

分类号

学校代码: 10112

密 级:

太原理工大学

博士学位论文

基于智能手机数字图像比色法的即时检测
技术与仪器研究

姓 名: 李海琴

学 号: 2018310142

培养单位: 生物医学工程学院

学 科: 生物医学工程

研究方向: 生物医学即时检测

指导教师: 李晓春 教授

论文提交日期: 2022 年 6 月

A Dissertation Submitted to
Taiyuan University of Technology
In partial fulfillment of the requirement
For the degree of Doctor

**Research on point-of-care testing technology and
instrument based on smartphone digital image colorimetry**

College of Biomedical Engineering
June 2022

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已发表或撰写过的科研成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：李海彦

签字日期：2022年6月21日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者和指导教师完全了解太原理工大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版；允许本学位论文被查阅和借阅；学校可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于：保密 ☐ 在___年解密后适用本授权书

不保密 ☒

论文作者签名：李海彦

导师签名：李皓青

签字日期：2022年6月21日

签字日期：2022年6月21日

学位论文答辩信息表

论文题目	基于智能手机数字图像比色法的即时检测技术与 仪器研究		
答辩日期	2022 年 6 月 10 日	答辩秘书	孟雪娟
学位论文答辩委员会成员			
姓名	职称	工作单位	备注
刘震	教授	南京大学	主席
夏帆	教授	中国地质大学	委员 1
张献明	教授	太原理工大学	委员 2
陈维毅	教授	太原理工大学	委员 3
安美文	教授	太原理工大学	委员 4

摘要

即时检测（point-of-care testing, POCT）技术由于具有检测实时性高、无需依赖专业设备、综合成本较低等优势，在医学诊断、食品安全、环境监测及公共安全等领域发挥着重要作用。其中，数字图片比色法因操作简单、获取结果快速，被广泛应用于即时检测技术中。而智能手机的广泛普及和性能提升为基于数字图片比色法的即时检测技术开拓了新的思路。

然而，在实际应用过程中，基于智能手机的数字图片比色分析系统仍有不足之处：

（1）外界光照环境不稳定及手机型号不同，导致获取的比色图像存在差异，进而影响比色分析结果的准确性，是目前智能手机的数字图片比色分析亟待解决的关键问题；（2）在多指标的比色反应体系中，通常将颜色信息转换成灰度值实现检测，存在检测准确度低的问题；（3）在便携式纸基荧光检测系统中，激发光源强度不足、激发光源不均匀性、纸基本身固有荧光背景等因素是影响纸基荧光分析灵敏度、准确性的痛点问题，也是提高纸基荧光分析信噪比的最大挑战。在本研究中，我们从色度学体系、生化传感器制备、生物芯片设计、检测硬件系统和软件系统等多个方面展开工作，解决了智能手机数字图片比色法存在的问题并实现了其在即时检测技术中的应用。具体研究内容如下：

1. 根据研究，pH 显色属于颜色色调发生变化的显色体系，以 pH 检测为例，为色调发生变化的显色体系提出了颜色“主波长”比色分析新指标。针对智能手机数字图片比色分析受外界环境光照、手机型号等不同因素的影响，设计了集成光学系统，研发了颜色纠正算法。本章针对 pH 试纸检测准确度低及传统 pH 计检测操作繁琐、试剂用量大等问题，提出了将智能手机与 pH 试纸条相结合的 pH 测量新方法。通过建立 pH 值与主波长值之间的对应关系实现了 pH 值的高精度测量，检测精度达到了 0.05 单位 pH。分别利用本检测系统与 pH 计对实际样本进行测定，通过构建 Bland-Altman 图对二者检测结果进行分析，两种检测方法所测值的差异在 $\pm 1.96SD$ 范围内，验证了本系统在测定 pH 值时的准确性与可靠性。该检测系统将商用试纸与智能手机数字图片比色分析巧妙结合，为即时医疗诊断、环境监测等领域 pH 值现场快速高精度测量提供了新平台。

2. 在解决了智能手机数字图片比色法应用过程中外界光环境等因素的影响，通过建立对多指标体系进行多色度学参数的精确分析方法，开发了基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统。尿常规检查是医学检查“三常规”项目之一，对代谢系统疾病、肾脏疾病等慢性疾病的临床诊断、诊疗判断及长期监测具有重要意义，开发一种居家尿常规检测系统势在必行。本章中将智能手机与商用尿液试纸条相结合

创新性地研发了基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统。通过 3×3 阵列式试纸布局设计，不仅可以多指标同时定量还可以在缩小装置的同时更易获取比色分析所需均匀光照；根据 9 项尿液指标显色变化特点针对性地选择最优色度值进行“一键式”定量检测。以葡萄糖、微量白蛋白、肌酐 3 种指标的加标样品为例与紫外分光光度计检测结果进行对比，一致性均达到了 98% 以上。为了评估该系统的可靠性与实用性，分别利用该检测系统与医院中的 H-800 Urine Analyser 尿干化学分析仪对 100 例实际样本的尿常规指标进行检测，通过 ROC 曲线分析了两种方法检测结果较高的一致性。该系统作为一种基于移动平台的尿常规筛查技术，为尿液指标居家检测提供了全新的方案和手段，具有巨大实际应用价值。

3. 为了进一步提高检测灵敏度，开发了智能手机 ZnO 纳米线纸基荧光传感平台。与普通滤纸相比，玻璃纤维滤纸的低荧光背景使其更适用于定量荧光分析。本研究利用“水热法”首次在玻璃滤纸基上合成了氧化锌纳米线，实现了荧光增强，解决了纸基荧光检测存在信噪比低的问题；结合纸基微流控技术，成功制备了高通量阵列式荧光生物芯片；研制了便携式荧光传感分析仪，通过巧妙设计环形贴片式激发光源，解决了便携式荧光传感平台存在的激发光源强度不足、激发不均匀等痛点问题。同时，开发了智能手机荧光阵列检测软件“H-T Fluorescence Detect”实现了荧光图像的精准获取和分析。使用聚合物量子点 CN-PPV 对高通量荧光检测系统进行了验证，证明了检测系统氧化锌纳米线荧光增强提高检测灵敏度的可行性。最后，利用开发的基于智能手机的高通量纸基微流控荧光分析装置实现了兔 IgG 的定量检测，实验结果显示，氧化锌纳米线纸基上兔 IgG 的检测限比纯玻璃滤纸的检测限提高了 10 倍，验证了该检测系统的可靠性。该基于智能手机的纸基免疫荧光传感平台无需复杂的制备过程，玻璃滤纸氧化锌纳米线的低背景、荧光增强作用为高信噪比、高灵敏度生化分子检测提供了一种新方法，在医学诊断、食品安全及环境监测领域有广阔的应用前景。

关键词：即时检测；数字图片比色法；pH 检测；尿常规检测；纸基荧光免疫传感；智能手机

ABSTRACT

Point-of-care testing (POCT) plays an important role in medical diagnosis, food safety, environmental monitoring and public safety due to its advantages of high real-time detection, no need to rely on professional equipment, and low comprehensive cost. Among them, digital image colorimetry is widely used in real-time detection technology because of its simple operation and quick results. The widespread popularity and performance improvement of smartphones have opened up new ideas for POCT based on digital image colorimetry. However, in practical application, the digital image colorimetric analysis system based on smartphone still has some shortcomings: (1) The unstable external lighting environment and different mobile phone models lead to differences in the obtained colorimetric images, which in turn affects the accuracy of the colorimetric analysis results. This is the key problem to be solved urgently in the colorimetric analysis of digital images of smartphones. (2) In the multi-index colorimetric reaction system, the color information is usually converted into gray value to realize the detection, which leads to the problem of low detection accuracy. (3) In the portable paper-based fluorescence detection system, such as insufficient excitation light source intensity, non-uniformity of excitation light source, and inherent fluorescence background of paper-based fluorescence analysis are the pain points that affect the sensitivity and accuracy of paper-based fluorescence analysis, and these are also the biggest challenges to improve the signal-to-noise ratio of paper-based fluorescence analysis. In this research, we work from the aspects of colorimetric system, biochemical sensor preparation, biochip design, detection hardware system and software system to solve the problems of smartphone digital image colorimetry and realize its application in point-of-care detection technology. The specific research contents are as follows:

1. According to research, pH color development belongs to the color development system in which the color tone changes. Taking pH detection as an example, a new colorimetric analysis index of color "dominant wavelength" is proposed for the color rendering system with changing hue. In view of the influence of different factors such as external ambient light and mobile phone model on the colorimetric analysis of smartphone digital images, an integrated optical system was designed, and a color correction algorithm was developed. Aiming at the low detection accuracy of pH test paper, the cumbersome operation of traditional pH meter, and the large amount of reagents, a new method for pH measurement that combines smartphones and

pH test strips is proposed. By establishing the corresponding relationship between the pH value and the dominant wavelength value, the high-precision measurement of the pH value is realized, and the detection accuracy reaches 0.05 pH units. The actual samples were measured by the detection system and the pH meter respectively, and the detection results of the two were analyzed by constructing a Bland-Altman diagram. The difference between the measured values of the two detection methods is within the range of $\pm 1.96SD$, which verifies the accuracy and reliability of the system in the determination of pH value. The detection system cleverly combines commercial test strips with smartphone digital image colorimetric analysis, providing a new platform for fast and high-precision on-site pH measurement in immediate medical diagnosis, environmental monitoring and other fields.

2. The influence of factors such as external light environment in the application process of smartphone digital image colorimetry is solved. By establishing an accurate analysis method for multi-index multi-colorimetric parameters, a smartphone-based array test strip urine multi-index quantitative detection system was developed. Routine urine examination is one of the "three routines" items of medical examination. It is of great significance to the clinical diagnosis, treatment judgment and long-term monitoring of chronic diseases such as metabolic system diseases and kidney diseases. It is imperative to develop a home urine routine detection system. In this chapter, a smartphone-based array test strip urine multi-index quantitative detection system is innovatively developed by combining smartphones with commercial urine test strips. Through the layout design of the 3×3 array test strips, it can not only quantify multiple indicators at the same time, but also make it easier to obtain uniform illumination required for colorimetric analysis while reducing the size of the device. According to the color change characteristics of 9 urine indicators, the optimal chromaticity value was selected for "one-click" quantitative detection. Taking the spiked samples of glucose, microalbumin, and creatinine as an example, the results were compared with the detection results of UV spectrophotometer, and the consistency reached more than 98%. In order to evaluate the reliability and practicality of the system, urine routine indexes of 100 actual samples were detected by the detection system and H-800 Urine Analyser in the hospital, respectively. The ROC curve was used to analyze the high consistency of the detection results of the two methods. As a urinalysis screening technology based on mobile platform, the system provides a new scheme and means for urine indicators home detection, and has great practical application value.

3. To further improve the detection sensitivity, the ZnO nanowire paper-based fluorescence sensing platform for smartphones was developed. Compared with ordinary filter paper, the low fluorescence background of glass fiber filter paper makes it more suitable for quantitative

fluorescence analysis. In this study, ZnO nanowires were synthesized on glass filter paper for the first time by "hydrothermal method", which achieved fluorescence enhancement and solved the problem of low signal-to-noise ratio in paper-based fluorescence detection. Combined with paper-based microfluidic technology, a high-throughput array fluorescent biochip was successfully prepared. A portable fluorescence sensing analyzer has been developed. By cleverly designing a ring-shaped patch-type excitation light source, the pain points of the portable fluorescence sensing platform such as insufficient excitation light source intensity and uneven excitation have been solved. At the same time, the smartphone fluorescence array detection software "H-T Fluorescence Detect" was developed to achieve accurate acquisition and analysis of fluorescence images. The high-throughput fluorescence detection system was validated using polymer quantum dots CN-PPV, which demonstrated the feasibility of fluorescence enhancement of ZnO nanowires to improve the detection sensitivity. Finally, the quantitative detection of rabbit IgG was realized by using the developed smartphone-based high-throughput paper-based microfluidic fluorescence analysis device. The experimental results show that the detection limit of rabbit IgG on the ZnO nanowire paper is 10 times higher than that of pure glass filter paper, which verifies the reliability of the detection system. This smartphone-based paper-based immunofluorescence sensing platform does not require complicated preparation procedures. The low background and fluorescence enhancement of ZnO nanowires on glass filter paper provide a new method for high signal-to-noise ratio and high sensitivity biochemical molecular detection, which has broad application prospects in the fields of medical diagnosis, food safety and environmental monitoring.

Keywords: POCT; Digital image colorimetry; pH determination; Urine routine test; Paper-based fluorescent immunosensing; Smartphone

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪论	1
1.1 即时检测的研究背景与意义	1
1.2 基于智能手机检测平台的生化传感	1
1.2.1 智能手机显微成像传感	3
1.2.2 智能手机分光光度分析	6
1.2.3 智能手机环境光传感器	8
1.2.4 数字图片比色传感	10
1.2.5 智能手机荧光传感	22
1.3 本文的主要内容	25
第 2 章 基于智能手机和颜色主波长比色分析的 pH 高精度定量检测	29
2.1 研究背景	29
2.2 智能手机检测系统的开发与实现	31
2.2.1 Android 操作系统介绍	31
2.2.2 应用程序开发	32
2.3 智能手机 pH 高精度定量检测系统的设计与开发	32
2.3.1 基于 CIE 1931 颜色空间的主波长值计算原理分析	32
2.3.2 智能手机 pH 高精度定量检测仪光学装置设计	34
2.3.3 智能手机图像分析算法应用程序实现	36
2.3.4 智能手机 pH 高精度定量检测仪性能评价	37
2.4 实验部分	39
2.4.1 实验试剂与仪器	39
2.4.2 pH 溶液的配制与实验过程	40
2.5 结果与讨论	42
2.5.1 基于智能手机的不同范围 pH 值的高精度定量检测	42
2.5.2 实际样品检测及与标准检测方法的对比	45
2.6 本章小结	47
第 3 章 基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测	49
3.1 研究背景	49

3.2 智能手机阵列式试纸尿液多指标定量检测仪的总体设计与制备.....	51
3.2.1 智能手机阵列式试纸尿液多指标定量检测仪开发.....	51
3.2.2 阵列式试纸检测手机应用程序的开发与实现.....	52
3.3 实验部分.....	53
3.3.1 实验试剂与仪器.....	53
3.3.2 九项尿液指标标准品的配制.....	54
3.3.3 九项尿液指标检测.....	55
3.4 结果与讨论.....	56
3.4.1 阵列式显色基底的制备.....	56
3.4.2 九项尿液指标标准品的定量检测.....	58
3.4.3 葡萄糖、微量白蛋白、肌酐加标样品检测与紫外分光光度法比较	60
3.4.4 智能手机阵列式试纸检测系统与医院中尿干化学分析仪对比.....	62
3.5 本章小结.....	63
第 4 章 智能手机 ZnO 纳米线纸基荧光传感平台的构建.....	65
4.1 研究背景.....	65
4.2 智能手机高通量荧光检测系统的搭建.....	66
4.2.1 荧光检测光学系统的设计与制备.....	66
4.2.2 荧光高通量检测 Android 应用程序的开发与实现.....	69
4.3 实验试剂及实验仪器.....	70
4.3.1 实验试剂.....	70
4.3.2 实验仪器.....	70
4.3.3 氧化锌纳米线纸基的表征方法.....	71
4.4 结果与讨论.....	71
4.4.1 玻璃滤纸表面氧化锌纳米线的合成.....	71
4.4.2 氧化锌纳米线的荧光信号增强作用验证.....	76
4.4.3 高通量滤纸生化芯片的制备.....	77
4.4.4 基于智能手机的氧化锌纳米线免疫纸基分析装置测定兔免疫球蛋白 (IgG)	79
4.5 本章小结.....	85
第 5 章 总结与展望.....	87
5.1 工作总结.....	87
5.2 进一步的工作和展望.....	88
参考文献.....	89
攻读学位期间取得的研究成果.....	99

致 谢	101
-----------	-----

第1章 绪论

1.1 即时检测的研究背景与意义

近年来,随着工业化、城镇化、人口老龄化进程不断加快,居民生活方式、生态环境和食品安全等对健康造成的影响已不容忽视,心脑血管疾病、癌症、慢性呼吸系统疾病、糖尿病等慢性疾病已成为严重威胁我国居民健康、影响国家经济社会发展的重大公共卫生问题。因此,疾病的早期诊断、定期监测和个性化治疗在控制疾病暴发、提高患者生存率方面发挥着越来越重要的作用。然而,传统的医疗诊断通常基于中心实验室的检测,其不仅需要大型的仪器设备,还需要经过专业培训的操作人员。另外,由于检测前复杂的样本和试剂制备,患者往往需要等待数天才能得到检测结果^[1, 2],尤其是在资源有限的环境中缺乏诊断工具仍然是疾病诊断和治疗的主要障碍之一。随着微纳米技术、生物技术、计算机技术、信号处理技术的融合,在不断增长的实时监测需求的推进下,医疗诊断技术正在逐渐从集中的医疗中心向个人家庭转移。因此,开发低成本、高效、快速的便携式诊断设备来替代传统的实验室诊断设备已成为一个热门的研究课题。

即时检测 (point-of-care testing, POCT),是指通过使用快速、便携的分析仪器和辅助试剂,能够在采样现场即刻获得检测结果的一种体外检测方法,是医学诊断领域快速发展的一门学科,作为一种用于诊断分析和临床应用的新型检测技术正在兴起^[1]。POCT 的独特优势如下:(1)操作简单,不需要经过专业培训的操作人员;(2)快速得到检测结果;(3)便携、低成本的检测仪器;(4)使用的便利性,尤其是在资源匮乏的地区;(5)低能耗、低试剂量消耗。POCT 的这些特点使其在传染性疾病和慢性病的诊断和控制中发挥了不可或缺的作用^[3, 4],尤其是在医疗资源匮乏的国家和地区,POCT 将在传感检测中发挥巨大的作用。

1.2 基于智能手机检测平台的生化传感

许多商用的非移动 POCT 系统在过去的十几年中已经被开发出来,但是,大多数 POCT 技术仍然没有在市场上广泛推广。这是由于 POCT 产品的集成化和自动化程度不能满足现场快速检测的需求,同时这也限制了其在全球医疗诊断领域的广泛应用。自 1973 年马丁·库珀 (Martin Cooper) 在摩托罗拉 (Motorola) 展示了第一款功能手机以来^[5],智能手机快速进入消费市场^[6],手机已经成为日常生活的重要支柱。根据国际电

信联盟（International Telecommunication Union, ITU）的数据，全球有超过 78 亿活跃的手机用户，智能手机与人们的生活已经密不可分^[7]。随着电子通信技术、制造技术、人工智能算法的进步和发展以及市场上的推动下，智能手机不再仅仅是用作通讯工具，更是一种功能强大的个人手持式终端设备，向个人或微型计算机的方向发展^[8]。它不仅配备多核快速处理器、独立的操作系统及高容量运行空间，还具有光学成像系统、光线传感器、距离传感器、加速计等多种类型的传感器用于检测和测量^[6]。此外，智能手机具有开放的操作平台，使得开发人员可以根据自身需求编写 App；还可以通过各种无线传输方式向个人或云端传输数据，实现数据获取、存储并实时共享。

智能手机产业的蓬勃发展给 POCT 技术带来了新的机遇，相比较于非移动 POCT 检测系统，基于智能手机的 POCT 检测技术具有以下优点：（1）轻量便携、易操作，适用于快速检测，能够面向基层及普通个人用户，更易推广；（2）强大的图像及数据处理功能，摒弃了检测仪依赖于电脑的缺陷；（3）智能手机可以使用有线连接或者无线连接的方式来共享数据，同时检测结果可以自动保存在云服务器上，更有利于达成数据共享，建立线上诊疗平台。这些特点促进了其在 POCT 中的广泛应用。

随着对便携、高效、低成本检测需求的增加，智能手机在疾病诊断、食品安全、环境监测、公共安全等领域显示出巨大潜力^[9]。如图 1-1 所示，基于智能手机的生化分子检测传感器主要可以分为显微成像分析、光谱分析、环境光传感、比色分析、荧光分析等。接下来详细阐述智能手机生化传感平台的具体应用。



图 1-1 智能手机快速诊断领域：免疫分析、尿液分析、兽医学、食品安全、环境监测、生物恐怖主义、药物滥用^[9]

Fig. 1-1 The array of rapid diagnostics: immunoassays, urinalysis, veterinary medicine, food safety, environmental monitoring, bioterrorism, drug abuse ^[9]

1.2.1 智能手机显微成像传感

高分辨率光学显微镜是对各种生物样本进行形态学分析和定量成像的有力工具，但现有的商用显微镜体积庞大、价格昂贵需要在中心实验室中由专业人员进行操作，使用门槛较高。这种方法的准确性和可靠性是毋庸置疑的，然而它极大限制了研究人员在检测现场对样本进行分析。近年来，研究者们通过开发各种便携式显微平台来克服这一限制，将其应用在细胞计数及形态分析、微生物计数等方面。

人体细胞具有丰富的功能和特性，在各种生理和病理过程中发挥着重要作用^[10]，对细胞特异性识别、细胞计数及细胞功能分析是生物医学诊断的重要方法^[11]。红细胞和白细胞计数是血常规中最常见的健康分析指标，为人体健康评估和疾病诊断提供了有效信息。早在 2011 年，Zhu 等报道了一种带有集成微流控装置的智能手机显微镜，如图 1-2 (a)，用于细胞计数，通过测量人体血液中的白细胞密度，成功验证了该系统。检测结果与商用血液分析仪 (Sysmex KX-21N) 的测量误差 <5%，具有很好的一致性^[12]。后来，Zhu 等进一步报道了一种多用途智能手机显微镜，用于测量白细胞和红细胞密度以及低容量人类血液样本中的血红蛋白，可以在 10 秒内确定细胞密度或血红蛋白并将检测结果存储在智能手机上，也可以无线发送到远程服务器进行进一步分析，结果与标准商用 Sysmex KN21 血液分析仪相当^[13]。为了能动态观察细胞形态和计数，2014 年 Balsam 等报道了一种通过集成微流控设备和网络摄像头成像的低成本流式细胞仪^[14]。随后，Zhang 等在前人的研究基础上进一步开发了对细胞运动进行成像的微型显微镜的系统，增加了荧光成像能力。这台升级的微型显微镜被有效地用于监测肝细胞的迁移和心脏细胞的搏动^[15]。2017 年 Knowlton 等提出了一种基于智能手机的磁聚焦荧光显微镜，能够通过磁聚焦与荧光成像并行进行基于密度的细胞分选，用于识别细胞类型和细胞活动，从而提供高度特异性的临床分析^[16]。以上技术通过在成像技术和分析技术上的改进实现了多种活细胞的成像与计数，如图 1-2 (b) 所示，2019 年 Kang 等设计了一款基于智能手机的现场便携式细胞计数器，将智能手机显微镜用于明场图像记录，首次同时实现细胞计数及活细胞和死细胞的区分。与血细胞分析仪、商用细胞计数器和流式细胞仪的结果相比，该装置在 105 cell/mL 和 107 cell/mL 的应用范围内准确检测细胞浓度和活力^[17]，为手机显微镜应用在临床诊断奠定了基础。Haan 等提出了一种深度学习框架，可以使用智能手机显微镜自动筛查血液涂片中的镰状细胞。该框架使用两个不同的、互补的深层神经网络。第一个神经网络增强并标准化了智能手机显微镜捕获的血液涂片图像，在空间和光谱上与实验室级台式显微镜的图像质量相匹配。第二个网络作用于第一个图像增强神经网络的输出，用于在血液涂片中的健康细胞和镰状细胞之间执行语义分割，然后使用这些分割图像实现镰状细胞性贫血症 (SCD) 的快速诊断。该工作中对 96 名患者对这种移动镰状细胞检测方法进行了盲测，准确率达到了 98%。由于其高精度度，这种移动且成本效益高的方法有可能在资源有

限的环境中用作 SCD 和其他血细胞疾病的筛查工具^[18] (图 1-2 (c))。显微观察药敏试验 (MODS) 是一种用于诊断结核病和药物敏感性的检测方法, 它是基于对在液体培养基中生长的结核分枝杆菌菌落特征条带的显微镜观察。需要使用倒置光学显微镜 (放大 100 倍) 来观察和解释 MODS 培养物。2022 年 Salgado 等设计了一款基于智能手机的 3D 打印光学倒置显微镜, 使用 226 张显微观察药敏试验 (MODS) 结核病 (TB) 阳性和 207 张 MODS TB 阴性数字图像对该系统进行评估, 这些图像是从 10 个 MODS 阳性的痰样本和 10 个 MODS 阴性的痰样本中获得的, 所有图像的质量均由医院中专业的技术人员进行评估, 评估其归类为肺结核阳性或阴性。通过智能手机 3D 打印倒置显微镜读取, 所有 20 个样本均被正确分类 (TB 阳性/阴性)^[19]。

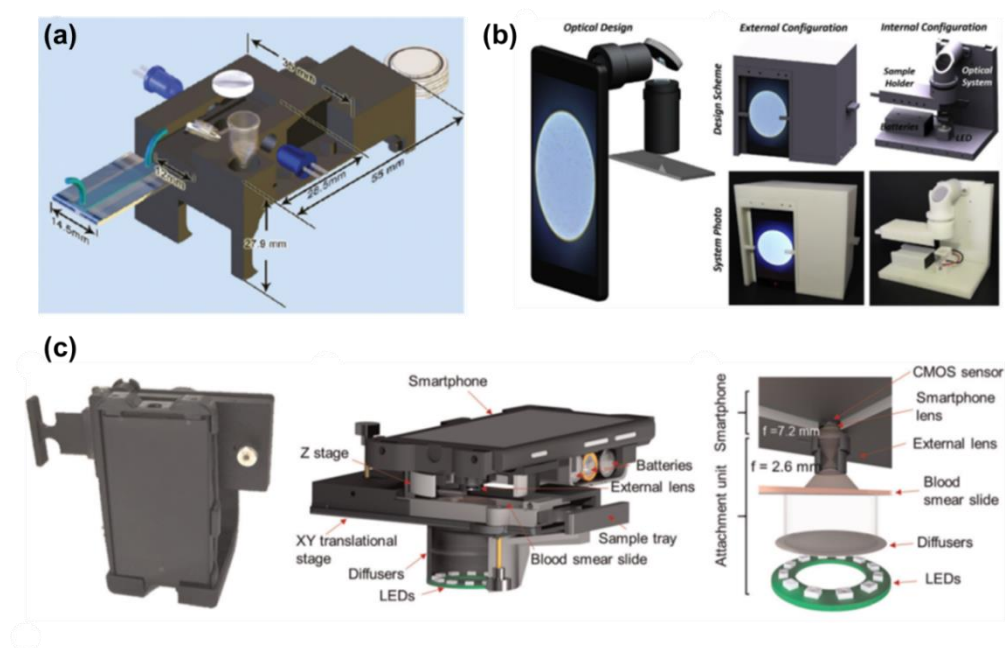


图 1-2 智能手机细胞识别和计数显微镜, (a) 人体血液中红细胞和白细胞计数^[12], (b) 活细胞和死细胞的区分与计数^[17], (c) 血液中镰状细胞筛查^[18]

Fig. 1-2 Smartphone cell identification and counting microscope, (a) red and white blood cell counts in human blood^[12], (b) distinction and counting of live and dead cells^[17], (c) sickle cells in blood screening^[18]

食物中或环境水样中细菌、病毒和寄生虫等病原体对人类健康构成了巨大威胁, 为了实现这些病原体的检测和定量, 用于评估食品安全及环境水样的质量。研究者们在该领域开展了一系列研究工作。2011 年 Ozcan 课题组开发了一个可用于水质分析的智能手机荧光成像系统, 如图 1-3 (a), 他们通过基于压缩采样理论对捕获的图像进行数字信号处理来提高分辨率, 并利用含有荧光标记的蓝氏贾第鞭毛虫作为病原体样本, 探索了该系统在水质监测中的潜在应用。他们的显微镜可以快速成像大量样本, 具有高度的特异性和灵敏度, 使其成为监测水质的一个有前途的工具^[20]。为了克服第一代手机荧光成像系统存在的缺陷, 2015 年该课题组又开发了一种基于智能手机的流动式

荧光计数平台，用于检测水样中完整的蓝氏囊藻。如图 1-3 (b) 所示，该平台上中包括三维样品架、激发过滤器、发射过滤器、Z 级旋转装置和外部消色差透镜等部件，可实现环境水样中样本的流动检测，并使用定制的智能应用程序将捕获的图像无线传输到服务器，以便根据机器学习算法自动计数标记的蓝氏囊藻，在于实验室流式细胞仪检测结果对比后，获得了约 79% 的平均捕获效率和约 84% 的灵敏度，检测限为每 10 毫升约 12 个蓝氏囊藻^[21]。目前，细菌感染依然是引起人类高发病率和高死亡率的主要原因，在细菌感染的诊断中，一个尚未满足的关键需求是以快速和定量的方式检测各种样本中稀缺的细菌病原体，尤其是在食品安全和水环境样本中的特异性细菌定量至关重要。2018 年 Shrivastava 等提出了一个强大、快速、无培养的智能手机细菌检测平台，利用荧光磁性纳米颗粒 (FMNPs) 的双重功能，通过智能手机成像同时在芯片上捕获和定量检测细菌。使用适体结合的 FMNPs，在定制细菌检测盒上从样本中选择性捕获金黄色葡萄球菌。在 10 分钟内直接从花生奶样品中有效捕获金黄色葡萄球菌，通过计数单个细菌，最小可检测浓度低至 10 cfu/mL。当使用掺有其他病原菌的样品研究检测的选择性时，没有发生明显的非特异性检测。因此，该智能手机上的定量荧光成像平台可以实现对细菌的现场检测，有助于在食品安全调查、诊断微生物学和环境监测等领域的应用^[22]。与以上技术路线类似，2019 年 Wang 的团队提出了一种基于智能手机的荧光磁免疫分析系统，如图 1-3 (c)，用于在线灵敏检测鼠伤寒沙门氏菌 (ST)。为了提高检测的准确度，使用纳米磁珠从含有杂质的样品中分离 ST。智能手机被用来处理荧光视频，以便快速在线检测。该系统能够在 $1.4 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^6$ cfu/mL 的范围内实现 ST 的高性能检测，检测限为 58 cfu/mL^[23]。

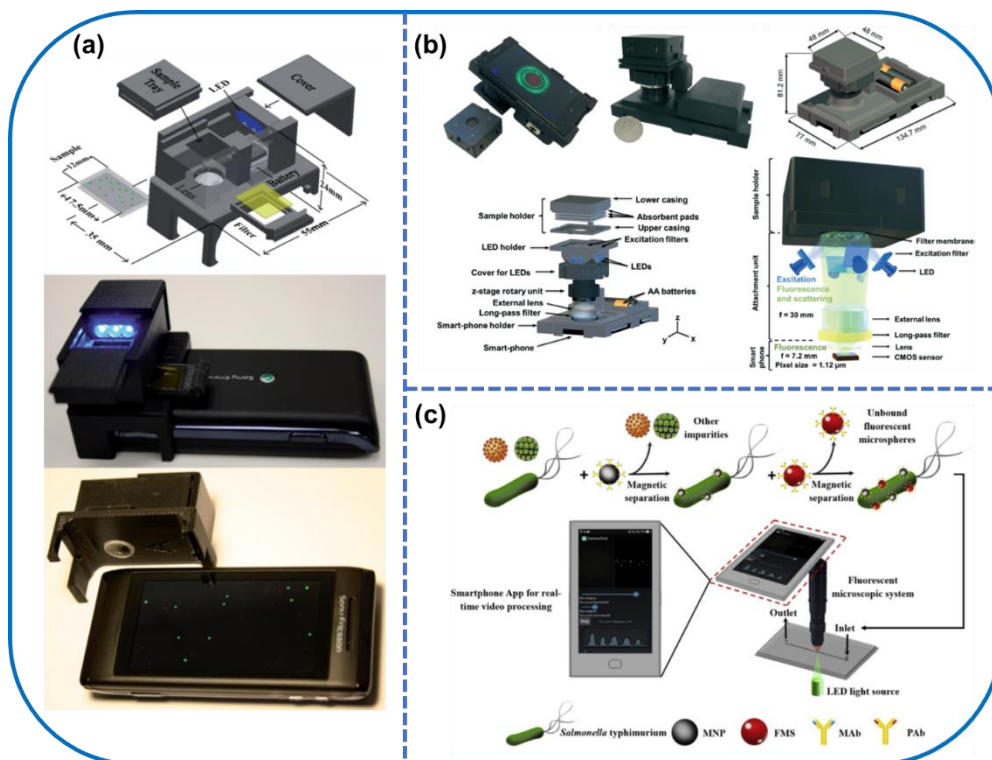


图 1-3 智能手机显微镜微生物计数, (a) 贾第鞭毛虫^[20], (b) 蓝氏囊藻^[21], (c) 伤寒沙门氏菌^[23]

Fig. 1-3 Smartphone microscope microbial counts, (a) *Giardia*^[20], (b) *Cyanocystis*^[21], (c) *Salmonella typhi*^[23]

综上所述，智能手机显微镜在光学成像系统、便携性和低成本等技术上不断改进，取得了很大进展，在病原体、微生物等的初步检测方面也显示出巨大的潜力，然而，在被接受为商业显微镜“替代品”之前，仍然有一些挑战需要克服。智能手机显微镜存在的主要问题是特定情况下缺乏准确性，以及这些已经开发的装置性能的现场检测验证仍然有限。

1.2.2 智能手机分光光度分析

分光光度分析是一种通过不同生化分析物在特定波长下的吸光度来量化分析物浓度的一种方法，图 1-4 概述了基于智能手机的光谱系统所涉及的仪器和检测流程。最初来自光源（卤素灯、手机手电筒或阳光）的光根据各自的光谱形态与样品相互作用。然后，使用透射或反射元件（通常为光栅或棱镜）分散样品调制光（反射或透射），并进入相机光圈，然后由手机的 CMOS 传感器捕捉。光谱以图像的形式显示在智能手机的显示单元上，然后对光谱进行数字处理，完成像素到波长的转换，以获得相应的吸光度-波长曲线。最后，结果保存在手机存储器中或传输到所需位置。其中，外部光学元件（如透镜、狭缝、光栅）可以封装在定制设计的支架，支架可以通过 3D 打印制作并连接到智能手机上。支架的设计主要取决于功能部件在智能手机中的位置。这一要

求对开发通用智能手机传感系统构成了重大挑战,因为这些功能部件的位置因手机而异。这些光谱系统的光学设计和配置经过优化,便于与智能手机集成^[24]。智能手机技术的快速发展使光谱检测技术得以集成,近年来,几个研究小组开发了基于智能手机的高分辨率光学光谱平台,并展示了它们在不同领域生化分子检测中的可行性。

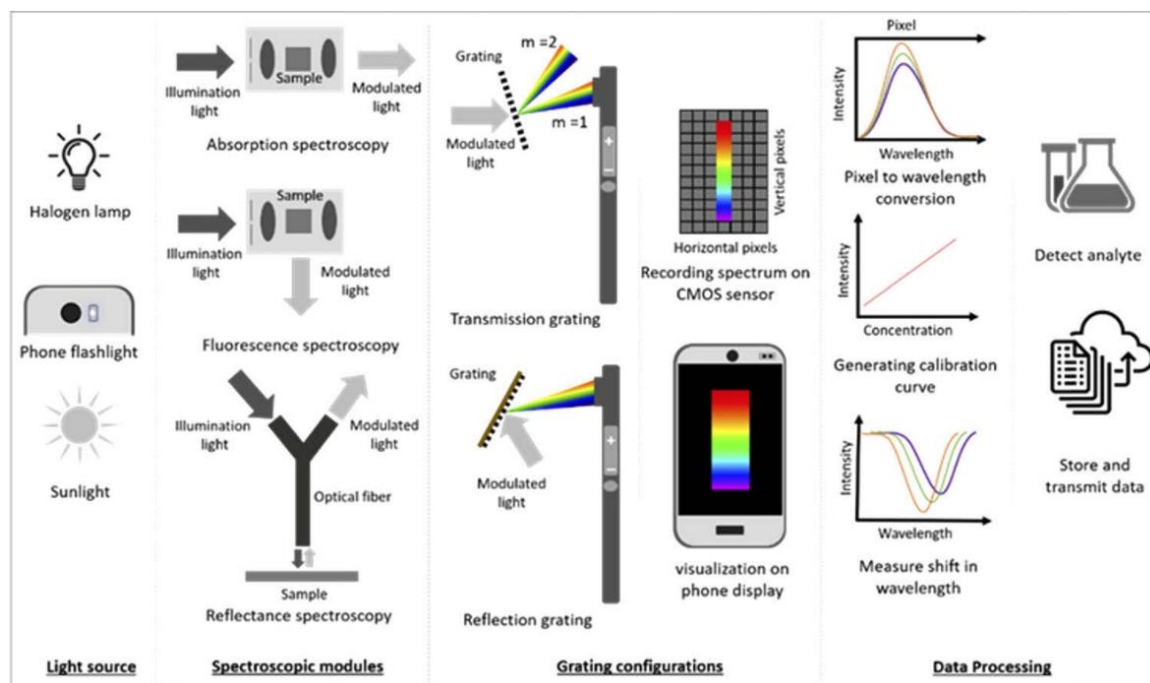


图 1-4 不同智能手机光谱系统中使用的配置概述^[24]

Fig. 1-4 Overview of possible configurations used in different smartphone spectroscopic systems^[24]

2008 年, Wang 等通过在智能手机相机镜头上安装透射光栅作为波长选择元件,展示了智能手机在可见光光谱方面的首次应用^[25]。所有智能手机摄像头都包含一个内置镜头单元,用于将光线从物体聚焦到传感器;因此,开发智能手机光谱仪最简单的方法是将色散元件直接放在手机摄像头前面,以捕获波长光谱。Smith 等利用这种原理展现了智能手机光谱仪的首次生物医学应用^[26]。随后, Long 等使用类似的技术进行酶联免疫吸附实验(ELISA),ELISA 试验中的抗体-抗原相互作用会对液体样本产生比色变化,波长的吸收在捕获的光谱中产生暗带,相应波长处也会产生较大的吸光度值^[27]。然而,智能手机光谱仪由于受到自带相机非线性灵敏度的影响,导致光谱的不准确性。2018 年 Ding 等采用了波长校准和强度校正两种方法来提高光谱精度,通过将罗丹明 B 的荧光光谱和吸收光谱与标准商用光谱仪进行比较,对校准后的智能手机光谱仪进行测试。同时,通过对肌酐的定量检测,证明了该装置在医疗诊断应用中的可行性^[28]。在手机光谱仪搭建中,光源所覆盖的波长范围会影响光谱的完整性,为了实现吸收光谱在可见光谱范围内的完整和均匀性,2019 年 Jian 等提出了一种基于日光的手持智能手机光谱仪。如图 1-5(a)所示,设备首先收集阳光,使其穿过样品,然后透射光在

