

微流控芯片中亚硝酸盐的 图像分析方法研究

穆莉莉¹ 郭玉祥¹ 孔兵^{2,3} 叶嘉明^{2,3,*}

(1.安徽理工大学,安徽淮南 232000;

2.浙江清华长三角研究院分析测试中心,浙江嘉兴 314006;

3.国家食品安全风险评估中心应用技术合作中心,浙江嘉兴 314006)

摘要:为快速检测亚硝酸盐含量,提出一种基于图像分析技术的微流控芯片中亚硝酸盐快速检测方法。微流控芯片中设计两级反应池分别进行亚硝酸盐的初级反应和显色反应,采集显色反应后的图像并进行图像处理,提取显色反应图像,计算相对灰度值表征亚硝酸盐浓度。结果表明,亚硝酸盐溶液在 0.5~10 mg/L 浓度范围区间,所测显色溶液的相对灰度值与亚硝酸盐浓度呈线性关系,决定系数是 0.9927,检出限为 0.8 mg/L,检测时间小于 10 min;对自来水和腊肉中的亚硝酸盐进行了测定,加标回收率在 94.1%~108.0% 之间。该方法拓展了微流控芯片中溶液浓度检测方法,具有简便、快速、准确的显著特点。

关键词:微流控芯片,亚硝酸盐,图像分析,浓度检测

Image Analysis Method Investigation of Nitrite Detection in Microfluidic Chip

MU Li-li¹, GUO Yu-xiang¹, KONG Bing^{2,3}, YE Jia-ming^{2,3,*}

(1. Anhui University of Science & Technology, Huainan 232000, China;

2. Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Biotechnology Center on Xiaoshan, Jiaxing 314006, China;

3. Cooperation Center for Application Technology, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Jiaxing 314006, China)

Abstract: To detect the concentration of nitrite in microfluidic chip, a rapid detection method based on image analysis was proposed. In the microfluidic chip, the two-stage reaction cell was designed to carry out the primary reaction and chromogenic reaction of nitrite respectively. The image was collected and processed when the chromogenic reaction was completed, then the chromogenic reaction area was extracted and the relative gray value was calculated to characterize the concentration of nitrite. It was found that there was a linear relationship between the gray value of chromogenic solution and the concentration of nitrite when the nitrite concentration range from 0.5 to 10 mg/L. The coefficient of determination was 0.9927, the detection limit was 0.8 mg/L and the detection time was less than 10 min. When this method was applied into the nitrite detection of tap water and bacon, the recovery rate was 94.1%~108.0%. The method proposed in this study extended the detection method of solution concentration in microfluidic chip, has convenient, speedy and accurate features.

Key words: microfluidic chip; nitrite; image analysis; concentration detection

中图分类号: TS210

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)03-0224-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.035

引文格式: 穆莉莉, 郭玉祥, 孔兵, 等. 微流控芯片中亚硝酸盐的图像分析方法研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 224-227, 238.

亚硝酸盐不仅能抑制微生物的生长和繁殖,并且能对食品进行保鲜。然而,有研究发现,亚硝酸盐不仅具有致癌性,而且与人类先天畸变有关系^[1-2];人体血液中亚硝酸盐浓度为 0.4~200 mg/kg 时会产

生毒性,1 g 亚硝酸盐即可致人死亡^[3]。因此,针对食品中亚硝酸盐的含量,我国制定了许多严格的检测标准^[4-5]。

目前用于亚硝酸盐的检测方法主要分为两大

收稿日期: 2018-06-19

作者简介: 穆莉莉(1973-), 博士, 教授, 研究方向: 微流体系统及微化学反应, E-mail: nlgm0611@163.com。

* 通讯作者: 叶嘉明(1979-), 博士, 高级工程师, 主要从事微流控芯片即时检测系统研究, E-mail: yejiaming723@126.com。

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1308085ME75); 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2013A086)。

