysis is studied in experimental teaching and helps students understand and be proficient in the experimental design and software of response surface methodology.

Key Words: Response surface; Instrumental analysis; Experimental teaching

1 选择背景

仪器分析实验课程是理论课程的重要组成部分, 为学生提供研究思路和分析方法。课程所用的仪器涉及多种学科和分析方法; 教学难度较大, 教师花很多时间讲解, 学生却仍一头雾水, 易产生畏难情绪, 学习积极性不高。解决上述问题的有效途径是丰富和改进教学方式方法, 让学生参与创新性实验设计, 充分发挥学生的实验自主性, 培养学生发现问题、分析问题和解决问题的能力^[1-4]。响应面分析法是统计和数学方法的结合, 可采用多元二次回归方程对受多个变量影响的问题进行建模和分析, 优化各试验因素水平的响应值; 主要包括试验设计、响应面拟合及优化计算等步骤。而

收稿: 2020-11-17; 录用: 2021-01-13; 网络发表: 2021-01-26

*通讯作者, E-mail: xjaumafud@163.com

基金资助: 国家自然科学基金(21564015); 新疆农业大学校级教科研项目(2020HSCC27)

将响应面法应用到仪器分析实验课程具有一定的难度和挑战性。在仪器分析实验教学中采用响应面分析法进行试验设计, 可以培养学生的自学、科研能力^[5,6]。下面以响应面法优化HPLC测定饮料苯甲酸的条件实验为例, 将响应面法应用于仪器分析实验教学中^[7-9]。

2 教学方法与内容的改进

实验教学内容的设计既要满足教学大纲要求, 又要有基本操作和技能训练; 同时必须不断更新内容, 与学科发展相结合。因此, 实验内容要综合考虑各方面的因素。

2.1 教学方法的改进

传统的实验教学方法是, 教师做实验前期工作, 学生不参与实验准备工作, 处于被动学习地位, 对过程一无所知。因此, 通过让学生参与到实验的前期准备工作中, 激发学生学习的主动性, 同时培养学生独立思考创新的能力。在课程的讲授过程中, 教师不是按部就班的教学, 而是让学生参加实验的前期准备工作。激发学生的求知欲望, 开展自由讨论, 最后教师进行归纳总结。在整个过程中师生共同实验, 通过及时纠正操作上的错误来达到实验操作规范化的要求。实验结束后学生写实验报告, 并由实验教师进行评阅、打分。

2.2 实验内容的改进

将响应面法应用于仪器分析实验教学, 选取“响应面法优化HPLC测定饮料苯甲酸的条件”实验, 首先进行两水平的Plackett-Burman设计方法, Plackett-Burman设计(以下简称P-B设计)是一种经济而有效的实验方法, 可以用较少的实验达到分析各因素主效应的效果; 可以快速地从众多因素中筛选出对实验条件有显著影响的因素, 从而达到筛选的目的, 避免在优化实验中由于部分因素不显著而浪费实验资源。针对影响因素, 可用单因素实验结果来选择, 并进行放大实验, 以验证优化条件的合理, 得到最后的响应值。对于响应面法优化HPLC测定饮料苯甲酸的条件实验, 选取的主要因素有超声时间(A)、氨水浓度(B)和pH值(C)为自变量。根据Plackett-Burman试验筛选出的显著因子效应的大小设计它们的变化方向和步长, 取各因素的中点作为最陡爬坡实验的中心点, 以垂直于拟和曲面等高线的直线方向为实验值变化的梯度方向。根据最陡爬坡试验得到的中心点, 利用Design-Experts软件对确定的影响因素进行中心复合设计, 对试验数据进行最小二乘二次回归, 得到带交互项和平方项的二次方程, 通过方差分析各因素的主效应和交互效应, 在一定范围求出最优条件。该方法的目的是利用数学模型描述因素与响应值的关系, 在此基础上, 确定其最佳条件。该方法能在设计合理的有限次数实验下, 评价各因素对响应值以及各个因素之间的交互作用, 最后求得其最优优化条件^[10]。

3 响应面法实验设计与分析实例

综合单因素实验结果, 根据Box-Behnken实验设计原理, 采用响应面法, 在三因素三水平上对饮料中苯甲酸的测定条件进行优化研究。

3.1 实验步骤

3.1.1 标准曲线的配制

加水稀释成0、20、40、60、80和100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的苯甲酸标准系列溶液, 过滤。按色谱条件, 进样测定。