光栅上照亮，产生光谱，最终由智能手机摄像头记录。所有光学元件都与智能手机组装在一起，以集成尺寸为 $140.2\text{ mm} \times 67.4\text{ mm} \times 80.5\text{ mm}$ 的手持设备。此外，还开发了智能手机应用程序，用于自动光谱校准、检测、分析和显示。与白光发光二极管和卤素灯相比，阳光在整个可见光谱范围内分布更均匀；此外，该装置还避免了宽带光源的体积过大的问题。并将其应用在禽流感病毒 H7N9 和猪圆环病毒 2 型抗体的检测方面，证明该设备具有相当高的灵敏度^[29]。光谱设备和移动终端之间的数据传输对于实现手持式现场水平监测至关重要。目前，在线（OTG）通信技术是一种方便、高效的移动设备数据传输方法。然而，很少有人通过 OTG 端口将光谱设备与智能手机联系起来。2022 年 Wang 等开发了一款便携式成像光谱仪，在可见-近红外波段（400~1000 nm）的光谱分辨率约为 12 nm。它可以通过 USB-OTG 端口连接到智能手机，通过智能手机的芯片系统（SoC）处理光谱信号，它还通过智能手机屏幕显示食品样本的实时光谱图像（图 1-5（b））。使用支持向量机（SVM）对各种实验样本（如鸡蛋和猪肉）的光谱进行分类，模型预测准确率约为 90%。这进一步证明了智能手机成像光谱仪用于现场监测食品样本新鲜度的可靠性^[30]。

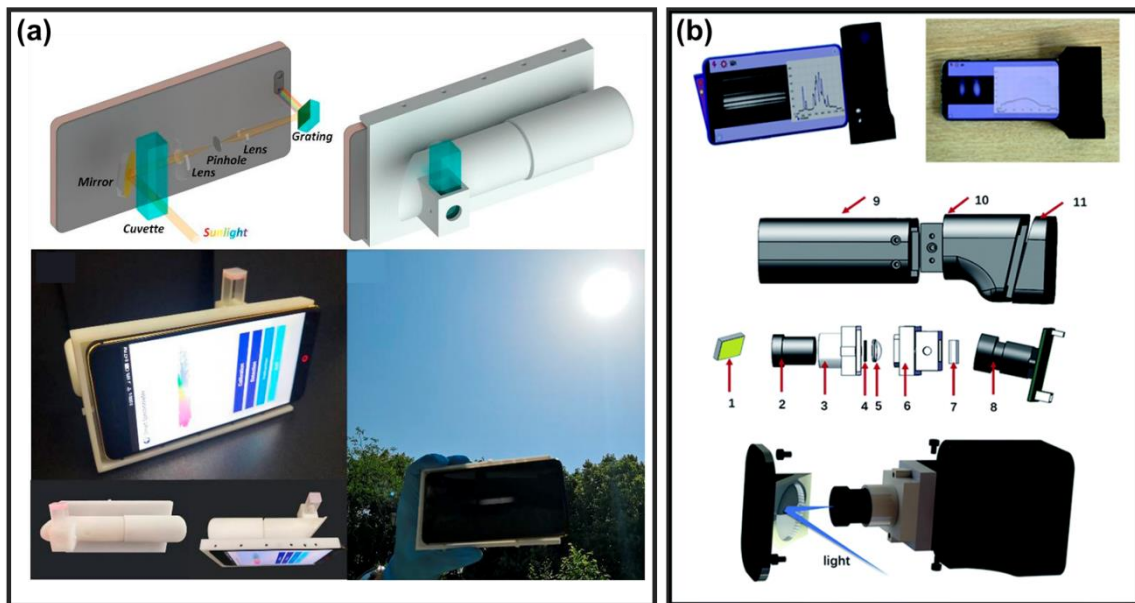


图 1-5 基于智能手机的便携式光谱平台。(a) Jian 等开发的以日光为光源的手持智能手机光谱仪^[29]，(b) Wang 等开发的 OTG 端口在线智能手机光谱仪^[30]

Fig. 1-5 Smartphone-based portable spectroscopy platform. (a) A handheld smartphone spectrometer developed by Jian et al.^[29], using sunlight as the light source, (b) OTG port online smartphone spectrometer developed by Wang et al.^[30]

1.2.3 智能手机环境光传感器

与使用手机摄像头基于成像原理的检测目标分析物的技术相比，利用智能手机的环境光传感器（ALS）在样本量小、易于设备制造和光学设计简单等方面具有一定的

优势。与智能手机摄像头的 CMOS 图像传感器类似, 智能手机的 ALS 是一种潜在的内置传感器, 通过测量光照强度来检测和分析不同类型的分析物, 为开发低成本传感设备提供新的机会。

Park 等报道了一种基于智能手机的集免疫印迹分析与光纤环境光生物传感器于一体的免疫传感系统, 首次用于骨关节炎标志物检测。在他们的工作中, 白色 LED 灯作光源, 智能手机的环境光传感器被用作探测器。HRP 酶诱导尿中 II 型胶原 C 端肽 (uCTX II) 不溶性沉淀物的产生, 这些沉淀物随着分析物浓度的增加而增加, 这些沉淀物会干扰通过样品的入射光, 导致光信号强度的变化。随着 uCTX-II 浓度范围从 0~10 ng/mL 变化, 光强值发生明显变化, 结果具有高度可重复性^[31]。随后, 该课题组进一步报道了一种基于智能手机的 ELISA 装置, 用于骨关节炎标志物尿中 II 型胶原 C 端肽 (uCTX II) 检测。然而, 与他们之前报道的工作相反, 由于智能手机的 ALS 能够在很宽的波长范围内响应, 而不需要额外提供单色或多色光源。如图 1-6 (a) 所示, 使用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 制作生物传感通道, 对样品进行了定量分析^[32]。Chen 等报告了一种与智能手机的 ALS 集成的比色阅读器, 如图 1-6 (b), 用于通过 ELISA 监测真菌毒素玉米赤霉烯酮, 在这项工作中, 可以实现对样本的高通量检测, 检测限为 2.01 ng/mL^[33]。2018 年 Zhao 等首次提出了一种透明的横向流动测试条, 结合基于智能手机的环境光传感器, 用于检测酶抑制和磷酸化程度。该平台可同时测量酶总量和酶活性, 以监测有机磷农残^[34]。上述基于智能手机环境光传感器的检测系统验证了其在生化分子检测中的可行性, 然而, 它们都只能实现单一模式下的检测。Gul 等报道了一个基于智能手机环境光传感器 (ALS) 的多模态分析 3D 打印平台 (3D-PMA), 首先使用微量滴定板读取器验证了该平台, 随后使用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 板条、比色皿和玻璃纤维膜作为样本容器测量卤代醇脱卤酶活性也证明其应用潜力。在 1, 3-二氯-2-丙醇 (1, 3-DCP) 的实际样品检测中, 加标河水中的回收率在 101.95~109.70% 之间, 在证明适用于液相分析之后, 利用 3D-PMA 还针对使用玻璃纤维膜检测 1, 3-DCP 进行了优化, 可使用 10 μ L 样本进行检测, 检测时间为 2 分钟, 检测限达到了 80 μ M。该平台体积小, 在低成本便携式系统对于不同生物和环境样品的传感中具有巨大潜力^[35]。

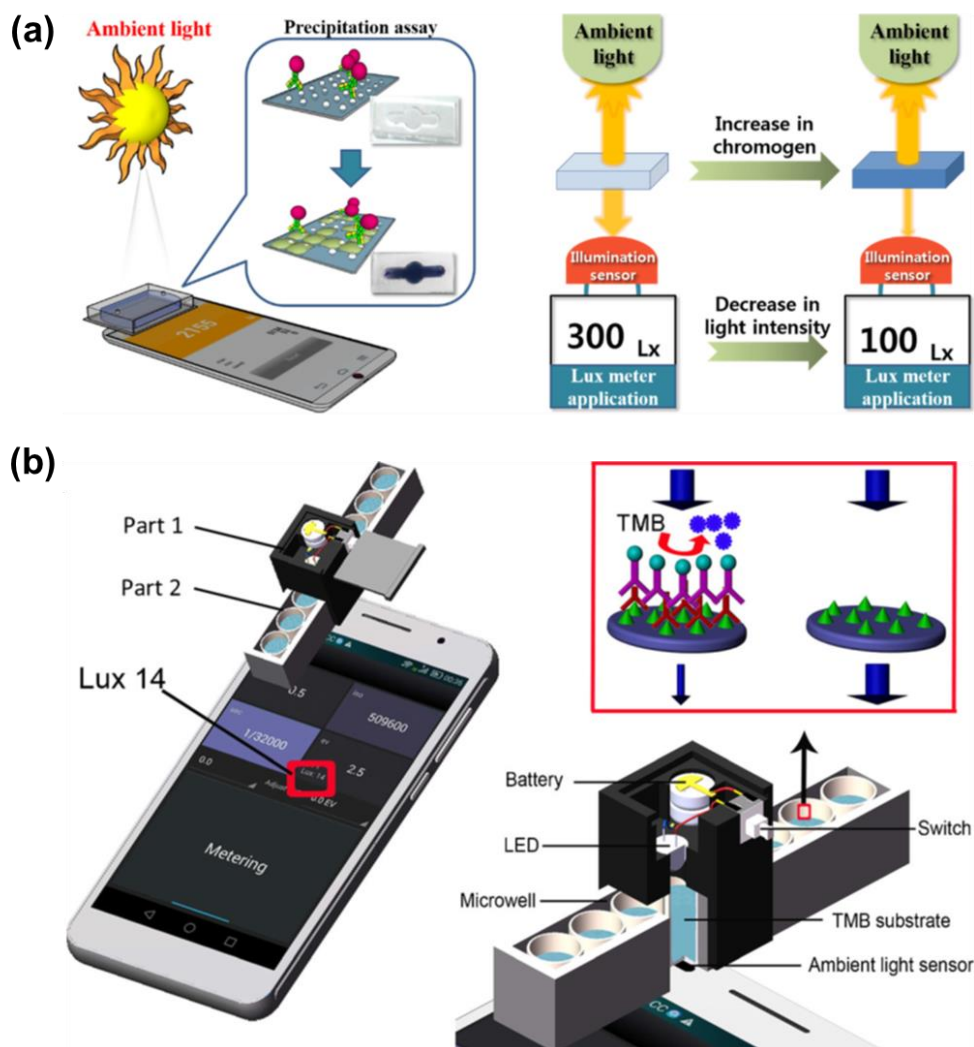


图 1-6 智能手机环境光传感器生化检测系统。(a) Park 等课题组以环境光为光源开发的用于骨关节炎标志物 uCTX II 检测的环境光传感器^[32], (b) Chen 等基于 ELISA 原理实现玉米中赤霉烯酮检测的高通量光环境传感系统^[33]

Fig. 1-6 Figure 1-6 Smartphone ambient light sensor biochemical detection system. (a) An ALS developed by Park et al. group using ambient light as the light source for the detection of the osteoarthritis marker uCTX II^[32], (b) Chen et al. realized a high-throughput ALS system for the detection of zearalenone in maize based on ELISA principle^[33]

1.2.4 数字图片比色传感

比色法是一种以显色反应为基础, 通过建立色度值与待测物浓度之间的关系来有效分析待测组分含量的检测方法。传统的比色法分为目视比色法^[36, 37]和光电比色法^[38, 39]两种。目视比色法是通过利用人眼观察与标准色卡对比来判断待测物质含量的分析方法, 其操作简单、检测速度快, 然而由于人眼差异导致该方法受主观因素影响较大, 只适用于对待测物质定性或半定量粗略分析。光电比色法是一种基于朗伯比尔定律, 利用光电传感器进行溶液吸光度检测进而对待测物定量的比色方法。相较于目视比色

法，光电比色法由于排除了主观因素的影响从而具有更高的准确性。如图 1-7 为常见的目视比色法和光电比色法的典型代表。

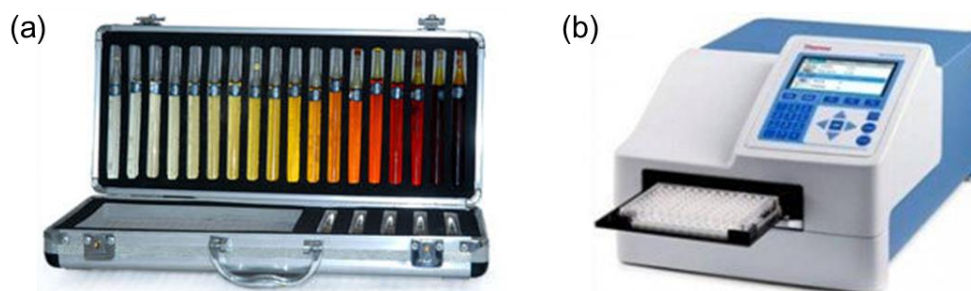


图 1-7 (a) 目视比色计; (b) 酶标仪

Fig.1-7 (a) Visual Colorimeter; (b) Microplate reader

近年来，随着 CCD、CMOS 等图像传感器的飞速发展，相机、扫描仪、智能手机等图像采集设备的功能日益丰富和先进。一种新型的比色传感方法——数字图片比色法^[40-42]在生化传感领域被广泛应用和研究。数字图片比色法是指利用图像采集设备实现显色图像获取，进而通过专业图像处理软件（比如 Photoshop 或 ImageJ）或自主开发的图像分析软件进行分析，将图像信息转化成数字信息进行数据存储及传输的一种分析方法。在对图像分析过程中，可以在 RGB、CMYK、HSV、Lab、CIE XYZ、YUV 等多种色度空间中建立待测组分浓度与色度参数之间的关系曲线实现检测。以下是这几种常见的色度空间的详细介绍。

RGB 颜色模型基于 Thomas Young 和 Hermann von Helmholtz 在 19 世纪初至中期开发的三色视觉的 Young-Helmholtz 理论，以及约 1860 年 James Clerk Maxwell 阐述的颜色三角形理论，是一种加法颜色模型^[43]，其中红光、绿光和蓝光以各种方式叠加在一起，组成各种颜色^[44,45]。该模型的名称来自三种原色的首字母缩写，即 R、G 和 B，如图 1-8 是映射到立方体的 RGB 色度空间模型。RGB 是一种依赖于设备的颜色模型，主要用在计算机、电视等设备中感应和显示图像。然而，不同设备的 RGB 值因制造商差异往往以不同的方式呈现，因此，在没有某种颜色管理的情况下，RGB 值不会在设备之间定义相同的颜色。日常生活中，任何一种颜色都可以由红、绿、蓝三种色光混合而成，因此，利用 RGB 色度空间颜色参数作为分析对象的比色分析方法广泛应用于生化分子检测中。

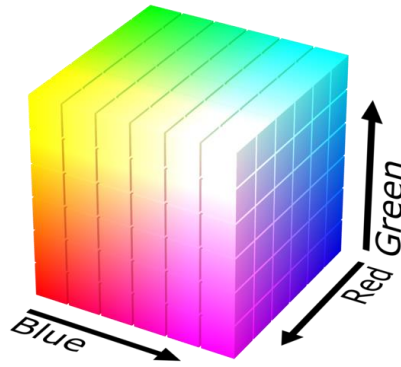


图 1-8 RGB 色度空间模型

Fig.1-8 The RGB color model

与 RGB 色度空间不同的是，CMYK 颜色模型是一种减法颜色模型，主要用于彩色打印。CMYK 是指在彩色印刷过程中的 4 种颜色：C（青色）、M（品红）、Y（黄色）和 K（黑色），如图 1-9 所示是 CMYK 颜色空间模型。理论上，100%的青色、洋红和黄色的组合应该完全吸收整个可见光谱，并叠加产生真正的黑色，然而，实际打印过程中油墨达不到理想的黑色，因此引入黑色，起到强化暗色调、加深色彩的作用。在利用 CMYK 色彩空间进行检测时，首先需要将图像的颜色信息 RGB 值转换成 CMYK 值，RGB 与 CMYK 之间的参数转换公式如下：

$$R=255\times(100-C)\times(100-K)/10000$$

$$G=255\times(100-M)\times(100-K)/10000$$

$$B=255\times(100-Y)\times(100-K)/10000$$

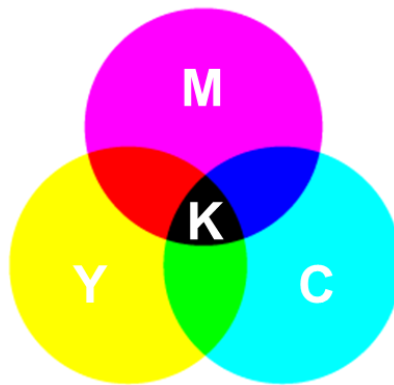


图 1-9 CMYK 色度空间模型

Fig.1-9 The CMYK color model

HSV 颜色模型是 1938 年 Georges Valensi 为电视发明的一种色度空间，与以上介绍的面向硬件的 RGB、CMYK 颜色模型都不同的是，HSV 颜色模型是一种面向用户的颜色空间，如图 1-10 所示，HSV 颜色模型呈现锥型。该模型中颜色的参数分别是：H

(色调), 取值范围是 $0^{\circ} \sim 360^{\circ}$, 从红色到紫色逆时针递增; S (饱和度), 取值范围为 0~1, 表示颜色接近光谱色的程度; H (亮度): 取值范围也为 0~1, 表示颜色的明亮程度。

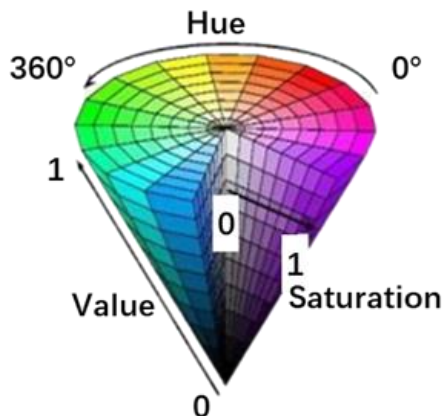


图 1-10 HSV 色度空间模型

Fig.1-10 The HSV color model

CIELAB 颜色空间也称为 $L^*a^*b^*$, 是国际照明委员会在 1976 年定义的一种颜色空间。如图 1-11, 它将颜色表示为三个值: L^* 表示感知亮度, a^* 和 b^* 表示人类视觉的四种独特颜色: 红色、绿色、蓝色和黄色。与 RGB 和 CMYK 颜色模型不同的是, 它是一种与设备无关的颜色空间, $L^*a^*b^*$ 的设计与人类视觉更接近, L^* 分量与人类对亮度的感知非常吻合, 旨在作为一个感知一致的空间, 其中给定的数值变化对应于相应的感知颜色变化。 $L^*a^*b^*$ 在颜色轴上的均匀性较差, 但可用于检测颜色的微小差异。 $L^*a^*b^*$ 的三个坐标分别表示: L^* —颜色的亮度、 a^* —红色和绿色之间的位置 (取值范围为: -128~127, 其中负值表示绿色, 正值表示红色) 及 b^* —黄色和蓝色之间的位置 (取值范围为: -128~127, 其中负值表示蓝色, 正值表示黄色)。

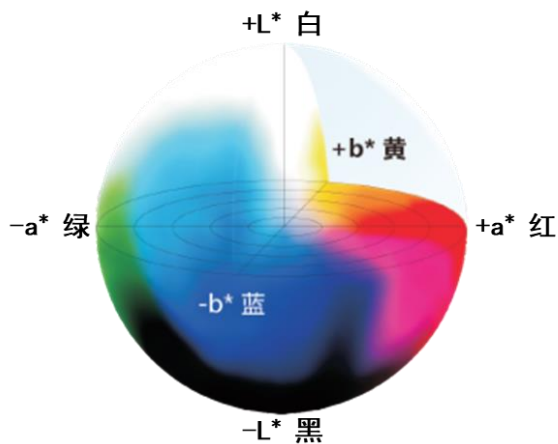


图 1-11 Lab 色度空间模型

Fig.1-11 The Lab color model

CIE 1931 XYZ 颜色空间是由国际照明委员会于 1931 年创建的，首次定义了电磁可见光谱中波长分布与人类色觉中生理感知颜色之间的定量联系。CIE 1931 XYZ 系统可以体现人眼的平均视觉特性，是在 RGB 系统的基础上，将颜色色度值转化成 CIE 1931 空间中的色品坐标。任何一个颜色的色品都可以用 CIE 1931 色品图来描述，该色度系统是被广泛认可的代表颜色的一种色度系统。在图 1-12 中，马蹄形线上的各点代表 380 nm~780 nm 之间所有的单色光，这条曲线是光谱轨迹；连接马蹄形曲线两端的直线——“紫线”代表光谱上所有的由紫到红的颜色^[46]。

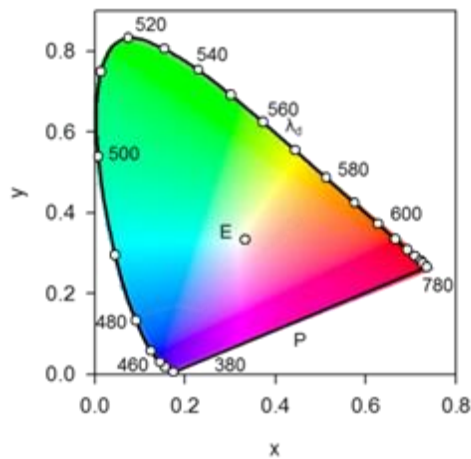


图 1-12 CIE 1931 XYZ 色度空间模型

Fig. 1-12 The CIE 1931 XYZ color space model

YUV 模型中包含一个亮度参数与两个色度分量，与标准的 RGB 模型相比，YUV 模型更能模拟人眼对颜色的感知。如图 1-13，在 YUV 颜色空间中，Y 代表亮度分量；U 表示蓝色亮度分量；V 表示红色亮度分量。YUV 模型一般适用于运动目标检测^[47]。

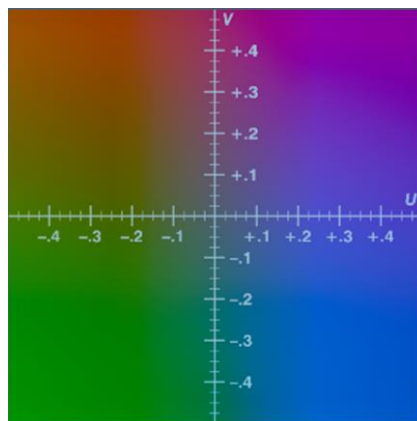


图 1-13 YUV 色度空间模型^[47]

Fig. 1-13 The YUV color space model^[47]

智能手机内部包含多种传感器，随着手机摄像头分辨率提高及成像效果的提升，

摄像头成为了分析检测设备应用最广泛的一种传感器。其内部包含低功耗的 CMOS 图像传感器阵列会对光线的颜色信息作出响应，并且具有一系列的自动化图像优化功能，如：闪光灯、自动白平衡、自动聚焦等功能。智能手机的处理能力使其既可以作为图像获取系统同时也可以作为数据分析系统。结合智能手机分析系统及各种色度学空间，研究者们开发了多种智能手机数字图片比色法生化分子检测技术，分析流程如图 1-14 所示。

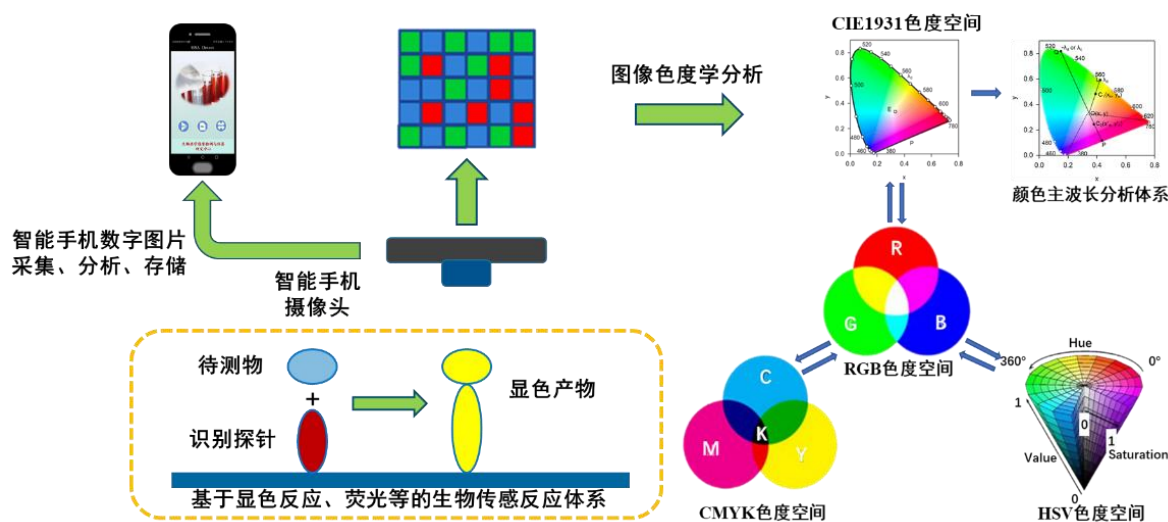


图 1-14 智能手机数字图片比色法检测流程

Fig. 1-14 The detection process of smart phone digital picture colorimetry

基于智能手机的数字图片比色法由于成本低、操作简单等优势引起了医学诊断、食品安全、环境监测等各研究领域人员的广泛关注^[48]。检测系统从需要附加外接装置到无附件比色检测，比色分析参量也从最基本的 RGB 色度空间逐渐扩展到 HSV、CMYK、Lab、YUV、CIE XYZ 多种色度空间的多参数综合分析。

由于智能手机的普及范围广、方便、快捷，基于智能手机的比色分析系统为医学诊断检测应用提供了潜力。早在 2008 年 Martinez 等使用智能手机分别获取葡萄糖和蛋白质与显色试剂反应后的反应溶液图像，并将其发送给特定技术人员进行处理，以实现预筛选过程^[49]，如图 1-15 (a)，方便、准确、快速的蛋白质传感方法在肾脏疾病、炎症、心血管疾病等诊断中具有重要意义，蛋白质的比色快速检测引起了研究者的广泛关注。2013 年 Ozcan 课题组开发了一款运行在智能手机上的“Albumin Tester”传感平台，可以实现尿液中白蛋白 5 分钟荧光成像和自动分析，在缓冲溶液和尿液中的检测限达到了 5~10 $\mu\text{g/mL}$ ，比临床公认的正常范围低 3 倍以上^[50]。2017 年 Wang 等提出了一种操作简单的智能手机比色体系，如图 1-15 (b)，基于未经修饰的金纳米粒子在不同 NaCl 浓度下以及在存在不同种类蛋白质的情况下表现出不同的聚集行为，从而产生不同的颜色反应来区分尿液中的 12 种蛋白质^[51]。随后，David Erickson 课题组研究了

一种移动设备便携式诊断系统“ironPhone”，如图 1-15 (c)，用于在几分钟内从指尖血中定量测定血清铁蛋白浓度，该检测系统由智能手机配件、应用程序及一次性侧向流动免疫检测纸条组成，可用于患者血液中铁元素含量的评估，对 20 名患者的指尖血进行分析，检测结果与实验室标准的 IMMULITE 2000 分析仪结果高度一致，该工作对诊断缺铁症具有重要意义^[52]。2020 年，我们课题组^[53]自主开发了一款基于智能手机的 96 微孔板分析仪，实现了人血清白蛋白（HSA）的高通量快速定量。分别利用该分析仪与医院中全自动生化分析仪对 12 名患者血清样本中 HAS 浓度进行测定，二者检测结果一致性高达 90%以上，可以满足临床检测的需求，由于其体积小、易操作、成本低的优势可广泛推广基层医疗机构，对促进医疗资源下沉具有重大意义。

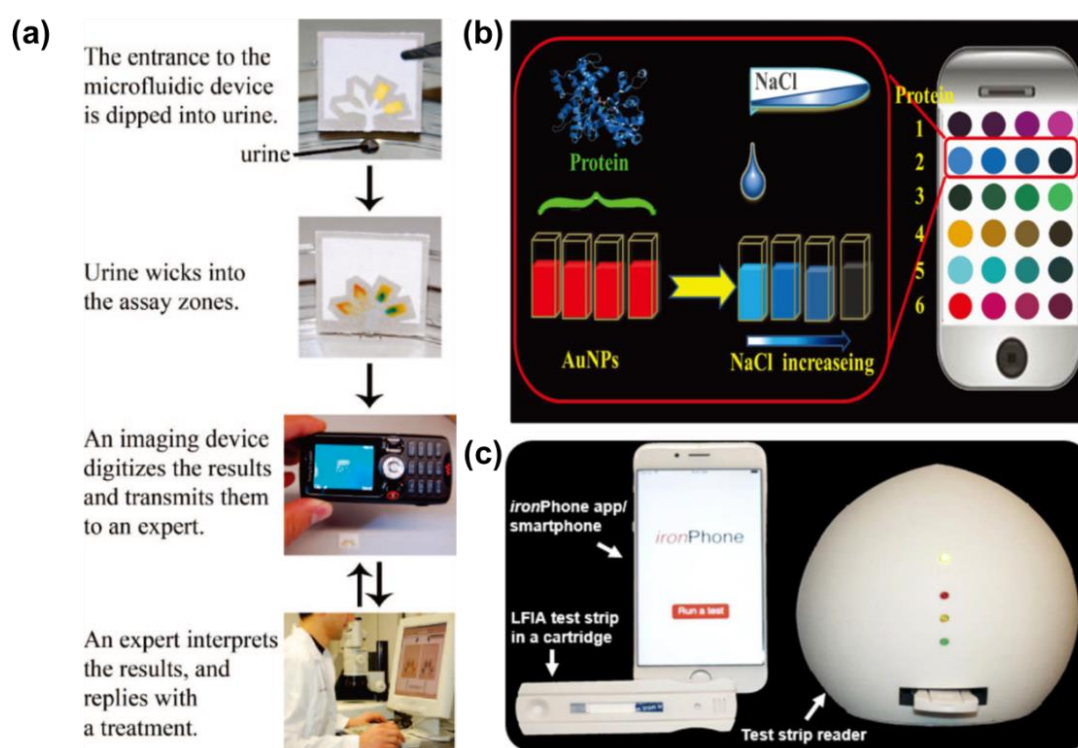


图 1-15 智能手机比色分析在蛋白质检测中的应用。(a) 2008 年 Martinez 等人开发的手机比色传感系统操作流程^[49]，(b) 根据蛋白对纳米金的聚集作用不同来区分尿液中的 12 种蛋白质^[51]，(c) David Erickson 课题组研究的移动设备便携式诊断系统“ironPhone”，利用一次性侧向流动免疫检测试纸条，仅采集指尖血就可实现铁蛋白浓度定量^[52]

Fig. 1-15 Application of smartphone colorimetric analysis in protein detection. (a) In 2008, the mobile phone colorimetric sensing system operation process developed by Martinez et al.^[49], (b) Distinguishing 12 proteins in urine according to their different aggregation effects on gold nanoparticles^[51], (c) “ironPhone”, a portable diagnostic system for mobile devices reported by David Erickson’s research group, uses disposable lateral flow immunoassay test strips to quantify ferritin concentration only by collecting fingertip blood^[52]

葡萄糖作为人体的一种主要的供能物质，其在尿液或血清中的含量多少可以反映

人体的健康状况^[54]，实时快速监测人体体液中葡萄糖的含量对糖尿病等慢性疾病的早期诊断以及疾病控制至关重要。2018年Wang等制备了一种将壳聚糖、显色剂和辣根过氧化物酶（HRP）、尿酸酶、葡萄糖氧化酶（GOD）等结合固定的多层改性试纸，将其用于构建比色传感平台，用智能手机作为信号获取和读出设备，通过分析计算显色图像的色度值实现了血清中尿酸和葡萄糖的定量^[55]。环境光照的不均匀性是影响比色分析准确性的关键因素，图1-16（a）中，2021年我们课题组开发了一种基于便携式扫描仪和智能手机相结合的比色分析系统，便携式扫描仪均匀稳定的光照环境保证了比色分析的准确性和高重复性，设计的一次性三维显色纸基可实现多个样本同时高通量检测，通过无线传输的方式将显色图像共享至智能手机并由其分析计算检测结果，通过对14个患者血清样本葡萄糖定量并与标准光谱法对比，展现了该检测系统在临床诊断中的实用性^[56]。为了克服在纸基上手动滴加显色剂或酶带来的检测误差，2019年Zhang等报告了一种喷墨打印显色纸基微流控制备方法。如图1-16（b），首先在纸基上蜡染形成疏水屏障，然后在传感检测区域打印壳聚糖、TMB和酶混合物溶液（包括葡萄糖氧化酶及辣根过氧化物酶），其中，将聚乙二醇作为酶稳定剂加入到显色体系中。这种标准化的打印方法降低了每个检测单元的成本，提高了显色均匀性、检测准确性和重复性。由此产生的纸基微流控装置结合智能手机应用程序，通过提供一致均匀的照明环境，实现了葡萄糖的高灵敏定量，最低检测限达到了0.01 mg/mL^[57]。比色法检测葡萄糖因操作简单、成本低、检测速度快被广泛应用在医学即时检测中，然而，由于全血中血红蛋白的天然红色背景，使全血中比色法分析葡萄糖浓度受到了局限。因此，该课题组在之前工作的基础上通过将血浆分离滤膜加载在传感区顶部实现血浆与红细胞的分离，并且3D打印了智能手机光学平台避免环境光对比色检测的影响，实现了全血样本中葡萄糖的比色检测，检测限达到了5 mg/dL（0.28 mM）。通过对人体全血样本检测，与分光光度法相比，相对误差在4.37%~14.41%之间，与商用血糖仪相比，相对误差在3.83%~14.53%之间。该系统结合了低成本、高可靠性和易制备的优点，有望成为血糖监测有竞争性的方法^[58]。

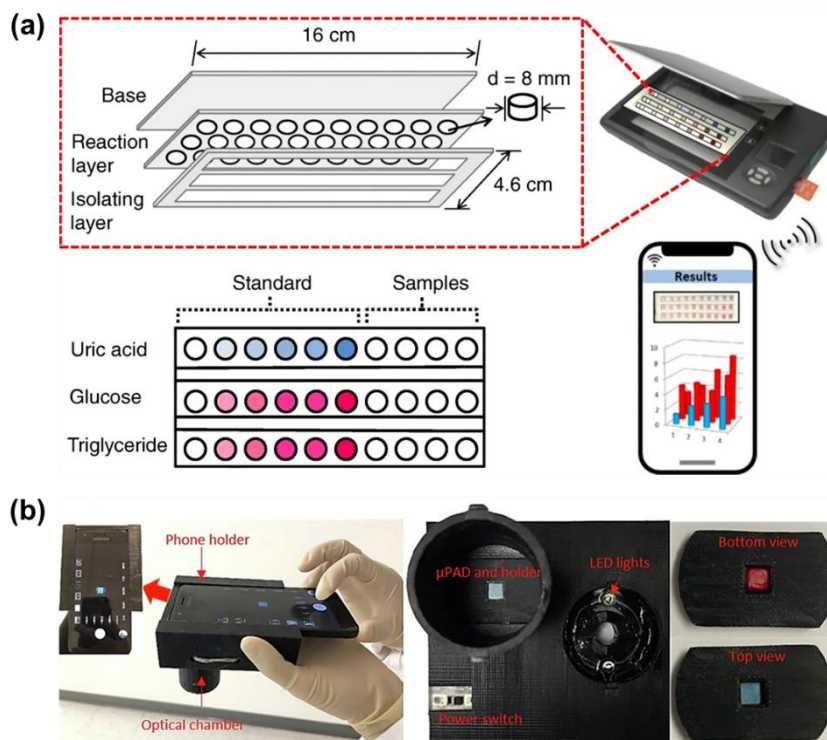


图 1-16 智能手机数字图片比色法在葡萄糖检测中的应用。(a) 我们课题组开发的便携式扫描仪与智能手机相结合的比色分析系统^[56], (b) Zhang 等人报告的基于智能手机的喷墨打印显色纸基微流控用于葡萄糖定量^[57]

Fig. 1-16 Application of smartphone digital picture colorimetry in glucose detection. (a) a colorimetric analysis system combining a portable scanner with a smartphone developed by our research group^[56], (b) Smartphone-based inkjet-printed chromogenic paper-based microfluidics for glucose quantification reported by Zhang et al.^[57]

除蛋白质与葡萄糖等慢性疾病标志物之外, 智能手机比色分析方法也广泛应用在病毒、癌症标志物检测领域。2018 年 Chen 等报告了一种用于前列腺癌生物标志物检测的高灵敏度纸基比色传感阵列, 如图 1-17 (a), 该体系中使用生物素化聚腺嘌呤单链 DNA 序列和链霉亲和素-辣根过氧化物酶标记的金纳米粒子实现酶信号增强, 同时还可以消除用单链 DNA 修饰 AuNP 表面的复杂且昂贵的硫醇结合过程, 不同抗体可以通过静电相互作用引入 AuNP 表面, 为生物分子提供高度特异的识别位点。该比色纸基结合智能手机检测系统可在 15 分钟内完成癌症标志物的测定, 针对前列腺癌标志物达到了 10 pg/mL 的检测限, 其有望在资源有限的环境中进行高度敏感和特定的疾病诊断^[59]。自 2001 年美国遭受炭疽杆菌孢子的生物攻击以来, 这种潜在的生物战剂引起了全世界的特别关注^[60-62]。因此, 开发快速高效的炭疽杆菌孢子现场检测方法, 对于控制炭疽病暴发至关重要。2019 年 Xu 等开发了一种基于 Tb^{3+} 在 DPA 和茜素红 (AR) 之间的竞争配位的新型比色传感探针, 用于检测炭疽生物标记物 (二吡啶甲酸, DPA)。AR 和 Tb^{3+} 离子在硼酸缓冲溶液中形成 3:1 的配位对, 溶液呈现淡紫色; 随后向复合溶液中添

加 DPA 完全破坏了 AR-Tb³⁺的配位, 导致 DPA-Tb³⁺的形成, 溶液从淡紫色变为黄色。通过智能手机获取图像分析并建立 DPA 浓度与 G/B 色度值比的关系达到 DPA 现场快速检测^[63], 如图 1-17 (b)。

