DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260320003
引用格式: 王磊, 高天宇, 胡朋, 等. 微生物法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸的超声提取条件优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(12): 271–278.
WANG L, GAO TY, HU P, *et al*. Optimization of ultrasound-assisted extraction for folic acid in infant formula by microbiological method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(12): 271–278. (in Chinese with English abstract).

微生物法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸的超声提取条件优化

王 磊[1], 高天宇[1], 胡 朋[1], 吴艳辉[1], 吴文章[1], 王 靖[1], 何艳玲[1,2*]
(1. 北京陆桥技术股份有限公司, 北京 100123; 2. 中国质量检验检测科学研究院, 北京 100176)

摘 要: 目的 通过响应面法优化微生物法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸的超声提取条件。**方法** 以超声温度、超声时间、样品中叶酸含量和提取液 pH 为研究对象, 通过 Plackett-Burman 试验、最陡上升路径法和 Box-Benhnken 试验进行响应面分析。**结果** 经响应面法优化后, 对超声提取影响最显著的 3 个因素及最佳提取条件为: 超声温度 32 ℃、超声时间 135 min、样品中叶酸含量 657 ng。在此条件下, 验证试验测得样品中叶酸含量均值为 148.12 μg/100 g, 标准差为 1.39 μg/100 g, 与预测值和样品特性值基本一致。对市售 17 个样品分别用最佳提取条件和国标提取条件测定, 最佳提取条件测定结果平均提高 13.7%。**结论** 优化后条件显著提升了微生物法检测叶酸的准确性和实验室间一致性, 有效消除了国标法的系统误差, 为保障婴幼儿配方乳粉营养标签的真实性提供了可靠的技术依据。

关键词: 叶酸; 响应面法; 微生物法; 超声提取法

Optimization of ultrasound-assisted extraction for folic acid in infant formula milk powder by microbiological method

WANG Lei[1], GAO Tian-Yu[1], HU Peng[1], WU Yan-Hui[1], WU Wen-Zhang[1], WANG Jing[1], HE Yan-Ling[1,2*]
(1. *Beijing Landbridge Technology Co*., *Ltd*., *Beijing* 100123, *China*; 2. *Chinese Academy of Quality and Inspection & Testing*, *Beijing* 100176, *China*)

ABSTRACT: Objective To optimize the ultrasound-assisted extraction conditions for folic acid in infant formula via the microbiological method using response surface methodology. **Methods** Taking ultrasonic temperature, ultrasonic duration, folic acid content in the sample, and pH of the extraction solvent as research objects, response surface analysis was conducted through Plackett-Burman design, the steepest ascent path method, and Box-Behnken design. **Results** The 3 most significant factors influencing ultrasonic extraction and the optimal extraction conditions were: Ultrasonic temperature of 32 ℃, extraction time of 135 min, and sample folic acid content of 657 ng. Under these conditions, validation tests yielded a mean folic acid content of 148.12 μg/100 g with a

收稿日期: 2026-03-20
第一作者: 王磊(1983—), 男, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。E-mail: football17@126.com
***通信作者:** 何艳玲(1976—), 女, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物检测技术。E-mail: hyl_lb@163.com

standard deviation of 1.39 μg/100 g, aligning closely with predicted values and sample specifications. The 17 commercially available samples were analyzed using both optimal and national standard extraction conditions. The results demonstrated an average improvement of 13.7% with the optimal extraction protocol compared to the national standard method. **Conclusion** Under the optimized conditions, the accuracy and inter-laboratory consistency of folic acid determination by the microbiological method are significantly improved, effectively eliminating the systematic errors associate with the national standard method. This provides a reliable technical basis for ensuring the authenticity of nutrition labeling in infant formula.

KEY WORDS: folic acid; response surface methodology; microbiological method; ultrasound-assisted extraction

0 引 言

叶酸又称维生素 B_9, 是人体必需的水溶性 B 族维生素之一。其主要生物学功能是作为甲基供体参与细胞内的甲基化反应和脱氧核糖核酸的合成[1−3]。因此, 叶酸在 DNA 合成、细胞分裂、氨基酸代谢及红细胞生成等生理过程中发挥着关键作用[4−5]。婴幼儿时期是生长发育最为迅速的阶段, 叶酸的充足摄入对神经系统发育、免疫功能建立及认知能力发展至关重要[6−8]。若过量摄入会掩盖维生素 B_{12} 缺乏, 可能导致不可逆的神经损伤以及精神运动发育迟缓, 也可能增加肥胖和哮喘风险[9−12]。婴幼儿无法通过多样化的膳食获取足够叶酸, 婴幼儿配方乳粉成为其重要的营养来源, 其叶酸含量的准确性直接影响到婴幼儿的营养健康状况[13−15]。目前测定婴幼儿配方乳粉叶酸含量的标准为 GB 5009.211—2022《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》, 测定方法为微生物检测法, 包括超声提取法处理样品, 以鼠李糖乳杆菌接种培养, 紫外光谱法测定培养液吸光度或透光率进行检测[16−19]。超声提取是此方法中最重要的步骤之一, 提取效率直接影响测定准确性。但 GB 5009.211—2022 中对超声提取条件的设定较为宽泛, 既影响叶酸检测的准确性, 又导致不同实验室之间的检测结果存在较大差异。