以苯甲酸峰面积A为纵坐标, 苯甲酸质量浓度C为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $y = 0.7 \times 10^4 x + 131634$, 线性相关系数为 $R = 0.9988$ 。

3.1.2 样品前处理

精取饮料样品10.00 mL, 超声一定时间除去 CO_2 , 用氨水调节pH约为7, 加水定容至100.0 mL, 滤膜过滤, 待测。

3.2 响应面法优化饮料中苯甲酸的提取率

3.2.1 试验安排与结果

根据单因素试验结果、以超声时间(*A*)、氨水浓度(*B*)、pH值(*C*)为自变量,苯甲酸提取率(*Y*)为响应值,设计3因素3水平的响应面分析试验。响应面因素水平编码见表1;响应面分析试验结果见表2。

表1 Box-Behnken试验因素和水平

因素	水平		
	-1	0	1
<i>A</i> /min	5	10	15
<i>B</i> %	10	12.5	15
<i>C</i>	6	7	8

表2 响应面试验设计及数据处理

试验号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>Y</i> /(mg·kg ⁻¹)
1	-1	0	-1	135
2	0	-1	1	138
3	0	0	0	140
4	-1	-1	0	135
5	1	0	1	138
6	1	1	0	130
7	0	0	0	140
8	1	0	-1	136
9	1	-1	0	135
10	0	0	0	140
11	-1	0	1	138
12	0	1	1	137
13	0	-1	-1	136
14	0	0	0	140
15	-1	1	0	137
16	0	1	-1	135
17	0	0	0	140

3.2.2 模型方程的建立与方差分析

应用SAS软件对表2中的数据进行二次多元回归拟合,得到超声时间、氨水浓度、pH值与饮料苯甲酸提取率之间的二次多项回归方程:

$$y = 5.25 + 4.15A + 13.15B + 8.625C - 0.14AB - 0.05AC - 0.0014477 - 0.14BC - 0.11A^2 - 0.48B^2 - 0.5C^2$$

根据表3中的*P*值可以评判模型中各项对响应值影响的显著程度,即*P* < 0.01表示“高度显著”,0.01 < *P* < 0.05表示“显著”,*P* > 0.05表示“不显著”。模型项*P* < 0.01说明*y*与*x*₁回归方程的关系是极显著的,该模型可用。失拟项越小越好,对应的*P*值越大越好,如果*P* > 0.05,说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小,说明*y*与*x*回归方程的关系是好的,否则可能是有的因素没有考虑到。

表3 方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	106.69	9	11.85	10.06	0.0030	**
A	4.50	1	4.50	3.82	0.0916	
B	3.12	1	3.12	2.65	0.1475	
C	10.13	1	10.13	8.59	0.022	*
AB	12.25	1	12.25	10.39	0.0146	*
AC	0.25	1	0.25	0.21	0.6591	
BC	1.421×10^{-14}	1	1.421×10^{-14}	1.206×10^{-14}	1.0000	
A ²	31.84	1	31.84	27.02	0.0013	**
B ²	37.89	1	37.89	32.15	0.0008	***
C ²	1.05	1	1.05	0.89	0.3761	
残差	8.25	7	1.18			
失拟项	8.25	3	2.75	1.47	0.2504	
纯误差	0.000	4	0.000			

$$R^2 = 0.9282$$

* $P < 0.05$ 为显著, ** $P < 0.01$ 为极显著, *** $P < 0.001$ 差异极显著

3.2.3 响应曲面分析

应用Design-Expert软件进行进一步优化; 根据回归模型作出相应的响应曲面图和等高线图, 考查拟合响应曲面的形状, 分析各因素对饮料中苯甲酸提取率的影响, 结果见图1。