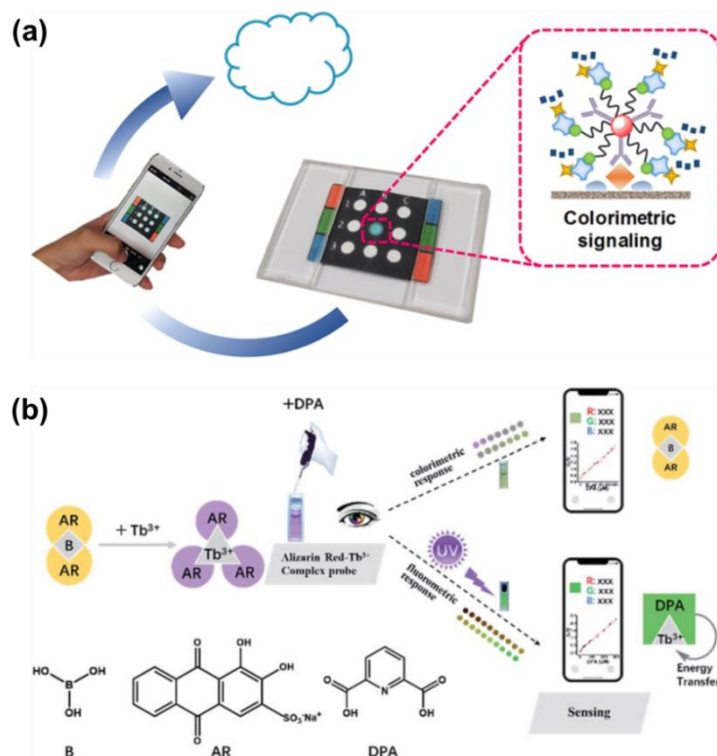


图 1-17 智能手机数字图片比色法在其他疾病标志物检测中的应用。(a) 智能手机比色法用于前列腺癌生物标志物检测^[59], (b) 炭疽生物标记物二吡啶甲酸 (DPA) 检测原理^[63]

Fig. 1-17 Application of smart phone digital picture colorimetry in the detection of other disease markers. (a) Smartphone colorimetry for prostate cancer biomarker detection^[59], (b) Principle of detection of the anthrax biomarker dipicolinic acid (DPA)^[63]

民以食为天, 食以安为先。食品安全是关系到国计民生的头等大事, 为保证“舌尖上的安全”, 开发成本低、准确度高、数据可溯源并适用于现场的食品安全检测技术迫在眉睫。因此, 国内外研究学者基于智能手机数字图片比色法开展了一系列食品安全研究工作。2015 年我们课题组利用智能手机可读条形码开发了一种有机磷农残快速定量技术, 如图 1-18 (a)。反应原理基于 39 码“+”、“-”结构的特殊性及不可逆的酶抑制法, 检测时加入到 PDMS 通道中的反应溶液与打印的同色 (黄色) 39 码“+”组成“生物条形码”, 通过智能手机扫码软件扫描得到检测结果, 利用检测过程中反应溶液的黄色的强度与有机磷农残浓度成反比关系, 实现了甲基对硫磷的定量^[64]。随后, 我们课题组借助 PDMS 微通道在透明塑料基底上制作间接竞争免疫结构, 开发了智能手机 AFB1 检测系统, 如图 1-18 (b)。建立 AFB1 浓度与 ODR 值的标准曲线实现了 AFB1 的定量检测, 检测范围为 0.5-250 ng/mL, 检测低限达到 0.5 ng/mL, 远低于国家对食品

中 AFB1 含量的限定标准 (20 ppb) [65]。食源性微生物引起的感染对当今的全球环境和公共医疗保健构成了巨大威胁。2020 年 Wang 等建立了一种智能荧光/比色双通道大肠杆菌检测系统, 以 Cu^{2+} 触发的邻苯二胺 (OPD) 氧化且大肠杆菌的引入可以有效地将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , 从而导致溶液颜色的变化; 同时, 在紫外灯照射下, 构建了一种基于纸基的颜色传感器, 利用智能手机拍照获取图像信息并分析, 实现大肠杆菌的定量。本研究为大肠杆菌的灵敏和现场可见检测提供了一种有效的双模式检测方法, 保证了检测方法的可靠性 [66]。在水产品供应链中, 组胺在深海鱼的发酵中或在其腐败变质过程中产生, 每年都会导致食品安全问题 [67]。如图 1-18 (c), 2020 年 Li 等基于智能手机比色分析程序结合聚二乙炔 (PDA) 囊泡与比色试纸实现了组胺半定量检测, 用于分析和监测深海鱼类及其罐装食品中的组胺含量 [68]。磷酸盐及其衍生物广泛应用于海产品及肉制品的加工过程中, 饮食中过量的磷酸盐会影响钙的吸收, 从而导致钙的缺乏 [69]。食品中磷酸盐的高灵敏、快速分析至关重要, 2021 年 Dong 等报道了一种基于智能手机的比色传感器, 如图 1-18 (d)。该传感器基于由 Pb^{2+} 引起的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 改性银纳米粒子的抗聚集, 可导致颜色从蓝色变为黄色, 从而准确可靠地检测水中和肉类罐头中的焦磷酸盐, 达到了 $0.2 \mu\text{M}$ 的检测限 [70]。

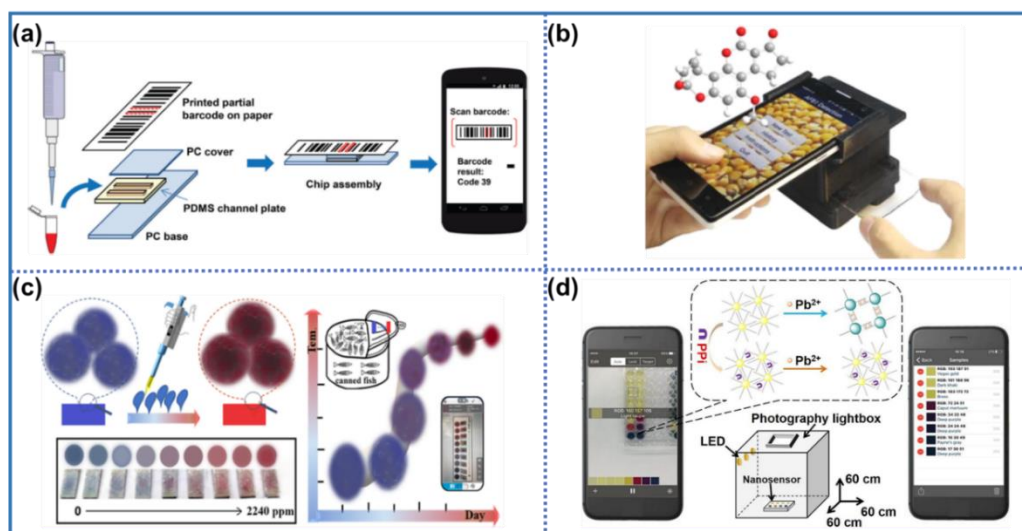


图 1-18 智能手机比色法在食品安全检测领域的应用。(a) 有机磷农残检测 [64], (b) 黄曲霉毒素 B1 检测 [65], (c) 深海鱼类及其罐装食品中的组胺含量 [68], (d) 肉类罐头中的焦磷酸盐检测 [70]

Fig. 1-18 The application of smart phone colorimetry in the field of food safety testing. (a) Detection of organophosphorus pesticides [64], (b) Aflatoxin B1 assay [65], (c) Histamine levels in deep-sea fish and their canned foods [68], (d) Detection of pyrophosphate in canned meat [70]

除此之外, 智能手机数字图片比色法在环境监测领域也具有广泛的应用。重金属离子在水、土壤、空气中的毒性是对生物体健康的主要威胁, 可引起环境污染和中毒。2018 年 Motalebizadeh 等开发了一种基于智能手机的 PDMS 微流控比色平台, 利用开发的智能手机应用程序进行图像处理, 对水中痕量砷离子和汞离子同时定量 [71]。之后,

我们课题组介绍了一种用“剪切-粘贴”方式制备的 3D 微流控纸基分析装置 (3D μ PAD), 结合为比色分析而开发的移动应用程序, 能够量化水样中六价铬离子和亚硝酸根离子, 通过将自来水中加标样检测结果与分光光度法对比, 证明了借助 3D μ PAD 和手机应用程序进行比色定量检测的可靠性, 证实了其在现场环境监测方面的潜力^[72]。除了重金属离子, 抗生素的滥用导致其在环境中的残留, 也会对人类健康造成严重威胁^[73]。近期, 我们课题组开发了一种金纳米粒子-适体传感的抗生素检测方法, 实现了磺胺二甲嘧啶 (SDM) 的快速定量。当 SDM 不存在的情况下, 核酸适体会吸附在纳米金粒子的表面, 此时溶液呈现稳定的红色; SDM 与适体特异性结合后, 核酸适体的脱离导致纳米金粒子聚集使溶液由红色变成蓝紫色。利用智能手机比色检测系统对显色图像进行分析, 测得 SDM 的最低检测限为 0.023 ppm, 远远低于水质中的最低检测标准, 这种比色适体传感方法提供了一种现场筛查抗生素残留的强大工具^[74]。

综上所述, 基于色度分析的传感器都是使用手机摄像头捕捉图像的, 然而, 当智能手机相机用作比色探测器时, 仍然存在一些挑战: 首先是光源的均匀性、光源的强度、着色的均匀性和拍照距离等因素严重影响检测结果的准确度; 其次不同品牌的智能手机在像素计数、CMOS 传感器灵敏度、相机镜头质量、光圈尺寸等方面具有不同的相机特性, 因此, 拍摄的图像质量不同, 导致色度传感中产生差异。为了解决这一问题, 研究人员分别对硬件和软件算法进行了改进。

2011 年, Garcia 等通过在封闭装置中安装三个对称放置的作为水溶液中 K^+ 分析的照明光源^[75]。同年, Suzuki 等使用了类似的封闭装置来测量水中的余氯, 其中 LED 阵列珠被用作图像采集的光源。上述方法在硬件方面基本解决了环境中光照不均匀引起的颜色失真问题^[76]。然而, 当使用多个 LED 珠子或阵列 LED 作为光源时, 如果灯珠的放置位置不适当, 就会不可避免地出现阴影, 因此很难收集图像。为了解决这个问题, Bang-iam 等进行了大量实验, 结果表明, 用一个 LED 微珠作为光源无法获得高质量的图像, 而用两个与样品成 45 度角的 LED 可以获得更好的图像, 并实现了天然乳胶和医用乳胶中蛋白质的测定^[77]。随后, 我们课题组提出使用小型面光源作为光源, 小型面光源中含有光扩散板使光线可以平行且均匀的照射到待测物, 从而解决了光源位置不当导致的图像失真问题^[65]。值得注意的是, 照明室对于均匀照明非常有用。对于智能手机上的比色分析来说, 一个合理的辅助设备提供固定的照明和摄像头与分析物之间的距离非常重要, 因为照明条件和距离将直接影响图像质量和后续分析的结果。

近年来, 为了去除光学附件, 仅使用智能手机进行准备比色分析开发了一系列校正方法同时实现对不同手机型号差异和光环境的校正。2012 年 Shen 等报道, 在不同光强度 (3500 K 荧光、阳光、阴影、手机闪光灯) 下获得的颜色值可以通过映射算法转换为特定的固定光强度 (5000 K 荧光), 实现了不同光照强度下颜色的统一, 解决了不同光照下分析结果偏差大的问题^[78]。之后, Hong 等通过颜色校正算法, 分别从荧光、

阳光和低照度等不同光照强度下采集的图像中可以获得相同颜色的图像，也解决了不同照度引起的偏差问题^[79]。Ming 等提出了一种简单的黑白校准方法，通过补偿环境光照条件、成像距离/角度和手机品牌的差异，对以手机内置摄像头为读卡器的色度传感器阵列进行成像，从而获得准确的识别^[80]。Bao 等提出了探针颜色校正方法和最优探针选择算法，并开发设计了一个可以在室内自然光条件下直接进行比色即时检测的系统^[81]。Kong 等提出了一种简单可靠的颜色量化方法，该方法将连续的智能手机 LED 照明与单色偏移的重新缩放和颜色量化相结合，在三个智能手机品牌 iPhone、三星和华为的不同型号上进行了测试，补偿了不同的照明环境，最大限度地减少了不同手机的图像质量差异，并提供了均匀的光线，以避免图像采集过程中出现任何阴影^[82]。

1.2.5 智能手机荧光传感

由于智能手机比色分析存在检测灵敏度低、检测结果易受环境光影响等局限性。随着检测要求的提高和检测方法的改进，基于荧光检测的传感器层出不穷。由于荧光传感具有更高的特异性和准确性、响应快速且灵敏的特点，基于荧光共振能量转移（FRET），荧光内滤效应（IFE），聚集诱导荧光淬灭（ACQ），光致电子转移（PET），聚集诱导荧光发射（AIE）等这几种传感机理的荧光生化传感器被研究者们广泛应用在医疗诊断、环境监测、食品安全等领域。

与单个荧光发射相比，比率荧光检测是一种很有吸引力的荧光检测方法，因为它具有固有的环境校正和其他干扰因素的自校准能力^[83, 84]。2016 年 Bueno 等使用智能手机作为荧光检测设备来量化赭曲霉毒素 A（OTA）的浓度，当样品被紫外线激发时，激发样品的荧光通过透镜传递到智能手机摄像头。最后，通过无线将荧光图像发送到个人电脑进行分析，将图像以红色、绿色和蓝色（RGB）分量表示，通过建立色度值与 OTA 的浓度关系实现定量^[85]。2016 年 Arts 等提出了一种基于生物发光共振能量转移（BRET）的新型通用抗体检测平台，与上述工作不同的是，该工作中仅使用智能手机就可以直接检测溶液中的抗体。其中生物传感器由一个蓝光发光的荧光素酶 NanoLuc 和一个绿色荧光受体蛋白组成，它们通过辅助结构域相互连接。因此，使用这种生物传感器的溶液会发出绿蓝光。然而，抗体会破坏辅助结构域之间的相互作用，溶液的颜色将为蓝色。使用智能手机摄像头记录颜色变化，我们可以分析抗体浓度，从而避免复杂的液体处理步骤，提高检测灵敏度^[86]。2019 年 Zhang 等通过合成氨基修饰的双发射量子点，开发了一种基于智能手机成像传感平台的比率荧光传感体系，用于现场测定氟离子（F⁻），具有很高的灵敏度和准确性。传感机理是基于氟化物促进的 Si-O 键断裂 2-TBDPSP 释放 2-羟基苯酚盐，后者迅速自动氧化成邻醌。作为优异的电子受体，这些醌类物质通过共价键结合在双发射氨基修饰的量子点（QD）纳米杂化物的表面上，在纳米杂化物表面淬灭绿色发射 QD 的荧光，同时不影响嵌入二氧化硅纳米球的红色发

射量子点的荧光。当加入不同浓度的 F^- 时, 双发射强度比的变化呈现出从绿色到红色的连续颜色变化, 然后通过 3D 打印技术构建了一个基于智能手机成像的传感平台, 智能手机摄像头获取样本荧光图像, 安装在智能手机中的 Color Picker APP 读取这些图像的红、绿、蓝 (RGB) 通道值。在 $0\sim70.0\ \mu\text{M}$ 范围内, 红绿比 (R/G) 与 F^- 浓度呈线性关系, 检测限为 $2.0\ \mu\text{M}$, 远低于世界卫生组织规定的饮用水中 F^- 的允许水平 ($63.16\ \mu\text{M}$)^[87]。2020 年 Yu 等设计了一个集成且经济高效的 3D 打印光学附件, 利用发光二极管用作激发光源, 智能手机捕捉荧光发射信号, 通过将量子点杂化和酶促氧化还原反应相结合, 在不同浓度的分析物存在下显示出多种颜色响应, 实现了鸡肉样本中微量金刚烷胺的高通量同时检测, 检测限达到了 $0.057\ \text{ng/mL}$ 。由于其在便携性、高灵敏度和成本效益方面的优势, 该传感器在没有实验室或昂贵基础设施的领域具有巨大的应用潜力^[88]。

然而, 液体荧光检测系统所需样本量大, 同时所需荧光探针量大, 这就增加了分析每个样品的方法成本。纸基因具有很强的毛细作用和吸收能力, 运输液体不需要外部仪器且可有效地存储试剂; 易于化学改性, 具有高的生物相容性和生物降解性; 基于纸基在分析检测中表现出的优势, 克服了液体荧光检测系统的局限。因此, 研究者们将其与纸基微流控相结合构建简单、低成本的生物传感平台实现多领域生化分子的高灵敏检测。早在 2014 年 Kim 等提出了将量子点固定在纸基质上的方法, 用于基于共振能量转移 (FRET) 的蛋白酶水解活性分析。固定化量子点和纸基质中自组装染料标记肽之间的稳态和时间分辨荧光特性表明, 能量转移效率显著提高。与本体溶液相比, 能量转移速率增加了大约四倍, 导致 FRET 受体染料发射和猝灭量子点发射的比率同时增加了七倍。量子点、纸质基材和增强型 FRET 的组合具有开发生物测定的强大潜力^[89]。同年 Noor 等使用固定化量子点 (QDs) 作为供体, 在基于纸基的平台上实现了核酸杂交定量。用咪唑基团修饰纸张表面, 以组装由固定化 QD 探针寡核苷酸缀合物组成的转导界面, 绿色发光量子点 (GQD) 作为供体, Cy3 作为受体, 产生 FRET 作为分析信号。如图 1-19 (a), 使用手持式紫外线灯作为激发源, 利用智能设备对图像的红色和绿色通道进行相对强度分析。通过检测对比率为 60:1 的单核苷酸多态性, 证明了杂交试验的选择性。这项作为 QD-FRET 方法与数字成像的集成提供了一个重要的框架, 用于在基于纸基的平台上进行核酸杂交定量^[83]。2017 年 Yu 等通过在滤纸上喷墨打印制备的“墨水”, 制备了用于目视和现场测定环境氟离子的比率荧光试纸。这种“墨水”是通过将荧光敏感有机探针 (C-TIPS) 与红色 CdTe 量子点 (QD) 以最佳比例混合而成的。设计的荧光氟化物探针在有氟离子存在的情况下产生荧光。借助 CdTe 量子点的红色荧光, 试纸在紫外线灯下呈现出从红色到紫色再到蓝色的可分辨荧光颜色变化。制备的比率荧光试纸对氟离子的定量显示出优越的灵敏度和视觉效果, 检测限为 $0.285\ \text{mM}$, 低于世界卫生组织 (WHO) 规定的限值 ($79\ \text{mM}$)。此外, 该试纸非常适用于以

一种非常简单、经济高效且现场的方式检测天然水中的氟离子^[90]。随后, Tenda 等报道了一种基于生物发光共振能量转移 (BRET) 开关的用于分析物识别和比色信号生成的完全集成的微流体纸基分析装置 (μ PAD), 该装置可实现血浆分离, 实现了全血中三种抗体 (抗 HIV1、抗 HA 和抗 DEN1) 的同时检测^[91]。2020 年 Chu 等结合 3D 打印技术, 推出了一种基于智能手机的便携式定量荧光感应纸条, 能够实现快速、实时、可靠、现场测定人血清中谷胱甘肽 (GSH), 对疾病早期诊断具有重要意义。这种灵敏的荧光纳米探针是通过蓝色碳点 (CDs) 和橙色金纳米团簇 (AUNC) 的混合物构建的。在铜离子存在的情况下, 蓝色荧光保持稳定, 而橙色荧光的 AuNC 则被猝灭。加入 GSH 后, 由于铜离子和 GSH 之间的亲和力更强, 猝灭的橙色荧光可以迅速恢复, 显示出从蓝色到橙色的可见颜色变化。经验证, 检测限为 $1.84 \mu\text{M}$, 远低于临床上血清中 GSH 的最低水平^[92]。为了实现多种待测物高通量检测, 如图 1-19 (b), 2020 年肖等开发了一种基于纸的微阵列, 制备了三种不同的碳量子点并将其滴加在预处理的纸基上, 用于选择性检测不同的重金属离子 (Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cu^{2+})。将 3D 打印光学装置与智能手机组装在一起, 使用手机上的图像传感器读取微阵列的荧光信号。测得的 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 的检测限分别为 5.8 nM 、 $0.12 \mu\text{M}$ 和 $0.076 \mu\text{M}$ ^[93]。

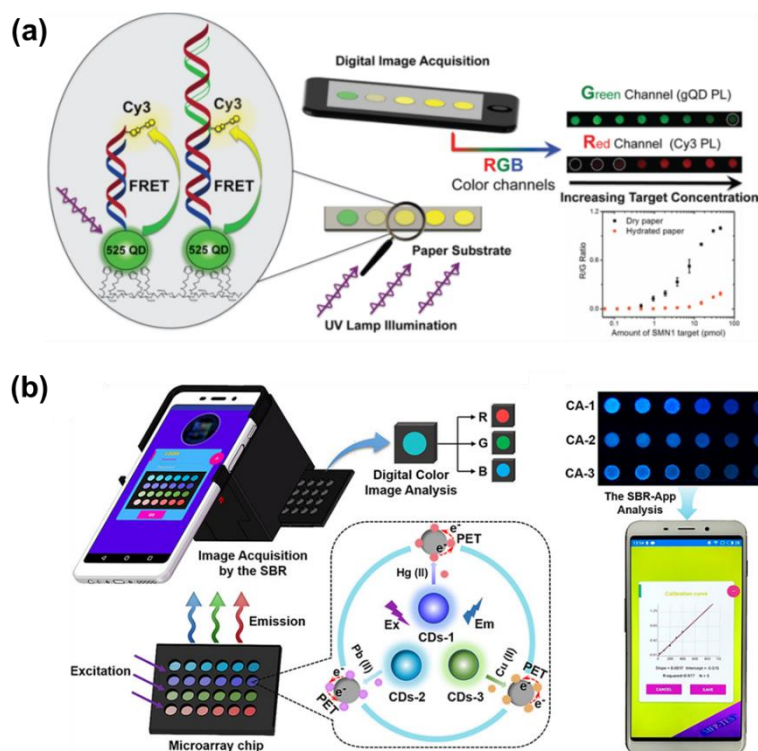


图 1-19 智能手机纸基荧光传感平台。(a) Noor 等人基于荧光 FRET 原理开发的纸基平台上实现核酸杂交定量^[83], (b) 纸基微阵列荧光检测平台实现三种重金属离子 (Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cu^{2+}) 检测^[93]

Fig. 1-19 Smartphone paper-based fluorescence sensing platform. (a) Nucleic acid hybridization quantification on a paper-based platform developed by Noor et al. based on the principle of fluorescent FRET ^[83], (b) The paper-based microarray fluorescence detection platform realizes the detection of three heavy metal ions (Hg^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+})^[93]

虽然以上纸基荧光传感器在现场快速检测方面取得了重大进展,然而,始终存在着必须解决的技术局限。例如,纸基荧光激发不均匀、干扰荧光传感的纸基自发荧光和高散射问题。目前已经有工作报道降低纸张的自发荧光,通过使用更长的波长,例如近红外(NIR)或红外(IR),也可以避免纸张的自发荧光^[94-96]。Yu 和 White^[97]观察到,在从表面增强拉曼光谱试纸拭子中测定罗丹明 6G、有机磷马拉硫磷、海洛因和可卡因时,使用 785 nm 激发降低了纸张的背景自发荧光。类似地,Ju 等人^[98]发现,使用更长的红外或近红外波长作为激发源可以减少自发荧光以及背向散射。他们使用掺镱系元素的 LiYF₄ 上转换纳米颗粒的纸基平台显示了 3.6 fmol DNA 的检测极限。Doughan 等^[99]使用 980 nm 近红外激发来降低通常与紫外或可见波长激发相对应的背景噪声。但是,对于纸基荧光检测而言,搭建合适的激发光源并选择低背景或无背景的基底是提高检测灵敏度、提高可重复性关键的一步。

1.3 本文的主要内容

基于智能手机比色分析的生化传感技术在医学诊断、环境监测、食品安全等领域都有了广泛应用,然而,比色分析结果的准确性通常受到外界光照环境、智能手机图像传感器的性能等多方面因素的干扰。尽管智能手机摄像头的自动白平衡功能可以在很大程度上减小光源颜色对物体颜色的影响。然而,在实际检测中,不同时间、不同地点下的光环境的强度与光源的均匀性难以精确地控制与统一。此外,智能手机摄像头光学透镜组合、光圈大小,传感器大小等因素同样会影响图像质量。因此,如何有效改善环境光和手机自身对比色分析检测的干扰,提高智能手机比色分析检测体系的准确性和稳定性是亟待解决的难题。针对这一问题,本论文从色度学体系、生化传感器制备、生物芯片设计、以及检测硬件系统和软件系统等多个方面展开工作。对于色调发生变化的显色体系,本研究创新性的提出了颜色“主波长”比色分析新指标,并基于 CIE1931 色度空间研发了颜色纠正算法,设计了可以提供均匀光照的集成光学系统,从硬件和软件两方面对光环境进行纠正、归一化处理。进一步的,对于多指标的比色反应体系,本论文通过建立多色度学参数的精确分析方法,解决了将颜色信息转换成灰度值检测准确度低的问题。随着检测技术的发展,为了提高生化分子检测灵敏度,基于智能手机的荧光传感平台应运而生,然而,荧光检测技术始终存在着必须解决的局限。例如,纸基荧光激发不均匀、干扰荧光传感的纸基自发荧光。本研究基于玻璃滤纸低荧光背景信号的特点,利用“水热法”首次在玻璃滤纸上合成了氧化锌纳米线,实现了荧光增强,解决了纸基荧光检测存在信噪比低的问题。综上所述,基于智能手机即时检测技术及目前存在的局限开展的具体研究工作如下:

第一章:介绍了即时检测的研究背景及意义,并对基于智能手机生物分子检测技

术国内外研究现状进行了分析。

第二章：本研究中以 Windows 系统为平台，搭建了 Android 程序的开发环境，为后期智能手机应用程序的开发奠定了基础。pH 显色是色调发生变化的显色体系，最佳比色分析参数的选择在 pH 测定中起着决定性作用。本章以 pH 检测为例，为色调发生变化的显色体系提出了“主波长”比色分析新指标；针对智能手机数字图片比色分析受外界环境光照、手机型号等不同因素的影响等问题，设计了可以提供均匀光照的集成光学系统，研发了智能手机颜色纠正算法；针对目前 pH 试纸检测准确度低及传统 pH 计检测操作繁琐、试剂用量大等问题，提出了将智能手机与 pH 试纸条相结合的 pH 测量新方法。通过建立 pH 值与主波长值之间的对应关系实现了 pH 值的高精度测量，检测精度达到了 0.05 单位 pH。分别利用本检测系统与 pH 计对实际样本进行测定，通过构建 Bland-Altman 图对二者检测结果进行分析，两种检测方法所测值的差异在 $\pm 1.96SD$ 范围内，验证了本系统在测定 pH 值时的准确性与可靠性。

第三章：在解决了智能手机数字图片比色法应用过程中外界光环境等因素的影响，通过建立对多指标进行多色度学参数的精确分析方法，将智能手机与商用尿液试纸条相结合创新性地研发了基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统。通过 3×3 阵列式试纸布局设计，不仅可以多指标同时定量还可以在缩小装置的同时更易获取比色分析所需均匀光照。根据 9 项尿液指标显色变化特点针对性地选择最优色度值进行量化，实现了 9 项尿常规指标的高通量“一键式”定量检测。以葡萄糖、微量白蛋白、肌酐 3 种指标的加标样品为例与紫外分光光度计检测结果进行对比，一致性均达到了 98% 以上。为了评估该系统的可靠性与实用性，分别利用该检测系统与医院中的 H-800 Urine Analyser 尿干化学分析仪对 100 例实际样本的尿常规指标进行检测，通过 ROC 曲线分析了两种方法检测结果较高的一致性。

第四章：为了进一步地提高生化分子检测的灵敏度，本章研发了智能手机 ZnO 纳米线纸基荧光传感平台。与普通滤纸相比，玻璃纤维滤纸的低荧光背景使其更适用于定量荧光分析。本章利用“水热法”首次在玻璃滤纸上合成了氧化锌纳米线，实现了荧光增强，解决了纸基荧光检测存在信噪比低的问题；结合纸基微流控技术，成功制备了高通量阵列式荧光生物芯片；研制了便携式荧光传感分析仪，通过巧妙设计环形贴片式激发光源，解决了便携式荧光传感平台存在的激发光源强度不足、激发不均匀等痛点问题。同时，开发了智能手机荧光阵列检测软件“H-T Fluorescence Detect”实现了荧光图像的精准获取和分析。使用聚合物量子点 CN-PPV 对高通量荧光检测系统进行了验证，证明了检测系统氧化锌纳米线荧光增强提高检测灵敏度的可行性。最后，利用开发的基于智能手机的高通量纸基微流控荧光分析装置实现了兔免疫球蛋白的定量检测，实验结果显示，氧化锌纳米线纸基上兔免疫球蛋白的检测限比纯玻璃滤纸的检测限提高了 10 倍，验证了该检测系统在生化分子检测方面具有高的灵敏度和可

靠性。

第五章：对本文的研究内容进行总结，并对智能手机数字图片比色法即时检测技术研究及仪器开发的后续的发展工作和应用进行了探讨和展望。

第2章 基于智能手机和颜色主波长比色分析的 pH 高精度定量检测

2.1 研究背景

pH 表示着水溶液中质子浓度大小。众所周知,材料的生产过程、啤酒或酸奶等食品的发酵过程、医院中“尿常规”检查等都需要对 pH 进行测定,因此, pH 在化学工业^[100, 101]、食品加工^[102-104]、环境监测^[105, 106]和生物医学诊断^[107-111]中起着至关重要的作用。

传统的测量 pH 值的方法有 pH 电极法、酸碱滴定法^[112]及 pH 试纸法。酸碱滴定法是利用酸和碱在水中以质子转移反应为基础的 pH 分析方法。滴定过程中需要选择甲基红、甲基橙、酚酞等合适的指示剂来指示滴定终点,且酸碱滴定法只能区分溶液的酸碱性,不能实现准确的 pH 值测定。电极由于检测精度较高,是化工生产、食品安全等领域普遍使用的检测方法。然而,电极法中使用的玻璃电极、饱和甘汞电极需要定期维护和更换,且在检测前均需校准,操作步骤较为复杂。同时,当溶液为强酸或强碱时会影响电极的性能。此外,待测物体积要求较大也是造成电极法测量不能广泛应用于现场快速检测中的一个原因。pH 试纸法由于成本低、操作简单、检测速度快被广泛使用。pH 试纸是将显色剂固定在其中制成的,待待测样显色后,通过显色后试纸条颜色与标准比色卡对比得出 pH 值。经调研,市场上有许多品牌的商业 pH 试纸条(见表格 2-1),最高检测精度可以达到 0.2 单位 pH。pH 试纸法是通过人肉眼与比色卡进行比较来得出检测结果,无论如何改进试纸条的检测精度,检测结果仍然受到人眼颜色识别差异等主观因素的影响。因此, pH 试纸法是定性半定量的检测方法,只适用于较粗略地筛查而难以用于高精度 pH 检测。

表格 2-1 不同品牌 pH 试纸

Table 2-1 pH test papers of different brands

品牌	国家	pH 检测范围	最高检测精度
Hydriion	美国	0~14、0~6.0、0.8~2.0、1.4~2.8、	0.2
		2.8~4.6、2.9~5.2、5.5~8.0、6.0~7.4、	
Whatman	英国	6.0~9.5、7.9~9.7、10.2~12.3	0.2
		0~14、0.5~5.5、1.0~12.0、1.8~3.8、	
		3.8~5.5、4.0~7.0、4.5~10.0、5.2~6.8、	

续表

Macherey Nagel	德国	0~6.0、0~14、1~12、0.3~2.3、 1.0~4.3、3.5~6.8、4.5~10.0、5.0~8.0、 5.1~7.2、7.0~10.0、7.9~9.8、9.5~14.0 1~14、0.5~5.0、1.4~3.0、2.7~4.7、	0.2
奥克新概念	中国	3.8~5.4、4.0~10.0、5.5~9.0、6.4~8.0、 8.2~10.0、9.0~14.0	0.4
东风	中国	0~14、0~6.0、0~7.0、0.5~5.0、 2.0~9.0、3.8~5.4、4.0~7.0、4.5~9.0、 5.5~9.0、4.5~10	0.25

在此基础上,人们开发了各种新型 pH 传感器用于 pH 的高精度测量。2015 年 Dutta 等基于智能手机开发了一款手持式光谱仪用于地表水和河流水的 pH 值检测^[113]。但是,在该实验中需要用到 pH 显色剂,给现场快速检测的增加了操作步骤。2014 年 Hossain 等利用 4-氨基萘二酰亚胺荧光团作为 pH 传感材料,开发了基于荧光的 pH 检测系统,通过商用软件“RGB Android”实现了色度值 G 值分析并对 pH 检测^[114]。2017 年 Gotor 等通过制备荧光染料膜阵列将 pH 溶液滴加在膜阵列中,并利用智能手机应用程序获取荧光探针的发光强度或 H 值,最后经由亨德森-哈塞尔巴尔赫方程处理,最终得到待测样本的 pH 值^[115]。以上几种化学分析的方法都比较新颖,相比较之前的传统方法更简便、准确,尽管如此,由于这些方法中 pH 显色剂、荧光染料等需自行配制,它们还是没能实现真正意义上的现场快速检测。

于是,研究者们又提出了利用商用试纸条结合智能手机实现 pH 值的高精度定量检测。2012 年 Shen 等在分析 pH 测试条的图像时,建立了 pH 值与 CIE 1931 颜色空间中色度值坐标 (x, y) 之间的相关性^[78]。2013 年 Onescu 等提出了他们的基于智能手机的方法对 5.0~9.0 和 1~14 pH 试纸进行成像,通过将读取的 RGB 值转换成 HSV 值,建立 pH 值与 H 值的对应关系,以确定汗液和唾液的 pH 值^[116]。2014 年 Yetisen 等开发了一种智能手机读取的自制显色测试条,以实现尿液 pH 值的高精度和可重复测定^[117]。尽管取得了上述开创性进展,但基于智能手机的高精度 pH 测定仍面临两个关键挑战。首先是光照环境的差异会影响图像质量,从而导致检测结果不准;另一方面, pH 显色是色调发生变化的显色体系,图像分析过程中选择最佳的色度值,从而建立直观准确的校准曲线对于 pH 测定至关重要。

因此,本章工作中,针对 pH 的显色色调发生变化的显色体系提出了“主波长”比色分析新指标;同时,针对智能手机数字图片比色分析受外界环境光照、手机型号等不同因素的影响,设计了集成光学系统,开发了颜色纠正算法,搭建了基于智能手机结合商业试纸条实现 pH 高精度定量检测系统。针对 pH 试纸检测准确度低及传统 pH 计检测操作繁琐、试剂用量大等问题,提出了将智能手机与 pH 试纸条相结合的 pH 测量新方法。通过建立 pH 值与主波长值之间的对应关系实现了 pH 值的高精度测量,检测精度达到了 0.05 单位 pH。分别利用本检测系统与 pH 计对实际样本进行测定,通过构

建 Bland-Altman 图对二者检测结果进行分析，两种检测方法所测值的差异在 $\pm 1.96SD$ 范围内，验证了本系统在测定 pH 值时的准确性与可靠性。该检测系统将商用试纸与智能手机数字图片比色分析巧妙结合，为即时医疗诊断、环境监测等领域 pH 值现场快速高精度测量提供了新平台。

2.2 智能手机检测系统的开发与实现

2.2.1 Android 操作系统介绍

智能手机自诞生后就凭借着其快速处理数据、多进程并行处理、内聚程度高等优点，得到广泛使用。智能手机应用程序的运行必须建立在强大的操作系统之上，主流的操作系统有 Android、Symbian OS、Mac OS、BlackBerry 等，其中在全球市场占有率最高的当之无愧是 Android 操作系统。据 2018 年 4 月移动系统统计报告显示，Android 系统在中国已经达到 86% 的市场份额，充分证明 Android 系统绝对领先的普及程度。Android 系统之所以可以拥有如今的知名度，源于 Andy Rubin 最初于 2003 年 10 月创办，并且坚持着“不重复造轮子”的软件开发理念让 Android 成为开源编程工具。当被谷歌公司收购之后，Android 成为 Eclipse 的一项重要分支，通过搭配 ADT 虚拟机来实现移动应用程序的模拟调试。随着智能手机近十几年的迅速发展，人们对手机应用程序的需求不断增加，开发人员对智能手机应用程序的迭代速度不断提升，Android 系统于 2013 年 5 月 16 日推出了独立用于 Android 开发的平台 Android Studio，让 Android 应用程序的开发更为灵活。在应用程序开发架构过程中，如图 2-1 所示，一般分为四层^[118]，从底层至高层依次是应用程序层，应用程序框架层，核心类库^[119]和 Linux 层^[120]。

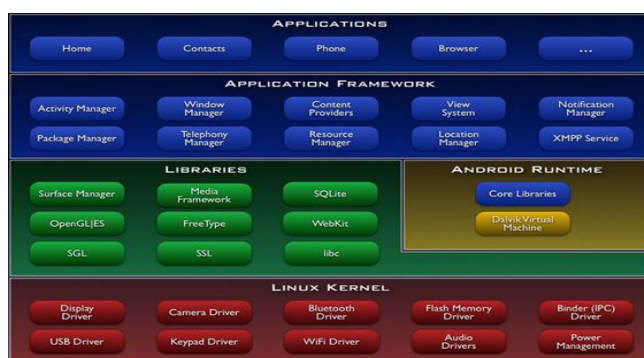


图 2-1 Android 系统架构

Fig. 2-1 Android system architecture

Android 是一种面向组件的移动应用开发架构，其中最核心且最基本的就是活动（Activity）、服务（Service）、内容提供者（Content Provider）、广播接收器（Broadcast Receiver）这四大组件^[121,122]。Android 系统为开发功能强大的应用程序并实现数据存储、

处理和读取奠定了基础。本研究中选择 Android 为操作系统、以 Windows 为开发平台实现了三款应用程序的开发。

2.2.2 应用程序开发

开发 Android 应用程序需要准备表 2-2 所示的工具：

表 2-2 Android 平台开发工具

Table 2-2 Android platform development tools

开发工具	功能
JDK	提供 Java 编译环境
Eclipse/Android Studio	Java 的 IDE 集成开发工具
Android SDK	提供 Android 应用开发环境及工具
ADT	Android 开发工具插件，连接 SDK 和 Eclipse

开发环境的搭建是程序开发的第一步。首先，我们需要下载 JDK，点击 jdk-8u91-windows-x64 运行并选择路径安装。安装 JDK 之后，设置系统中的三个环境变量：JAVA_HOME，PATH，CLASSPATH 之后才可以使用。如需确认 JDK 是否安装成功，可以点击图标，并输入命令“cmd”之后在屏幕上会弹出一个对话框，在此对话框的命令行输入“java-version”，如果对话框中显示如图 2-2 所示信息，则表明运行环境搭建成功。完成了开发环境的搭建，通过安装 Android Studio 或 Eclipse 软件就可以进行具体的应用程序的开发工作。