类,一类是传统的精密仪器检测分析方法,主要包括色谱-质谱联用法、离子色谱法、电化学方法等^[6-8];另一类是现场快速检测方法,主要为比色法、分光光度法等^[9-10]。精密仪器分析方法虽然精度高、灵敏度高,但操作繁琐,设备昂贵,需要专业人员操作,无法满足对亚硝酸盐进行现场、快速、微量化、便携化的检测需要^[11]。现场快速检测方法中的比色法主要采用试剂盒显色反应后,检测者将反应后的溶液颜色与标准比色卡进行人眼判读,从而快速获得定性分析结果,这种方法虽然成本低、操作方便、检测时间短,但准确度低、误差大^[12-13];分光光度法主要使用分光光度计对显色反应后的溶液直接进行定量分析,但操作步骤繁琐,需要现场配制及多次移取溶液,而且需要专业人员进行操作^[13-14]。因此,研究更加简便、快速、准确的亚硝酸盐测定方法具有一定的实际需求。

近年来,基于纸基微流控芯片和图像分析技术的快速检测方法^[15-17],已被用于生化显色反应结果的快速定量检测。例如,赵联朝^[15]等开发了一种用于亚硝酸根离子检测的过氯乙烯树脂纸基微流控芯片,采用 Photoshop 软件计算纸基微流控芯片上的显色强度,实现了水样和食品中亚硝酸根离子测定;肖良品^[16]等提出使用中性滤纸为基材的三维纸芯片,结合自制的比色检测装置,采用 Photoshop 软件检测自来水中的亚硝酸盐。上述方法不仅试剂用量少,而且分析速度快、成本低、操作简单,可实现一定浓度范围内亚硝酸盐的快速定量分析。然而在图像分析过程中,纸基微流控芯片中容易受滤纸或高分子膜的形貌及材料本体颜色的干扰^[11,18]导致检测结果误差较大。

本文提出一种基于微流控芯片液相反应^[19-20]结合图像分析技术的亚硝酸盐检测方法。通过微泵驱动待测溶液在具有二级串联式通道的微流控芯片中,依次与预先固定于芯片内部的两种试剂发生化学显色反应;使用自行搭建的图像采集平台对微量反应池的封闭溶液进行图像采集,基于 OpenCV(计算机视觉库)图像库中的处理方法,建立图像处理的方法和步骤,计算获得亚硝酸盐显色溶液的相对灰度值^[21],从而定量分析亚硝酸盐浓度。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

盐酸萘乙二胺、对氨基苯磺酸 上海士峰生物科技有限公司;36% 盐酸 国药集团;亚硝酸钠 山东西亚化学工业有限公司;杭州当地市售腊肉;光学级聚甲基丙烯酸甲酯板材(PMMA) 苏州扬清芯片科技有限公司。

U-2900 型紫外可见分光光度计 日立公司;JA1203B 型电子天平 上海精科实业有限公司;KFSHAA2B03G 型蠕动泵 卡川尔流体科技有限公司;RER-USB8MP02G 型摄像头 深圳市锐尔威视科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 亚硝酸钠标准溶液:准确称取

0.01 g 亚硝酸钠,溶解定容至 10 mL,配制成 1 g/L 的亚硝酸盐溶液作为母液。实验中待测标准溶液依此母液稀释而成。20% 盐酸溶液:量取 36% 的盐酸 10 mL 稀释定容至 18 mL。亚硝酸盐检测试剂 I:称取 0.1 g 对氨基苯磺酸,溶于 20% 盐酸中,并用此盐酸定容至 10 mL;亚硝酸盐检测试剂 II:称取 0.08 g 盐酸萘乙二胺,加入蒸馏水,溶解定容至 10 mL。实验中所用水均为蒸馏水。

1.2.2 检测原理 待测溶液中的亚硝酸盐依次与试剂 I、试剂 II 充分反应后,生成玫瑰红溶液,可以通过溶液的颜色深浅来表征亚硝酸盐浓度^[22-23]。实验过程为:首先在芯片上进行亚硝酸盐的显色反应;将充分反应后的芯片放入检测装置中,启动图像采集系统;对采集到的图像进行处理,计算显色反应池内的平均灰度值。根据标准亚硝酸盐显色溶液的平均灰度值与亚硝酸盐浓度,获得浓度标准曲线,为定量检测食品中亚硝酸盐的含量提供技术保证和理论依据。