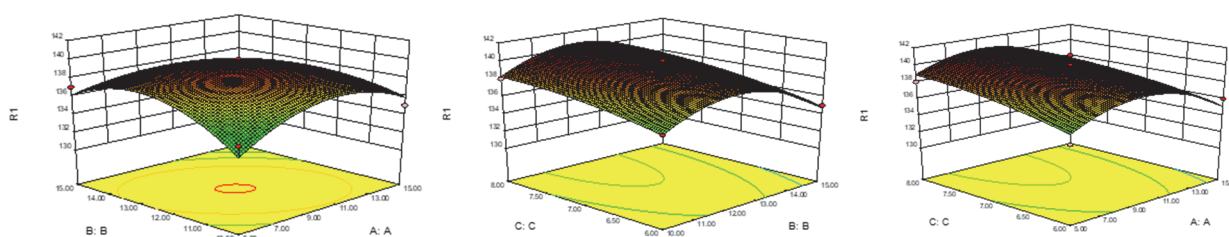


图1 各因素交互作用的响应面和等高线图

图1为所得的优化响应曲面图, 反映了三因素中任意两因素的交互作用对苯甲酸提取率的影响。图形曲面呈现为陡峭则表明该因素对提取率影响显著, 响应值比较敏感; 曲面呈现为平缓则表明该因素对提取率影响不显著, 响应值不敏感。等高线的形状则反映任意两因素的交互作用的强弱, 椭圆形表明两因素交互作用强, 对提取率的影响较显著, 圆形表明两因素交互作用弱, 对提取率的影响不显著。

3.2.4 参数优化

通过软件分析, 响应面法优化饮料中苯甲酸的最佳条件为超声时间10.0 min、氨水浓度12.5%、pH为7.0。在此条件下, 苯甲酸的提取率为140 mg·kg⁻¹。

4 结语

4.1 激发学生兴趣

学生根据兴趣和理解程度巩固和消化所学知识, 缩减了教师课程上枯燥说教的时间, 又培养了学生的自学能力、学习兴趣。此外将响应面法应用于仪器分析实验教学中, 学生根据设计题目将整

个实验内容更清晰直观地展示出来,通过对实验结果进行科学分析,培养了学生的独立思维能力和基本科研素质。

4.2 提高学生的动手能力

采用响应面法设计实验,学生必须通过多次实验才能得到实验结果。允许学生在课余时间进入实验室,通过前期实验掌握实验技术,缓解大型分析测试仪器不足的矛盾。整个实验过程是一种探究过程,重在科研能力的训练和创新思维的培养。实验教学中将开放式实验教学和科技训练相结合,形式灵活,不受课时限制,是值得大力推广的新教学手段。

4.3 培养学生的团队精神

应用Design-Experts软件进行实验设计以拓展实验形式开展,分组做不同题目;构建新的实验内容体系,避免了传统实验教学的内容单一、重复、无创新性的弊端。同时,响应面法利用实验数据建立数学模型来解决受多因素影响的最优组合问题,可以在更广泛的范围内考虑因素组合、预测响应值。响应面法优势明显,如试验次数少,精度高,适合于多因素、多水平试验。另一方面,学生作为主角,充分参与前期准备工作,能弥补传统实验教学不足,培养学生的实验设计能力、应用软件能力、科研能力等。

4.4 促进教师自身素质的提高

仪器分析实验课程采用响应面法进行实验设计,指导教师不仅需要具备系统的理论知识和熟练的操作技能,还必须结合学科发展前沿提出新的实验选题,指导学生分析和解决实验中出现的新问题,以创新思维影响和培养学生。这也是一种加强教学科研相结合、促进教师队伍整体素质提高的新途径。软件应用与实验教学的结合,使实验课程更接近科学研究,提高学生的学习积极性,促进教学相长,实现教改目的。实验课程对学生的综合能力要求较高,为学生的毕业论文实验和今后的生产实践打下良好的理论基础^[11]。

参 考 文 献

- [1] 程玲,李俊凯. 长江大学学报, 2010, 7 (2), 102.
- [2] 沈玥,张永忠. 东北农业大学学报, 2011, 9 (1), 119.
- [3] 张玉芬,韩娜仁花. 内蒙古民族大学学报, 2012, 18 (2), 143.
- [4] 李丽. 西北民族大学学报, 2010, 31 (77), 84.
- [5] 张润楚,郑海涛,兰燕. 试验设计与分析及参数优化. 北京: 中国统计出版社, 2003.
- [6] 卢泽湘,范立维,廖益强. 福建农林大学学报, 2010, 13 (5), 106.
- [7] 廖鹏. 浙江化工, 2018, 49 (1), 44.
- [8] 薛林科. 云南化工, 2019, 46 (5), 75.
- [9] 曹利雅,曹文博. 化工技术与开发, 2019, 48 (9), 43.
- [10] 徐向宏,何明珠. 实验设计与Design-Expert、SPSS应用. 北京: 科学出版社, 2010.
- [11] 马少妹,袁爱群,白丽娟. 高校实验室工作研究, 2004, 82 (4), 21.