图 2-2 确认正确安装 JDK

Fig. 2-2 The verification that JDK was installed correctly

2.3 智能手机 pH 高精度定量检测系统的设计与开发

2.3.1 基于 CIE 1931 颜色空间的主波长值计算原理分析

众所周知，pH 试纸的比色反应具有较大的色度跨度。因此，通常采用的比色参数，例如 RGB 或 HSV 值，很难准确地“量化”由 pH 值变化引起的色调变化。在此，我们

探索使用从商用 pH 试纸中确定的主波长值 (λ_d) 或互补波长值 (λ_c) 来实现标准缓冲溶液和实际样品的 pH 值的高精度、定量测定。

在 CIE1931 色度空间中, 单色光谱色与标准照明体按一定比例混合匹配出各种颜色, 其主波长值指的是该颜色对应的单色光谱色的波长值^[123]。为了计算颜色的主波长值或补色波长值, 首先需要得到颜色点在 CIE1931 色度空间中的坐标。在本研究中, 智能手机 App “Smart-pH-Reader” 获取图像后, 图片经过软件算法中的“去马赛克”过程后每个像素点都会包含 R、G、B 三个色度值信息。在获得的 RGB 色度信息的基础上, 通过公式 (2-1)、(2-2)、(2-3) 得到亮度因子 r、g、b, 未经转换的 R、G、B 值是非线性的, 转换之后 r、g、b 为线性 RGB 值^[124]:

在 8 位编码的情况下, R、G、B 值取整数 0~255:

$$\begin{cases} R' = R / 255 \\ G' = G / 255 \\ B' = B / 255 \end{cases} \quad (2-1)$$

当 $R', G', B' \leq 0.04045$ 时

$$\begin{cases} r = R' / 12.92 \\ g = G' / 12.92 \\ b = B' / 12.92 \end{cases} \quad (2-2)$$

当 $R', G', B' > 0.04045$ 时

$$\begin{cases} r = [(R' + 0.055) / 1.055]^{2.4} \\ g = [(G' + 0.055) / 1.055]^{2.4} \\ b = [(B' + 0.055) / 1.055]^{2.4} \end{cases} \quad (2-3)$$

经过转换之后得到的仍然是色度信息的数字信息, 我们都知道, 用物理量来表示颜色, 以及采用仪器对颜色进行测量的方法, 都是以人眼色觉的实验规律为基础的。CIE XYZ 色度空间是一个可以体现人眼视觉特性的标准空间, 将 RGB 颜色空间的色度信息转化到 CIE XYZ 色度空间中可以对人眼视觉进行定量描述。接下来将线性 r、g、b 亮度因子形成的混合色光转换到 D65 标准照明体下的 CIE XYZ 色度值, 转化关系如下^[125]:

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix}_{D65} = \begin{bmatrix} 0.4124 & 0.3576 & 0.1805 \\ 0.2126 & 0.7152 & 0.0722 \\ 0.0193 & 0.1192 & 0.9505 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r \\ g \\ b \end{bmatrix} \quad (2-4)$$

通过三刺激值 XYZ 可以得到色品坐标 x, y。所有颜色的色品坐标 [x, y] 形成了一个马蹄形的色品图, 这些坐标值可以代表颜色的色品^[126]。

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} / (X + Y + Z) \quad (2-5)$$

得到颜色点在 CIE1931 色品图中的坐标后，在已知规定白点 $O(x_0, y_0)$ 的前提下，可以通过有差异的方式来求出颜色的主波长。如图 2-3 所示，从白点出发，经过颜色点 $C_1(x_n, y_n)$ 引一条射线与马蹄形光谱轨迹相交于一点，该点处的波长值就是颜色点 C_1 的主波长值。在程序算法中，通过计算白点与颜色点之间直线斜率的方式，实现颜色点与波长值的一一对应，计算公示如下所示，每个波长值对应一个斜率值再通过查找附表的形式，得到每个颜色点的主波长值。

$$k = \frac{x_0 - x_n}{y_0 - y_n} \quad (2-6)$$

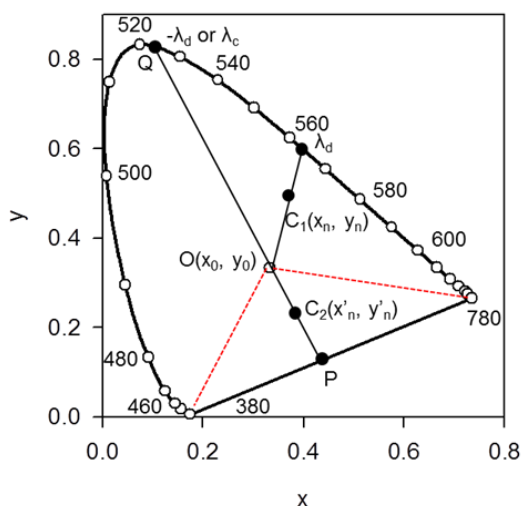


图 2-3 CIE 1931 色品图中主波长值的定义

Fig. 2-3 Definition of dominant wavelength value in CIE 1931 chromaticity diagram

然而，在色品图中，并不是所有的颜色都有主波长值，如图 2-3 所示，在由白点与光谱轨迹末端的点形成的红色三角区域中的颜色点的波长值由补色波长值来表示。例如， C_2 点的补色波长是从 C_2 点到白点引一条直线，直线延长线与光谱轨迹的交点的主波长值就是 C_2 点的补色波长值。上述计算过程，包括斜率的计算、斜率与主波长值（补色波长值）的匹配，均是在智能手机应用程序“Smart-pH-Reader”中进行。

2.3.2 智能手机 pH 高精度定量检测仪光学装置设计

本研究中是基于数字图片比色法实现 pH 的高精度定量检测，图像的准确获取与分析对提高检测精度与准确性具有重要意义，在比色分析中，外界光照环境是影响图像质量进而影响实验结果的关键因素。

为了探究不同光照环境对实验结果的影响，本文中利用图像处理软件 Photoshop 设计 RGB 值分别为 (255, 0, 0)、(255, 165, 0)、(255, 255, 0)、(0, 255, 0)、(0, 255, 255)、(0, 0, 255)，对应主波长分别为 611 nm、584 nm、570 nm、549 nm、491 nm 和 464 nm 的六种颜色的图片，并将其进行高品质彩色打印。分别在 2 Lux 面光源、63 Lux 点光源和 805 Lux 台灯光源这三种不同的光照环境下利用智能手机 “Smart-pH-Reader” 检测六种颜色的主波长值，检测结果如图 2-4 所示，通过与设计的三种颜色的标准波长值对比可以发现，在 2 Lux 面光源环境下检测结果与标准波长值最为一致，因此，最终选用 2 Lux 的小型面光源作为检测的光照环境。

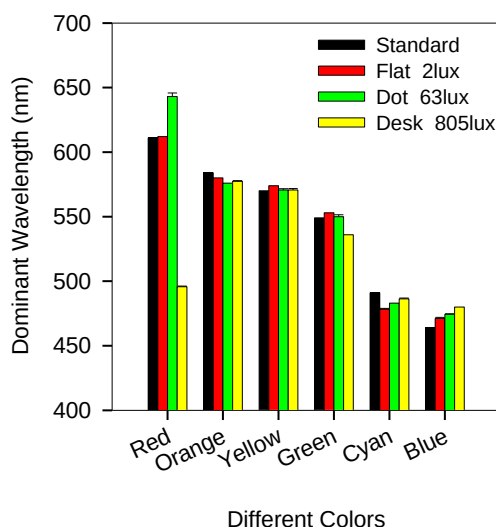


图 2-4 不同光照环境下对六种颜色主波长的测量结果图，分别在 2 Lux 面光源、63 Lux 点光源、805 Lux 台灯三种不同光照环境下测量以上六种颜色的主波长值 ($n=3$)

Fig. 2-4 The measurement results of the dominant wavelengths of the six colors under different lighting environments. The dominant wavelengths of the above six colors are measured under three different lighting environments: 2 Lux surface light source, 63 Lux point light source, and 805 Lux desk lamp ($n=3$)

为了提供均匀的光照排除外界环境光的影响，同时能够满足现场检测的需要，实现 pH 的高精度检测，我们利用 3D 绘图软件 SOLIDWORKS 设计并制作了一款可以与智能手机结合使用的 pH 检测便携式光学装置，如图 2-5 (a) 所示是便携式光学装置的结构图，整个装置的尺寸为 $69 \times 54 \times 40$ mm，主要由两个小型面光源、一个电池盒（内装三个纽扣电池作为面光源电源）、一个 pH 试纸条插槽（将试纸条保持在适当位置）、一个安装有微距透镜的手机拍照口组成。其中组成小型面光源的 LED 灯的尺寸为 $2 \times 3 \times 4$ mm，额定电压为 3 V，功率为 60 mW。

本文中购买的 Hydrion 品牌的 pH 试纸采用的卷装包装，实验过程中为了检测方便且保持每次检测一致，将卷装的试纸裁剪成 5×10 mm² 的矩形，并使用双面胶带粘贴在疏水相纸上，如图 2-5 (b) 所示。为了实现一次性多个检测，将裁剪的试纸每三个为

一组相距 5 mm 排列在相纸上，制作了实验中所用的 pH 试纸。

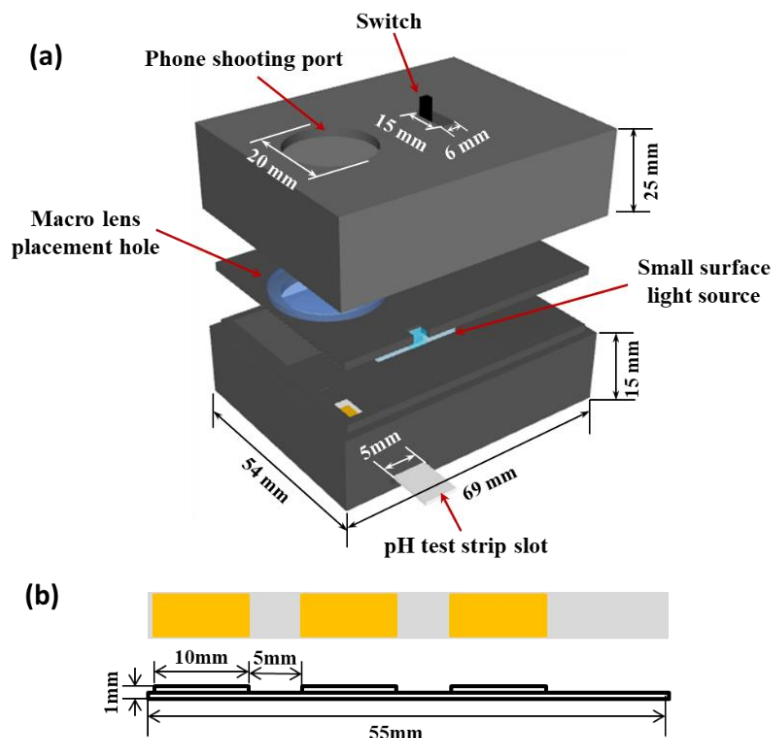


图 2-5 (a) 基于智能手机的 pH 检测光学附件结构示意图。(b) 重新排列的 pH 试纸，可直接使用 Smart-pH-Reader 进行分析。将卷状的 pH 测试条切成矩形贴片 ($5 \times 10 \text{ mm}^2$)，使用双面胶带粘贴在疏水相纸上。每个“重新排列”的测试条都包含三个彼此相距 5 mm 长的矩形贴片

Fig. 2-5 (a) Schematic illustration of the construction of the optical attachment for the smartphone-based pH reading system, namely, Smart-pH-Reader. (b) Rearranged pH test strip that can be directly analyzed with the Smart-pH-Reader. A rolled pH test strip was cut into rectangular patches ($5 \times 10 \text{ mm}^2$) that affixed on a hydrophobic photo paper using double-sided adhesive tape. Each of this “rearranged” test strip contains three rectangular patches with a length of 10 mm and 5 mm apart from each other

2.3.3 智能手机图像分析算法应用程序实现

本研究中利用华为 honor 7i 智能手机对所开发的“Smart-pH-Reader”应用程序进行运行调试。应用程序的运行界面如图 2-6 所示。如图 2-6 (a) 主界面上包括：Start、History、Help、Quit 及 pH test strip selection 五个选项。首先，在应用程序的主界面中，点击 pH 范围前面的按钮，选择相应的 pH 范围，应用程序加载相应的校准数据，即可开始准确测量 pH 值。其次，通过点击“Start”应用程序调用手机摄像头自动聚焦，并在点击“Capture”按钮后获取显色图像并保存在手机中，软件界面如图 2-6 (b) 所示。最后，通过点击“Analyse”显色图像波长值及对应的 pH 值显示在手机屏幕上，如图 2-6 (c) 所示。此外，用户还可以点击“History”按钮来查询检测结果列表；点击“Help”按钮了解“Smart-pH-Reader”软件操作说明等信息；点击“Quit”按钮退出

应用程序。

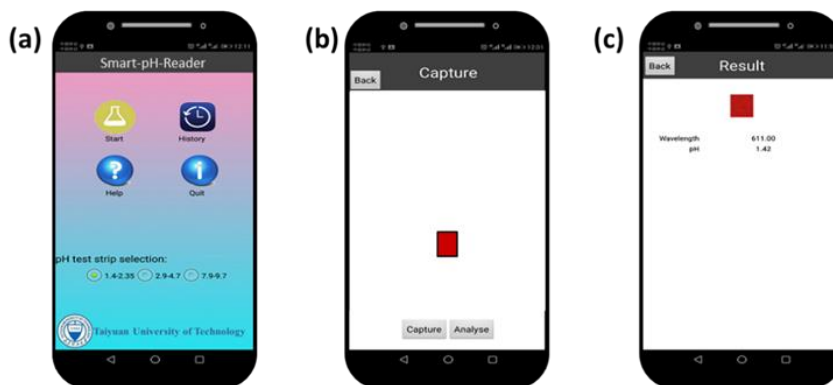


图 2-6 用于检测 pH 值的 Android 应用程序的界面图。(a) 主菜单显示开始, 历史记录, 帮助, 退出和 pH 范围选择; (b) 用户获取 pH 试纸测试区的图像; (c) 测试结果显示在智能手机屏幕上

Fig. 2-6 The user interface and operation of the “Smart-pH-Reader” app. (a) shows the main interface, which displays five options for the user to select: Start, History, Help, Quit and pH range selection. (b) shows the results upon selecting the corresponding test strip and clicking the “Start”, i.e., a preview with a black box is displayed on the screen. (c) shows the results upon clicking the “Analyze” button

以上是本文研发的应用程序对图像的分析过程, 整个过程中颜色主波长值的计算是通过程序化的算法来实现的。首先, 通过代码获得图片的每个像素点的 RGB 值, 然后对全部像素点的 RGB 值求平均值 R_{mean} 、 G_{mean} 、 B_{mean} 。然后通过 2.3.1 部分的公式 (2-1)、(2-2)、(2-3) 得到红、绿、蓝三个通道的亮度因子 r 、 g 、 b 。经过公式 (2-4)、(2-5) 将图像的颜色信息从 RGB 值转换到 CIE 1931 色度空间中的坐标 (x, y) 。之后, 计算颜色点与白点之间连线的斜率, 记为 X_{ielv} 。最后, 通过斜率与波长值的一一对应关系建立数据库保存在代码中。波长值与斜率对应查找的循环代码如下所示:

```
if(x1<=0.31272){
    if(Xielv1<=M[0][1]&Xielv1>=1){
        double l[]=new double[99];
        for(int h=0;h<99;h++){
            m[h]=M22[h][1]-Xielv2;
            l[h]=Math.abs(m[h]);
        }
        w=getmin(l);
        wave=M22[w][0];
    }
```

2.3.4 智能手机 pH 高精度定量检测仪性能评价

在完成了应用程序 “Smart-pH-Reader” 的开发后, 需要通过对标准颜色波长值的测量来验证该应用程序的可行性与准确性。本文中利用图像处理软件 Photoshop 设计

RGB 值分别为 (255, 0, 0)、(255, 165, 0)、(255, 255, 0)、(0, 255, 0)、(0, 255, 255)、(0, 0, 255) 六种颜色的图片, 它们的波长范围分别为红 (600~770 nm)、橙 (580~600 nm)、黄 (550~580 nm)、绿 (530~500 nm)、青 (470~500 nm)、蓝 (430~470 nm) [123, 127]。从图 2-7 可以看出, 智能手机检测系统分析的六种颜色的主波长值分别为 611、584、570、549、491、464 nm, 该系统测得的每个颜色的主波长值都与标准值一致。

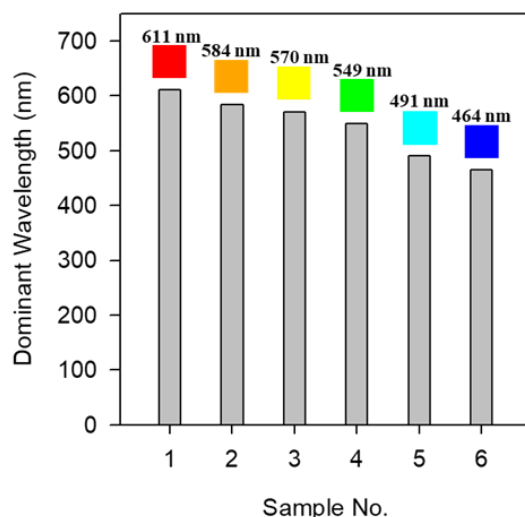


图 2-7 “Smart-pH-Reader” 测得的 Photoshop 设计的六种颜色的主波长值

Fig. 2-7 Dominant wavelength values of six colors designed by Photoshop measured by “Smart-pH-Reader”

为了验证 “Smart-pH-Reader” 检测系统在不同型号智能手机上的普适性, 选取华为畅享 10Plus、华为畅享 7Plus、红米 10X、VIVO Y31s、VIVO IQOO 这五款智能手机作为研究对象。将研发应用程序 “Smart-pH-Reader” 分别安装在这五款智能手机上。同时, 购买了潘通的标准色卡, 选择 RGB 值分别为 (240, 141, 138)、(247, 176, 106)、(255, 232, 133)、(113, 201, 115)、(63, 201, 230)、(66, 164, 228)、(165, 150, 206) 的七种颜色标准色卡作为分析对象。用制作 pH 试纸条的方法将色卡剪切粘贴在相纸上, 在 Smart-pH-reader 检测系统中进行检测, 得到每种颜色的主波长值。七种色卡的图像采集结果和测量的主波长值如图 2-8 所示。从分析结果可以看出, 本文所开发的智能手机应用程序运行在五款不同品牌智能手机上, 其对同一颜色的波长值的测量结果基本上是一致的。证明 “Smart-pH-reader” 可以应用于不同的手机且可以校正不同型号手机在比色分析过程中导致的误差, 排除了智能手机型号对检测的影响, 因此, 所开发的应用程序 “Smart-pH-Reader” 具有普适性。

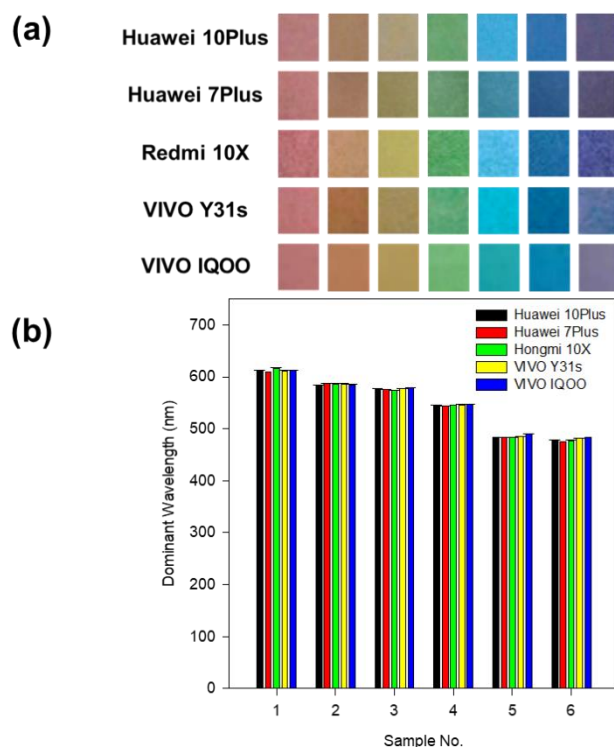


图 2-8 (a) 不同型号的五部智能手机分别获取同一批 7 张色卡的图像; (b) 5 款智能手机主波长值在 7 张色卡上的检测结果对比 ($n=3$)

Fig. 2-8 (a) Five smart phones of different models respectively obtained images of the same batch of 7 color cards; (b) Comparison of the detection results of dominant wavelength values of 5 smart phones on 7 color cards ($n=3$)

2.4 实验部分

2.4.1 实验试剂与仪器

pH 值为 1.4~2.8、2.9~5.2、7.9~9.7 的 pH 试纸条 (Hydriion, Micro Essential Laboratory, Inc)。HCl (36-38%), NaCl, NaOH 均为分析纯, 购自 Aladdin 公司, Na_2HPO_4 (无水, $\geq 99.5\%$, Aladdin 公司); NaHCO_3 ($\geq 99.5\%$), KCl ($\geq 99.5\%$), Na_2CO_3 ($\geq 99.8\%$) 购自 Kermel 公司; 柠檬酸 ($\geq 99.5\%$, ACS, Sigma-Aldrich 公司); 实验用水为超纯水 (电阻率为 $18.20 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$); 白醋 (山西老陈醋集团有限公司), 苏打水, 柠檬水。用到基于 Windows 8 系统笔记本电脑、Eclipse 软件, 其余所用设备如表 2-3 所示:

表 2-3 实验设备

Tab.2-3 Experimental instruments

仪器名称	生产商
------	-----

续表

4℃冰箱	中国海尔
STARTER 3100 pH 计	奥豪斯公司（美国）
华为畅享 7S 手机	华为公司（中国）
电子天平	奥豪斯公司（美国）
数显鼓风干燥箱	上海博讯
超纯水系统	赛默飞世尔科技公司（美国）
微量移液器	梅特勒-托利多（瑞士）
3D 打印机	创想三维（上海）
SK-1 快速混匀器	科析仪器有限公司（中国）

2.4.2 pH 溶液的配制与实验过程

在 pH 溶液的配制过程中需要用到 pH 计，因此，首先对 pH 计进行校准。pH 计的校准过程：在室温（25℃）下，pH 计校准使用的 pH 值为 4.00（0.05 mol/L $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ）、6.86（0.025 mol/L KH_2PO_4 和 0.025 mol/L Na_2HPO_4 体积比为 1:1）、9.18（0.01 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ）pH 电极校准溶液。使用两点校准方法进行校准。首先将电极放入 pH=6.86 的标准溶液中，点击校准按钮使 pH 计值变为 6.86，清洗电极后，根据待测溶液的酸碱度选择第二种校准缓冲液。如果待测溶液为酸性，选择 pH=4.00 的校准缓冲液；如果待测溶液为碱性，则选择 pH=9.18 的校准缓冲液。再次点击校准按钮，使 pH 计的值变为 4.00 或 9.18，校准完成。

pH 值从 1.4 到 2.35（间隔 0.05）溶液的配制：首先分别配制 0.2 mol/L 的 KCl 溶液与 0.2 mol/L 的 HCl 溶液，随后，将配制好的 0.2 mol/L 的 KCl 溶液和 0.2 mol/L 的 HCl 溶液按不同比例混合得到 1.4~2.35（间隔 0.05）的溶液。具体的配制体积比如表 2-4 所示。

表 2-4 1.4~2.1 范围内 pH 缓冲溶液的配制

Table 2-4 Configuration of pH buffer solution in the range of 1.4~2.1

pH Value	0.20 mol/L HCl (x mL)	Water (y mL)
1.4	5.32	14.68
1.5	4.14	15.86
1.6	3.24	16.76
1.7	2.60	17.40
1.8	2.04	17.96
1.9	1.62	18.38

续表

2.0	1.30	18.70
2.1	1.02	18.98

pH 值从 2.9 到 5.2（间隔 0.05）溶液及 pH 值从 7.9 到 8.9（间隔 0.1）溶液的配制：首先，配制 0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液与 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液；其次，将 0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液和 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液按不同比例混合得到 2.9~5.2（间隔 0.05）溶液及 7.9~8.9（间隔 0.1）溶液。具体的配制体积比如表 2-5 所示。

表 2-5 2.2~5.2 范围内 pH 缓冲溶液的配制

Table 2-5 Configuration of pH buffer solution in the range of 2.2~5.2

pH Value	0.2 mol/L Na_2HPO_4 (x mL)	0.1 mol/L Citric acid (y mL)
2.2	0.4	19.6
2.4	1.24	18.76
2.6	2.18	17.82
2.8	3.17	16.83
3.0	4.11	15.89
3.2	4.94	15.06
3.4	5.70	14.30
3.6	6.44	13.56
3.8	7.10	12.90
4.0	7.71	12.29
4.2	8.28	11.72
4.4	8.82	11.18
4.6	9.35	10.65
4.8	9.86	10.14
5.0	10.30	9.70
5.2	10.72	9.28
7.8	19.15	0.85
8.0	19.45	0.55

pH 值从 9.0 到 9.7（间隔 0.1）溶液由不同比例的 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液和 0.1 mol/L 的 NaHCO_3 溶液混合得到。具体的配制体积比如表 2-6 所示。

表 2-6 7.9 ~ 9.7 范围内 pH 缓冲溶液的配制

Table 2-6 Configuration of pH buffer solution in the range of 7.9 ~ 9.7

pH Value	0.1 mol/L Na_2CO_3 (x mL)	0.1 mol/L NaHCO_3 (y mL)
9.16	1.0	9.0
9.40	2.0	8.0
9.51	3.0	7.0
9.78	4.0	6.0

所有溶液的 pH 值均用 STARTER 3100 pH 计测定。

2.5 结果与讨论

2.5.1 基于智能手机的不同范围 pH 值的高精度定量检测

为了验证该检测系统的灵敏度和准确性，我们选取了三个具有代表性 pH 范围的 Hydrion 试纸：1.40~2.35（强酸）、2.9~5.2（弱酸）、7.9~9.7（碱性）来进行实验。

在 1.40~2.35 范围内，我们以 0.05 为间隔配置了 20 个 pH 缓冲溶液，在制作的试纸上进行了实验。“Smart-pH-Reader”检测系统获得的图像如图 2-9（a）所示。我们可以很明显的看出，随着 pH 值的逐渐增加，试纸的颜色出现从红色到橙色的逐渐变化。对于定量分析来说，一般情况下会选择 R 值作为红色变化的参数。从图 2-9（b）中可以看到，随着 pH 值的增加，R 值也表现出普遍增加的趋势，但并不是单调增加，且误差较大。这表明，R 值与 pH 值之间没有直接的线性关系，无法为检测提供准确的标准曲线。相比之下，从图 2-9（c）可以看出，主波长值与 pH 值之间呈现良好的线性关系，回归方程可以表示为 $y = -23.3x + 635.8$ ，相关系数为 $R^2 = 0.996$ 。图 2-9（c）的插图是试纸比色卡的照片图，可以看到，色卡的测量精度是 0.2 单位 pH，远小于该检测系统 0.05 单位 pH 的检测精度。且对应的 1.4、1.7、2.1、2.4 这四个点均落在拟合的标准曲线上，这也证明了标准曲线的准确性。

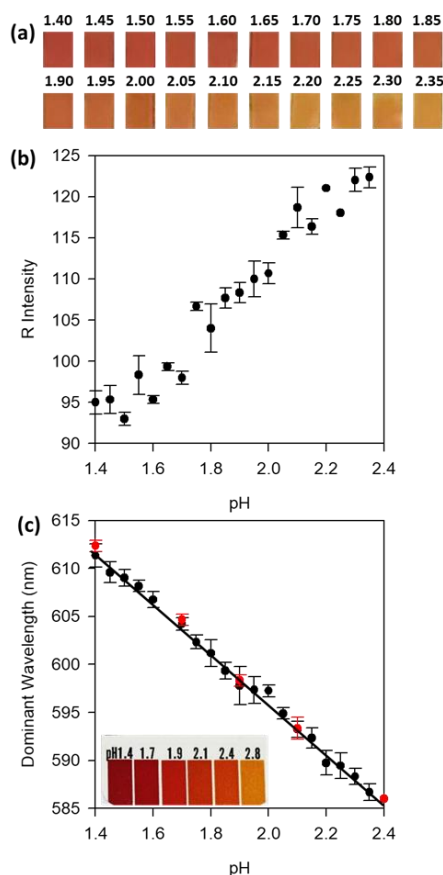


图 2-9 利用“Smart-pH-Reader”系统对 Hydrion 试纸 1.4~2.35 范围 pH 值的高精度测量。(a)“Smart-pH-Reader”系统获取的 20 个标准 pH 缓冲溶液的显色图像；(b) pH 值与色度值 R 的对应关系；(c) pH 值与主波长值的对应关系。插图中为 pH 试纸的比色卡图片，图中红色数据点表示的是比色卡上 pH 值对应的主波长值 ($n=3$)

Fig. 2-9 High-precision measurement of pH value in the range of 1.4~2.35 of Hydrion test paper using the "Smart-pH-Reader" system. (a) Captured images of the 20 standards using the Smart-pH-Reader. (b) The relationship between the R value and the pH. (c) The relationship between the determined λ_d and the pH value. The inset is a scanned image of the color chart; the red solid circles show their correspond λ_d ($n=3$)

紧接着，我们为了拓展该检测系统更大范围的使用，我们使用 2.9~5.2 范围内的 pH 试纸进行下一步实验。该试纸条上不同于 1.40~2.35 范围的试纸条，同时存在两种显色剂。如图 2-10 (a) 在 2.90~4.80 范围内，由于溴酚蓝指示剂的存在，试纸颜色由黄色变为蓝绿色；当 pH 值进一步增加到 5.20 时，由于显色剂溴甲酚绿的存在，试纸条的显色从黄色变为了蓝色^[128, 129]。虽然颜色变化相当明显，但同样不可能用肉眼确定准确的 pH 值。在分析显色图像时，如图 2-10 (b) 由于两种显色剂的存在，在整个 pH 范围内，pH 值与主波长值呈现分段线性。线性方程及相关系数分别为：2.9~4.8 范围内： $y=-8.20x+603.1$ ，相关系数 $R^2=0.991$ ；4.9~5.2 范围内： $y=-51.0x+809.1$ ， $R^2=0.988$ 。虽然它不如 1.4~2.35 范围内的单一线性校准那么理想，但我们当然可以实现 0.05 单位分辨率的 pH 定量。相比之下，这款试纸的色卡仅提供了八种颜色进行对比，即我们可以分辨出 0.3 个单位的 pH 值差异。同样明显的是，较高 pH 值 (4.0~5.2) 的颜色图表读

数偏离回归线，如果仅基于颜色匹配，这可能会在 pH 测定中引入系统误差。如图 2-10 (c) 所示，我们无法获得测试溶液的 pH 值与 RGB 值之间的相关性。

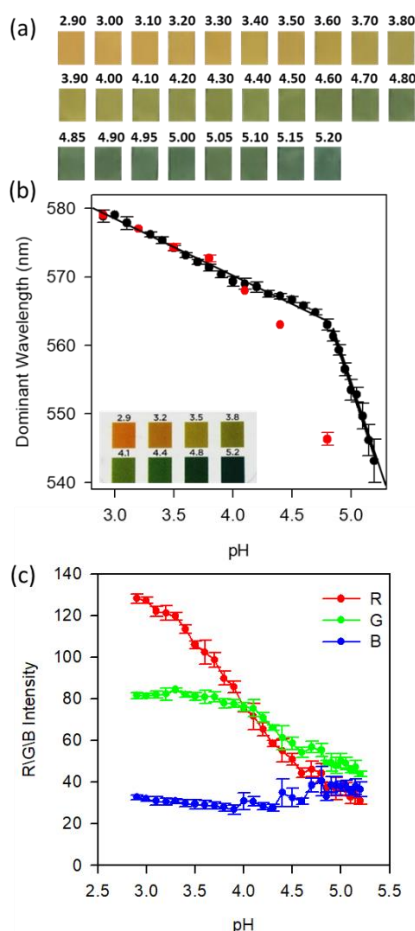


图 2-10 利用“Smart-pH-Reader”系统对 Hydrion 试纸 2.9~5.2 范围 pH 值的高精度测量。(a) “Smart-pH-Reader”系统获取的 28 个标准 pH 缓冲溶液的显色图像；(b) pH 值与主波长值的对应关系，插图中为 pH 试纸的比色卡图片，图中红色数据点表示的是比色卡上 pH 值对应的主波长值；(c) pH 值与色度值 RGB 的对应关系 ($n=3$)

Fig. 2-10 High-precision measurement of pH values in the range of 2.9~5.2 with Hydrion test paper using the "Smart-pH-Reader" system. (a) Captured images of the 28 standards using the Smart-pH-Reader. (b) Corresponding relationship between pH value and λ_d . The inset is the scanned color chart of this product, for which the corresponding λ_d values are shown as solid red circles. (c) The relationship between the R, G, B value and the pH ($n=3$)

我们还将该检测系统的应用拓展到了碱性溶液 7.9~9.7 范围内 pH 值的测量。从图 2-11 (a) 可以看到，由于百里酚蓝显色剂的第二次变色，试纸的显色范围逐渐从黄绿色变为蓝色^[128, 129]。我们也分析了随着 pH 值的变化，RGB 值的变化趋势，如图 2-11 (c) 所示，RGB 值仍然不能作为 pH 显色的分析参数。同样的，如图 2-11 (b) 所示，在该范围内主波长值随着 pH 值的变化也呈现分段线性关系，这是由 CIE1931 色品图的不均匀颜色分布导致的，在色品图中绿色所占面积最大。这也就意味着，主波长值的

微小变化会带来颜色的明显改变。两段实验数据可以分别用两条线性回归线拟合, $y=-13.80x+681.0$ 和 $y=-30.21x+760.3$, 相关系数 R^2 值分别为 0.976 和 0.973。如图 2-11 (b) 的插图所示, 该产品的颜色图表以 0.3 个单位增量显示一组 7 种颜色; 虽然可以实现半定量, 但我们的检测系统已将精度提高到 0.1 pH 单位。

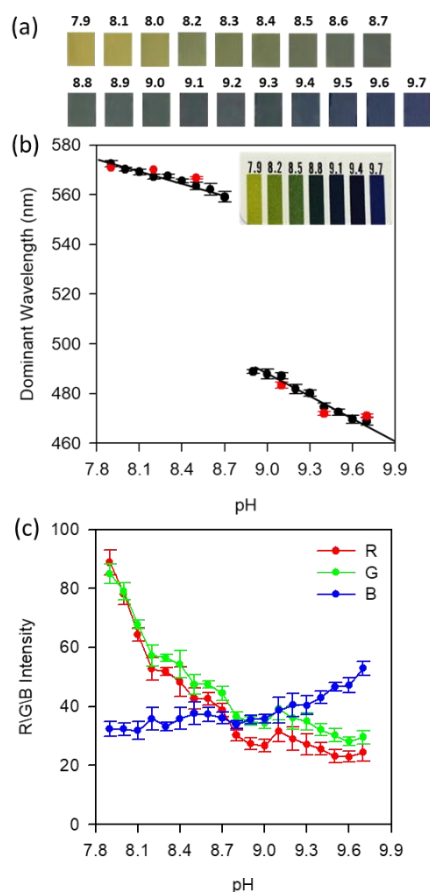


图 2-11 利用“Smart-pH-Reader”系统对 Hydrion 试纸 7.9~9.7 范围 pH 值的高精度测量。(a) “Smart-pH-Reader”系统获取的 19 个标准 pH 缓冲溶液的显色图像;(b) pH 值与主波长值的对应关系, 插图中为 pH 试纸的比色卡图片, 图中红色数据点表示的是比色卡上 pH 值对应的主波长值;(c) pH 值与色度值 RGB 的对应关系 ($n=3$)

Fig. 2-11 Quantitative determination of pH values with Hydrion 7.9~9.7 pH test strip using the smartphone-based pH reading system. (a) Colored images of 19 standard pH buffer solutions acquired by the "Smart-pH-Reader" system. (b) The determined λ_d as a function of the pH value of the standard solutions. The inset is the scanned color chart of this product, for which the corresponding λ_d values are shown as solid red circles. (c) The relationship between the R, G, B value and the pH ($n=3$)

2.5.2 实际样品检测及与标准检测方法的对比

通过前述开展的各项实验并分析与讨论实验结果, 我们已经研究并开发了用于不同 pH 范围测量的检测系统, 为了评价检测系统的准确性和可靠性, 因此, 接下来非常有必要对实际样品的 pH 进行定量检测。首先, 我们根据弱酸及其共轭碱的计算量制备

了五种 pH 缓冲溶液，如表 2-7 所示，它们各自的 pH 值可以从 Henderson-Hasselbalch 方程推导出来，并用 pH 计校准。图 2-12 (a) 显示了使用智能手机和 pH 计测量的 pH 值之间的相关度，最佳线性拟合产生 1.00 ± 0.05 的斜率且相关系数 $R^2=0.990$ ，二者呈现良好的一致性。值得一提的是，对于所取的五个读数，两种方法之间的最大差值为 3.2%；并且所有其他读数的差异均小于 1.3%，如表 2-7 所示。

除此之外，我们使用该检测系统对日常生活中常见的白醋、柠檬水、苏打水三种实际样品的 pH 值进行了测量，将检测结果与 pH 计进行了比较。二者检测结果如图 2-12 (b) 所示，可以看到二者的检测结果呈现良好的一致性，进一步，我们所有实际样本的二者检测结果通过构建 Bland-Altman 图进行了分析^[130]，如图 2-12 (c) 两种检测方法所测值的差异在 $\pm 1.96SD$ 范围内。以上两种方法对实际样本的检测结果，验证了本检测系统在检测实际样品时的可靠性与准确性。