1.2.3 微流控芯片结构与反应流程 本文所采用的 PMMA 微流控芯片厚度为 3 mm,其中显色反应池的深度为 2 mm。芯片结构如图 1a 所示,包括进样口、初级反应池、显色反应池和微泵接口。

芯片封装前,采用冻干工艺^[24]预先将 10 μ L 的试剂 I 和 10 μ L 试剂 II 分别存储到微流控芯片的初级反应池和显色反应池内。检测时,首先通过微泵定量吸取 150 μ L 待测样品溶液于初级反应池内;充分反应后,再通过微泵将初级反应池内的溶液吸入到显色反应池,自动进行化学显色反应,如图 1b 所示。

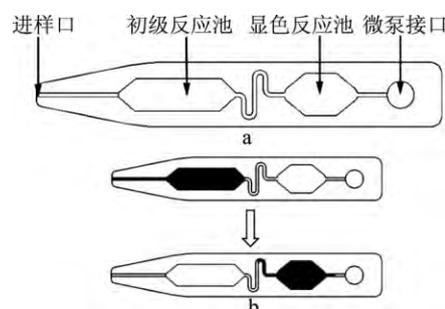


图1 微流控芯片结构及进样反应流程

Fig.1 Structure of microfluidic chip and injection reaction flow

1.2.4 图像采集平台 光源及拍照环境对图像质量以及后续图像处理、分析影响较大,本文设计并搭建了用于提供光源的暗箱图像采集装置,如图 2 所示,暗箱图像采集装置包括微流控芯片固定平台、摄像头及 LED 环形灯组。摄像头安装在芯片正上方,LED 灯组安装在摄像头周围环形均匀分布保证拍照光源的均一性。

1.2.5 反应动力学 配制 10 mg/L 的亚硝酸钠溶液作为待测液,使用微泵定量吸取 150 μ L 待测液于初级反应池内,静置反应一段时间,确保亚硝酸盐与试剂 I 反应完全;再通过微泵将初级反应池内的溶液吸入到显色反应池,调节分光光度计的检测波长为

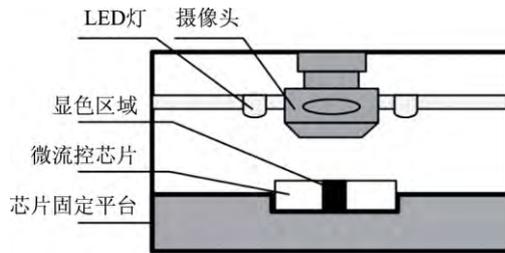


图2 图像采集装置结构

Fig.2 Structure of image acquisition device

540 nm^[25] 监测显色反应池中吸光度随时间的变化情况。

1.2.6 图像分析方法 为了计算显色反应池区域的相对灰度值,需要分割出背景区域与显色反应池区域,本文基于 Visual Studio 2012 平台和 OpenCV 图像库进行处理操作,运用灰度二值化处理、图像形态学运算及图像滤波等图像处理方法,对背景区域与显色反应池进行分割,分别计算背景图像灰度值与显色反应池区域灰度值,根据公式 $G_r = G_b - G_f$ 计算相对灰度值,其中 G_r 为相对灰度值, G_b 为背景灰度值, G_f 为前景灰度值。

1.2.7 系统考察

1.2.7.1 标准曲线的建立 配制浓度分别为 0.5、2、4、6、8、10 mg/L 的亚硝酸钠溶液进行系统考察,按照图像处理流程对显色反应后的微流控芯片进行图像采集及分析,以亚硝酸钠溶液浓度为横坐标,分析获得的相对灰度值为纵坐标,进行线性拟合分析,绘制亚硝酸钠的标准曲线,根据检出限公式 $MDL = St(n-1, 0.99)$ 计算检出限。

1.2.7.2 加标回收实验 将市售腊肉切成约 1 mm × 1 mm 的小碎片,用天平称取 2.0 g 置于烧杯中,加入蒸馏水 20 mL,浸泡 10~15 min,取样品上清液 10 mL 于离心管中,备用。