本研究将响应面法应用于叶酸超声提取步骤的优化, 重点研究了超声过程中超声温度、超声时间、样品中叶酸含量和提取液 pH 对于超声提取效率的影响[20−25]。为准确衡量各试验因素的影响, 本研究选用婴幼儿配方乳粉制作的叶酸定量分析质控样为试验样品, 通过 Plackett-Burman 试验、最陡上升路径法和 Box-Benhnken 试验进行因子筛选和响应面分析, 以优化出最佳超声提取条件[26−31]。从而保证叶酸测定的准确性, 提升实验室间检测结果的一致性, 为验证婴幼儿配方乳粉营养标签的真实性提供数据支撑, 进而维护婴幼儿身体健康。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

婴幼儿配方乳粉中叶酸定量分析质控样(特性值 149.5 μg/100 g, 中国质量检验检测科学研究院测试评价中心); 叶酸标准品(纯度≥97.0%, 德国 Supelco 公司); 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) ATCC7469(美国典型菌种保藏中心); 叶酸测定培养基、菌种储备用琼脂培养基(北京陆桥技术股份有限公司); 无水乙醇、氢氧化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

UH5300 紫外-可见分光光度计[日立高新技术(上海)国际贸易有限公司]; GI54TR 高压灭菌锅[致微(厦门)仪器有限公司]; XP205 电子天平(精度 0.1 mg)、S220-K 台式 pH 离子计[梅特勒-托利多科技(中国)有限公司]; CLC-B2V-M/CLC404-TV 培养箱(德国 MMM 集团); SG604-INT 生物安全柜(美国 Baker 公司); KQ-250E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品处理

称量 0.1~2.0 g 样品, 精确至 0.001 g, 转入锥形瓶中, 加入 80 mL 氢氧化钠-乙醇溶液[0.4 g 氢氧化钠用 20%乙醇溶液(*V*:*V*)定容至 1 L], 超声振荡 0.5~4.0 h 至试样完全溶解或分散, 转入 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。再根据样品预估含量取一定量试样提取液转入 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。使试样稀释液中叶酸含量在 0.2~0.3 ng/mL 范围内。

1.3.2 菌种及接种液的制备

按照 GB 5009.211—2022 制备储备菌种和接种液。

1.3.3 标准溶液叶酸的制备

按照 GB 5009.211—2022 配制叶酸标准储备液(20 μg/mL)、叶酸标准中间液(0.2 μg/mL)和叶酸标准工作液(0.2 ng/mL)。

1.3.4 标准系列管的制作

取试管分别加入叶酸标准工作液 0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、4.00 和 5.00 mL, 补水至 5.00 mL, 相当于标准系列管中叶酸含量为 0、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80 和 1.00 ng, 混匀。制备 3 套标准系列管。

1.3.5 试样系列管的制作

取 3 支试管, 分别加入 1.0、2.0、3.0 mL 试样稀释液,

补水至 5.0 mL, 混匀。

1.3.6　灭　菌

将所有测定系列管、叶酸测定培养基于 121 ℃高压灭菌 5 min。

1.3.7　接种、培养和测定

在无菌操作条件下, 每 10 mL 叶酸测定培养基加入接种液 40 μL, 混匀, 每支测定管中加入接种后的叶酸测定培养基 5 mL, 混匀。置于 36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 20~24 h。培养后震荡混匀, 于 540 nm 处, 用紫外-可见分光光度计进行测定吸光度值。

1.3.8　结果计算

以标准系列管叶酸含量为横坐标(*X*, ng), 标准系列管培养液吸光度值为纵坐标(*Y*), 通过回归分析方法拟合标准曲线, 计算样品中叶酸的含量。

1.3.9　叶酸超声提取条件优化试验

(1) Plackett-Burman 试验

在预实验的基础上, 选取对超声提取叶酸有影响的 4 个因素, 包括超声温度(*A*)、超声时间(*B*)、样品中叶酸含量(*C*)和提取液 pH (*D*), 进行 4 因素 2 水平 3 中心点的 Plackett-Burman 试验, 试验次数为 15 次, 以挑选出对叶酸提取影响显著的因子。其中, 样品中叶酸含量(*C*)的不同水平通过称取不同的样品量来实现, 提取液 pH (*D*)的不同水平是在配制氢氧化钠乙醇溶液时添加不同含量的氢氧化钠, 经电子 pH 计测定而实现。具体试验设计见表 1。

表 1　Plackett-Burman 试验设计

Table 1　Experiment design of Plackett-Burman

水平	*A*: 超声温度/℃	*B*: 超声时间/min	*C*: 样品中叶酸含量/ng	*D*: 提取液 pH
–1	20	30	100	10
1	80	240	2000	14

(2)第一次响应面试验

根据上述 Plackett-Burman 试验结果, 应用 Design-Expert. V13.0.5.0 统计软件建立回归方程的模型参数, 并进行方差分析, 最终选择 3 个显著因素。同时缩小因素水平到一个更可能包含最优值的子区域, 采用 Box-Benhnken 的中心组合设计 3 因素 3 水平 3 中心点的试验, 试验次数为 15 次。具体试验设计见表 2。