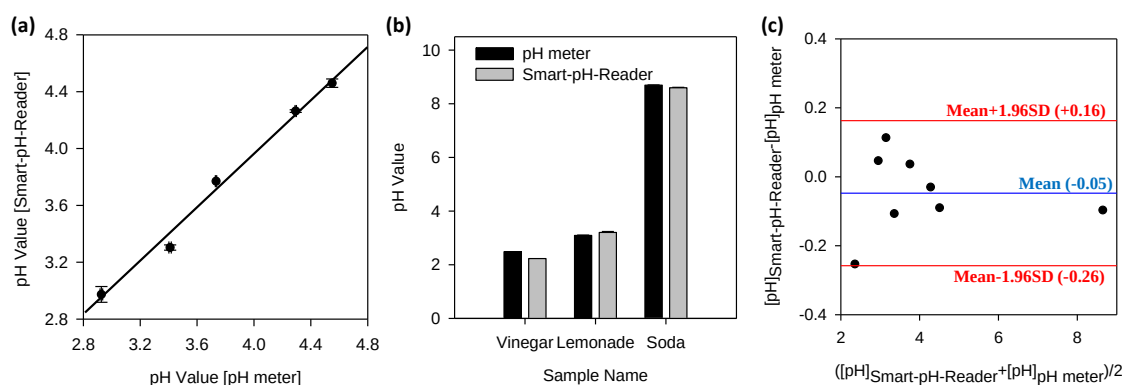


图 2-12 Smart-pH-Reader 检测系统的可靠性与准确性验证。(a) pH 计与 Smart-pH-Reader 检测系统对 5 种标准 pH 缓冲溶液检测结果对比；(b) pH 计与 Smart-pH-Reader 检测系统对白醋、柠檬水、苏打水 3 种实际样品检测结果对比；(c) Bland-Altman 图显示了 Smart-pH-Reader 检测系统和 pH 计检测结果之间的一致性 (n=3)

Fig. 2-12 Validation of the smart-pH reader with a standard pH meter. (a) Correlation between the results of the smart-pH reader and the pH meter for five standard solutions. (b) The determined pH values of three actual samples (vinegar, lemonade and soda) using the smart-pH-reader (grey bars) and the pH meter (black bars). (c) Bland-Altman plots showing the agreements between SPD and pH meter (n=3)

表 2-7 五种标准 pH 缓冲溶液 pH 理论值、pH 计检测及 “Smart-pH-Reader” 检测结果对比

Table 2-7 Comparison of pH theoretical value, pH meter detection value, and "Smart-pH-Reader" detection value of five pH buffer solutions

Sample No.	Theory value	pH meter	Smart-pH-Reader
1	3.00	2.93	2.97
2	3.40	3.41	3.30
3	3.80	3.73	3.77

续表

4	4.20	4.29	4.26
5	4.60	4.55	4.50

作为一种 pH 值现场快速测量系统,我们讨论了“Smart-pH-Reader”检测系统的优势和局限。与 pH 计相比,本文所提出的智能手机检测系统在便携性、试剂用量及成本上具有明显优势。整个检测过程仅需一部智能手机和便携式光学装置。可与任意商用的高精度试纸条配合使用,在应用程序内部建立标准曲线,在检测前可以根据初筛结果选择合适精密检测范围。设计制作了 3D 打印光学装置避免了外界光环境的影响,提高了检测准确性。值得一提的是,主波长概念的提出,可以作为比色分析的校准算法,使测量不受手机型号的限制。此外,检测通量可以大大提高,因为我们可以使用多个试纸重复测量或重新排列测试试纸在同一试纸上进行多次重复。在以有限的日常生活样本展示了该检测系统的准确性和可靠性后,我们还可以将应用范围扩展到环境监测和即时医疗诊断的样本测量中。例如,在医学检测中,pH 值的异常变化可以作为疾病早期诊断的指标,进行长期监测。文献报道 pH 失衡被认为是癌症的标志,因为大多数实体恶性肿瘤的糖酵解增加,灌注不足会产生酸性的细胞外环境,从而促进肿瘤的生长、侵袭和转移^[131]。另外,本文开发的检测系统属于平台技术,除了使用彩色试纸实现 pH 检测外,还可以实现对人体尿液和血清中其他指标的检测^[132-134]。当然,除了医学检测,还可以实现食品中有害物质、水环境中重金属等污染物的检测^[135-137]。

2.6 本章小结

pH 显色是色调发生变化的显色体系,最佳比色分析参数的选择在 pH 测定中起着决定性作用。本章以 pH 检测为例,为色调发生变化的显色体系提出了“主波长”比色分析新指标;针对智能手机数字图片比色分析受外界环境光照、手机型号等不同因素的影响等问题,设计了可以提供均匀光照的集成光学系统,研发了智能手机颜色纠正算法;针对目前 pH 试纸检测准确度低及传统 pH 计检测操作繁琐、试剂用量大等问题,提出了将智能手机与 pH 试纸条相结合的 pH 测量新方法。通过建立 pH 值与主波长值之间的对应关系实现了 pH 值的高精度测量,检测精度达到了 0.05 单位 pH。分别利用本检测系统与 pH 计对实际样本进行测定,通过构建 Bland-Altman 图对二者检测结果进行分析,两种检测方法所测值的差异在 $\pm 1.96SD$ 范围内,验证了本系统在测定 pH 值时的准确性与可靠性。值得一提的是,该检测系统将商用试纸与智能手机数字图片比色分析巧妙结合,为即时医疗诊断、环境监测等领域 pH 值现场快速高精度测量提供了新平台。

第3章 基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测

3.1 研究背景

尿液是一种能表征生理信息的人体排泄物，其中包含重要的生理与病理信息^[138, 139]，与全身血液循环及组织功能具有密切联系，为此临床上尿常规检查十分重要，是医学检查“三常规”项目之一。它主要通过物理检查或化学检查等方法检查包括尿液颜色、透明度、pH值、红细胞和尿蛋白等指标的检测值来诊断患者。对泌尿生殖系统疾病^[140, 141]、肾脏疾病^[142]和代谢紊乱^[143]的临床诊断、诊疗判断及长期监测具有重要意义^[144, 145]。

医院尿常规检查主要通过尿沉渣分析仪、尿液干化学分析仪、全自动生化分析仪等仪器进行。在尿常规检查中，尿沉渣检查是重要的一项。这个技术是采取显微镜对尿液中的有形成分，如细胞、结晶、管型、细菌、寄生虫等进行识别和分析^[146]，可为临床诊断、治疗、预后判断多种类型疾病提供客观依据^[147]。目前尿沉渣显微镜检查包括以下几种：非染色尿沉渣显微镜检查、染色尿沉渣显微镜检查、尿沉渣定量法。

随着科技的进步，目前尿常规检查多以尿干化学分析法为主，且已实现自动化分析多联条尿干化学试带，利用尿液中的成分与试纸条上的显色剂发生显色反应可实现同时对尿液中的10多项指标进行检测。尿干化学分析仪一般采用反射光强测定或CCD图像采集显色图像为原理，一般是将检测试纸置于暗环境中，当光照射在显色试纸上时，照射光会被吸收，尿干化学分析仪的光电探测器接收到反射光信号，待测物浓度越大吸收越强，发射光信号越弱，通过建立浓度与探测到的反射光信号的强度关系实现尿液指标的定量。另外，为了适应尿试带上多种不同颜色的反应，生产厂家采用不同波长的滤光片实现更准确的检测，尿干化学分析仪器测定原理示意图见图3-1所示。许多国家已经把尿干化学分析仪作为常规方法在临床检验中广泛应用。

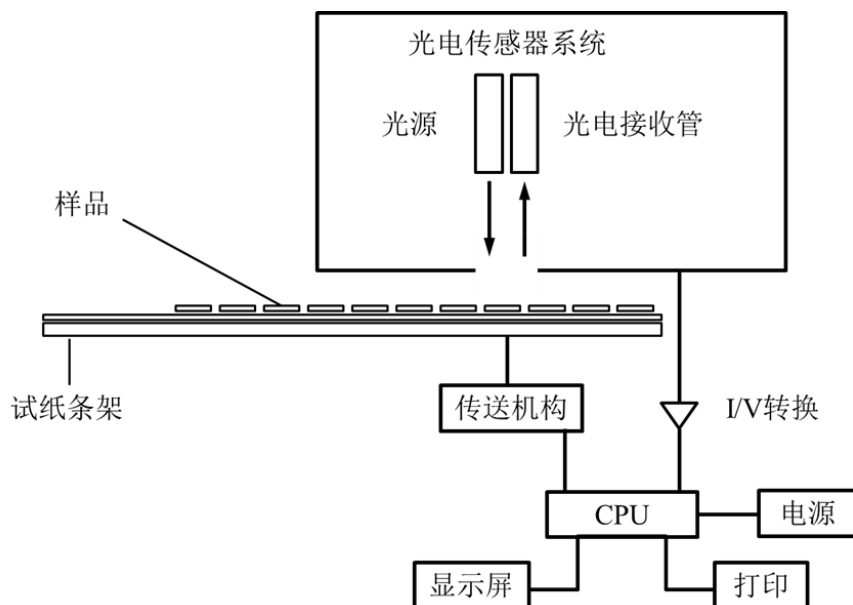


图 3-1 尿干化学分析仪检测原理示意图

Fig. 3-1 Schematic diagram of detection principle of urine dry chemical analyzer

以上阐述的尿沉渣分析仪、尿干化学分析仪等仪器检测精度高、准确率高，是尿液指标检测的金标准，但需要专业的医务人员操作，检测时间比较长，不适用于现场快速筛查。传统的尿液试纸条具有便携、成本低、分析方便等优点，被广泛应用于尿液常规指标的筛查。通过将参考色表与色块上反应后分析物的颜色进行匹配，得到分析物的浓度范围。由于人类视觉的差异，颜色识别也会受到光照环境等外界因素的干扰，导致对试纸颜色的评价不准确，属于一种定性和半定量测试，不能满足即时检验的临床应用要求。

基于以上大型仪器检测方法存在的仪器操作复杂、检测时间长等局限性，及肉眼比色存在的检测结果不准确等问题，国内外研究学者结合智能手机内部的多种传感器及数字图片比色法开发了一系列尿常规检测新方法。2014年 Hong 等研究了一种将比色传感器阵列的颜色数字化的应用程序，其中各个传感器的位置由智能手机自动识别，基于标准黑色和白色校正算法对获取的图像进行数字化校正，通过预先加载的校准曲线实现尿液指标浓度的检测^[79]。2016年 Marios 等提出了一种对尿液试纸进行自动比色分析的智能系统，根据比色卡的已知颜色校正分析物垫的颜色，最后与比色卡上的参考颜色进行比较，以估计每个分析物的浓度值^[148]。2017年 Ye 等开发了一种小型的尿液分析仪，其集成颜色传感器实现了对显色后尿液试纸条图像的获取，将获取图像通过蓝牙传输至智能手机进行分析，并没有实现真正的一键式获取检测指标定量信息，但是该分析仪可以避免由于手机摄像头不同造成的图像获取差异^[149]。2018年 Yang 等提出了一种基于人类视觉的智能手机算法，采用 CIELab 色彩空间中的 CIEDE2000 公式进行色差评价，根据显色试纸与比色卡之间的色差，用于对各种尿液指标的比色分

析^[150]。2021年 Cristina 等开发了一款移动折纸生物传感器,可在不到7分钟的时间内检测由大肠杆菌引起的尿路感染。其中折纸生物传感器包含抗体修饰的纳米颗粒,当尿液样本中含有大肠杆菌时,生物传感器上的抗体与大肠杆菌结合在纸条上产生彩色斑点,然后使用实时计算像素强度的移动应用程序对大肠杆菌进行量化。传统的比色尿液试纸条显色都是手动加样的,不能有效控制尿样的体积^[151]。2017年 Jalal 等提出了一种利用 PDMS 微型泵可以控制液体体积的尿液指标检测的装置,结合智能手机实现了葡萄糖、蛋白质、pH 以及胆红素的检测^[152]。

在本章中,介绍了一种基于智能手机的尿液分析系统,该系统中建立了多色度学参数的比色分析方法。不同于传统的尿液分析设备,该检测系统可以与现有的商用试纸结合,根据9项尿液指标显色变化特点针对性地选择最优色度值进行量化,实现“一键式”获取各项尿液指标的浓度值。考虑到用户检测的便携性,将“长条”尿液试纸重新布局成3×3的阵列,不仅可以多指标同时定量还可以在缩小装置的同时更易获取比色分析所需均匀光照,保证了测试结果的准确性。以葡萄糖、微量白蛋白、肌酐3种指标的加标样品为例与紫外分光光度计检测结果进行对比,一致性均达到了98%以上。为了评估该系统的可靠性与实用性,分别利用该检测系统与医院中的 H-800 Urine Analyser 尿干化学分析仪对100例实际样本的尿液指标进行检测,通过 ROC 曲线分析了两种方法检测结果较高的一致性。该检测系统可应用于一般用户、基层医疗机构和资源匮乏的环境。

3.2 智能手机阵列式试纸条尿液多指标定量检测仪的总体设计与制备

3.2.1 智能手机阵列式试纸条尿液多指标定量检测仪开发

本研究设计了一种便携式尿液分析装置,包括照明单元、充电单元和检测单元。选择发出均匀光强的背光源作为系统的照明源。在该设备中,一个3.7 V可充电锂电池(尺寸:8×30×35 mm,宇展能源,中国深圳)和一个小型充电模块(TP4056,尺寸:2×26×18 mm, Risym, 中国深圳)显示电源构成一个简单的充电单元,智能手机适配器可直接作为其充电器使用。如图3-2所示,便携式比色分析仪是使用聚乳酸(PLA)通过3D打印制造的。检测装置尺寸为50×60×50 mm(宽×长×高)。试纸盒底部设计了推拉式阵列式尿液试纸卡槽,方便试纸放置及检测后处理,用户可选择清洗一段时间。为了最大限度地缩小便携设备的尺寸并获得更清晰的图像,在设备顶部设计了微距镜头(尺寸:直径30 mm,大利明电子,中国深圳)。

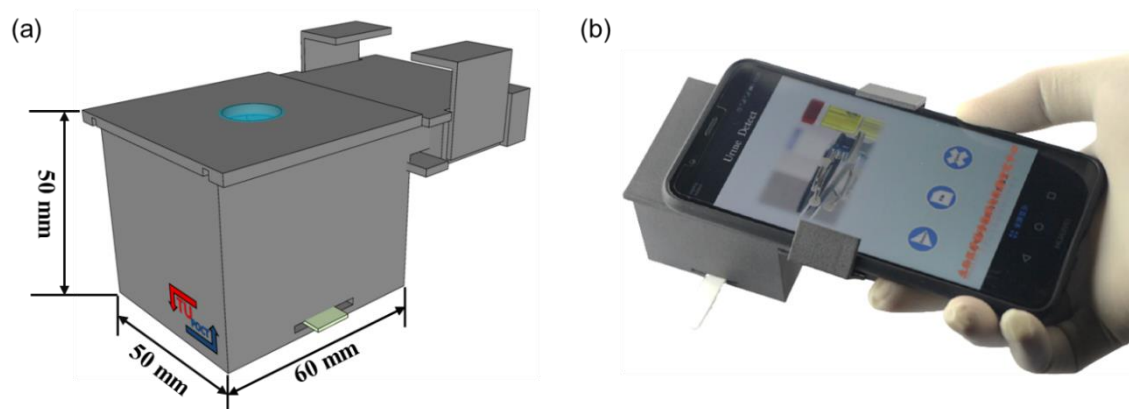


图 3-2 (a) 基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测光学附件结构示意图；(b) 智能手机与光学附件结合实现检测示意图

Fig. 3-2 (a) Schematic diagram of optical accessory structure for multi-indicator quantitative detection of urine based on smart phone array type test strip; (b) Schematic diagram of the combination of smart phone and optical accessory to realize detection

3.2.2 阵列式试纸检测手机应用程序的开发与实现

本文展示了一个智能手机应用程序，其中包含一组匹配的尿液试纸，用于量化尿液指标的比色分析。如图 3-3 所示，这是在及时诊断过程中必须执行的所有步骤。首先，用户可以通过图 3-3 (a) 和 (b) 显示的界面进行用户注册与登录，随后进入主界面，单击图 3-3 (c) 中所示的“DETECT”图标来开始检测。将图 3-3 (d) 中的图像预览框与设计的 3×3 阵列试纸进行匹配，通过在检测过程中实现预览框与试纸的对齐，可以得到图 3-3 (e) 中各指标的具体浓度值，检测结果可以通过图 3-3 (f) 实现保存，从保存记录中可以查看在一定时间内的检测历史；如图 3-3 (g) 所示，经用户许可后可与医院医生共享，进行医患在线交流，最终通过点击“Quit”退出程序 (h)。该智能手机应用程序旨在提供快速的现场定量检测，在需要诊断时为用户提供实时便携式尿液常规监测。

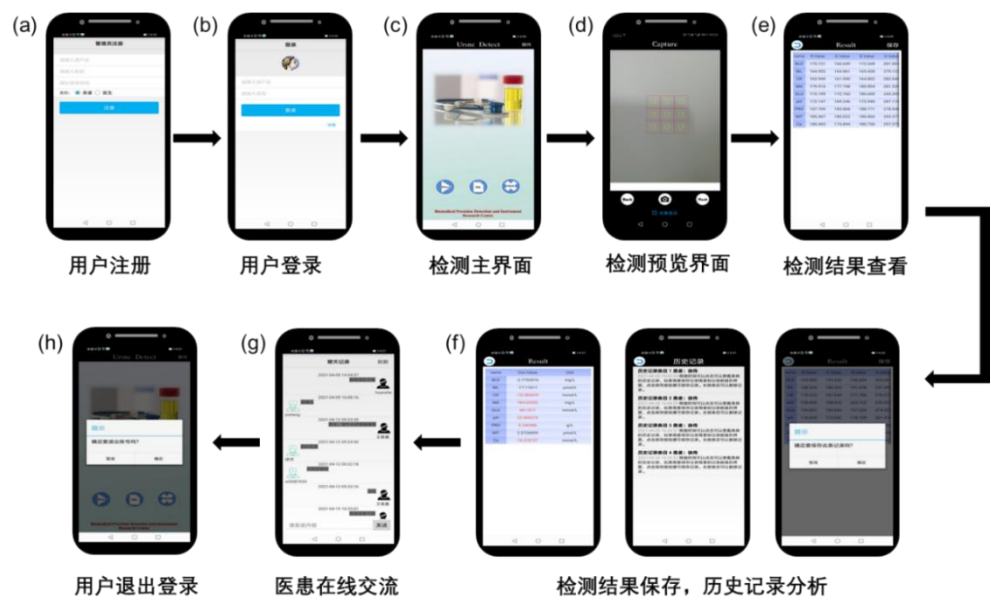


图 3-3 智能手机阵列式试纸 App 检测流程图

Fig. 3-3 Smart phone array test strip App detection flow chart

3.3 实验部分

3.3.1 实验试剂与仪器

亚硝酸钠（分析纯，科密欧公司）；肌酐（≥98%，Gemic）；胆红素（200 μmol/L，Gemic）；钙（20 mmol/L，Gemic）；血红蛋白（20 mg/mL，华迈科技）；葡萄糖（≥99%，上海瑞永生物科技有限公司）；人血清白蛋白（HSA，96%~99%，索莱宝公司）；柠檬酸（≥99.5%，ACS，科密欧公司）；Na₂HPO₄（分析纯，阿拉丁）Tween-20（美国 Sigma-Aldrich 公司）。对于所有尿液指标的分析检测，我们均使用 Mission 14 项尿液分析试纸条（杭州，艾康科技有限公司）。实验中，使用去离子水制备不同浓度的亚硝酸盐、微量白蛋白、肌酐、胆红素、尿钙、蛋白质、血红蛋白和葡萄糖的标准溶液。由不同比例的磷酸氢二钠溶液和柠檬酸溶液制备 4.5 至 8.0 的 pH 缓冲溶液。白蛋白检测试剂盒、葡萄糖检测试剂盒均购自信帆生物科技有限公司、肌酐检测试剂盒购自上海远慕生物科技有限公司用于对微量白蛋白、葡萄糖、肌酐三种指标进行吸光度测定。

用到基于 Windows 8 系统笔记本电脑、Eclipse 软件，其余所用设备如表 3-1 所示：

表 3-1 实验设备

Table 3-1 Experimental instruments

仪器名称	生产商
------	-----

续表

4℃冰箱	中国海尔
DW-86W100 超低温冷藏箱	中国海尔
STARTER 3100 pH 计	奥豪斯仪器（上海）有限公司
华为畅享 7Plus 手机	华为公司（中国）
电子天平	奥豪斯仪器（上海）有限公司
数显鼓风干燥箱	上海博讯
超纯水系统	赛默飞世尔科技公司（美国）
微量移液器	梅特勒-托利多（瑞士）
3D 打印机	创想三维（上海）
SK-1 快速混匀器	科析仪器有限公司（中国）
UV-3100 分光光度计	美普达（上海）
KQ-100DE 数控超声波清洗机	昆山超声波仪器有限公司（昆山）

3.3.2 九项尿液指标标准品的配制

分别准备了亚硝酸钠、微量白蛋白、肌酐、胆红素、尿钙、蛋白质、血红蛋白和葡萄糖的标准品，制备了 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液和 0.1 mol/L 柠檬酸溶液用于不同 pH 值缓冲溶液配制。

（1）亚硝酸盐标准品的配制

尿液中亚硝酸盐的浓度检测的是 NO_2^- 离子的浓度，我们使用亚硝酸钠配制不同浓度的亚硝酸盐溶液。首先，先称取 6.9 mg 亚硝酸钠溶于 100 mL 超纯水中，配制成 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的母液用于后期稀释。随后，将 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的亚硝酸盐稀释成 50、40、20、15、10、8、5、2、1 $\mu\text{mol/L}$ 的标准品用于检测，浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 的样品用去离子水代替。

（2）微量白蛋白标准品的配制

尿微量白蛋白检测使用的标准品是人血清白蛋白，称取 10 mg 人血清白蛋白粉末溶于 10 mL 去离子水中配制成 1000 mg/L 的母液用于后期稀释。将 1000 mg/L 的人血清白蛋白稀释成 100、80、50、40、25、20、15、10、5、2、1 mg/L 的标准品用于检测，浓度为 0 mg/L 的样品用去离子水代替。

（3）肌酐标准品的配制

称取 33.94 mg 的肌酐粉末溶于 1 mL 去离子水中配制成 300 mmol/L 的肌酐母液用于后期稀释。将 300 mmol/L 的肌酐溶液稀释成 45、40、25、18、15、10、5、1 mmol/L 的标准品用于检测，浓度为 0 mmol/L 的样品用去离子水代替。

（4）胆红素标准品的配制

购买的胆红素为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的标准品, 将其稀释成 18、15、10、8、5、2、1 $\mu\text{mol/L}$ 的标准品用于检测, 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 的样品用去离子水代替。

(5) 尿钙标准品的配制

购买的尿钙为 20 mmol/L 的标准品, 将其稀释成 12、10、8、5、3、2、1 mmol/L 的标准品用于检测, 浓度为 0 mmol/L 的样品用去离子水代替。

(6) 蛋白质标准品的配制

称取 100 mg 的白蛋白粉末溶于 5 mL 的去离子水中配制成 20 g/L 的蛋白质母液用于后期稀释。将 20 g/L 的蛋白质溶液稀释成 2.0、1.5、1.0、0.8、0.3、0.2、0.15、0.1、0.05 g/L 的标准品用于检测, 浓度为 0 g/L 的样品用去离子水代替。

(7) 血红蛋白标准品的配制

称取 5 mg 血红蛋白粉末溶于 5 mL 去离子水中配制成 1000 mg/L 的血红蛋白母液用于后期稀释。将 1000 mg/L 的血红蛋白溶液稀释成 5.0、4.0、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5、0.3 mg/L 的标准品用于检测, 浓度为 0 mg/L 的样品用去离子水代替。

(8) 葡萄糖标准品的配制

称取 9.008 g 葡萄糖粉末溶于 50 mL 去离子水中配制成 1 mol/L 的母液用于后期稀释。将 1 mol/L 的葡萄糖溶液稀释成 30、25、20、15、10、8、5、2、1 mmol/L 的标准品用于检测, 浓度为 0 mmol/L 的样品用去离子水代替。

(9) pH 值 4.5~8.0 缓冲溶液的配制

pH 值为 4.5~8.0 间隔为 0.5 的缓冲溶液由 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液与 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液按不同体积比配制而成。

3.3.3 九项尿液指标检测

(1) 阵列式尿液试纸条的制作

首先, 用电脑绘图软件 (CoreDRAW X4) 设计好阵列式试纸基底的外形, 并用喷墨打印机将设计好的图形打印在相片纸的疏水面, 然后使用剪刀按照打印好的轮廓剪下需要的图形。将购买的 14 项试纸条显色块分别裁剪, 将亚硝酸钠、微量白蛋白、肌酐、胆红素、尿钙、蛋白质、血红蛋白、葡萄糖、pH 这 9 个指标的显色试纸块按照 3 $\times$ 3 重新排列。最后, 用固体胶将 9 个试纸块固定在相片纸的疏水面, 将试纸条置于干燥箱 2 分钟, 确保固体胶完全干燥, 用锡箔纸将试纸条包裹, 放入黑色塑料瓶中充入氮气保存备用。

(2) 利用紫外分光光度法对葡萄糖进行检测

取浓度为 0、1、2、5、10、20 mmol/L 的葡萄糖标准样品 10 μL , 分别加入显色液 1000 μL , 利用快速混匀器混匀后置于室温下 10 min, 反应结束后混合溶液呈现红色。将各浓度混合液分别取 200 μL 加入比色皿中, 利用紫外分光光度计扫描溶液 200~900

nm 全波段吸光度值, 得到波峰 510 nm 处的吸光度值。

(3) 利用紫外分光光度法对微量白蛋白进行检测

取浓度为 0、1、2、5、10、20、25、40、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的白蛋白标准样品 10 μL , 分别加入溴甲酚绿显色剂 2000 μL , 利用快速混匀器混匀后置于室温下 30 s, 反应结束后随着白蛋白浓度的增大混合溶液呈现从黄绿色到蓝绿色的变化。将各浓度混合液分别取 200 μL 加入比色皿中, 利用紫外分光光度计扫描溶液 200~900 nm 全波段吸光度值, 得到波峰 621 nm 处的吸光度值。

(4) 利用紫外分光光度法对肌酐进行检测

取浓度为 5、10、15、20、30 mmol/L 的白蛋白标准样品 50 μL , 分别加入肌酐显色液、肌酐 Assay Buffer 各 225 μL , 利用快速混匀器混匀后置于室温下 15 min, 反应结束后混合溶液呈现橘红色。将各浓度混合液分别取 200 μL 加入比色皿中, 利用紫外分光光度计扫描溶液 200~900 nm 全波段吸光度值, 得到波峰 510 nm 处的吸光度值。

(5) 利用智能手机阵列式试纸尿液多指标定量检测仪对 9 项指标标准品进行检测

9 项指标标准品的检测是分别进行的, 首先 9 项指标显色块在阵列式试纸上的位置是固定的, 检测过程相同: 取 10 μL 不同浓度的标准品滴加在显色块上, 反应 60 s 后, 将显色后的试纸块放入检测仪内, 打开智能手机检测软件, 完成检测并将检测结果保存。

3.4 结果与讨论

3.4.1 阵列式显色基底的制备

尿液试纸条可对人体尿液中的单项或多项化学指标进行定性/半定量检测, 常见的检测指标包括亚硝酸钠 (NIT)、微量白蛋白 (MA)、肌酐 (CR)、胆红素 (BIL)、尿钙 (Ca)、蛋白质 (PRO)、血红蛋白 (BLD)、葡萄糖 (GLU)、酸碱度 (pH)、酮体 (KET)、尿胆原 (URO)、白细胞 (WBC)、维生素 C (VC) 等, 可为临床检验和诊断提供参考。尿试纸条在临床上广泛使用, 量大面广, 是临床尿液分析最常见、最基本的检验项目。典型的结构和组成如图 3-4 所示, 试纸块从上到下一般由尼龙膜、绒制层、吸水层、底层 4 部分组成。第一层尼龙膜: 一般该尼龙膜的孔径较小只允许小分子通过, 阻止大分子物质的进入, 对显色反应起保护作用, 防止大分子物质对反应的污染; 第二层绒制层: 该层中又包含碘酸盐层和试剂层, 碘酸盐层用于破坏干扰物质, 待测物的显色试剂固定在试剂层中, 主要与尿液中所测定物质发生化学反应, 产生颜色变化; 第三层吸水层: 该层具有很好的吸水性, 其毛细作用力可使待测尿样均匀快速地浸入并储存在试纸块中; 第四层支撑层: 一般由疏水基底, 如塑料片或防水纸构成, 用作以上三层的支撑体便于固定和操作^[153]。传统的尿液试纸条包括 8 联条、9 联

条、11 联条、12 联条、14 联条等多种规格，均属于长条形。这种设计在使用上存在两种局限性。第一，试纸过长，容易出现色块颜色不均，且在拿着试纸显色过程中会污染用户的手指。另外，过长的试纸条需要更大的成像面积，可能会因为成像问题导致检测结果不准确。其实这些缺陷可以通过改变色块的排列来解决。

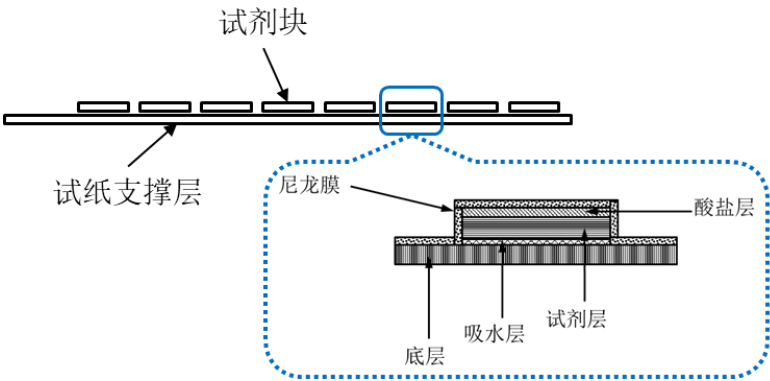


图 3-4 典型的尿干化学试纸条的结构

Fig. 3-4 The structure of a typical urine dry chemical test strip

如图 3-5（a）所示，本研究将试纸设计成方形图案，改善了颜色不均，方便用户操作，提高了检测结果的准确性。整个阵列式试纸由两层组成，底层为试纸块疏水支撑层，顶层为重组后的试纸块。底层中包含 9 个打印好的 3×3 阵列，阵列块的大小为 $5\times 5\text{ mm}^2$ ，作为排列试纸块的区域，是整个阵列式试纸的显色区域；其中底层支撑层还包含便于检测的 60 mm 长的手柄。顶层排列的试纸块的大小为 $4\times 5\text{ mm}^2$ ，各检测指标的排列顺序如图 3-5（b）所示，从左到右，每三个指标组成一列，潜血、胆红素、肌酐为一列；微量白蛋白、葡萄糖、pH 为一列；蛋白质、亚硝酸盐、钙为一列。

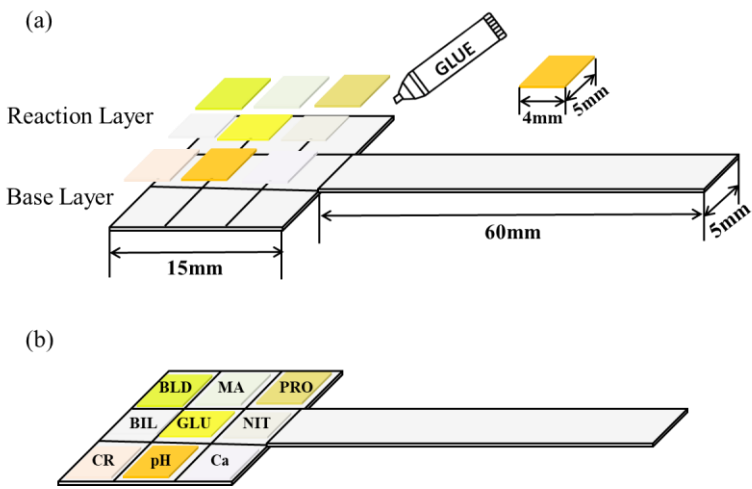


图 3-5 （a） 3×3 阵列式尿液试纸条的制作过程；（b） 3×3 阵列式试纸上各检测指标的排列顺序
Fig. 3-5 (a) Manufacturing process of 3×3 array urine test strips; (b) Arrangement order of each test index on 3×3 array test paper

3.4.2 九项尿液指标标准品的定量检测

3.4.2.1 检测原理

本研究中检测的亚硝酸钠、微量白蛋白、肌酐、胆红素、尿钙、蛋白质、血红蛋白、葡萄糖、pH 这 9 项指标的检测原理均是比色分析。试纸块上提前固定有显色剂，将待测物滴加在试纸块上均会生成有色物质，且颜色的深浅与反应物的浓度有关，浓度越高最终反应生成的颜色越深。通过分析显色试纸块图像的色度值，建立色度值与检测指标浓度的线性关系，便可实现定量检测。以下将详细介绍 9 项指标各自的显色反应原理。

(1) 蛋白质与微量白蛋白检测均是根据染料结合的蛋白误差法原理，采用一种高亲和力的酚磺酞染料与白蛋白结合形成复合物产生变色。尿微量白蛋白指的是尿蛋白发现早期尿液中少量的白蛋白；尿常规的蛋白，也是指白蛋白，是 24 小时尿蛋白定量，是指尿中的所有蛋白总量。

(2) 胆红素的检测基于偶氮偶合法的原理，显色试剂块上的 2, 6-二氯苯胺重氮盐与胆红素进行特异性反应，并与胆红素的浓度相对应产生不同的颜色。

(3) 葡萄糖的检测是基于葡萄糖氧化酶反应原理，葡萄糖氧化酶特异性氧化 β -D-葡萄糖，生成葡萄糖醛酸和过氧化氢，过氧化氢在过氧化物酶的作用下，使指示剂氧化而显色。

(4) 亚硝酸盐检测基于重氮偶合反应原理，尿液中革兰氏阴性细菌把硝酸盐还原成亚硝酸盐，亚硝酸盐与对氨基苯磺酸反应生成重氮化合物，重氮化合物再与 3-羟基-1, 2, 3, 4-四氢苯并喹啉结合呈现出桃红色。

(5) 肌酐检测原理：根据肌酐-铜离子结合物的类过氧化物酶活性催化分解过氧化物，使甲基联苯胺氧化呈色。

(6) pH 值检测原理：基于 pH 指示剂法，通过甲基红、溴百里香酚蓝混合的酸碱指示剂适量配合，可以反应尿液 pH 的变化范围。

(7) 潜血检测原理：根据血红蛋白接触活性法原理，通过血红蛋白的类过氧化物酶活性催化分解过氧化物，使甲基联苯胺氧化呈色。

(8) 尿钙检测原理：根据络合金属离子显色原理，采用邻甲酚酞络合酮为指示剂，与钙离子络合产生颜色变化。

3.4.2.2 九项指标标准品的定量检测

根据实验部分配置 9 项指标的标准品浓度，进行比色分析。目前最常用的是 RGB、HSV 色度空间，不同浓度的 9 项指标标准品滴加在显色试纸上会呈现不同颜色变化，智能手机获取图像转化为色度值的变化。在实验过程中，获取了每个显色块的 R、G、B、H、S、V 六种色度值，其中只有一种色度值能最准确的反应指标的显色反应变化。

因此,针对不同的检测指标选择了不同的色度值。

对比色分析来说,色度值的选择是至关重要的。接下来,具体分析一下各项检测指标色度值的选择。如图 3-6 所示,对于亚硝酸盐、微量白蛋白、蛋白质、pH、葡萄糖的显色反应,从显色图像可以看到是显色调发生变化的反应,因此,可以通过分析色相值 H 实现定量检测。对于肌酐和血红蛋白的检测,显色图像中的绿色成分随着检测物浓度的加大而增加,通过建立 G 值与浓度之间的线性关系实现定量。对于尿钙的检测,从显色图像可以看到随着浓度的加大颜色呈现从浅紫色到深紫色的变化趋势,在 CIE1931 色品图中,紫色的补色为绿色,随着紫色成分的增加,绿色成分逐渐减少;因此随着尿钙浓度的逐渐增加, G 值逐渐减小,因此同样可以通过建立 G 值与尿钙浓度的关系实现检测。对胆红素的检测,显色图像是从浅黄色到深黄色的变化,与紫色与绿色的互补原理类似,黄色与蓝色在色品图中也是互补关系,可以通过分析胆红素浓度与 B 值的关系实现定量检测。图中红色字体表示的是在临床上各检测指标在人体内的正常范围值,可以看到在远超正常阈值的范围内,9 个检测指标的浓度与色度值均呈现良好的线性关系,这为之后临床检测提供了简单、准确的标准曲线。

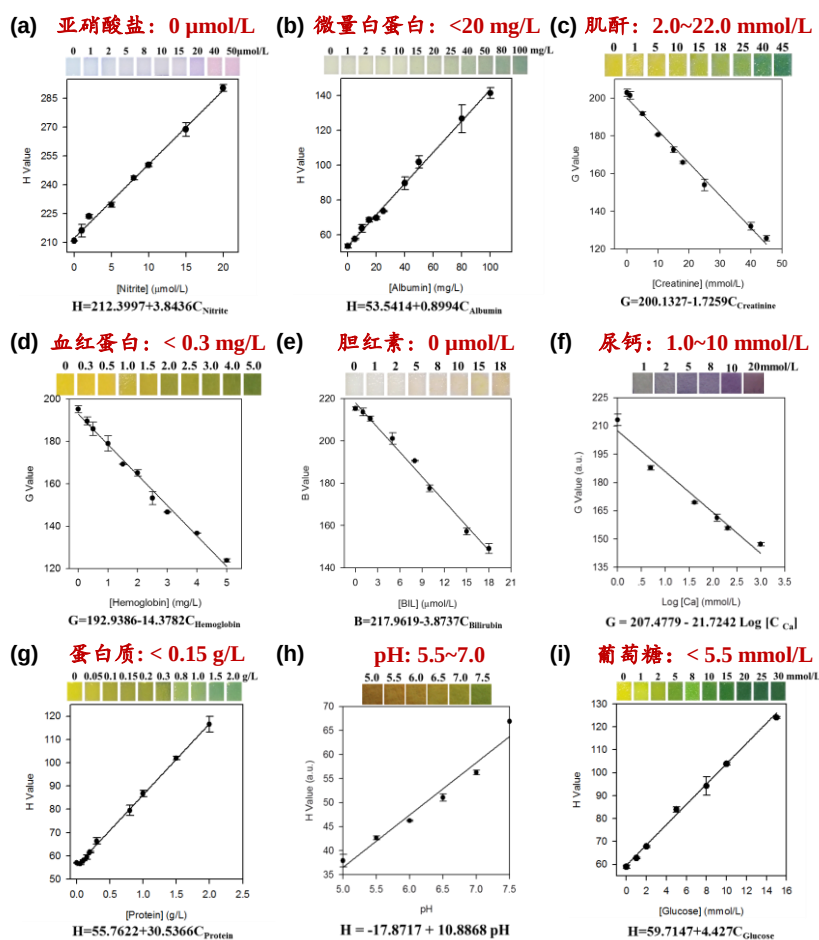


图 3-6 尿液指标标准品检测结果。(a) 亚硝酸盐, (b) 微量白蛋白, (c) 肌酐, (d) 血红蛋白, (e) 胆红素, (f) 尿钙, (g) 蛋白质, (h) pH, (i) 葡萄糖 ($n=3$)