用本文方法对腊肉提取液做样品加标回收实验,对空白自来水溶液做空白加标回收实验,腊肉提取液和自来水溶液分别测定 3 组样品,每组测定 6 次,计算 6 次测量浓度结果的均值、回收率、标准偏差(SD)。

1.2.8 方法对比 分别考察文中方法、试剂盒结合分光光度计法^[9]和试剂盒结合比色卡法^[10]在试剂、检测时间、样品用量、试剂消耗量、准确性以及操作步骤六个指标,并将文中方法分别与试剂盒结合分光光度法、试剂盒结合比色卡法进行比较。

2 结果与分析

2.1 反应动力学考察

图 3a 显示了微流控芯片显色反应池中亚硝酸盐与试剂 II 的反应动力学过程曲线,当待测液进入显色反应池后 0~90 s 时间内溶液吸光度不断增大,表明显色反应的快速进行;90~150 s 时间内,溶液吸光度继续增大,但增速缓慢,表明显色反应接近终点;当反应时间大于 150 s 时,溶液的吸光度基本保持不变,表明显色反应结束,因此本文选择 150 s 作为检测时间。

同时还发现,初级反应池内的反应时间对显色

反应稳定后的吸光度也有一定的影响,随着初级反应池反应时间的增加,显色反应池中的溶液吸光度逐渐增大,如图 3b 所示,初级反应池内反应时间在 30~210 s 内时,溶液吸光度缓慢增大,在 210 s 后基本保持不变,为保证检测结果的准确性,本文选择初级反应池反应时间为 210 s。

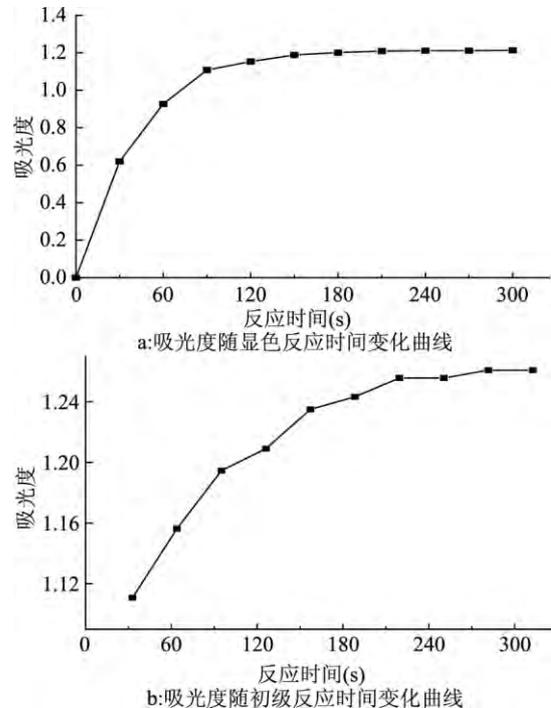


图3 亚硝酸钠反应动力学曲线

Fig.3 Reaction kinetics curves of sodium nitrite

2.2 图像处理分析

图 4a 为微流控芯片的原始灰度图片,可以看出芯片边缘部分有背景光干扰,对显色反应池的图像分析将会产生较大影响。同时,考虑到芯片壁、非扩散区域的影响,需要对图像进行分割。

首先通过 OpenCV 对图像进行二值化处理。如图 4b 所示,对原始灰度图像进行提取,可以得到如图 4c 所示的背景灰度图像,背景灰度图像并不包含微流控芯片和显色反应池区域,可用于计算背景灰度值。经二值化处理后的图像存在明显的孤立点和细小线条,这些点和线条并不属于显色区域;图像形态学的开运算可以消除孤立点与细小线条,并且在平滑较大的边界并不明显改变其面积,通过调用 OpenCV 中的图像形态学运算函数对图像进行开运算处理,处理后的二值图像明显去除了目标区域的孤立点和部分细小线条(图 4d)。

以二值图像为掩膜,对原始灰度图像进行提取,可以得到如图 4e 所示的灰度图像,由于图像中存在噪声,需要进一步对图像进行滤波处理。由于溶液颜色具有单一性,理论上溶液各处颜色相同,即灰度值相同,需要对该灰度值两侧的噪音进行滤波,本文选择带通滤波。遍历图 4e 各像素点的灰度值,统计各灰度值(零灰度值除外)的像素点数量,选择像素点数量处于峰值状态时的灰度值,以此灰度值为中心,进行带通滤波。多次实验表明,滤波带宽为