表 2　Box-Benhnken 试验设计

Table 2　Experiment design of Box-Benhnken

水平	*A*: 超声温度/℃	*B*: 超声时间/min	*C*: 样品中叶酸含量/ng
–1	40	120	500
0	50	150	750
1	60	180	1000

(3)最陡上升路径法试验

根据第一次响应面试验结果和回归方程, 选取回归方程中因素系数绝对值最大的作为主要步长, 其他因素步长根据系数比例进行计算。根据计算出的试验条件进行试验, 并找到拐点。

(4)第二次响应面试验

根据最陡上升路径法试验结果选择原点, 依据 Box-Behnken 设计新的响应面试验。依据第二次响应面试验结果, 通过 Design-Expert. V13.0.5.0 统计软件计算, 最终确定超声提取叶酸的最佳提取条件。在最佳条件下重复 5 次检测婴幼儿配方乳粉中叶酸定量分析质控样, 以验证超声提取叶酸最佳条件的有效性。

1.4　数据处理

上述 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 响应面试验的设计、结果计算和分析均使用 Design-Expert. V13.0.5.0 统计软件完成。以 $P<0.05$ 为显著性标准, 对试验数据进行方差分析和模型拟合; 通过比较拟合统计量来验证模型的充分性。最后, 运用回归方程模型确定各因素的最优水平。

2　结果与分析

2.1　Plackett-Burman 试验结果

根据表 1 中的各因素与水平, 进行 Plackett-Burman 试验, 测得样品中叶酸含量和方差分析如表 3 和表 4 所示。表 3 中的 0 水平即为中心点。

由表 4 的方差分析结果可知, 各因素与叶酸含量(*Y*, μg/100 g)的一次回归方程为: $Y=128.7-0.1754A+0.0551B+0.00806C-0.83D$; 模型 *P* 为 0.012, 小于 0.05, 说明该模型

表 3　Plackett-Burman 试验结果

Table 3　Experimental result of the Plackett-Burman

试验号	*A*: 超声温度/℃	*B*: 超声时间/min	*C*: 样品中叶酸含量/ng	*D*: 提取液 pH	叶酸含量/(μg/100 g)
1	0	0	0	0	137.99
2	–1	1	1	–1	136.98
3	1	1	–1	1	110.58
4	–1	1	–1	–1	129.06
5	–1	1	1	1	145.65
6	–1	–1	–1	1	115.61
7	0	0	0	0	135.70
8	1	–1	–1	–1	108.18
9	1	1	1	–1	138.34
10	1	1	–1	1	111.59
11	1	–1	1	1	118.82
12	–1	–1	1	1	125.26
13	0	0	0	0	138.33
14	1	–1	1	–1	118.43
15	–1	–1	–1	–1	116.55

表 4 Plackett-Burman 试验的方差分析结果
Table 4 Analysis of variance results of the Plackett-Burman

项目	自由度	调整平方和	调整均方	*F*	*P*
模型	4	1470.72	367.679	5.60	0.012
线性	4	1470.72	367.679	5.60	0.012
A	1	332.34	332.345	5.06	0.048
B	1	400.94	400.940	6.10	0.033
C	1	703.97	703.970	10.72	0.008
D	1	33.46	33.463	0.51	0.492
误差	10	656.75	65.675		

注: $P<0.05$ 表示影响显著, 。

显著性可靠, 能够准确的描述试验影响因素与叶酸提取效率之间的关系。其中超声温度(*A*)、超声时间(*B*)和样品中叶酸含量(*C*)均是显著性影响($P<0.05$)。提取液 pH (*D*)为影响不显著($P>0.05$)。因此, 根据 Plackett-Burman 试验结果选择超声温度(*A*)、超声时间(*B*)和样品中叶酸含量(*C*)进行第一次响应面试验。提取液 pH (*D*)保持其原有水平。由此可知, 叶酸提取虽然需要碱性环境, 但是在碱性范围内的波动对提取效果影响不大。

2.2 响应面法优化超声提取条件

以 Plackett-Burman 试验设计中确定的超声温度(*A*)、超声时间(*B*)和样品中叶酸含量(*C*), 3 个高显著性因素为自变量, 测定最终样品中的叶酸含量为响应值, 采用 Box-Benhnken 的中心组合设计 3 因素 3 水平 3 中心点的试验, 试验次数为 15 次。测得样品中叶酸含量和方差分析如表 5 和表 6 所示。

表 5 Box-Benhnken 试验结果
Table 5 Experimental result of the Box-Benhnken

试验号	*A*(超声温度)/℃	*B*(超声时间)/min	*C*(样品中叶酸含量)/ng	叶酸含量/(μg/100 g)
1	0	1	–1	123.52
2	–1	0	1	138.49
3	1	1	0	125.42
4	0	1	1	130.56
5	1	–1	0	115.84
6	0	–1	–1	116.45
7	0	0	0	129.45
8	–1	1	0	146.50
9	0	0	0	127.44
10	–1	0	–1	111.00
11	–1	–1	0	121.71
12	0	–1	1	126.69
13	0	0	0	135.72
14	1	0	–1	104.95
15	1	0	1	108.50