Fig. 3-6 Urine index standard test results. (a) nitrite, (b) microalbumin, (c) creatinine, (d) hemoglobin, (e) bilirubin, (f) urinary calcium, (g) protein, (h) pH, (i) glucose (n=3)

3.4.3 葡萄糖、微量白蛋白、肌酐加标样品检测与紫外分光光度法比较

为了验证本检测系统的可行性，本研究以具有代表性的葡萄糖、微量白蛋白、肌酐三种指标为例，将加标样本在该系统检测结果与紫外分光光度计检测结果进行了对比。

本研究中首先对不同浓度葡萄糖样品显色后溶液的吸光度进行了检测，测得的吸收光谱图如图 3-7 (a) 所示，可以看出葡萄糖显色溶液的吸收峰在 510 nm，且随着葡萄糖浓度的增大吸光度值逐渐增大；从图 3-7 (b) 可以看出葡萄糖浓度与吸光度值呈现良好的线性关系，线性相关系数为 0.9961。配制了浓度为 8、7、6、4、3、0.5 mmol/L 的加标实际样品，分别用智能手机检测系统与紫外分光光度计进行检测，利用测得的吸光度值与色度值根据标准曲线分别计算得出对应的葡萄糖浓度值，结果如图 3-7 (c) 所示，两种检测方法测得的浓度值相关系数达到了 0.9976，具有良好的一致性。

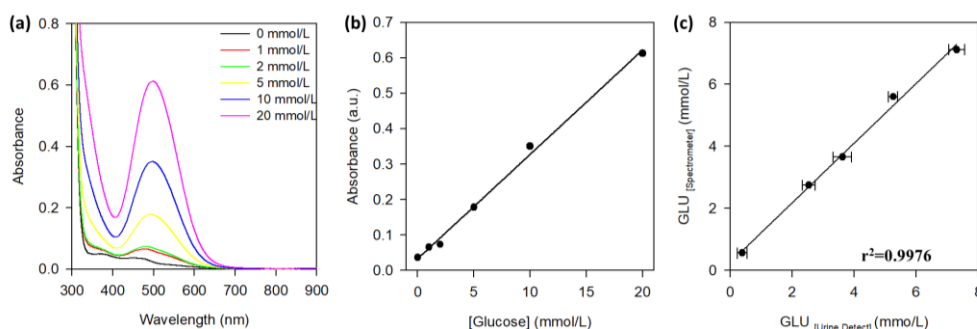


图 3-7 紫外分光光度法与“Urine Detect”葡萄糖检测浓度对比。(a) 0~20 mmol/L 浓度葡萄糖显色溶液吸收光谱图；(b) 葡萄糖浓度与 510 nm 处吸光度之间的线性关系曲线；(c) 紫外分光光度法与“Urine Detect”葡萄糖检测浓度对比，二者呈现良好的一致性 (n=3)

Fig. 3-7 Contrast between UV spectrophotometry and "Urine Detect" glucose detection concentration. (A) The absorption spectrum of the color-developing solution of glucose with a concentration of 0~20 mmol/L; (B) The linear relationship curve between glucose concentration and absorbance at 510 nm; (C) Contrast between UV spectrophotometry and "Urine Detect" glucose detection concentration, they show good consistency (n=3)

本研究中接下来对不同浓度白蛋白样品显色后溶液的吸光度进行了检测，测得的吸收光谱图如图 3-8 (a) 所示，可以看到白蛋白显色溶液在全光谱波段内 420 nm 和 621 nm 处分别有两个吸收峰，且随着白蛋白浓度的增大，621 nm 处的峰值逐渐增大，412 nm 处的峰值逐渐减小。由于 621 nm 处的吸收峰来自白蛋白与溴甲酚绿显色剂结合形成蓝绿色复合物，因此，选择分析 621 nm 处吸光度值随白蛋白浓度的变化趋势。从图 3-8 (b) 可以看到，随着白蛋白浓度与 621 nm 吸光度值呈现良好的线性关系，线性相关系数达到了 0.9996。随后配制了浓度为 200、100、50、40、25、20、10、5、2、1、0

$\mu\text{mol/L}$ 的加标实际样品, 分别用智能手机检测系统与紫外分光光度计进行检测, 检测结果如图 3-8 (c) 所示, 两种仪器的检测结果之间呈现良好的一致性, 相关系数为 0.9832。

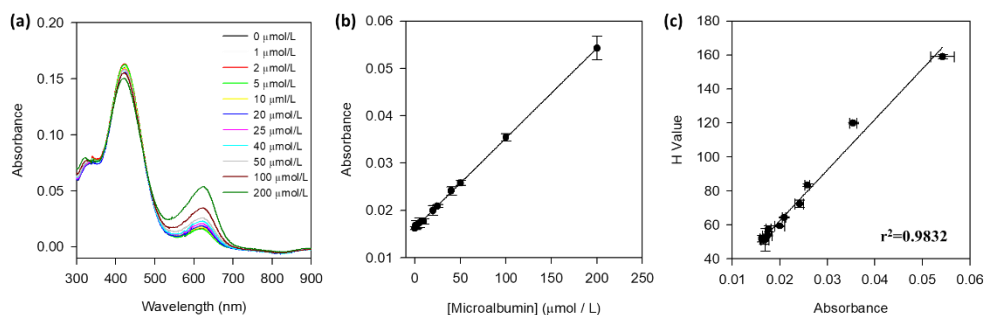


图 3-8 紫外分光光度法与“Urine Detect”微量白蛋白检测浓度对比。(a) 0~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度微量白蛋白显色溶液吸收光谱图; (b) 微量白蛋白浓度与 621 nm 处吸光度之间的线性关系曲线; (c) 紫外分光光度法与“Urine Detect”微量白蛋白检测浓度对比, 二者呈现良好的一致性 ($n=3$)

Fig. 3-8 Contrast between UV spectrophotometry and "Urine Detect" microalbumin detection concentration. (A) The absorption spectrum of the color-developing solution of microalbumin with a concentration of 0~200 $\mu\text{mol/L}$; (B) The linear relationship curve between microalbumin concentration and absorbance at 510 nm; (C) Contrast between UV spectrophotometry and "Urine Detect" microalbumin detection concentration, they show good consistency ($n=3$)

最后对肌酐显色后溶液的吸光度进行了检测, 测得的吸收光谱图如图 3-9 (a) 所示, 可以看出随着肌酐浓度的逐渐增大, 510 nm 处的吸收峰的峰值不断增大; 从如图 3-9 (b) 可以看出, 溶液 510 nm 处的吸光度与肌酐浓度之间具有良好的线性关系, 线性相关系数为 0.9870。接下来, 配制了浓度为 5、10、15、20 mmol/L 的加标实际样品, 分别用智能手机检测系统与紫外分光光度计进行检测, 检测结果如图 3-9 (c) 所示, 两种检测仪器分别测得的 H 值与吸光度值呈现良好的一致性, 相关系数为 0.9845。

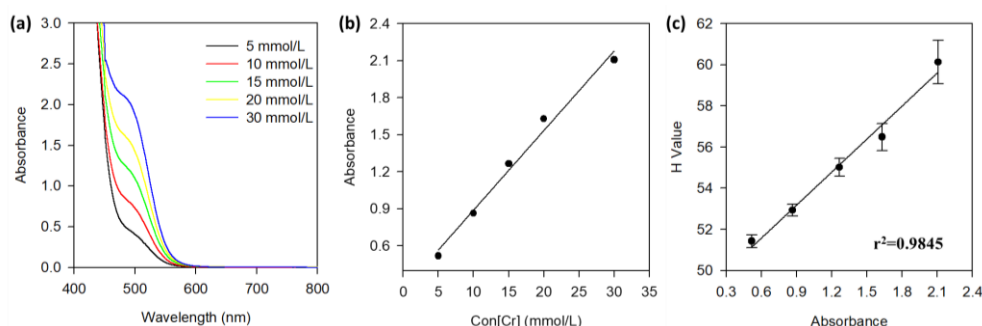


图 3-9 紫外分光光度法与“Urine Detect”肌酐检测浓度对比。(a) 0~20 mmol/L 浓度肌酐显色溶液吸收光谱图; (b) 肌酐浓度与 510 nm 处吸光度之间的线性关系曲线; (c) 紫外分光光度法与“Urine Detect”肌酐检测浓度对比, 二者呈现良好的一致性 ($n=3$)

Fig. 3-9 Contrast between UV spectrophotometry and "Urine Detect" creatinine detection concentration. (A) The absorption spectrum of the color-developing solution of creatinine with a concentration of 0~20 mmol/L; (B) The linear relationship curve between creatinine concentration and absorbance at 510 nm; (C) Contrast between UV spectrophotometry and "Urine Detect" creatinine detection concentration, they show good consistency ($n=3$)

Contrast between UV spectrophotometry and "Urine Detect" creatinine detection concentration, they show good consistency (n=3)

以上通过与紫外分光光度计对比实验结果可以证明,本研究开发的智能手机阵列式尿液多指标分析仪在尿常规检测中具有良好的准确性和可靠性,由于具有便携、易操作的特点可代替传统检测方法广泛应用于居家医疗检测中。

3.4.4 智能手机阵列式试纸检测系统与医院中尿干化学分析仪对比

为了评估基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统的实用性,本研究对山西白求恩医院提供的 100 例实际样本的检测结果与医院里使用的尿干化学分析仪进行了比较。由于医院的检测结果中没有给出肌酐、尿钙及胆红素的检测结果,这三个指标在血清检测中具有更重要的价值。因此,利用两种方法分别对尿样中的蛋白质、血红蛋白、亚硝酸盐、葡萄糖、微量白蛋白、pH 这 6 项指标的检测结果进行了比较。具体的检测原理在 3.4.2 中已经详细介绍。

本研究中利用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线)来分析基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统与医院中尿干化学分析仪检测结果的一致性。ROC 曲线是以真阳性率(灵敏度)为纵坐标,假阳性率(1-特异度)为横坐标绘制的曲线。在分析中,ROC 曲线越靠近坐标轴的左上角,实验的准确性越高,然而 ROC 曲线并不能直观的说明问题。通常情况下,利用 ROC 曲线下面积 AUC (Area Under Curve) 的大小定量的分析检测的准确性。根据 AUC 值的大小可以将准确性判断分为 4 类^[154]:

- (a) 当 $AUC=1$ 时,说明采用该预测模型时判断的准确率是最高的;
- (b) 当 $0.5 < AUC < 1$ 时,当选择合适的阈值时,其判断的准确性具有一定的参考价值;
- (c) 当 $AUC=0.5$ 时,判断的准确率与随机猜测相近,结果没有参考价值;
- (d) 当 $AUC < 0.5$ 时,判断结果的准确性比随机猜测还差,对于医学诊断来说没有任何意义。

六项指标的检测结果对比如图 3-10 所示。通过对六项指标的检测结果对比绘制的 ROC 曲线可以看到,蛋白质、亚硝酸盐、微量白蛋白、pH、葡萄糖、血红蛋白这六项指标的 AUC 值分布在 0.88~0.99 之间,说明两种检测方法对于这六项指标的检测结果具有良好的一致性,验证了本方法用于实际样品尿常规多指标检测的可靠性与准确性。从检测结果的对比我们还可以注意到,对于血红蛋白的检测,AUC 的值为 0.88,也就是说两种检测方法在检测血红蛋白这一指标时一致性不是很好。这是由于医院检测中给出的是血红蛋白的定性结果,一般情况下以镜检的红细胞数量为临床诊断的参考,且红细胞的存在不一定代表尿液中存在游离的血红蛋白分子,这就导致了试纸条检测方法检测结果的值普遍小于由红细胞个数换算得到的值,这也是导致二者检测结果一

致性差的重要原因。但是总体上两种方法检测结果一致性较高。这一结果证明了本研究开发的基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统的可靠性与准确性，且本检测系统所需设备简单、检测成本低、检测速度快，借助普通的 Android 智能手机就可实现检测，因此也具有更好的普适性。

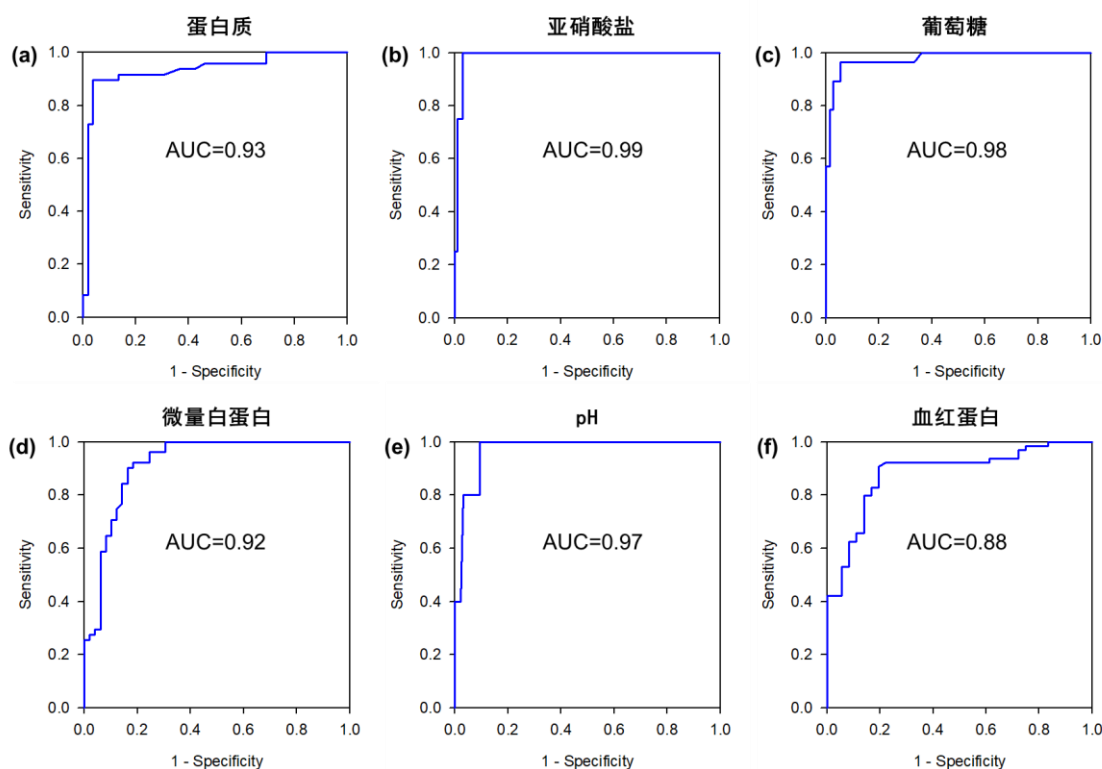


图 3-10 100 例实际样本“Urine Detect”系统检测结果与尿干化学分析仪进行了比较的 ROC 曲线图。对蛋白质 (a)、亚硝酸盐 (b)、葡萄糖 (c)、微量白蛋白 (d)、pH (e)、血红蛋白 (f) 这 6 项指标的二者检测结果一致性进行了评估

Fig. 3-10 ROC curve chart comparing the test results of 100 actual samples with the “Urine Detect” system and the urine dry chemistry analyzer. The consistency of the test results of the six indicators of protein (a), nitrite (b), glucose (c), microalbumin (d), pH (e), and hemoglobin (f) was evaluated

3.5 本章小结

本章针对多指标比色反应体系中，通常将颜色信息转换成灰度值实现检测，存在的准确度低、灵敏度差等问题，建立了多色度学参数的精确比色分析方法。以尿常规指标监测在临床诊断中的重要意义为出发点，针对目前医院中尿常规检查存在的耗时长、需专业人员操作等局限性，将智能手机与商用尿液试纸条相结合创新性地研发了基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统。通过 3×3 阵列式试纸布局设计，不仅可以多指标同时定量还可以在缩小装置的同时更易获取比色分析所需均匀光照；根据 9 项尿液指标显色变化特点针对性地选择最优色度值进行量化，实现了 9 项尿

常规指标的“一键式”定量检测。以葡萄糖、微量白蛋白、肌酐3种指标的加标样品为例与紫外分光光度计检测结果进行对比，一致性均达到了98%以上。为了评估该系统的可靠性与实用性，分别利用该检测系统与医院中的H-800 Urine Analyser尿干化学分析仪对100例实际样本的尿液指标进行检测，通过ROC曲线分析了两种方法检测结果较高的一致性，同时也证明了该便携式分析仪可以用于临床检测。相比目前临床上常用的检测方法，本方法无需依赖计算机或尿干化学分析仪等大型仪器，且检测速度快、成本低、易操作，为居家医疗检测提供了新的解决方案，具有很大的应用前景。

第4章 智能手机 ZnO 纳米线纸基荧光传感平台的构建

4.1 研究背景

纸基分析技术是近年来发展起来的一种新型传感分析技术,纸作为一种易降解的理想材料,具有质地轻、便携易操作、样品用量少、易改性、可批量生产等优势^[155, 156],为分析检测提供了很大的便利。自2007年哈佛大学的 Whitesides 教授课题组首次提出纸基微流控分析装置(μ PADs)以来^[157],由于其易于制造(存储,运输和使用),试剂体积小,便于毛细管流动的多孔结构以及易于读取信号等,引起了众多科研工作者的广泛关注^[158-160]。复杂的纸基微流控分析装置通常是通过使用疏水性聚合物^[161, 162]作为阻隔材料^[163]切割带图案的亲水性纸张来制备的^[164]。目前,纸基微流控已经广泛应用在了生物传感领域^[165]。

荧光分析技术具有检测速度快、灵敏度高的特点,荧光发射的能量来源于激发光的能量,激发停止,发射随之停止,荧光基本不受温度的影响^[166]。荧光分析技术与纸基微流控相结合的纸基荧光分析技术是检测生物标志物的主要检测方法,纸基荧光装置因具有所需样品和试剂量少且灵敏度高、纸基易固定荧光探针/生物分子、低成本、操作简单等优势广泛应用于生化传感。

然而,在纸上进行分析时,仍然存在纸基自发荧光和高散射的问题,降低了信噪比,阻碍了纸基荧光分析的实际应用。通过利用各种纳米结构来增强荧光,该方法被广泛研究并用于各种传感器,大大提高了荧光传感性能。Mei 等开发了一种金纳米棒(GNR)阵列生物芯片,与随机排列的金纳米棒相比,在玻璃表面上垂直有序的金纳米棒相邻纳米粒子之间的表面等离子体共振显著增强,荧光增强依赖于纳米棒组装模式、等离子体调制以及荧光团与纳米阵列表面之间的距离。此外,利用有序 GNR 阵列开发创新 DNA 生物芯片的实际应用表明,由于等离子体激元耦合荧光增强,分子信标检测的灵敏度显著提高^[167]。Liu 等发现在抗原抗体反应中利用瑞利表面声波(SAW)去除非特异性结合的蛋白质,改善混合,可减少孵育时间。通过在 SAW 设备上培育边缘长度为 50 nm 的银纳米立方体(AgNCs),荧光强度通过等离子体增强。这将传感器灵敏度提高了 6 倍,并将癌胚抗原荧光检测的检测限降低到 1 ng/mL 以下。对 AGNCs 的表面密度进行了优化,以产生最大的金属荧光增强,从而将信号强度提高了一个数量级^[168]。随后, Ventura 等开发了一种免疫传感器,其中由图案化金纳米颗粒产生的荧光信号增强与生物功能化的高选择性相结合,以产生高度敏感、特异和可靠的装置实现人尿液中免疫球蛋白检测^[169]。荧光染料标记的 DNA 寡核苷酸与金纳米棒的结合已

被广泛用于开发多功能荧光纳米探针。Botequim 等展示了功能化路线对于实现基于金纳米棒的染料的增强至关重要。与游离的染料相比,通过选择性地将染料分子的硫醇附着到金纳米棒上,可以有效地将染料的发射增加 10 倍以上^[170]。除此之外,纳米氧化锌具有优异的压电性能、良好的生物相容性等^[171, 172]。之前的研究表明,ZnO 纳米线的大表面体积比和长径比可以极大地增强荧光强度^[173, 174]。与金属纳米材料增强不同的是,即使荧光团直接接触,增强效果也很稳定,没有猝灭风险。目前,氧化锌纳米线荧光信号增强的确切机制尚不清楚,还需要进一步研究。可能的增强机制以下两种:一个途径是减少荧光团之间的共振能量转移^[175, 176];另一个导致荧光增强的途径可能来自金属氧化物的倏逝波增强和波导性质^[177]。

最近,有报道称氧化锌纳米线(ZnO NWs)可以增强各种生物学分析中的荧光强度,从而实现心肌梗死标志物的高通量检测^[178]。Guo 等开发了与 ZnO NWs 集成的微流控芯片,用于检测癌症生物标记物,在人类 α -甲胎蛋白分析中实现了低至 1 pg/mL 的检测限,在癌胚抗原分析中达到了 100 fg/mL 的检测限^[179]。左旋多巴是一种儿茶酚胺神经递质,用于治疗帕金森病。Lin 等介绍了一种低成本的纸基生物传感器,旨在提高 L-多巴浓度监测的便利性。采用微波辅助水热法,在不到 90 分钟的时间内在纸上合成了 ZnO 纳米线。ZnO 纳米线放大绿色荧光信号以提高 L-dopa 的检测灵敏度,最佳测量波长为 475/537 nm,与未改性的纸张相比,所提出的 ZnO 纳米线纸张生物传感器的绿色荧光增加了约 3 倍,左旋多巴的检测限为 24 nM,符合帕金森病患者监测左旋多巴的临床要求^[180]。

本章将数字图像分析也应用到了荧光传感平台,为提高生化分子检测的灵敏度,开发设计了一款基于智能手机 ZnO 纳米线纸基荧光传感平台,巧妙设计了环形贴片式激发光源解决激发不稳定、不均匀的问题;基于 Android Studio 开发了“H-T Fluorescence Detect”App 可用于对荧光进行一个精准的捕捉和分析。首次制备了玻璃滤纸氧化锌纳米线纸基,并通过纸基疏水化处理成功的制备出纸基微流控芯片并且实现了荧光增强,改善了纸基荧光信噪比低的局限,利用聚合物量子点 CN-PPV 实现了检测系统可行性验证。最后,利用开发的基于智能手机的高通量纸基微流控荧光分析装置实现了兔免疫球蛋白的定量检测,实验结果显示,氧化锌纳米线纸基上兔免疫球蛋白的检测限比纯玻璃滤纸的检测限提高了 10 倍,验证了该检测系统的可靠性。

4.2 智能手机高通量荧光检测系统的搭建

4.2.1 荧光检测光学系统的设计与制备

为了使荧光检测不受外界可见光照的影响,获得稳定可靠的紫外激发光源及荧光检测环境,研究设计了基于智能手机的荧光检测光学系统,如图 4-1 所示。该系统内部

包含 3D 打印光学装置、环形贴片式紫外激发光源（波长为 395 nm）、长通滤光片（LP 400 nm）、带通滤光片（根据待检测荧光的波长而定）、电源开关、充电器（12 V）、纸基生物反应阵列。如图 4-2（a）所示为智能手机高通量荧光检测装置的 3D 设计图，4-2（b）所示为该装置的实物图。装置的整体尺寸为 100 mm×100 mm×80 mm（长×宽×高），装置从上到下依次是手机支撑、滤光片卡槽（用于放置 400 nm 的长通滤光片）、DC 母头卡槽（用于与充电器连接）、样品板盖（用于放置纸基荧光生物芯片）。

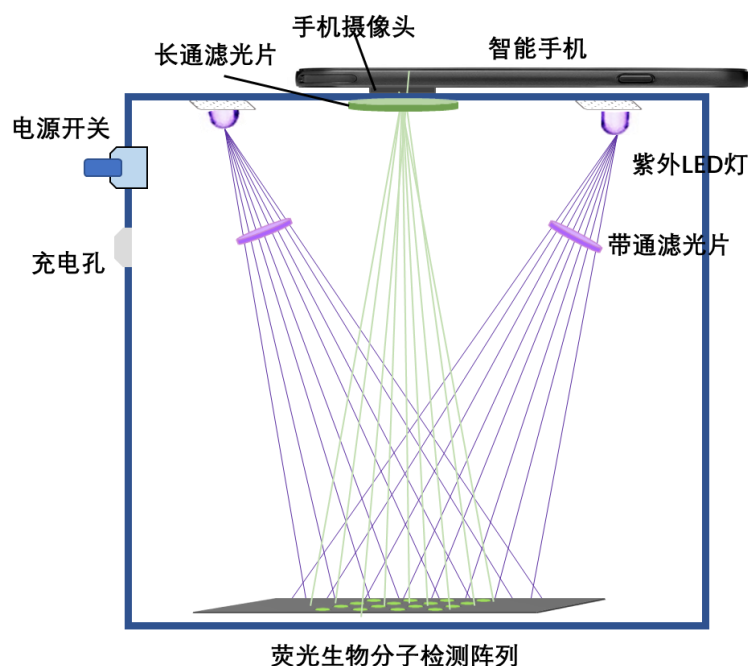


图 4-1 智能手机高通量荧光检测系统的光路设计图

Fig. 4-1 The optical path design diagram of the smart phone high-throughput fluorescence detection system

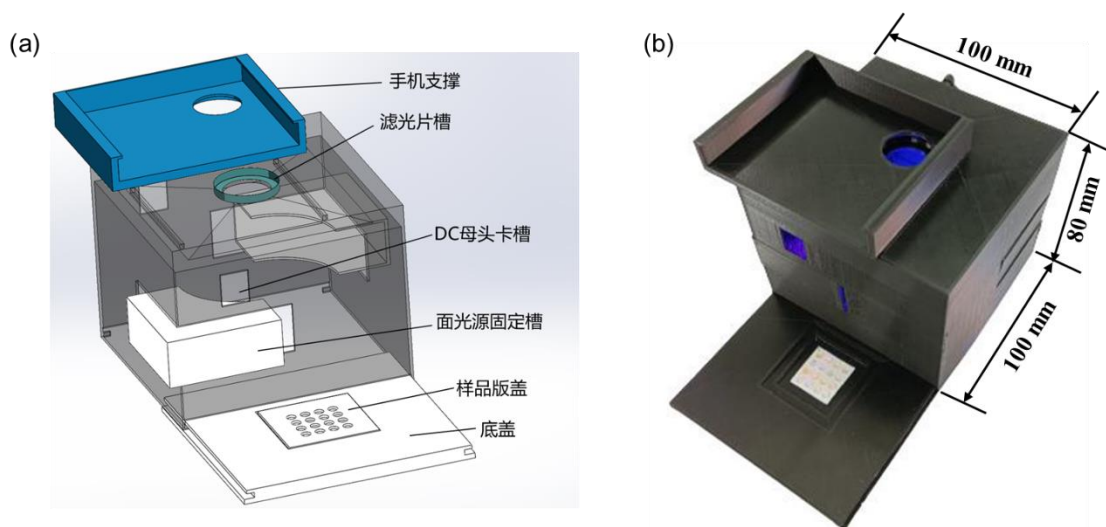


图 4-2 3D 打印光学装置的设计图及实物图

Fig. 4-2 Design drawing and physical drawing of 3D printing optical device

在荧光检测中，激发光源对检测区域荧光分子的均匀激发是保证检测结果准确的关键环节。本研究中，首先利用光强仪对安装有紫外 LED 灯珠装置 16 个检测区域的激发光光强进行测定，通过打开紫外 LED 激发光源，将光强仪探测头分别置于以上设计的光学装置中 16 个检测区域，并记录 395 nm 处的光强值，结果如图 4-3（a）所示。可以看到，在 16 个检测区域激发光强度的波动范围在 250~450 之间，且光强分布不均匀。接下来，使用相同的实验操作对本研究中使用的环形贴片式激发光源在 16 个检测区域的光强分布进行测定。结果如图 4-3（b）所示，可以看到 16 个检测区域接收到的光强信号在 655~660 之间浮动，基本一致。相较于普通的 LED 紫外灯光源，环形贴片式紫外灯激发光源对检测区域的激发更均匀，且激发光强度更大，更加适用于荧光检测。

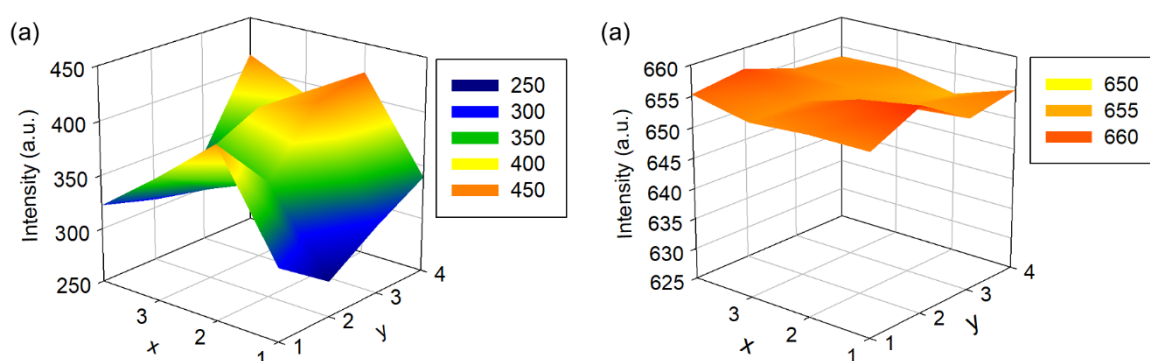


图 4-3 荧光检测装置 16 个检测区域紫外激发光强值分布图，（a）LED 灯珠，（b）环形贴片式紫外灯光源

Fig. 4-3 Distribution of UV excitation light intensity values in 16 detection areas of the fluorescence detection device, (a) LED lamp beads, (b) annular patch type UV light source

为了进一步验证激发光源对 16 个检测区域荧光激发的均匀性，在 16 个检测区域分别滴加相同体积、相同浓度的 FITC 标记的 anti-IgG，放置于本研究研发的荧光激发装置中并用智能手机获取检测区域的 G 值，检测结果如图 4-4 所示，可以看到 16 个检测区域 G 值基本保持一致，且从插图中也可以看到每个检测区域的光强基本一致。实验结果表明，设计的荧光检测装置可以实现对检测区域的均匀激发，可以满足荧光检测的要求。

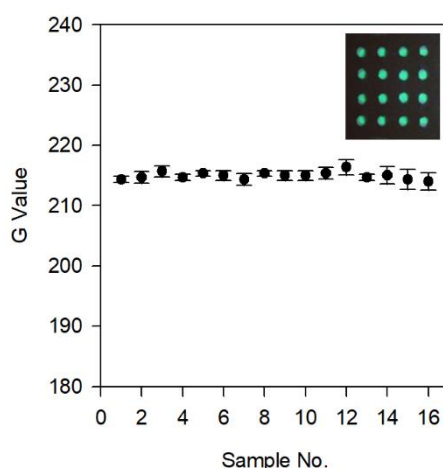


图 4-4 荧光检测装置下 16 个检测区域荧光图像 G 值分析结果 (n=3)

Fig. 4-3 Analysis results of G value of fluorescence images of 16 detection areas under the fluorescence detection device (n=3)

4.2.2 荧光高通量检测 Android 应用程序的开发与实现

如图 4-5 所示为通过 Android Studio 平台开发的“H-T Fluorescence Detect”软件，通过华为畅享 10Plus 智能手机进行运行调试。该应用程序的运行界面如图 4-3 所示。点击智能手机上的应用程序图标即进入如图 4-5 (a) 所示的应用程序主界面，主界面上包括五个选项：Detect、File、Quit。首先，在应用程序的主界面中，点击“Detect”按钮进入图像预览界面；如图 4-5 (b) 所示，该界面中包含用于对齐的 4×4 圆形阵列，手动点击手机屏幕聚焦，由于该软件针对荧光图像检测开发，为了获取较好的图像获取效果，在预览界面的底部设计有手机摄像头曝光强度按钮，用于调节拍照时的光亮度，然后点击预览界面中间的摄像机按钮获取图像；点击“Next”按钮跳转到结果显示界面，如图 4-5 (c) 所示，在该界面中可以选择要读取的色度值参数，选择了所需参数后界面 4-5 (d) 中显示了获取的 16 个区域的图像、色度学参数值及待测物浓度值，点击界面右上角的“Save”按钮对检测结果保存，再一次返回到主界面点击“File”按钮可以查看数据历史记录，如图 4-5 (e) 所示。

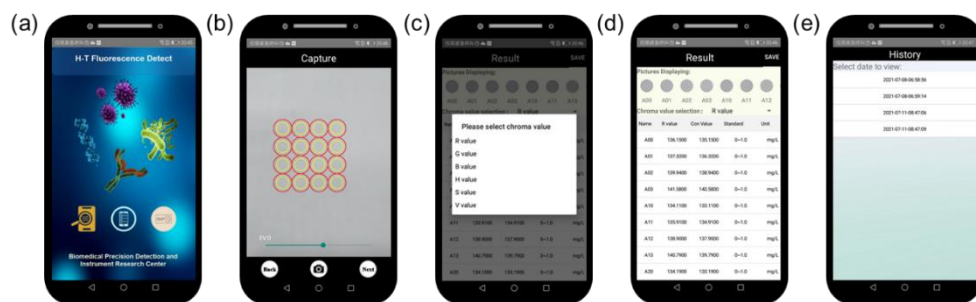


图 4-5 智能手机荧光高通量检测 App 检测流程图

Fig. 4-5 The flow chart of the H-T fluorescence detection App for smartphones

4.3 实验试剂及实验仪器

4.3.1 实验试剂

本实验使用的主要实验药品如表 4-1 所示：

表 4-1 实验中使用的试剂列表

Table 4-1 List of reagents used in the experiment

实验试剂	纯度级别	生产厂家
正己烷	分析纯	阿达玛斯试剂
乙酸乙酯	分析纯	阿拉丁试剂
三甲氧基甲硅烷	95%	阿拉丁试剂
硝酸锌六水合物	≥99%	Damas-beta
六亚甲基四胺	分析纯	国药集团
聚乙烯亚胺	≥99%	Damas-beta
乙酸锌二水合物	分析纯, ≥99%	General-Reagent
氢氧化铵	分析纯	九鼎化学
CN-PPV	分析纯	南方科技大学
3-缩水甘油醚氧基丙基 三甲基硅烷	分析纯	阿拉丁试剂
甲氧基聚乙二醇硫醇	分析纯	上海源叶生物科技
牛血清白蛋白	生化试剂	上海生工生物工程
IgG 抗原	生化试剂	上海博奥龙免疫技术
FITC 标记的 anti-IgG	生化试剂	上海博奥龙免疫技术
磷酸盐缓冲溶液	生化试剂	北京索莱宝
0.05% Tween-20 的磷酸 盐缓冲溶液	生化试剂	自制
超纯水	18.2 MΩ·cm	/

本实验使用的材料：Whatman 层析纸来源于电气公司（GE）医疗集团生命科学部。

4.3.2 实验仪器

本实验使用的主要仪器如表 4-2 所示

表 4-2 实验中使用的实验仪器列表

Table 4-2 List of experimental instruments used in the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
喷墨打印机	L810	EPSON
3 mm 打孔器	0093C	欧歌
生物安全柜	BSC-1100 II A2-X	济南鑫贝西生物
秒表计时器	/	大龙仪器
剪刀	170 mm	得力
接触角测量仪	VCA optima	AST
扫描电子显微镜	JSM-7100F	日本电子株式会社
3D 打印机	A8S	极光尔沃
电子天平	ME	Mettler-Toledo
真空干燥箱	DZF-6020	无锡玛瑞特科技
超声波清洗机	KQ-400VDE	昆山市超声仪器
智能手机	华为畅享 10Plus	华为技术有限公司

4.3.3 氧化锌纳米线纸基的表征方法

通过扫描电子显微镜对制备的氧化锌纳米线纸基进行表面结构和微观形貌的表征。

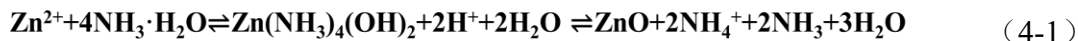
本实验采用日本电子公司的型号为 JSM-7100F 的扫描电镜进行表征。工作电压为 10 kV，将样品直接粘在贴有导电胶的样品台上，由于玻璃纤维滤纸不具有导电性，为了获得较为清晰的电镜扫描照片，在测试之前，首先在样品表面进行喷金处理。

4.4 结果与讨论

4.4.1 玻璃滤纸表面氧化锌纳米线的合成

氧化锌纳米线是一种多功能的纳米材料，具有结构尺寸小、比表面积大、反应活性强的特点，在常温下，氧化锌纳米线的禁带宽度在 3.37 eV 附近，最高激子束缚能甚至可以达到 60 meV，其常温下的发光能力是其他半导体材料难以比拟的。再加上纳米氧化锌材料透明度高、分散性好，其在化学、光学及生物等多个领域展示出良好的物理和化学性能^[171, 181]。氧化锌纳米线具有增强荧光的能力，本文通过在纸基上制备氧化锌纳米线实现荧光增强，从而提高检测灵敏度。

常用的制备氧化锌纳米线的方法物理合成法、电沉积法、水热法等方法，本实验利用水热法在纸基上生长氧化锌纳米线。在氧化锌纳米线生长过程中 NH_4^+ 可以吸附在 ZnO 晶核表面从而导向 ZnO 纳米结构的生长，化学反应原理如公式（4-1）所示：



其中氨水与 Zn^{2+} 形成络合物 $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})_2$ ，在水热条件下，前驱物 $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})_2$ 通过脱水反应生成 ZnO 沉淀，附着在玻璃滤纸纸基上。具体的制备实验步骤如下：（1）氧化锌种子纸基的制备：将反应中使用的 Whatman 玻璃滤纸浸入氧化锌种子溶液中 60 秒，然后取出在 100 °C 的烘箱中干燥 1 小时，得到氧化锌纳米线种子纸基；（2）氧化锌纳米线生长溶液的制备：准确称取 0.372 g 硝酸锌六水合物、0.088 g 六亚甲基四胺、0.0912 g 聚乙烯亚胺，将三者溶于 50 mL 超纯水中，然后吸取 1.306 mL 氨水加入上述溶液中，通过超声获得均一相的溶液，即氧化锌生长溶液；（3）将氧化锌种子纸基放在生长液中，用锡箔纸密封，在 90 °C 的烘箱中放置 4 小时，充分反应后取出，用超纯水彻底冲洗，90 °C 干燥，最终得到氧化锌纳米线纸基。具体的制备流程如图 4-6 所示。