表2 微流控技术和传统亚硝酸盐快速检测方法对比

Table 2 Comparison of microfluidic technology and traditional nitrite rapid detection method

方法	试剂	检测时间 (min)	样本用量 (mL)	试剂消耗量 (μL)	准确性	操作步骤
微流控芯片 + 图像分析平台	预存储	10	0.15	25	定量	简单的人工操作
试剂盒 + 分光光度计	现配	15~20	0.6	90	定量	繁琐
试剂盒 + 比色卡	现配	8	5	600	定性	简单的人工操作

5~9 个灰度值时,计算结果相差不到 0.3 个灰度值,随着滤波带宽的增加,所提取到的显色区域比较完整。本文所取滤波带宽为 9 个灰度值,如图 4f 所示,明显去除了显色区域的噪声,可以用于计算显色反应池的灰度值,根据背景灰度值和显色反应池的灰度值计算相对灰度值。

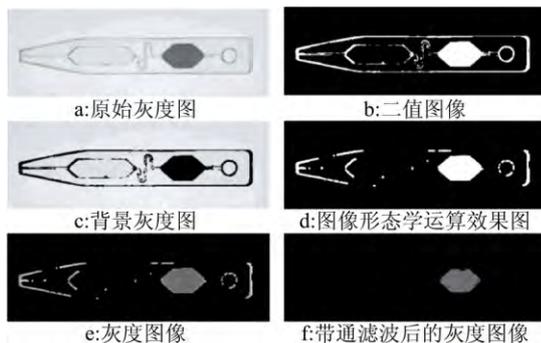


图4 图像处理分析

Fig.4 Image analysis with different treatments

2.3 标准曲线

图 5 为亚硝酸钠溶液的标准曲线,结果表明,拟合方程为 $y = 8.2219x + 4.6389$, 决定系数 $R^2 = 0.9927$, 线性范围在 0.5~10 mg/L 之间,检出限为 0.8 mg/L。

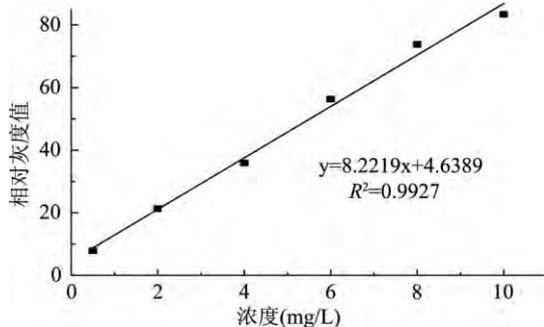


图5 亚硝酸钠溶液的标准曲线

Fig.5 Standard curve of sodium nitrite solution

2.4 加标回收实验

表 1 列出了不同样品基质下的加标回收结果。未加标时,测得腊肉提取液的亚硝酸盐浓度是 1.89 mg/L。在不同的基质中,所测得的回收率在 94.1%~108.0% 之间,表明微流控芯片系统的准确度较好,因此,文中方法可以用来进行亚硝酸盐的快速、准确检测。

2.5 方法对比

表 2 为本文方法和传统亚硝酸盐快速检测方法对比的结果。本文方法可直接将亚硝酸盐检测试剂预存储于微流控芯片内部,无需现场配制溶液,只需简

表1 加标回收实验结果(n=6)

Table 1 The results of recovery(n=6)

样品基质	标准加入量 (mg/L)	加标测得量 \pm SD (mg/L)	回收率 (%)
自来水	1	1.06 \pm 0.32	106.0
	5	5.23 \pm 0.64	104.6
	9	8.47 \pm 0.74	94.1
腊肉提取液	1	1.08 \pm 0.36	108.0
	3	2.87 \pm 0.47	95.7
	5	4.72 \pm 0.69	94.4