表 6 Box-Benhnken 试验方差分析结果
Table 6 Analysis of variance results of the Box-Benhnken

项目	自由度	调整平方和	调整均方	*F*	*P*
模型	9	1708.48	189.831	6.78	0.024
线性	3	1044.49	348.164	12.44	0.009
A	1	495.95	495.950	17.72	0.008
B	1	256.68	256.678	9.17	0.029
C	1	291.87	291.866	10.43	0.023
A^2	1	134.53	134.531	4.81	0.080
B^2	1	23.73	23.731	0.85	0.399
C^2	1	305.78	305.780	10.92	0.021
AB	1	57.85	57.853	2.07	0.210
AC	1	143.21	143.205	5.12	0.073
BC	1	2.56	2.560	0.09	0.775
误差	5	139.95	27.989		
失拟项	3	102.66	34.221	1.84	0.372
纯误差	2	37.28	18.642		

由表 6 的方差分析结果可知, 超声温度(*A*)、超声时间(*B*)和样品中叶酸含量(*C*)这 3 个主因素的 *P* 和模型 *P* 均小于 0.05, 说明该模型显著性可靠。不过平方项和交互项中有些因素不显著, 需要对模型进行简化。经简化后, 各因素与叶酸含量(*Y*, μg/100 g)的一次回归方程为: $Y=42.1-0.787A+0.1888B+0.2366C-0.000142C^2$; 简化后模型 *P* 为 0.007, 依旧小于 0.05, 说明该模型显著性可靠。由上述方程可知, 超声温度(*A*)系数为负, 该因素对叶酸提取呈负相关, 与叶酸易受热分解的特性相吻合, 说明此时超声温度的水平范围 40~60 ℃对叶酸破坏较明显。超声时间(*B*)和样品中叶酸含量(*C*)系数为正, 这两个因素对叶酸提取呈正相关, 说明超声时间长和样品中叶酸含量高都是可以提高提取效果的。简化后模型未见明显弯曲, 说明部分因素的选取水平并未包含最优区域, 因此需要用最陡上升路径法确定最佳优化区域。

2.3　最陡上升路径法试验设计和结果

以第一次响应面试验 3 因素的中心点为原点, 根据简化后模型回归方程中主因素的系数计算步长。按照最陡上升路径法设计步长试验和结果如表 7 所示。

表 7　最陡上升路径法试验结果
Table 7　Results of the steepest ascent experiment

试验号	*A*(超声温度)/℃	*B*(超声时间)/min	*C*(样品中叶酸含量)/ng	叶酸含量/(μg/100 g)
1	50	150	750	132.49
2	40	143	675	138.13
3	30	136	600	147.50
4	20	129	525	141.03
5	10	122	450	116.37

由表 7 可知, 在不同的步长条件下, 叶酸测定结果出现了一个明显的趋势, 即先升后降。在第 3 组试验附近出现了 3 个显著影响因素的最佳中心点, 所以将第 3 组试验作为第二次响应面试验的中心点, 即超声温度 30 ℃, 超声时间 136 min 和样品中叶酸含量 600 ng。

2.4　第二次响应面试验设计和结果

根据最陡上升路径法的结果, 以第 3 组试验为中心点, 采用 Box-Benhnken 的中心组合设计 3 因素 3 水平 3 中心点的试验, 以步长跨度为参考, 确定各因素高低水平, 试验次数为 15 次。测得样品中叶酸含量和方差分析如表 8 和表 9 所示。

由表 9 可知, 此回归模型 *P* 为 0.003, 小于 0.05, 表明此模型效应显著; 失拟项 *P* 为 0.61, 大于 0.05, 表示此模型能较好地拟合实际情况; 此模型决定系数 R^2 为 0.9699, 大于 0.9, 校正决定系数 R^2_{adj} 为 0.9156, 大于 0.9, 表明本试验的误差较小, 回归模型的相关性较好。通过计算, 二项式回归方程为 $Y=-3176+21.99A+38.63B+1.117C-0.1018A^2-0.1182B^2-0.000335C^2-0.1103AB-0.00093AC-0.00483BC$。由方程可知, 3 个因素的系数均为正, 说明在当前水平下, 三

表 8　第二次响应面 Box-Benhnken 试验结果
Table 8　Experimental result of the second response surface Box-Benhnken

试验号	*A*(超声温度)/℃	*B*(超声时间)/min	*C*(样品中叶酸含量)/ng	叶酸含量/(μg/100 g)
1	0	–1	–1	131.33
2	0	–1	1	140.69
3	0	0	0	146.16
4	0	0	0	143.26
5	–1	0	–1	126.82
6	0	0	0	148.77
7	–1	1	0	136.98
8	1	0	–1	135.24
9	1	–1	0	138.63
10	1	1	0	132.25
11	0	1	–1	141.15
12	0	1	1	140.36
13	–1	–1	0	112.49
14	–1	0	1	134.14
15	1	0	1	139.78

表 9　第二次响应面 Box-Benhnken 试验的方差分析结果
Table 9　Analysis of variance results of the second response surface Box-Behnken