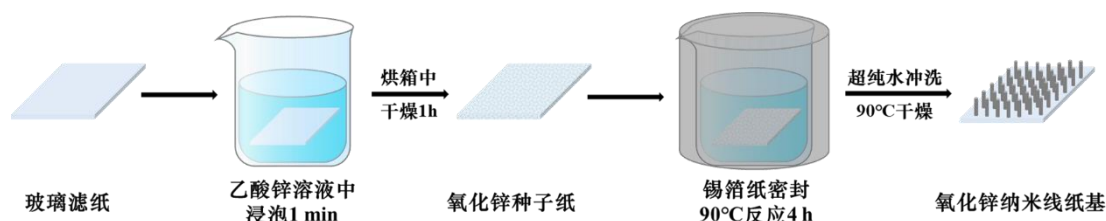


图 4-6 玻璃滤纸氧化锌纳米线纸基制备流程图

Fig. 4-6 Flow chart of preparation of glass filter paper ZnO nanowire paper base

4.4.1.1 反应通道纸基类型的选择

为了选择合适的纸基亲水反应通道，以提高检测的灵敏度，探究了 Whatman 3MM 滤纸、Whatman 1 号滤纸、Whatman 3 号滤纸及 Whatman 玻璃滤纸在紫外灯照射下的状态。从图 4-7 的对比可以看出，在同一紫外灯照射下，Whatman 3MM 滤纸、Whatman 1 号滤纸、Whatman 3 号滤纸表面均存在自发荧光，这就在一定程度上降低了检测过程中的信噪比，对荧光信号的准确检测造成了干扰，进而会导致一定的测量误差，对荧光测量存在一定的影响，影响最终的实验结果。相比之下，Whatman 玻璃滤纸表面基本没有自发荧光，因此，将玻璃滤纸做亲水通道用于反应可以提高信噪比及检测灵敏度。

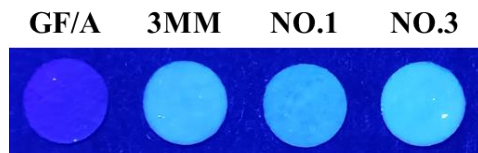


图 4-7 Whatman 3MM 滤纸、Whatman 1 号滤纸、Whatman 3 号滤纸及 Whatman 玻璃滤纸在荧光灯照射下的自发荧光强度对比

Fig. 4-7 Comparison of the autofluorescence intensity of Whatman 3MM filter paper, Whatman No. 1 filter paper, Whatman No. 3 filter paper and Whatman glass filter paper under fluorescent light irradiation

4.4.1.2 氧化锌纳米线在 Whatman 玻璃滤纸上生长条件的优化

由于之前没有工作报告在玻璃滤纸上制备氧化锌纳米线，需要对氧化锌纳米线在 Whatman 玻璃滤纸上生长条件进行优化。在氧化锌纳米线合成的过程中，氧化锌纳米线种子溶液的浓度、聚乙烯亚胺（PEI）的浓度及生长时间均会影响氧化锌纳米线的形貌与质量。因此，我们探究了氧化锌纳米线种子溶液浓度、PEI 浓度及生长时间对合成氧化锌纳米线的影响。

(1) 氧化锌纳米线种子溶液浓度的优化

配制不同浓度（0.1 mol/L、0.15 mol/L、0.2 mol/L、0.25 mol/L、0.3 mol/L、0.35 mol/L、0.4 mol/L、0.5 mol/L）的氧化锌纳米线种子溶液，将反应所用的玻璃滤纸浸没在不同浓度的氧化锌种子溶液中 1 min，取出放在烘箱中 100 °C 干燥 1 h，随后将以上氧化锌种子纸基放入生长液中，置于 90 °C 的烘箱中反应 3 h。如图 4-8（a）、（b）、（c）所示，在氧化锌纳米线种子液的浓度为 0.1 mol/L、0.15 mol/L、0.2 mol/L 的情况下，观察到纸基上生成的晶体较少且形貌为团簇的颗粒状，这表明种子溶液的浓度较低。如图 4-8（d）所示，种子溶液浓度为 0.25 mol/L 时，纸基上生成了致密的氧化锌纳米线。如图 4-8（e）、（f）、（g）、（h）所示，随着种子溶液浓度逐渐增加，纸基上的晶体增多但仍然为团簇的颗粒状。因此我们选择的最优氧化锌纳米线种子溶液的浓度为 0.25 mol/L。

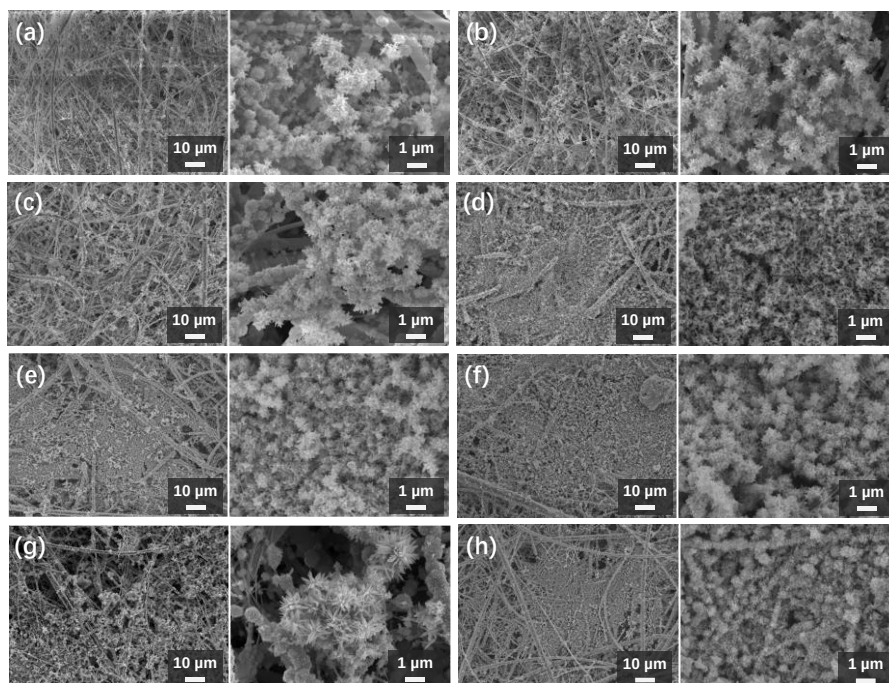


图 4-8 不同浓度氧化锌纳米线种子溶液得到的玻璃滤纸表面扫描电镜照片。(a-h) 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 和 0.5 mol/L

Fig. 4-8 SEM images of glass filter paper surfaces obtained from ZnO nanowire seed solutions with different concentrations. (a-h) 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4 and 0.5 mol/L

(2) 生长时间的影响

将 0.25 mol/L 的氧化锌种子溶液浸泡并干燥后的玻璃滤纸放入生长液之后，置于 90 °C 的烘箱中分别反应不同的时间（1 h、2 h、3 h 和 4 h），如图 4-9（a）所示，在生长 1 h 时，生长的晶体比较稀少，这表明氧化锌纳米线在 1 h 时处于刚开始生长的状态；随着生长时间延长到 2 h、3 h 时，可以观察到团簇的颗粒状氧化锌晶体，并且逐渐变密（图 4-9（b）和图 4-9（c））。当反应 4 h 时，可以看到玻璃滤纸表面长满了致密的氧化锌纳米线，如图 4-9（d）。因此，我们选择 4 h 作为玻璃滤纸上氧化锌纳米线的生长时间。

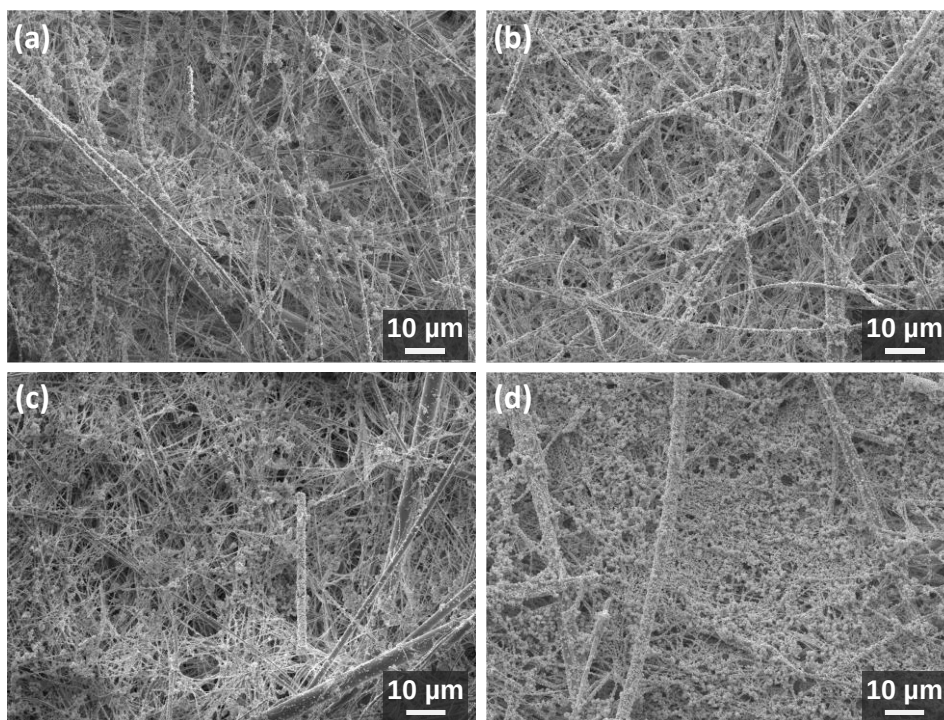


图 4-9 不同的生长时间玻璃滤纸上得到氧化锌纳米线的扫描电镜照片。（a）生长 1 h，（b）生长 2 h，（c）生长 3 h 和（d）生长 4 h

Fig. 4-9 SEM images of ZnO nanowires on glass filter paper were obtained at different growth times. (a) 1 h, (b) 2 h, (c) 3 h and (d) 4 h

(3) PEI 浓度的优化

聚乙烯亚胺（PEI）是一种非极性聚合物，在氧化锌纳米线生长过程中，可以通过静电亲和作用吸附在晶面上并改变这些晶面的表面自由能和生长速度，从而抑制氧化锌纳米线的侧向生长，最终获得高纵横比的氧化锌纳米线^[182]。基于此，探究了不同浓度 PEI 对氧化锌纳米线形貌的影响。将氧化锌种子纸基放入分别含有不同浓度 PEI 的生长液中（0 mM、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、）用锡箔纸密封，置于 90 °C 的烘箱中反应 4 h。如图 4-10 所示，在没有 PEI 的情况下，合成的氧化锌晶体的直径较大；随着 PEI 浓度的增加，氧化锌晶体纵向生长较明显；当 PEI 浓度为 3 mM 时，可以观察

到生长的氧化锌纳米线较为均匀且直径较小；当 PEI 的浓度继续增加时，可以看到生成的氧化锌的量逐渐减少且为团簇，这是因为过量的 PEI 可以抑制氧化锌的结晶^[183]。因此，实验中选择 PEI 的最佳加入浓度是 3 mM。

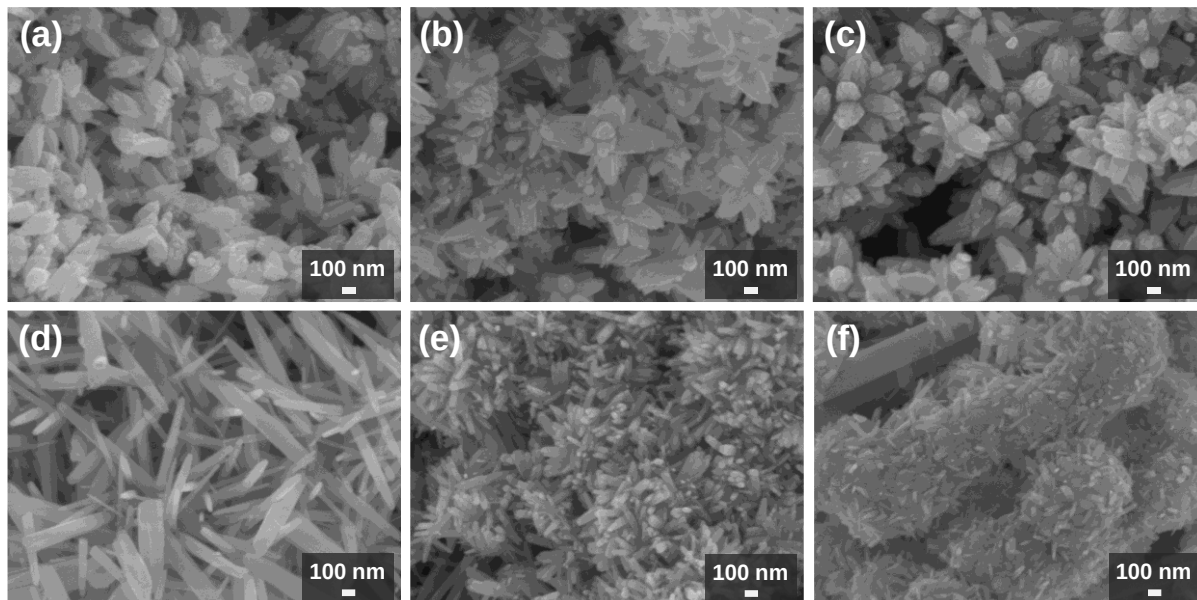


图 4-10 加入不同浓度 PEI 后，氧化锌纳米线纸基的扫描电镜图。(a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 3 mM、(e) 4 mM 和 (f) 5 mM

Fig. 4-10 SEM images of ZnO nanowire paper bases with different concentrations of PEI added. (a) 0 mM、(b) 1 mM、(c) 2 mM、(d) 3 mM、(e) 4 mM and (f) 5 mM

4.4.1.3 Whatman 玻璃滤纸上生长的氧化锌纳米线的表征

在最佳反应条件下，采用水热法在 Whatman 玻璃滤纸上生成了氧化锌纳米线。如图 4-11 (a) 与 (b) 所示，从纯玻璃滤纸的扫描电镜图片可以观察到裸露的玻璃纤维网格。从图 4-11 (c) 与 (d) 中可以明显的看到致密的氧化锌纳米线完全覆盖在玻璃滤纸纤维的表面。

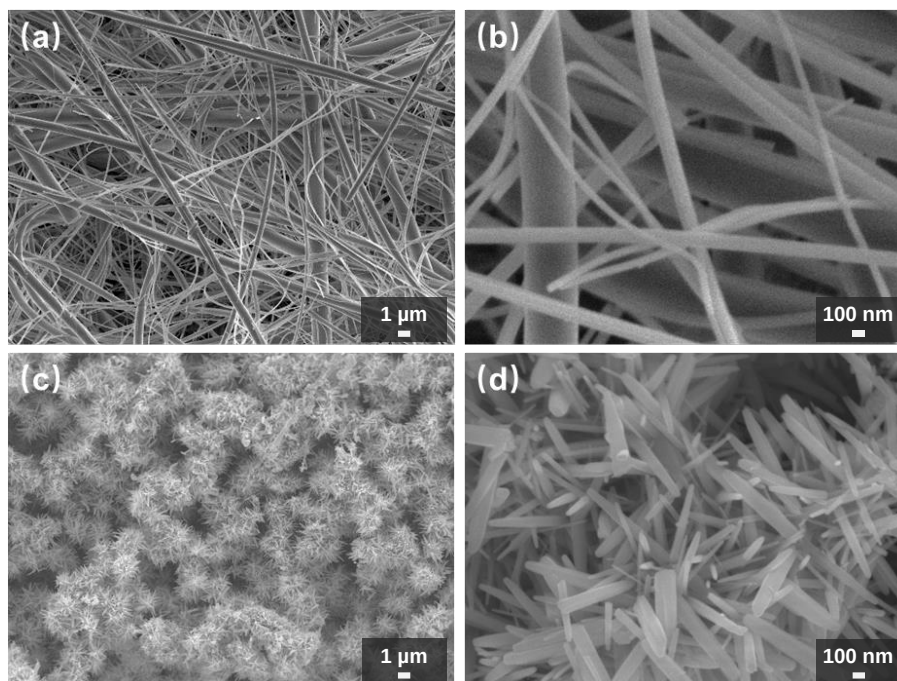


图 4-11 玻璃滤纸上有无生长氧化锌纳米线扫描电镜表征图。(a) 和 (b) 是纯玻璃滤纸的扫描电镜照片；(c) 和 (d) 是氧化锌纳米线玻璃滤纸的扫描电镜照片

Fig. 4-11 SEM images of the presence or absence of growth of zinc oxide nanowires on glass filter paper. (a) and (b) are SEM pictures of pure glass filter paper; (c) and (d) are SEM pictures of ZnO nanowire glass filter paper

4.4.2 氧化锌纳米线的荧光信号增强作用验证

通过以上实验，已经在玻璃滤纸基底上成功制备了氧化锌纳米线。为了探究滤纸表面氧化锌纳米线是否对荧光信号具有增强作用，如图 4-12 所示，使用不同浓度的（200、100、50、40、20、10、5、2 ppm）聚合物量子点 CN-PPV 验证了氧化锌纳米线的荧光增强作用。从图中可以看出，与图 4-12 (a) 中纯玻璃滤纸相比不同浓度的 CN-PPV 在氧化锌纳米线纸基上（图 4-12 (b) 所示）均有显著荧光增强。

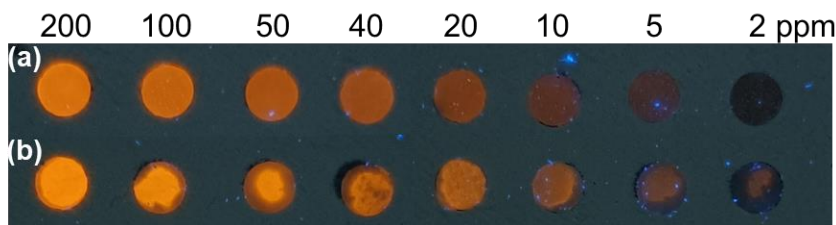


图 4-12 氧化锌纳米线荧光增强效果图。分别在纯玻璃滤纸与氧化锌纳米线玻璃滤纸上滴加不同浓度的 CN-PPV，(a) 纯玻璃滤纸；(b) 氧化锌纳米线玻璃滤纸

Fig. 4-12 Fluorescence enhancement effect of zinc oxide nanowires. Different concentrations of CN-PPV were added dropwise to pure glass filter paper and zinc oxide nanowire glass filter paper respectively, (a) pure glass filter paper; (b) zinc oxide nanowire glass filter paper

接下来,用智能手机 App 对纸质芯片进行拍照并分析其色度值,如图 4-13 (a) 所示为 Whatman 玻璃纤维滤纸 GF/A 表面有无氧化锌纳米线的荧光信号分析 R 值散点图,其中红色点表示的是有氧化锌纸基的荧光信号 R 值分析结果,黑色点表示的纯玻璃滤纸荧光信号 R 值分析结果。对比之下可以看出,在相同的浓度下,有氧化锌纳米线纸基上的 R 值均大于纯玻璃滤纸上 R 值的分析结果,说明生长有氧化锌纳米线的纸基具有荧光增强效果。从图 4-13 (b) 可以看出,CN-PPV 浓度的对数与 R 值呈现良好的线性关系,氧化锌纳米线纸基可以用于后期检测实验。

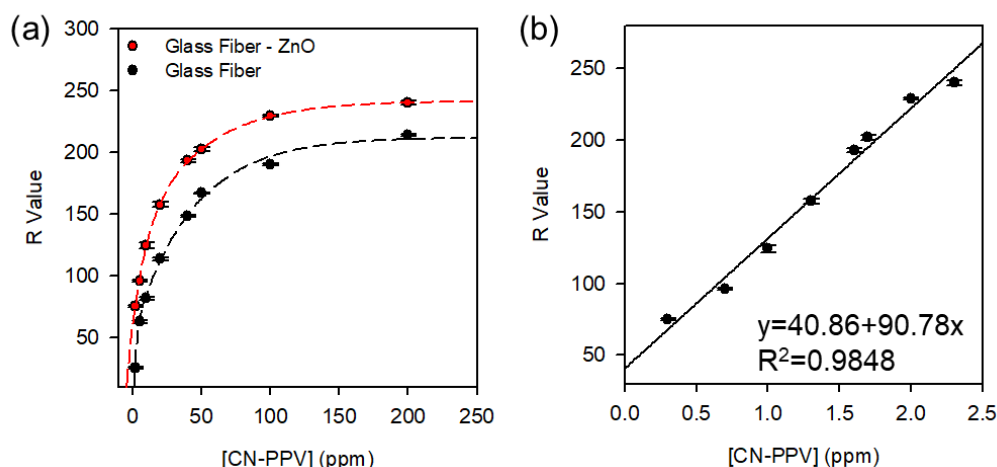


图 4-13 (a) Whatman 玻璃滤纸荧光增强前后的 R 值散点图, (b) 荧光增强后 CN-PPV 浓度对数与 R 值的关系曲线

Fig. 4-13 (a) Scatter plot of R value before and after fluorescence enhancement of Whatman glass filter paper, (b) relationship between the logarithm of CN-PPV concentration and R value after fluorescence enhancement

4.4.3 高通量滤纸生化芯片的制备

芯片微流控实验室也称为芯片实验室,它利用微通道结构在数平方厘米或更小的微芯片上集成了样品的预处理,分离和检测。涉及化学,生物学,医学等领域的不同化学或生物反应的最终完成和反应产物的分析,为分析仪器和设备的微型化和便携性做出了重要贡献^[184]。

自 Whitesides 课题组最先提出 μ PADs 的概念到现在,研究者们已经做了大量的努力来制备纸基微流控芯片,包括利用物理封闭和沉积的方法,以及在纸纤维表面进行共价化学改性。文献报道的纸基芯片加工技术有紫外光刻^[157]、激光刻蚀^[185]、喷墨刻蚀^[186]、蜡印^[187]、融蜡浸渍^[188]、绘图仪印刷、柔版印刷和三维器件等,能够提供快速制造工艺,并可用于大规模生产纸基微流控芯片。但是,这些方法不仅需要昂贵的专业设备,如光刻设备、CO₂激光、蜡墨打印机、激光或线切割机器,而且还需要训练有素的人员。本研究采用一种快速、简单、低成本、易应用的方法,以三甲氧基硅烷

(TOS) 为纤维素疏水剂制备疏水性纸基。具体步骤为将事先设计好的纸基阵列打孔，然后疏水处理，再将亲水的滤纸 3 mm 小孔嵌入已经完成疏水化处理的纸基上，从而完成纸基微流控芯片的制备。下面将详细介绍纸基微流控芯片的制备过程。

4.4.3.1 滤纸芯片的设计与制备

如图 4-14 所示，利用 PPT 设计了 4×4 的 3 mm 圆孔阵列，通过喷墨打印机在 Whatman 1 号滤纸上打印已经设计好的阵列图形（大小为 27 mm $\times$ 27 mm），打印完成后用剪刀裁剪成正方形的形状，然后利用 3 mm 打孔器在滤纸上进行打孔处理，从而得到纸基阵列。

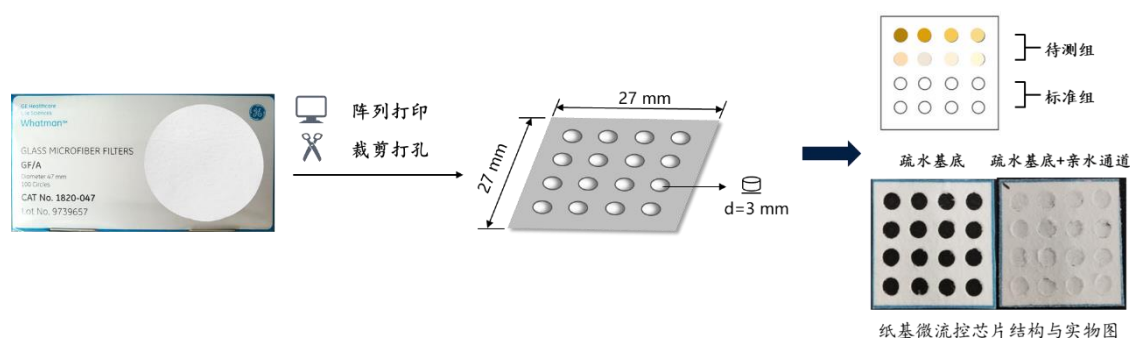


图 4-14 4×4 高通量纸基阵列设计与制备过程

Fig. 4-14 Design and fabrication of 4×4 high-throughput paper-based arrays

4.4.3.2 纸基表面疏水化处理

在 50 mL 量筒中量取正己烷 30 mL，移至 50 mL 烧杯中；随后用移液枪分别量取 1.5 mL 乙酸乙酯和 1.26 mL 三甲氧基硅烷（TOS）至上述烧杯中；用玻璃棒均匀搅拌 30 s，然后倒入玻璃培养皿中；将已经完成打孔处理的纸基阵列放入玻璃培养皿中，使其完全浸泡；浸泡 1 min 后用镊子取出放在干净的玻璃培养皿中，静置直到其完全风干 [189]。

使用接触角测量仪对完成疏水化的纸基进行接触角测量。取一小块疏水化过后的 Whatman 1 号滤纸，使用移液枪吸取 2 μ L 稀释过的蓝墨水滴在滤纸表面，进行接触角的测量。如图 4-15 所示，测得完成疏水化的 Whatman 1 号滤纸表面的接触角为 135.8° 。滤纸疏水化处理后达到了强疏水的效果。

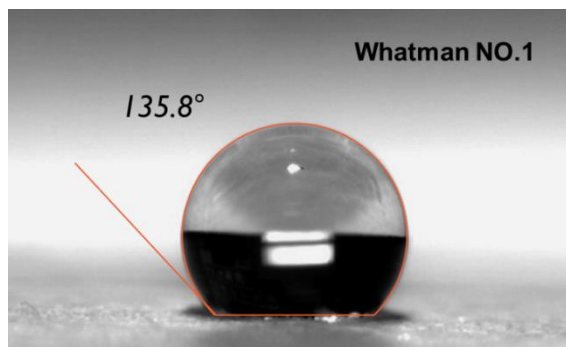


图 4-15 Whatman 1 号滤纸疏水化处理后的接触角大小

Fig. 4-15 Contact angle of Whatman No. 1 filter paper after hydrophobization treatment

4.4.3.3 生化反应通道试剂体积优化

为了实现在检测过程中滴加的试剂体积为最优，本研究使用稀释过 20 倍的红墨水设计体积梯度，分别滴加在已经制备好的纸基微流控分析装置上，通过观察红墨水在两种滤纸上的吸收以及稳定情况来选择最合适的体积，而之后滴加荧光染料进行检测时也将采用本体积。如图 4-16 所示，在进行过疏水化处理的纸基阵列上嵌入亲水性的不同滤纸的 3 mm 圆孔，由上到下设置体积梯度从 0.5 μL 依次递增 0.5 μL 至 4.0 μL ，通过观察结果可知，当墨水体积为 3 μL 时，墨水颜色最均匀且没有多余的墨水溢出。因此，本次实验我们选取的最佳的试剂滴加体积为 3 μL 。

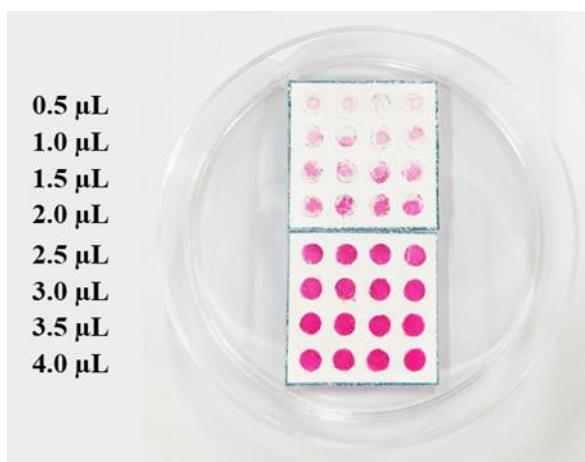


图 4-16 滤纸亲水通道液体体积优化

Fig. 4-16 Optimization of liquid volume in filter paper hydrophilic channels

4.4.4 基于智能手机的氧化锌纳米线免疫纸基分析装置测定兔免疫球蛋白 (IgG)

4.4.4.1 氧化锌纳米线纸基对检测兔 IgG 的荧光增强验证

为了评估氧化锌纳米线纸基在免疫检测体系中的荧光增强能力，以 PBS 缓冲溶液作为对照，用 FITC-labeled anti-IgG 来验证氧化线纳米线的荧光增强作用。如图 4-17 所

示是氧化锌纳米线纸基上兔 IgG 检测的过程图。为了提高氧化锌纳米线纸基捕获抗原或抗体的能力, 首先将氧化锌纳米线纸基浸没在含有 4% 的 3-缩水甘油氧基丙基三甲基硅烷 (GPTMS) 的乙醇溶液中 20 min, 然后后乙醇和超纯水清洗干燥, 此时氧化锌纳米线上得到环氧基团。之后将 3 μL 一定浓度的兔 IgG 溶液滴入检测区域, 与 GPTMS 修饰的氧化锌纳米线纸基共价结合, 室温孵育 30 min, 使用 1% 的甲氧基聚乙二醇硫醇处理 20 min 封闭未反应的环氧基团, 再用 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 处理 10 min 用以封闭未占据的位点, 以防止蛋白质的非特异性吸附。然后, 将 3 μL 一定浓度的 FITC-labeled anti-IgG 加入到反应区, 反应 30 min, 用 PBST 缓冲溶液冲洗反应区, 吸水纸吸收过量的洗涤缓冲溶液。最后, 将反应阵列置于自制的便携式高通量荧光检测仪器中, 使用智能手机获取并分析荧光照片色度值。

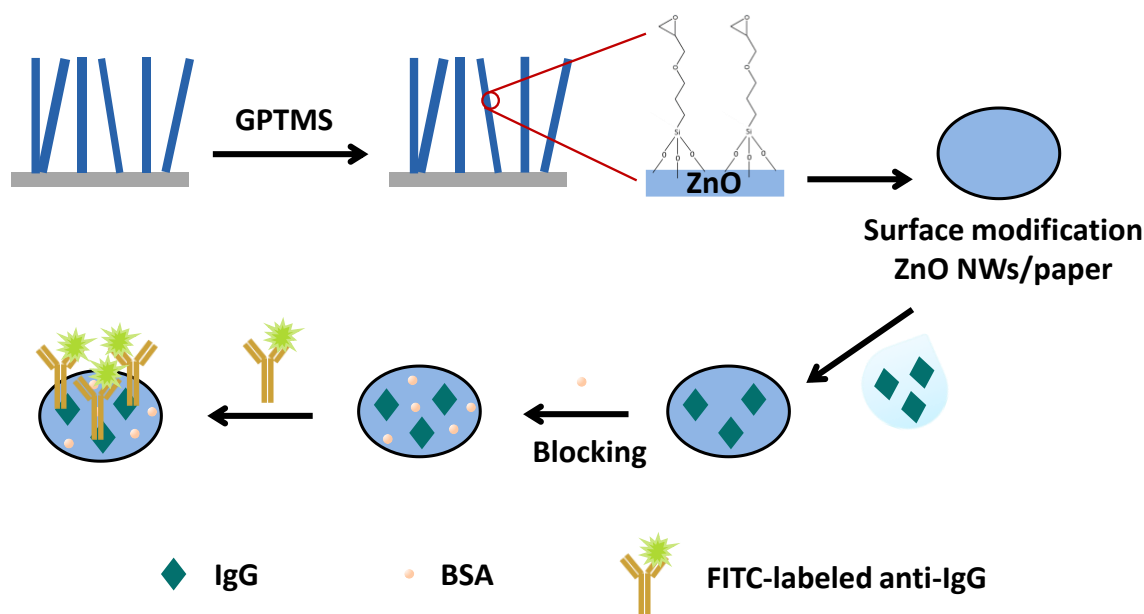


图 4-17 氧化锌纳米线纸基制备及荧光免疫检测过程示意图

Fig. 4-17 Schematic diagram of the paper-based preparation and fluorescence immunodetection of ZnO nanowires

如图 4-18 (a) 和 (c) 所示, 在纯玻璃滤纸上和氧化锌纳米线纸基上检测 PBS 的荧光信号都不明显, 且差异不大, 说明背景信号较弱且保持一致。对比图 4-18 (b) 和 (d) 可以看出, 氧化锌纳米线纸基上检测 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 FITC-labeled anti-IgG 的荧光强度明显高于纯玻璃滤纸上的荧光强度。实验结果表明, 氧化锌纳米线能有效增强荧光强度, 提高检测灵敏度和信噪比, 为后期兔 IgG 定量检测提供更加精准的装置。

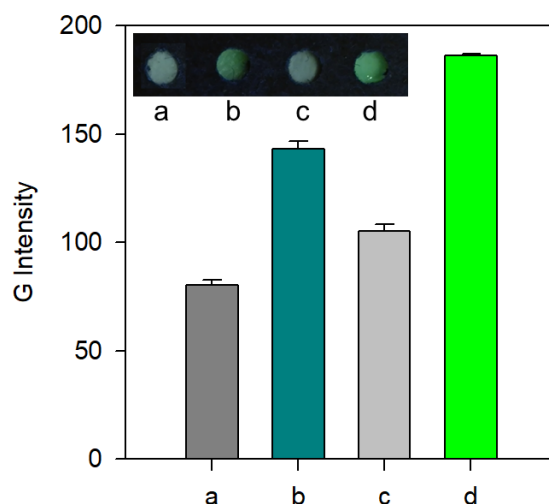


图 4-18 氧化锌纳米线纸基信号增强。(a) 纯玻璃滤纸上检测 3 μL PBS, (b) 纯玻璃滤纸上检测 3 μL 的浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 FITC-labeled anti-IgG 溶液, (c) 氧化锌纳米线纸基上检测 3 μL PBS, (d) 氧化锌纳米线纸基上检测 3 μL 的浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 FITC-labeled anti-IgG 溶液的荧光强度柱状图 (插图为柱状图相对应的荧光照片, $n=3$)

Fig. 4-18 Signal enhancement of ZnO nanowire paper-based. (a) 3 μL of PBS on pure glass filter paper, (b) 3 μL of FITC-labeled anti-IgG solution at a concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ on pure glass filter paper, (c) 3 μL of ZnO nanowire paper μL PBS, (d) Fluorescence intensity histogram of 3 μL of 1 $\mu\text{g/mL}$ FITC-labeled anti-IgG solution detected on zinc oxide nanowire paper substrate (inset is the fluorescence photo corresponding to the histogram, $n=3$)

4.4.4.2 兔 IgG 检测冲洗次数的优化

为了使检测更加准确, 需要对冲洗次数进行优化, 将 3 μL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 FITC-labeled anti-IgG 溶液滴加至检测区并反应 30 min, 然后使用 3 μL 的 PBST 分别将检测区域洗涤 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次。从图 4-19 可以看出, 随着洗涤次数的增加, 检测区荧光强度逐渐降低, 在洗涤 3 次之后随着洗涤次数的增加荧光强度没有明显降低。因此, 选择 3 次为最佳的冲洗次数。

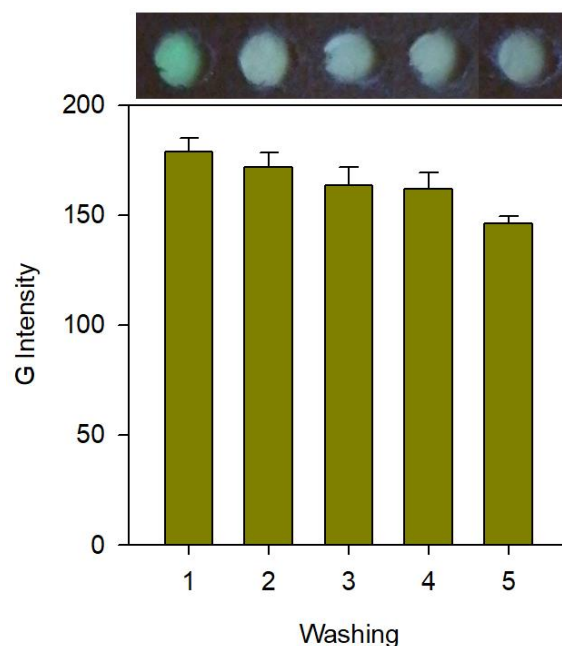


图 4-19 检测时冲洗次数的优化。在检测区加入 3 μL 的 PBST 分别洗涤 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次的荧光照片 G 值分析, $n=3$

Fig. 4-19 Optimization of the number of flushes during detection. Add 3 μL of PBST to the detection area to wash 1, 2, 3, 4, and 5 times respectively. G value from the analysis of fluorescence photos, $n=3$

4.4.4.3 FITC-labeled anti-IgG 浓度的优化

为了优化 FITC-labeled anti-IgG 的浓度, 将 3 μL 浓度为 1 mg/mL 的兔 IgG 加入到检测区共价结合 30 min; 使用 1% 的甲氧基聚乙二醇硫醇处理 20 min, 封闭氧化锌纳米线表面未反应的环氧基团, 随后再用 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 处理 10 min 用于占据未结合的位点, 阻止蛋白的非特异性结合; 然后, 向检测区分别滴加 3 μL 浓度为 0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL 的 FITC-labeled anti-IgG, 室温孵育 30 min; 接下来向检测区加入 3 μL 的 PBST 冲洗 3 次, 用吸水纸吸收过量的洗涤缓冲溶液; 最后, 用智能手机高通量荧光检测装置获取并分析检测区域的荧光照片的 Green 值。从图 4-20 中可以看出反应图片的 G 值随着 FITC-labeled anti-IgG 浓度的增加而增大, 在浓度为 1.0 mg/mL 时达到最大值。因此, 反应中选择的 FITC-labeled anti-IgG 最佳浓度为 1.0 mg/mL。

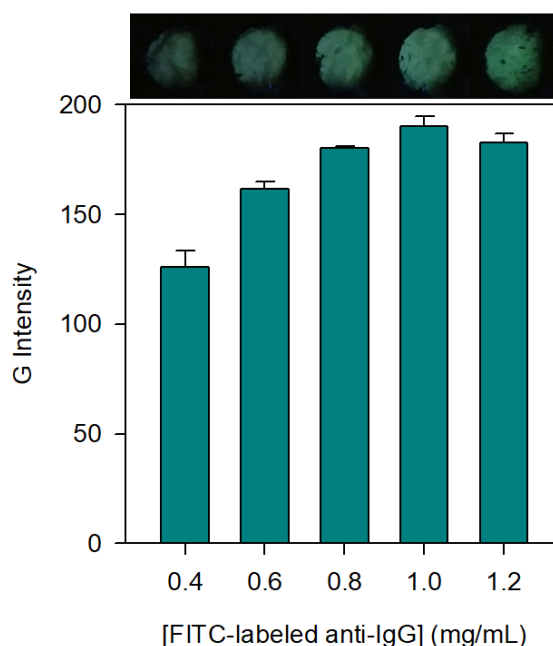


图 4-20 FITC-labeled anti-IgG 浓度的优化。在检测区分别滴加 3 μL 浓度为 0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL 的 FITC-labeled anti-IgG 荧光照片 G 值分析结果, $n=3$