单的人工操作即可实现。样品消耗量约为分光光度法的 1/4,试剂消耗量约为分光光度法的 1/3;试剂消耗约为比色法的 1/30,样品用量约为比色法的 1/24,可以满足定量检测亚硝酸盐浓度的要求。相对于传统的快速检测方法,本文方法具有以下优点:基于微流控芯片的液相反应,保证化学显色反应更为均一、稳定可控;样品试剂消耗量少,检测时间短;液相使用 PMMA 为芯片材料,芯片成本低、易于批量化生产。

3 结论

本文提出了一种基于图像分析技术的微流控芯片中亚硝酸盐快速检测方法,实现了对亚硝酸盐的低成本、快速、准确的检测。采用自行搭建的拍照装置结合图像分析技术,自动截取并获得微流控芯片中显色区域的相对灰度值,实现了亚硝酸盐的简便、快速、准确的定量分析。实验结果表明,亚硝酸盐溶液在 0.5~10 mg/L 浓度范围区间,所测显色溶液的相对灰度值与亚硝酸盐浓度呈线性关系,决定系数是 0.9927,检测限可达到 0.8 mg/L,加标回收率在 94.1%~108.0% 之间,可用于食品中亚硝酸盐的现场、低成本、快速、准确检测。综上所述,本文提出的方法具有稳定性好、操作简单、反应时间短,适合非专业人员的操作,有望满足基于化学显色反应原理的检测需求。

参考文献

- [1] 陈卫民, 童海滨, 秦明周, 等. NO_2^- 诱发癌症的作用机制 [J]. 卫生研究 2011, 40(2): 252-255.
- [2] Shen Y C, Tsai H M, Ruan J W, et al. Genetic and functional analyses of the gene encoding synaptophysin in schizophrenia [J]. Schizophrenia Research 2012, 137(1-3): 14-19.
- [3] Pham V V, Stichtenoth D O, Tsikas D. Nitrite correlates with 3-nitrotyrosine but not with the F(2)-isoprostane 15(S)-8-isoprostane (2alpha) in urine of rheumatic patients [J]. Nitric Oxide (下转第 238 页)

accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acid analysis using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100 HPLC (pp.1e10).

[25] Cho I H, Choi H K, Kim Y S. Comparison of umami-taste active components in the pileus and stipe of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) of different grades. *Food Chem*, 2010, 118(3): 804-807.

[26] Kersch R, Grosch W. Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract dilution and concentration analysis [J]. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 1997, 204: 3-6.

[27] Cerny C, Werner G. Quantification of character-impact odour compounds of roasted beef [J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1993, 196: 417-422.

[28] Grosch W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission [J]. *Chemical Senses*, 2001, 26: 533-545.

[29] 谢建春, 孙宝国, 刘玉平, 等. 维生素 B₁ 微波加热降解香味成分分析 [J]. *食品科学*, 2004, 25(10): 241-244.

[30] Cerny C, Davidek T. Formation of aroma compounds from ribose and cysteine during the Maillard reaction [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 2714-2721.

[31] Schlichtherle-Cerny H, Grosch W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 1998, 207(5): 369-376.

[32] Kato H, Rhue M R, Nishimura T. Role of free amino acids

and peptides in food taste. ACS symposium series [J]. American Chemical Society, 1989, 388: 158-174.

[33] 马相杰, 谢华. 美拉德反应与肉味变化 [J]. *肉类工业*, 2002(11): 8-11.

[34] 康乐. 牛肉中 Maillard 反应风味前体肽的鉴定及其产物形成机理的研究 [D]. 北京: 北京工商大学, 2017.

[35] 王然. 基于肽的美拉德反应中关键肉香味化合物的形成机理研究 [D]. 北京: 北京工商大学, 2012.

[36] Lancker F V, An A, Kimpe N D. Impact of the N-terminal amino acid on the formation of pyrazines from peptides in Maillard model systems [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(18): 4697-4708.

[37] 鲁珍, 秦小明, 穆利霞, 等. 呈味肽制备天然复合调味料的研究进展 [J]. *中国调味品*, 2012, 37(10): 7-11.

[38] Noguchi M, Arai S, Yamashita M, et al. Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975, 23(1): 49-53.

[39] Fujimaki M, Arai S, Yamashita M, et al. Taste peptide fractionation from a fish protein hydrolysate [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1973, 37(12): 2891-2898.