项目	自由度	调整平方和	调整均方 *S*	*F*	*P*
模型	9	1048.69	116.521	17.88	0.003
线性	3	304.66	101.553	15.58	0.006
A	1	157.27	157.265	24.13	0.004
B	1	95.22	95.220	14.61	0.012
C	1	52.17	52.173	8.00	0.037
A^2	1	382.77	382.768	58.73	0.001
B^2	1	123.96	123.960	19.02	0.007
C^2	1	13.14	13.143	2.02	0.215
AB	1	238.24	238.239	36.55	0.002
AC	1	1.93	1.932	0.30	0.610
BC	1	25.76	25.756	3.95	0.104
误差	5	32.59	6.518		
失拟项	3	17.39	5.798	0.76	0.610
纯误差	2	15.19	7.597		

个因素均对叶酸提取呈正相关。虽然在第一次响应面试验时，超声温度 40~60 ℃对叶酸有较明显破坏作用，但是当温度降到 20~40 ℃时，温度对叶酸的破坏基本消失，转而形成了对叶酸提取的正相关。

对上述二次多项式回归方程分析得到的响应面图和等高线图，见图 1~3。响应面越陡，等高线越密集，表示影响越显著；等高线越接近椭圆，表示两个因素的交互作用越显著。由图 1~3 可见，图 1 中响应面曲线坡度最大，所以 3 个因素中超声温度(*A*)和超声时间(*B*)的影响更加显著。适当的温度可以软化样品基质，超声时长保证了超声波“空化效应”的持续作用，两者均能将叶酸释放的效率显著提升。由图 2 和图 3 可见，响应面坡度相对平缓，所以样品中叶酸含量在 3 个因素中影响最小。说明当前水平下的超声温度和时长对于叶酸提取的能力足够覆盖当前水平下叶酸的含量范围。同时，3 个图中的等高线均呈椭圆，说明 3 个因素之间均具备一定的交互作用，从表 9 中可以看出只有超声温度(*A*)和超声时间(*B*)的相互作用 *P* 为 0.002，小于 0.05，呈显著的交互作用。同时也验证了叶酸是由适当温度软化样品和超声波“空化效应”的共同作用下释放出来。

2.5 最佳提取条件的确定和试验验证

根据 Design-Expert. V13.0.5.0 统计软件对回归方程进行分析处理，获得超声提取叶酸的最佳提取条件为：超声温度 31.71 ℃、超声时间 135.09 min、样品中叶酸含量 656.91 ng。预测值为 147.29 μg/100 g。为方便实际应用，将参数进一步调整为：超声温度 32 ℃、超声时间 135 min、样品中叶酸含量 657 ng。为了验证响应面法的可靠性，在调整参数的条件下，试验重复 5 次，所得叶酸含量均值为 148.12 μg/100 g，标准差为 1.39 μg/100 g。与预测值 147.29 μg/100 g 和特性值 149.5 μg/100 g 之间具有良好的一致性。

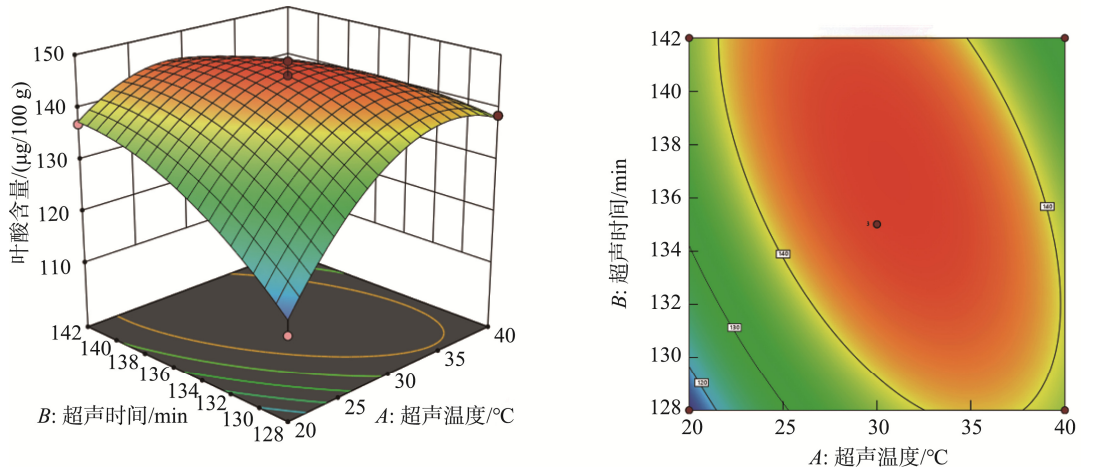


图 1 超声温度与超声时间对叶酸提取量的影响

Fig.1 Effects of ultrasonic temperature and ultrasonic time on the extraction yield of folic acid

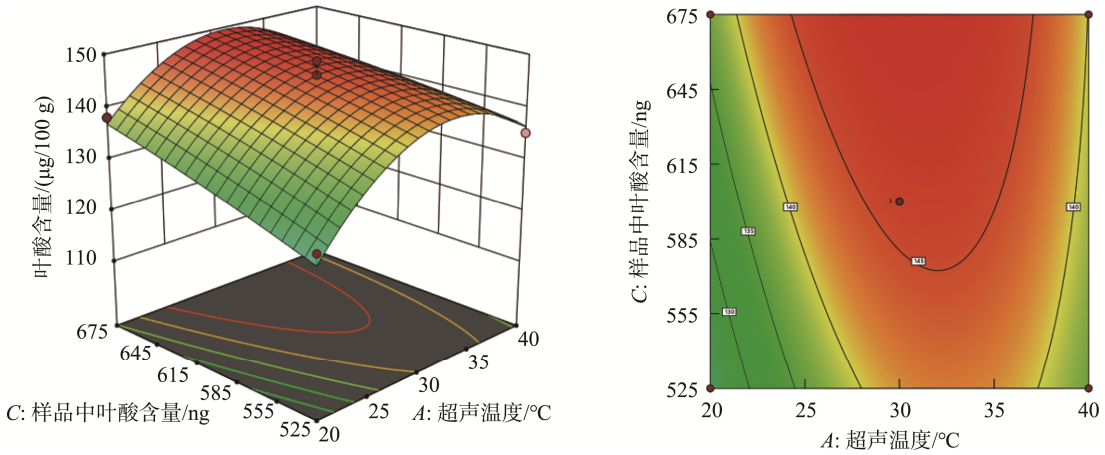


图 2 超声温度与样品中叶酸含量对叶酸提取量的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic temperature and sample folic acid content on the extraction yield of folic acid

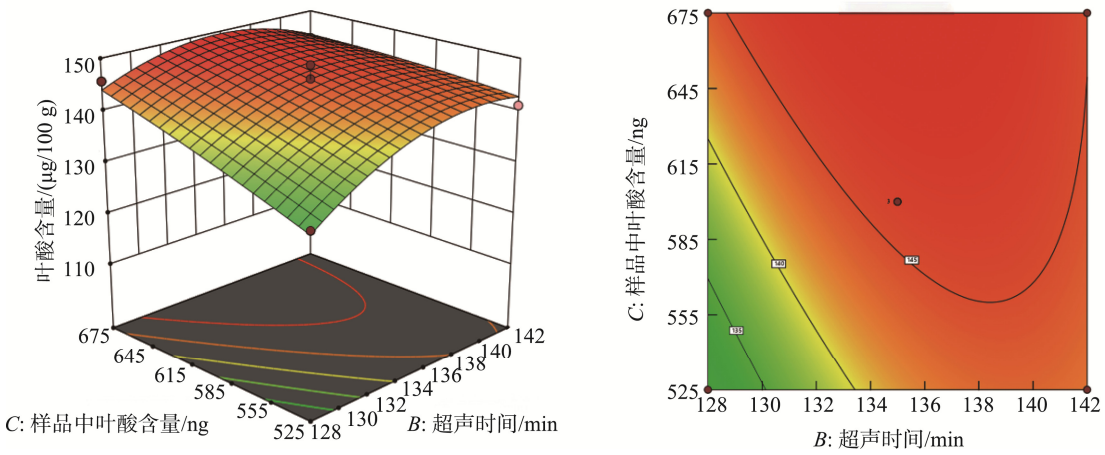


图 3　超声时间与样品中叶酸含量对叶酸提取量的影响

Fig.3　Effects of ultrasonic time and sample folic acid content on the extraction yield of folic acid

分别用优化后最佳提取条件与 GB 5009.211—2022 中参数范围的中位值或自然值为条件(即：称样量 1 g、超声时间 2 h、超声温度为不控温)，对 17 个市售婴幼儿配方乳粉进行检测。检测结果如图 4 所示。将两组数据进行独立样本单尾 T 检验，P 为 0.047，小于 0.05，说明两组数据有显著性差异。对结果进行直观比较，最佳提取条件检测的 17 个样品结果均高于国标法，检测结果提高幅度在 3.5%~20.9%之间，平均提高 13.7%。证实了最佳提取条件的有效性。

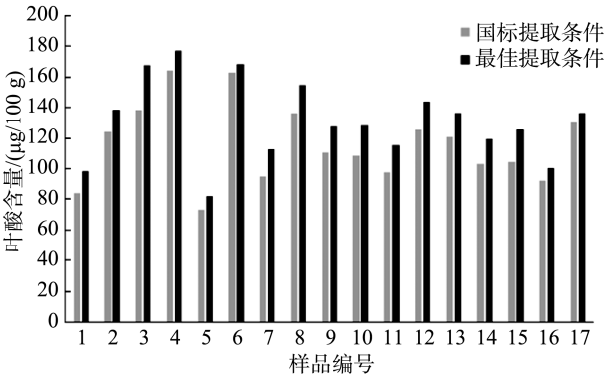


图 4　最佳提取条件与国标提取条件检测 17 个样品的结果

Fig.4　Detection results for 17 samples under the optimal extraction conditions and the national standard extraction conditions respectively