[40] Adler-Nissen J, Olsen H S. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein [J]. *Acs Symposium*, 1979, 92(92): 125-146.

[41] 刘甲. 呈味肽的研究及其在调味品中的应用 [J]. *肉类研究*, 2010, 24(5): 88-92.

(上接第 227 页)

Biology & Chemistry, 2009, 21(3-4): 210-215.

[4] 卫生部. 生活饮用水卫生标准 [J]. *经济管理文摘*, 2006(11): 36-38.

[5] 国家卫生和计划生育委员会. GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[6] 钟莺莺, 陈平, 俞雪钧, 等. 改进的离子色谱法测定乳制品中亚硝酸盐和硝酸盐 [J]. *色谱*, 2012, 30(6): 635-640.

[7] 郑冬云, 刘晓军, 朱珊莹, 等. 电化学传感法测定水中亚硝酸盐 [J]. *中国环境监测*, 2014(4): 140-145.

[8] 何浩, 陈幸莺, 孙映球, 等. 顶空气相色谱法测定食品中亚硝酸盐 [J]. *食品与机械*, 2017, 33(1): 55-58.

[9] 王丽丽, 曹建敏, 于卫松, 等. 紫外-可见分光光度法测定烤烟中亚硝酸盐的含量 [J]. *烟草科技*, 2013(1): 64-67.

[10] 刘岩, 孙建华, 吴佳茹. 香肠类肉制品中亚硝酸盐的快速检测法 [J]. *肉类工业*, 2005(3): 33-35.

[11] 田恬, 黄艺顺, 林冰倩, 等. 纸芯片微流控技术的发展及应用 [J]. *分析测试学报*, 2015, 34(3): 257-267.

[12] 汪菊, 付大友, 徐晨曦. 食品中亚硝酸盐快速检测方法的研究 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(9): 278-281.

[13] 张翠芬. 食品添加剂硝酸盐、亚硝酸盐检测方法研究进展 [J]. *中国食品添加剂*, 2014(6): 152-155.

[14] 赵静, 王娜, 冯叙桥, 等. 蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐检测方法的研究进展 [J]. *食品科学*, 2014, 35(8): 42-49.

[15] 赵联朝, 闫宏涛. 纸基过氯乙烯树脂微流控亚硝酸根离

子检测片的研制 [J]. *化学学报*, 2012, 70(9): 1104-1108.

[16] 肖良品, 刘显明, 刘启顺, 等. 用于亚硝酸盐快速检测的三维纸质微流控芯片的制作 [J]. *食品科学*, 2013, 34(22): 341-345.

[17] Liu C C, Wang Y N, Fu L M, et al. Microfluidic paper-based chip platform for benzoic acid detection in food [J]. *Food Chemistry*, 2018, 249: 162-167.

[18] 林炳承. 微流控芯片的研究及产业化 [J]. *分析化学*, 2016, 44(4): 491-499.

[19] 周拙恒, 张博. 微流控液相色谱 [C]. 全国色谱学术报告会及仪器展览会, 2015.

[20] 王新珏, 祝莹, 方群. 基于微流控芯片的色谱技术的研究进展及其应用 [J]. *色谱*, 2011, 29(2): 99-104.

[21] Weng W, Chen H. Detecting pit defects on rail surface using a fast detection algorithm based on relative gray value [C]. *International Conference on Information Science and Electronic Technology*, 2015.

[22] 沈继忱, 王雪晴, 刘邦利, 等. 基于图像比色法的有色溶液浓度检测方法的研究 [J]. *光学仪器*, 2008, 30(2): 9-12.

[23] 张洁, 陈晓敏, 徐桂花, 等. 亚硝酸盐快速检测试纸的研制 [J]. *食品科技*, 2010(8): 344-346.

[24] 叶嘉明, 邵佳美, 杨平, 等. 用于农残快速检测的离心式微流控芯片研制 [J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 292-297.

[25] 李文, 牛彪, 洪陵成. 顺序流动环定量注射分析技术测定水中亚硝酸盐 [J]. *分析实验室*, 2011, 30(12): 70-73.