3　结　论

本研究针对 GB 5009.211—2022 中超声提取条件较为宽泛导致的叶酸回收率偏低及实验室间结果偏差大的问题，采用响应面法系统优化超声提取条件。通过 Plackett-Burman 试验、最陡上升路径法试验和两次 Box-Benhnken 试验分析得出，超声法最优提取条件是超声温度 32 ℃、超声时间 135 min、样品中叶酸含量 657 ng。响应面设计建立的理论模型拟合度较好，在最佳提取条件下，验证试验测得样品中叶酸含量为 148.12 μg/100 g，与预测值和特性值基本一致。

对拟合的回归方程和响应面图分析，发现优化条件中的温度和时长充分平衡了超声波的“空化效应”和热软化作用，实现了叶酸从婴幼儿配方乳粉中的高效释放。与 GB 5009.211—2022 常规条件相比，优化后方法对 17 个市售样品中的叶酸检测结果平均提升了 13.7%，证实了优化条件的有效性。因此，本研究建立的叶酸提取最佳条件，显著提升了微生物法检测婴幼儿配方乳粉中叶酸的准确性，为实验室消除系统误差、保障婴幼儿配方乳粉营养标签的真实性提供了可靠的技术依据。

参考文献

[1] 连增林，刘康，顾锦华，等. 叶酸与 5-甲基四氢叶酸的生物学特征与应用[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(2): 230–239.
LIAN ZL, LIU K, GU JH, *et al*. Biological characteristics and application of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate [J]. China Food Additives, 2022, 33(2): 230–239.

[2] 许天月，张俊杰，魏家乐，等. 叶酸形式、稳定性及天然化叶酸的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(2): 266–274.
XU TY, ZHANG JJ, WEI JL, *et al*. Research progress on folate forms, stability and naturalization folate [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(2): 266–274.

[3] GAZZALI AM, LOBRY M, COLOMBEAU L, *et al*. Stability of folic acid under several parameters [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 93: 419–430.

[4] AYDEMIR ME, ALTUN SK. Investigation of some quality properties of yogurt made from cow and sheep milk fortified with folic acid (B_9), biotin (B_7) and vitamin D_3 [J]. Journal of the science of food and agriculture, 2023, 104(2): 1085–1091.

[5] OBEID R, WARNKE I, HECHT C, *et al*. Dependence of bioavailability of folic acid and (6S)-5-methyltetrahydrofolate on baseline red blood cell folate concentrations in infants [J]. Human Nutrition & Metabolism, 2025, 42: 200335.

[6] 解琪，李宝莲，赵永莉，等. 叶酸缺乏对小鼠胚胎干细胞神经谱系分化的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(12): 1799–1809.
XIE Q, LI BL, ZHAO YL, *et al*. The effect of folate deficiency on neural spectrum differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. Chinese Journal

of Biochemistry and Molecular Biology, 2025, 41(12): 1799–1809.

[7] 常韶燕, 郭九叶, 陈燕, 等. 叶酸缺乏抑制 Brachyury 表达的表观调控机制及其对拟胚体分化的影响[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(14): 1401–1409.
CHANG SY, GUO JY, CHEN Y, *et al*. Epigenetic regulation mechanism of folic acid deficiency inhibiting *Brachyury* expression and its effect on differentiation of embryoid bodies [J]. Journal of Army Medical University, 2022, 44(14): 1401–1409.

[8] SMITH AD, KIM YI, REFSUM H. Is folic acid good for everyone? [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 87(3): 517–533.

[9] 王姝, 李泉波, 冯晓玲. 叶酸补充过量与生殖风险相关性的研究进展[J]. 中国计划生育学杂志, 2023, 31(4): 982–987.
WANG S, LI QB, FENG XL. Research progress of the correlation between the folic acid over supplementation and the reproductive risk [J]. Chinese Journal of Family Planning, 2023, 31(4): 982–987.

[10] ESTRADA ME, WANG XY, UHLERMD, *et al*. Folate interaction with genetic risk for neural tube defects among infants in Bangladesh [J]. Birth defects research, 2025, 117(12): e70007.

[11] MONSENALB, TORSVIKIK, BENTSENMHL, *et al*. Exclusive breastfeeding is not ensuring an adequate vitamin b status in premature infants with very low birth weight [J]. Nutrients, 2026, 18(3): 423–423.

[12] PERIYATHAMBI N, SUKUMAR N, WELDESELASSIE GY, *et al*. Maternal serum folate status during early pregnancy: Sex-specific association with neonatal adiposity [J]. Diabetes & metabolic syndrome, 2025, 19(3): 103222.

[13] 唐子茜, 曾小峰, 商桑, 等. 叶酸强化食品研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(22): 192–198.
TANG ZQ, ZENG XF, SHANG S, *et al*. Research progress in folate fortified food [J]. Food Research and Development, 2023, 44(22): 192–198.

[14] 焦雯姝, 关嘉琦, 李慧臻, 等. 乳酸菌生物合成叶酸的研究及应用进展[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 1–7.
JIAO WS, GUAN JQ, LI HZ, *et al*. Research and application of folate biosynthesis by lactic acid bacteria [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(10): 1–7.

[15] LIANG XS, ZHAO FQ, HAO LX. Research on stability of synthetic folic acid [J]. Advanced Materials Research, 2013, 781: 1215–1218.

[16] 涂宏建, 陆伟, 贾福怀, 等. 涡旋振荡提取-高效液相色谱-紫外检测法测定铁叶酸片中的叶酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3721–3726.
TU HJ, LU W, JIA FH, *et al*. Determination of folic acid in iron-folic acid tablets by vortex oscillation extraction-high performance liquid chromatography-ultraviolet detection method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(9): 3721–3726.

[17] 王博伦, 顾丰颖, 刘子毅, 等. 食品中叶酸测定方法的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 294–300.
WANG BL, GU FY, LIU ZY, *et al*. Advances in methods for the determination of folate in foods [J]. Food Science, 2020, 41(9): 294–300.

[18] 陈琼, 王子威, 辛博, 等. 微生物法测定特殊食品中叶酸含量的研究[J]. 食品科技, 2023, 48(1): 240–245.
CHEN Q, WANG ZW, XIN B, *et al*. Determination of folate content in special foods by microbial method [J]. Food Science and Technology, 2023, 48(1): 240–245.

[19] 商迎辉, 刘馨君, 黄汉昌, 等. 婴幼儿乳品中叶酸的微生物测定方法[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(7): 727–731.
SHANG YH, LIU XJ, HUANG HC, *et al*. Studies of microbiological assay folic acid in infant milk [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(7): 727–731.

[20] 陆其聪, 陈冬梅, 胡春红, 等. 微生物法检测婴儿配方乳粉中叶酸含量的影响因素[J]. 食品科技, 2021, 46(7): 273–277.
LU QC, CHEN DM, HU CH, *et al*. Factors influencing the determination of folate in infant formula milk powder by microbiological assay [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(7): 273–277.

[21] 刘子音, 卓一鸣, 刘腊兰, 等. 微孔板法测定乳粉中叶酸含量的不确定度分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(3): 95–99, 119.
LIU ZY, ZHUO YM, LIU LL, *et al*. Analysis of uncertainty in determination of folic acid in milk powder by microplate method [J]. Food & Machinery, 2024, 40(3): 95–99, 119.

[22] 张涛, 张瑞, 张子仑, 等. 婴幼儿配方乳粉中叶酸检测用鼠李糖乳杆菌定量菌株制备[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(22): 189–193.
ZHANG T, ZHANG R, ZHANG ZL, *et al*. Preparation of quantitative strains of *Lactobacillus rhamnosus* for the detection of folic acid in infant formula milk powder [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(22): 189–193.

[23] 贺银菊, 杨再波, 彭莘媚, 等. 响应面优化紫果西番莲维生素 C 的超声辅助提取工艺[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 119–124.
HE YJ, YANG ZB, PENG XM, *et al*. Optimization of ultrasound-assisted extraction of vitamin C in the purple passionfruit by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(1): 119–124.

[24] 叶晓利, 康文怀, 李巧玲, 等. 响应面法优化玉米叶酸提取工艺的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2019, 40(4): 64–70.
YE XL, KANG WH, LI QL, *et al*. Optimization of extraction process of folic acid from maize by response surface methodology [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 40(4): 64–70.

[25] 焦雯姝, 关嘉琦, 史佳鹭, 等. 响应面法优化乳酸乳球菌 KLDS4. 0325 产叶酸的培养基成分及发酵条件[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 123–130.
JIAO WS, GUAN JQ, SHI JL, *et al*. Optimization of medium composition and fermentation conditions for folate production by *Lactococcus lactis* KLDS4. 0325 by response surface methodology [J]. Food Science, 2020, 41(6): 123–130.

[26] ABDEL-BAKI RMM, AHMED MN, BARAKAT OS, *et al*. Enhanced vitamin B_{12} production by isolated *Bacillus strains* with the application of response surface methodology [J]. BMC Biotechnology, 2024, 24(1): 90–102.

[27] JIAO Z, HAN S, WANG WF, *et al*. Preparation and optimization of vitamin E acetate liposomes using a modified RESS process combined with response surface methodology [J]. Particulate Science and Technology, 2020, 38(7): 863–875.

[28] PATRICK UU, JOHN C, OKORO L. Response surface optimization of dietary iron, calcium and vitamin C in soyamilk for complementary feeding [J]. Asian Journal of Probability and Statistics, 2022, 36–53. DOI:10.9734/AJPAS/2022/V16I330404.

[29] 陆凯迪, 孙玉琦, 程琳, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化维生素 D_3 微囊的处方工艺[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(9): 768–775.
LU KD, SUN YQ, CHENG L, *et al*. Optimizing the formulation of vitamin D_3 microcapsules with Box-Behnken design-response surface method [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2019, 36(9): 768–775.

[30] 王红, 吴启南, 崔永伟, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化芡实中总维生素 E 的提取工艺研究[J]. 中国药房, 2019, 30(11): 1497–1501.
WANG H, WU QN, CUI YW, *et al*. Study on optimization of the extraction technology of total vitamin E in euryale ferox by Box-Behnken design-response surface methodology [J]. China Pharmacy, 2019, 30(11): 1497–1501.

[31] 闵亚能. 实验设计(DOE)应用指南[M]. 北京: 机械工业出版社, 2011.
MIN YN. Application guide of design of experiments (DOE) [M]. Beijing: China Machine Press, 2011.

(责任编辑: 曹岱琳 韩晓红)