Fig. 4-20 Optimization of FITC-labeled anti-IgG concentrations. 3 μL of FITC-labeled anti-IgG with concentrations of 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.0 mg/mL, and 1.2 mg/mL were added dropwise to the detection area respectively. The results of the fluorescence photo G value analysis, $n=3$

4.4.4.4 智能手机高通量荧光检测装置实现兔 IgG 定量检测

在上述实验确定的最佳条件下, 分别使用纯玻璃滤纸与氧化锌纳米线玻璃滤纸进行兔 IgG 定量检测。如图 4-21 (a) 和 (b) 所示, 在纯玻璃滤纸上和氧化锌纳米线玻璃滤纸上检测浓度为 0~500 $\mu\text{g/mL}$ 的兔 IgG, 随着兔 IgG 浓度的逐渐增加, 检测区荧光强度增加, 相应的色度值 G 也逐渐增大。对比图 4-21 (a) 与 (b) 中检测区域照片及 4-21 (c) G 值分析结果可以看到, 相同的兔 IgG 浓度下氧化锌纳米线纸基检测区荧光强度明显高于纯玻璃滤纸上的荧光强度, G 值也更大, 这同时也进一步验证了氧化锌纳米线的荧光增强能力。

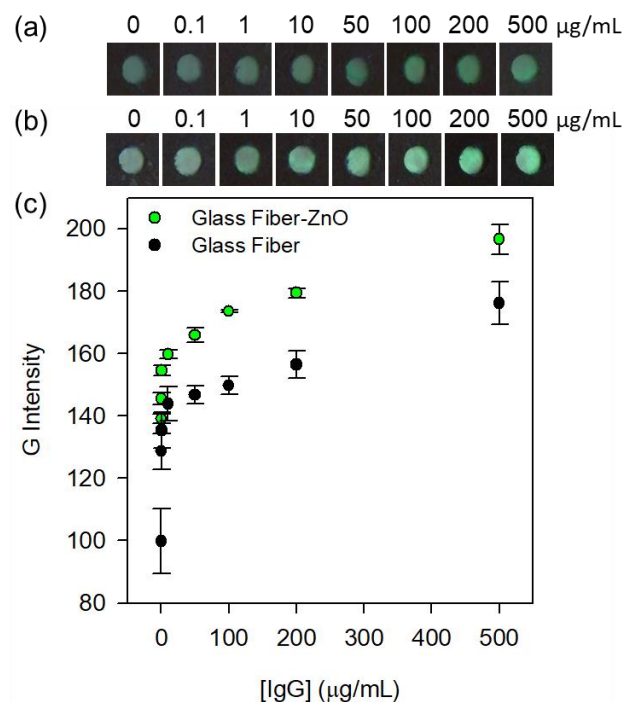


图 4-21 (a) 纯玻璃滤纸和 (b) ZnO 纳米线玻璃滤纸在不同浓度兔 IgG 手机检测的荧光图像, (c) 纯玻璃滤纸和 ZnO 纳米线玻璃滤纸 G 值随兔 IgG 浓度变化的趋势, 兔 IgG 的浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$

Fig. 4-21 The relationship between (a) pure glass filter paper and (b) ZnO nanowire glass filter paper with different concentrations of rabbit IgG and G value (inset: fluorescent images), the concentration of rabbit IgG is 0 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$

为了进一步验证氧化锌玻璃滤纸检测的灵敏度, 在最佳实验条件下, 按照上述相同的实验步骤在纯玻璃滤纸和氧化锌纳米线玻璃滤纸上对低浓度的兔 IgG 进行定量检测, 结果如图 4-22 所示。图 4-22 (a) 中显示了在纯玻璃滤纸上 0~0.15 $\mu\text{g/mL}$ 浓度呈现良好的线性, 可以计算出, 在氧化锌纳米线玻璃滤纸上兔 IgG 的检测限为 11.25 ng/mL。图 4-22 (b) 中显示了在氧化锌玻璃滤纸上 0~0.15 $\mu\text{g/mL}$ 浓度呈现良好的线性, 线性方程为 $y=2.2783+71.1922x$, $R^2=0.9928$ 。由 3σ 公式可以计算出, 在氧化锌纳米线玻璃滤纸上兔 IgG 的检测限为 1.29 ng/mL, 相比较于纯玻璃滤纸上的检测结果, 检测限提高了大约 10 倍。综上所述, 智能手机高通量荧光检测装置可以实现兔 IgG 定量检测, 为其他生化分子的高灵敏定量检测提供新的可能。

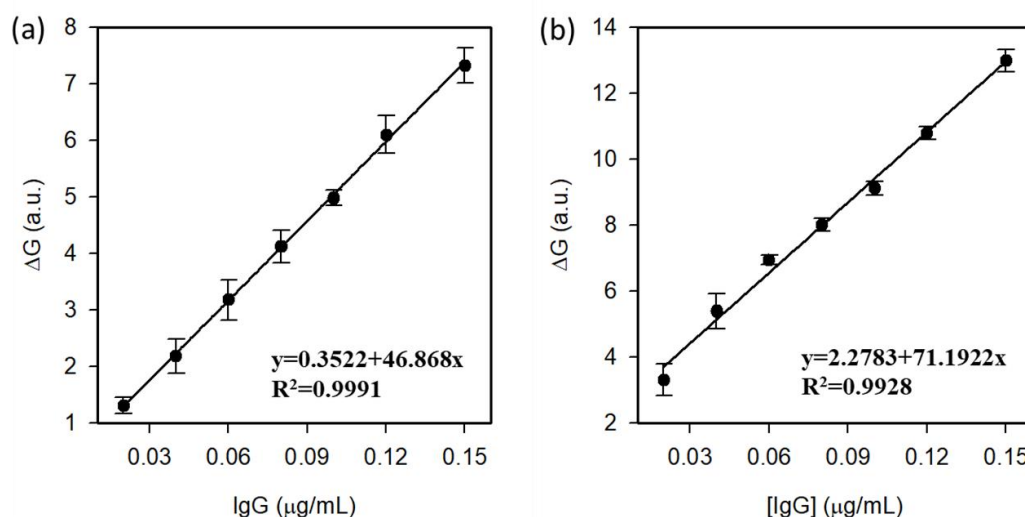


图 4-22 (a) 纯玻璃滤纸上与 (b) 氧化锌纳米线玻璃滤纸上不同浓度的兔 IgG 与 ΔG 值的标准曲线, 兔 IgG 的浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.04 $\mu\text{g/mL}$ 、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、0.08 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.12 $\mu\text{g/mL}$ 、0.15 $\mu\text{g/mL}$

Fig. 4-22 The curve between (a) pure glass filter paper and (b) ZnO nanowire glass filter paper with different concentrations of rabbit IgG and ΔG value, the concentration of rabbit IgG is 0 $\mu\text{g/mL}$, 0.02 $\mu\text{g/mL}$, 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 0.06 $\mu\text{g/mL}$, 0.08 $\mu\text{g/mL}$, 0.10 $\mu\text{g/mL}$, 0.12 $\mu\text{g/mL}$, 0.15 $\mu\text{g/mL}$

4.5 本章小结

为了进一步地提高生化分子检测的灵敏度, 本章研发了智能手机 ZnO 纳米线纸基荧光传感平台。与普通滤纸相比, 玻璃纤维滤纸的低荧光背景使其更适用于定量荧光分析。本研究利用“水热法”首次在玻璃滤纸基上合成了氧化锌纳米线, 实现了荧光增强, 解决了纸基荧光检测存在信噪比低的问题; 结合纸基微流控技术, 成功制备了高通量阵列式荧光生物芯片; 研制了便携式荧光传感分析仪, 通过巧妙设计环形贴片式激发光源, 解决了便携式荧光传感平台存在的激发光源强度不足、激发不均匀等痛点问题。同时, 开发了智能手机荧光阵列检测软件“H-T Fluorescence Detect”实现了荧光图像的精准获取和分析。使用聚合物量子点 CN-PPV 对该荧光检测系统进行了验证, 证明了检测系统与氧化锌纳米线荧光增强的可行性。最后, 通过构建荧光免疫传感体系, 实现了兔 IgG 的定量, 实验结果表明, 氧化锌纳米线纸基上兔 IgG 的检测限比纯玻璃滤纸的检测限提高了 10 倍, 验证了该检测系统在生化分子检测方面具有高的灵敏度和可靠性。该荧光检测系统有望在医学诊断、食品安全及环境监测领域有广阔的应用场景。

第5章 总结与展望

5.1 工作总结

本文主要工作内容是基于数字图片比色分析法,结合智能手机开发了一系列即时检测仪器及实现了相关仪器的初步应用。完成了以下几个工作:

1. 开发了基于智能手机和商业试纸条结合实现 pH 高精度定量的检测系统。为色调发生变化的显色体系提出了“主波长”比色分析新指标。该检测系统从硬件和软件两方面为数字图片比色法准确分析提供了解决方案,针对智能手机数字图片比色分析受外界环境光照、手机型号等不同因素的影响等问题,设计了可以提供均匀光照的集成光学系统,研发了智能手机颜色纠正算法及应用程序“Smart-pH-Reader”。将智能手机与商用 pH 试纸条相结合,通过建立 pH 值与主波长值之间的对应关系实现了 pH 值的高精度测量。分别利用本检测系统与 pH 计对实际样本进行测定,通过构建 Bland-Altman 图对二者检测结果进行分析,两种检测方法所测值的差异在 $\pm 1.96SD$ 范围内,验证了本系统在测定 pH 值时的准确性与可靠性。该检测系统操作简单、检测快速、试剂用量少,有望应用于环境监测、医疗诊断等检测领域。

2. 以尿常规指标监测在临床诊断中的重要意义为出发点,针对目前医院中尿常规检查存在的耗时长、需专业人员操作等局限性,将智能手机与商用尿液试纸条相结合创新性地研发了基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测系统。通过 3×3 阵列式试纸布局设计,不仅可以多指标同时定量还可以在缩小装置的同时更易获取比色分析所需均匀光照。根据 9 项尿液指标显色变化特点针对性地选择最优色度值进行量化,实现了蛋白质、血红蛋白、微量白蛋白、亚硝酸盐、肌酐、葡萄糖、尿钙、胆红素的含量及 pH 值 9 项尿常规指标的定量检测。以葡萄糖、微量白蛋白、肌酐 3 种指标的加标样品为例与紫外分光光度计检测结果进行对比,一致性均达到了 98%以上。为了评估该系统的可靠性与实用性,与山西白求恩医院合作,实现了对 100 例实际样本的检测,检测结果与医院里使用的 H-800 Urine Analyser 尿干化学分析仪通过 ROC 曲线分析,检测结果具有很高的一致性,验证了基于智能手机的阵列式试纸条尿液多指标定量检测技术的准确性与可靠性。该检测系统不受手机型号限制,检测结果可实时存储和传输,为居家医疗提供了可靠的保障。

3. 为了进一步地提高生化分子检测的灵敏度,开发了智能手机 ZnO 纳米线纸基荧光传感平台基。基于玻璃滤纸低荧光背景的特点,利用“水热法”首次在玻璃滤纸基上合成了氧化锌纳米线,实现了荧光增强,解决了纸基荧光检测存在信噪比低的问题。

结合纸基微流控技术，成功制备了高通量阵列式荧光生物芯片；研制了便携式荧光传感分析仪，通过巧妙设计环形贴片式激发光源，解决了便携式荧光传感平台存在的激发光源强度不足、激发不均匀等问题。同时，开发了智能手机荧光阵列检测软件“H-T Fluorescence Detect”实现了荧光图像的精准获取和分析。使用聚合物量子点 CN-PPV 对高通量荧光检测系统进行了验证，证明了检测系统与氧化锌纳米线荧光增强的可行性。最后，利用开发的基于智能手机的高通量纸基微流控荧光分析装置实现了兔免疫球蛋白的定量检测，实验结果显示，氧化锌纳米线纸基上兔免疫球蛋白的检测限比纯玻璃滤纸的检测限提高了 10 倍，验证了该检测系统的可靠性。该检测系统检测通量高、检测速度快、稳定性好，有望用于医学诊断领域多种生物分子的高灵敏定量检测。

5.2 进一步的工作和展望

虽然上述三部分工作在智能手机数字图片比色法的即时检测技术的研究及应用中取得了一定的研究成果。但是还存在以下问题亟待解决：

1. 环境光照、手机型号、拍照距离与角度等都是影响智能手机数字图片比色法准确性的关键因素。在该工作中通过设计外置光学系统的方式对环境光照、拍照距离与角度进行了均一化处理；通过 CIE1931 色度空间算法实现了不同型号手机比色分析的一致化。若将智能手机与图像处理算法、机器学习相结合，摆脱硬件系统的控制，只利用软件算法的方式实现数字图片比色法影响因素的纠正与图像的自动获取也是目前的一个发展趋势，因此可以提供一种更为便捷的检测模式。

2. 尿常规检测是医学检验最重要的项目。目前我们实现了对 9 项尿常规指标的检测，并利用 100 例实际样品对系统进行了验证，开发了线上问诊平台。然而检测系统的实际应用还有差距，需要进一步加大实际样品量的检测，建立起大数据管理平台，真正应用于尿常规检测。

3. 荧光比色分析方法中，荧光信号的增强在提高检测灵敏度、提高信噪比、降低生化分子检测限方面具有重要意义。在该工作中，通过在纸基基底制备氧化锌纳米线的方式实现了荧光增强。除此之外，还可以探索更多的基底荧光增强方式，或者在免疫分析过程中通过多标记的方式实现荧光增强，开发更灵敏的荧光检测体系。

4. 智能手机 POCT 技术目前还存在质量控制、操作者的技术水平参差不齐以及临床管理不够完善等问题，同时，还需要在数据安全、合规的前提下，打通数据，形成全面、长期、动态的数据，形成个性化闭环管理方案。

参考文献

- [1] Luppia P B, Mueller C, Schlichtiger A, et al. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(6): 887-898.
- [2] Jung W E, Han J, Choi J, et al. Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies[J]. *Microelectronic Engineering*, 2015, 132: 46-57.
- [3] Holland C A, Kiechle F L. Point-of-care molecular diagnostic systems-past, present and future[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(5): 504-509.
- [4] Wood C S, Thomas M R, Budd J, et al. Taking connected mobile-health diagnostics of infectious diseases to the field[J]. *Nature*, 2019, 566(7745): 467-474.
- [5] Barr T. Cell phone culture: Mobile technology in everyday life [Book Review] [J]. *Media International Australia Incorporating Culture & Policy*, 2007(123).
- [6] Huang X, Xu D, Chen J, et al. Smartphone-based analytical biosensors[J]. *Analyst*, 2018, 143(22): 5339-5351.
- [7] Xu X, Akay A, Wei H, et al. Advances in Smartphone-based point-of-care diagnostics[J]. *Proceedings of the IEEE*, 2015, 103(2): 236-247.
- [8] Kanchi S, Sabela M I, Mdluli P S, et al. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 102: 136-149.
- [9] Yetisen A K, Akram M S, Lowe C R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(12): 2210-2251.
- [10] Hartwell L H, Hopfield J J, Leibler S, et al. From molecular to modular cell biology[J]. *Nature (London)*, 1999, 402(6761 Suppl): C47-C52.
- [11] Katz L E, Gleich G J, Hartley B F, et al. Blood eosinophil count is a useful biomarker to identify patients with severe eosinophilic asthma[J]. *Annals of the American Thoracic Society*, 2014, 11(4): 531-536.
- [12] Zhu H, Mavandadi S, Coskun A F, et al. Optofluidic fluorescent imaging cytometry on a cell phone[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(17): 6641-6647.
- [13] Zhu H, Sencan I, Wong J, et al. Cost-effective and rapid blood analysis on a cell-phone[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(7): 1282-1288.
- [14] Balsam J, Bruck H A, Rasooly A. Webcam-based flow cytometer using wide-field imaging for low cell number detection at high throughput[J]. *Analyst*, 2014, 139(17): 4322-4329.
- [15] Zhang Y S, Ribas J, Nadhman A, et al. A cost-effective fluorescence mini-microscope for biomedical applications[J]. *Lab on a chip*, 2015, 15(18): 3661-3669.
- [16] Knowlton S, Joshi A, Syrrist P, et al. 3D-printed smartphone-based point of care tool for fluorescence- and magnetophoresis-based cytometry[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(16): 2839-2851.
- [17] Kang W, Huang H, Cai M, et al. On-site cell concentration and viability detections using smartphone-based field-portable cell counter[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1077: 216-224.
- [18] de Haan K, Ceylan K H, Rivenson Y, et al. Automated screening of sickle cells using a smartphone-based microscope and deep learning[J]. *NPJ Digital Medicine*, 2020, 3: 76.
- [19] Salgado M, Zarate G, Coronel J, et al. Low-cost 3D-printed inverted microscope to detect *Mycobacterium tuberculosis* in a MODS culture[J]. *Tuberculosis*, 2022, 132: 102158.

- [20] Zhu H, Yaglidere O, Su T, et al. Cost-effective and compact wide-field fluorescent imaging on a cell-phone[J]. Lab on a Chip, 2011, 11(2): 315-322.
- [21] Koydemir H C, Gorocs Z, Tseng D, et al. Rapid imaging, detection and quantification of Giardia lamblia cysts using mobile-phone based fluorescent microscopy and machine learning [J]. Lab on a Chip, 2011, 15(5): 1284-1293.
- [22] Shrivastava S, Lee W, Lee N. Culture-free, highly sensitive, quantitative detection of bacteria from minimally processed samples using fluorescence imaging by smartphone[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 109: 90-97.
- [23] Wang S, Zheng L, Cai G, et al. A microfluidic biosensor for online and sensitive detection of Salmonella typhimurium using fluorescence labeling and smartphone video processing[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 140: 69-76.
- [24] Hussain I, Bowden A K. Smartphone-based optical spectroscopic platforms for biomedical applications: a review [Invited][J]. Biomedical Optics Express, 2021, 12(4): 1974-1998.
- [25] Wang S X, Zhou X J. Spectroscopic sensor on mobile phone: US 11/419, 823 [P/OL]. 2006-12-14 [2022-4-9]. <https://www.freepatentsonline.com/20060279732.pdf>
- [26] Smith Z J, Chu K, Espenson A R, et al. Cell-phone-based platform for biomedical device development and education applications[J]. PloS one, 2011, 6(3): e17150.
- [27] Long K D, Yu H, Cunningham B T. Smartphone instrument for portable enzyme-linked immunosorbent assays[J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(11): 3792-3806.
- [28] Ding H, Chen C, Qi S, et al. Smartphone-based spectrometer with high spectral accuracy for mHealth application[J]. Sensors and Actuators A: Physical, 2018, 274: 94-100.
- [29] Jian D, Wang B, Huang H, et al. Sunlight based handheld smartphone spectrometer[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 143: 111632.
- [30] Wang T, Shen F, Deng H, et al. Smartphone imaging spectrometer for egg/meat freshness monitoring[J]. Analytical Methods, 2022, 14(5): 508-517.
- [31] Park Y M, Han Y D, Kim K R, et al. An immunoblot-based optical biosensor for screening of osteoarthritis using a smartphone-embedded illuminometer[J]. Analytical Methods, 2015, 7(15): 6437-6442.
- [32] Park Y M, Han Y D, Chun H J, et al. Ambient light-based optical biosensing platform with smartphone-embedded illumination sensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 93: 205-211.
- [33] Chen Y, Fu Q, Li D, et al. A smartphone colorimetric reader integrated with an ambient light sensor and a 3D printed attachment for on-site detection of zearalenone[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(28): 6567-6574.
- [34] Zhao Y, Yang M, Fu Q, et al. A Nanozyme and ambient light-based smartphone platform for simultaneous detection of dual biomarkers from exposure to organophosphorus pesticides[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(12): 7391-7398.
- [35] Gul I, Aer L, Zhang M, et al. Multifunctional 3D-printed platform integrated with a smartphone ambient light sensor for halocarbon contaminants monitoring[J]. Environmental Technology & Innovation, 2021, 24: 101883.
- [36] Okazaki T, Kuramitz H, Hata N, et al. Visual colorimetry for determination of trace arsenic in groundwater based on improved molybdenum blue spectrophotometry[J]. Analytical methods, 2015, 7(6): 2794-2799.
- [37] Chong T, Billmeyer Jr F W. Visual evaluation of daylight simulators for the colorimetry of luminescent

- materials[J]. *Color Research and Application*, 1981, 6(4): 213-220.
- [38] 陈淑卿, 石正宝, 王艳, 等. 光电比色法测定水样中的氯化物含量[J]. *工业水处理*, 2016, 12, 101-102, 117.
- [39] 管慧玲, 李小明, 杨麒, 等. 光电比色法测定低浓度废水的化学需氧量[J]. *环境工程*, 2007, 25(2): 72-74.
- [40] Digital image colorimetry coupled with a multichannel membrane filtration-enrichment technique to detect low concentration dyes[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(14): 2887-2894.
- [41] Lopez-Molinero A, Li An D, Sipiera D, et al. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics[J]. *Microchemical Journal*, 2010, 96(2): 380-385.
- [42] Yang C X, Sun X Y, Liu B, et al. Determination of total phosphorus in water sample by digital imaging colorimetry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35(6): 850-853.
- [43] Hirsch R. *Exploring colour photography: A complete guide*[M]. Laurence King Publishing, 2004.
- [44] Poynton C A. *Digital video and HDTV: Algorithms and Interfaces*[J]. Morgan Kaufmann, 2003.
- [45] Boughen N. *LightWave 3D 8 Lighting (Wordware Game and Graphics Library)* [M]. Wordware Publishing, 2004.
- [46] 曾晓栋, 滕秀金, 邱迦易. 颜色测量技术[M]. 北京: 中国计量出版社, 2007: 26.
- [47] Hu H, Xu L, Zhao H. A spherical codebook in YUV color space for moving object detection[J]. *Sensor Letters*, 2012, 10(1-2): 177-189.
- [48] Kanchi S, Sabela M I, Mdluli P S, et al. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 102: 136-149.
- [49] Martinez A W, Phillips S T, Carrilho E, et al. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(10): 3699-3707.
- [50] Coskun A F, Nagi R, Sadeghi K, et al. Albumin testing in urine using a smart-phone[J]. *Lab on a chip*, 2013, 13(21): 4231-4238.
- [51] Wang F, Lu Y, Yang J, et al. A smartphone readable colorimetric sensing platform for rapid multiple protein detection[J]. *Analyst*, 2017, 142(17): 3177-3182.
- [52] Srinivasan B, O Dell D, Finkelstein J L, et al. iron Phone: Mobile device-coupled point-of-care diagnostics for assessment of iron status by quantification of serum ferritin[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 99: 115-121.
- [53] 晁晓欣, 李海琴, 杨泽华, 等. 智能手机微孔板分析仪的开发与 HSA 的定量检测[J]. *分析测试学报*, 2020, 39(7): 838-843.
- [54] Scholl T O, Sowers M, Chen X, et al. Maternal glucose concentration influences fetal growth, gestation, and pregnancy complications[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2001, 154(6): 514-520.
- [55] Wang X, Li F, Cai Z, et al. Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(10): 2647-2655.
- [56] Hou P, Deng R, Guo J, et al. A WiFi scanner in conjunction with disposable multiplex paper assay for the quantitation of disease markers in blood plasma[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(18): 4625-4634.
- [57] Zhang H, Smith E, Zhang W, et al. Inkjet printed microfluidic paper-based analytical device (PAD) for glucose colorimetric detection in artificial urine[J]. *Biomedical Microdevices*, 2019, 21(3): 48.
- [58] Zhang H, Chen Z, Dai J, et al. A low-cost mobile platform for whole blood glucose monitoring using

- colorimetric method[J]. *Microchemical Journal*, 2021, 162: 105814.
- [59] Huang J, Lin H, Chen T, et al. Signal amplified gold nanoparticles for cancer diagnosis on paper-based analytical devices[J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(1): 174-182.
- [60] Walt D R, Franz D R. Biological warfare detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(23): 738A-746A.
- [61] John J. Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2001, 7(6): 933-944.
- [62] Cheung M, Lee W, Cowcher D P, et al. SERS of meso-droplets supported on superhydrophobic wires allows exquisitely sensitive detection of dipicolinic acid, an Anthrax biomarker, considerably below the infective dose[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(64): 9925-9928.
- [63] Xu M, Huang W, Lu D, et al. Alizarin Red-Tb³⁺ complex as a ratiometric colorimetric and fluorescent dual probe for the smartphone-based detection of an anthrax biomarker[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11(33): 4267-4273.
- [64] Guo J, Wong J X, Cui C, et al. A smartphone-readable barcode assay for the detection and quantitation of pesticide residues[J]. *Analyst*, 2015, 140(16): 5518-5525.
- [65] Li X, Yang F, Wong J X H, et al. Integrated smartphone-App-chip system for on-site parts-per-billion-level colorimetric quantitation of aflatoxins[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(17): 8908-8916.
- [66] Wang C, Gao X, Wang S, et al. A smartphone-integrated paper sensing system for fluorescent and colorimetric dual-channel detection of foodborne pathogenic bacteria[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(3): 611-620.
- [67] Joanna S, Zbigniew J D. Biogenic amines in meat and fermented meat products[J]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2010, 9(3): 102-105.
- [68] Li Q, Ren S, Peng Y, et al. A colorimetric strip for rapid detection and real-time monitoring of histamine in fish based on self-assembled polydiacetylene vesicles[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(1): 1611-1617.
- [69] Fleisch H A, Russell R, Bisaz S, et al. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 1970, 1(1): 12-18.
- [70] Dong C, Ma X, Qiu N, et al. An ultra-sensitive colorimetric sensor based on smartphone for pyrophosphate determination[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 329: 129066.
- [71] Motalebizadeh A, Bagheri H, Asiaei S, et al. New portable smartphone-based PDMS microfluidic kit for the simultaneous colorimetric detection of arsenic and mercury[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(48): 27091-27100.
- [72] Wang J, Zhang L, Li X, et al. From kirigami to three-dimensional paper-based micro-analytical device: cut-and-paste fabrication and mobile app quantitation[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(40): 23267-23275.
- [73] Białk-Bielińska A, Maszkowska J, Mroziak W, et al. Sulfadimethoxine and sulfaguanidine: Their sorption potential on natural soils[J]. *Chemosphere*, 2012, 86(10): 1059-1065.
- [74] Zhang X, Wang L, Li X, et al. AuNP aggregation-induced quantitative colorimetric aptasensing of sulfadimethoxine with a smartphone[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 33(6): 3078-30824.
- [75] García A, Erenas M M, Marinetto E D, et al. Mobile phone platform as portable chemical analyzer[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 156(1): 350-359.
- [76] Suzuki Y, Endo M, Jin J, et al. Tristimulus colorimetry using a digital still camera and its application to determination of iron and residual chlorine in water samples[J]. *Analytical sciences*, 2006, 22(3): 411-414.

- [77] Bang-iam N, Udnan Y, Masawat P. Design and fabrication of artificial neural network-digital image-based colorimeter for protein assay in natural rubber latex and medical latex gloves[J]. *Microchemical Journal*, 2013,106: 270-275.
- [78] Shen L, Hagen J A, Papautsky I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(21): 4240-4243.
- [79] Hong J I, Chang B. Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(10): 1725-1732.
- [80] Jia M, Wu Q, Li H, et al. The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015,74: 1029-1037.
- [81] Bao X, Jiang S, Wang Y, et al. A remote computing-based point-of-care colorimetric detection system with a smartphone under complex ambient light conditions[J]. *Analyst*, 2018, 143(6): 1387-1395.
- [82] Kong T, You J B, Zhang B, et al. Accessory-free quantitative smartphone imaging of colorimetric paper-based assays[J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(11): 1991-1999.
- [83] Noor M O, Krull U J. Camera-based ratiometric fluorescence transduction of nucleic acid hybridization with reagentless signal amplification on a paper-based platform using immobilized quantum dots as donors[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(20): 10331-10339.
- [84] Díaz S A, Giordano L, Jovin T M, et al. Modulation of a photoswitchable dual-color quantum dot containing a photochromic FRET acceptor and an internal standard[J]. *Nano Letters*, 2012, 12(7): 3537-3544.
- [85] Bueno D, Muñoz R, Marty J L. Fluorescence analyzer based on smartphone camera and wireless for detection of Ochratoxin A[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 232: 462-468.
- [86] Arts R, den Hartog I, Zijlema S E, et al. Detection of antibodies in blood plasma using bioluminescent sensor proteins and a smartphone[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(8): 4525-4532.
- [87] Zhang J, Qian J, Mei Q, et al. Imaging-based fluorescent sensing platform for quantitative monitoring and visualizing of fluoride ions with dual-emission quantum dots hybrid[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 128: 61-67.
- [88] Yu W, Jiang C, Xie B, et al. Ratiometric fluorescent sensing system for drug residue analysis: Highly sensitive immunosensor using dual-emission quantum dots hybrid and compact smartphone based-device[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1102: 91-98.
- [89] Kim H, Petryayeva E, Algar W R. Enhancement of quantum dot Förster Resonance Energy transfer within paper matrices and application to proteolytic assays[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2014, 20(3): 141-151.
- [90] Yu X, Yang L, Zhao T, et al. Multicolorful ratiometric-fluorescent test paper for determination of fluoride ions in environmental water[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(84): 53379-53384.
- [91] Tenda K, van Gerven B, Arts R, et al. Paper-based antibody detection devices using bioluminescent BRET-switching sensor proteins[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(47): 15369-15373.
- [92] Chu S, Wang H, Du Y, et al. Portable smartphone platform integrated with a nanoprobe-based fluorescent paper strip: visual monitoring of glutathione in human serum for health prognosis[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(22): 8175-8183.
- [93] Xiao M, Liu Z, Xu N, et al. A smartphone-based sensing system for on-site quantitation of multiple heavy metal ions using fluorescent carbon nanodots-based microarrays[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(3):

870-878.

- [94] Zhou F, Noor M O, Krull U J. Luminescence resonance energy transfer-based nucleic acid hybridization assay on cellulose paper with upconverting phosphor as donors[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(5): 2719-2726.
- [95] Cristina R. Ispassupa Sup G C S S. Review: Recent developments in enzyme-based biosensors for biomedical analysis[J]. *Analytical Letters*, 2012, 45(2-3): 168-186.
- [96] He M, Liu Z. Paper-based microfluidic device with upconversion fluorescence assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(24): 11691-11694.
- [97] Yu W W, White I M. Inkjet-printed paper-based SERS dipsticks and swabs for trace chemical detection[J]. *Analyst*, 2013, 138(4): 1020-1025.
- [98] Ju Q, Uddayasankar U, Krull U. Paper-based DNA detection using lanthanide-doped LiYF₄ upconversion nanocrystals as bioprobe[J]. *Small*, 2014, 10(19): 3912-3917.
- [99] Doughan S, Uddayasankar U, Krull U J. A paper-based resonance energy transfer nucleic acid hybridization assay using upconversion nanoparticles as donors and quantum dots as acceptors[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 878: 1-8.
- [100] Azdarpour A, Asadullah M, Mohammadian E, et al. A review on carbon dioxide mineral carbonation through pH-swing process[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 279: 615-630.
- [101] Ghoneim M T, Nguyen A, Dereje N, et al. Recent progress in electrochemical pH-sensing materials and configurations for biomedical applications[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(8): 5248-5297.
- [102] Watts E G, Janes M E, Prinyawiwatkul W, et al. Microbiological changes and their impact on quality characteristics of red-hot chilli pepper mash during natural fermentation[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(8): 1816-1823.
- [103] Peng B, Lei Y, Zhao H, et al. Response surface methodology for optimization of fermentation process parameters for improving apple wine quality[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(11): 7513-7518.
- [104] Guo C, Xin L, Dong Y, et al. Dielectric properties of yogurt for online monitoring of fermentation process[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2018, 11(5): 1096-1100.
- [105] Boström M L, Berglund O. Influence of pH-dependent aquatic toxicity of ionizable pharmaceuticals on risk assessments over environmental pH ranges[J]. *Water Research*, 2015, 72: 154-161.
- [106] Wei Z, Spinney R, Ke R, et al. Effect of pH on the sonochemical degradation of organic pollutants[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2016, 14(2): 163-182.
- [107] Godha K, Tucker K M, Biehl C, et al. Human vaginal pH and microbiota: an update[J]. *Gynecological endocrinology*, 2017, 34(6): 451-455.
- [108] Tang H, Zhao W, Yu J, et al. Recent development of pH-responsive polymers for cancer nanomedicine[J]. *Molecules*, 2019, 24(1): 4.
- [109] Marunaka Y. Roles of interstitial fluid pH in diabetes mellitus: Glycolysis and mitochondrial function[J]. *World Journal of Diabetes*, 2015, 6(1): 125-135.
- [110] Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2003, 29(6): 541-549.
- [111] Ghoneim M T, Nguyen A, Dereje N, et al. Recent progress in electrochemical pH-sensing materials and configurations for biomedical applications[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(8): 5248-5297.
- [112] Karita S, Kaneta T. Acid-base titrations using microfluidic paper-based analytical devices[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(24): 12108-12114.

- [113] Dutta S, Sarma D, Nath P. Ground and river water quality monitoring using a smartphone-based pH sensor[J]. AIP Advances, 2015, 5(5): 57151.
- [114] Hossain M A, Canning J, Ast S, et al. Lab-in-a-phone: Smartphone-based portable fluorometer for pH field measurements of environmental water[J]. IEEE Sensors Journal, 2015, 15(9): 5095-5102.
- [115] Gotor R, Ashokkumar P, Hecht M, et al. Optical pH sensor covering the range from pH 0–14 compatible with mobile-device readout and based on a set of rationally designed indicator dyes[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(16): 8437-8444.
- [116] Oncescu V, O' De Il D, Rickson D. Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(16): 3232-3238.
- [117] Yetisen A K, Martinez-Hurtado J L, Garcia-Melendrez A, et al. A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 196: 156-160.
- [118] 姚昱旻, 刘卫国. Android 的架构与应用开发研究[J]. 计算机系统应用, 2008, (11): 110-112.
- [119] 郭霖. 第一行代码 Android[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2016.
- [120] 朱桂英. Android 网络开发技术实战详解[M]. 北京: 电子工业出版社, 2012.
- [121] 曾健平, 邵艳洁. Android 系统架构及应用程序开发研究[J]. 微计算机信息, 2011, 9: 1-3.
- [122] 卿斯汉. Android 广播机制安全性研究[J]. 电信科学, 2016, 32(10): 27-35.
- [123] Muller M J, Haslwanter J H, Dayton T. Handbook of Human-Computer Interaction: Sickness & in Health Pew Internet & American Life Project Report May[J]. 1997, 573-615.
- [124] Wyszecki G, Stiles V S, Kelly K L. Color science: Concepts and methods, quantitative data and formulas[J]. Physics Today, 1968, 21(6): 83-84.
- [125] Hunt R W G, Pointer M R. A colour-appearance transform for the CIE 1931 standard colorimetric observer[J]. Color research and application, 1985, 10(3): 165-179.
- [126] Smith T, Guild J. The C.I.E. colorimetric standards and their use[J]. Transactions of the Optical Society, 2002, 33(3).
- [127] Bohren C F, Clothiaux E E, Johnson N D. Fundamentals of atmospheric radiation[J]. American Journal of Physics, 2007, 75(7): 671-672.
- [128] Foster L S, Grunfest I J. Demonstration experiments using universal indicators[J]. Journal of Chemistry Education, 1937, 14(6): 274-276.
- [129] “pH indicator.” Wikipedia. org. [EB/OL]. (2014) [2022-04-09]. 错误!超链接引用无效。.
- [130] Bland J M, Altman D G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement[J]. Lancet, 1986, 1(8476): 307-310.
- [131] Chen Y. Recent advances in fluorescent probes for extracellular pH detection and imaging[J]. Analytical Biochemistry, 2021, 612: 113900.
- [132] Mercan Ö B, Kılıç V, Şen M. Machine learning-based colorimetric determination of glucose in artificial saliva with different reagents using a smartphone coupled μ PAD[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 329: 129037.
- [133] Biswas S K, Chatterjee S, Bandyopadhyay S, et al. Smartphone-enabled paper-based hemoglobin sensor for extreme Point-of-Care diagnostics[J]. ACS Sensors, 2021, 6(3): 1077-1085.
- [134] Liu C, Luo Y, Wen H, et al. Red-to-blue paper-based colorimetric sensor integrated with smartphone for point-of-use analysis of cerebral AChE upon Cd^{2+} exposure[J]. Nanoscale, 2021, 13(2): 1283-1290.
- [135] Monisha, Shrivastava K, Kant T, et al. Inkjet-printed paper-based colorimetric sensor coupled with smartphone for determination of mercury (Hg^{2+}) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 414: 125440.

- [136] Chung-An, Chen, Peng-Wei, et al. Fast analysis of ketamine using a colorimetric immunosorbent assay on a paper-based analytical device[J]. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2019, 282: 251-258.
- [137] Nadar S S, Patil P D, Tiwari M S, et al. Enzyme embedded microfluidic paper-based analytic device (μ PAD): a comprehensive review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 18: 1-39.
- [138] García-Carmona L, Rojas D, González M C, et al. Microchip in situ electrosynthesis of silver metallic oxide clusters for ultra-FAST detection of galactose in galactosemic newborns' urine samples[J]. *Analyst*, 2016, 141(21): 6002-6007.
- [139] 穆欣颜. 尿常规检查的临床研究现状[J]. *医学信息*, 2019, 32(z2): 69-70.
- [140] Lubell T R, Barasch J M, Xu K, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for the diagnosis of urinary tract infections[J]. *Pediatrics*, 2017, 140(6): e20171090.
- [141] Wang C, Boyd R, Mitchell R, et al. Development of a novel mobile application to detect urine protein for nephrotic syndrome disease monitoring[J]. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 2019, 19: 105.
- [142] Suzuki Y, Katayama K, Ishikawa E, et al. Granulomatous interstitial nephritis due to chronic lymphocytic leukemia: a case report[J]. *BMC Nephrology*, 2017, 18: 348.
- [143] El-Maghrabey M, Mine M, Kishikawa N, et al. A novel dual labeling approach enables converting fluorescence labeling reagents into fluorogenic ones via introduction of purification tags. Application to determination of glyoxylic acid in serum[J]. *Talanta*, 2018, 180: 323-328.
- [144] Devillé W L J M, Yzermans J C, Van Duijn N P, et al. The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy[J]. *Journal of Urology*, 2004, 4(1): 4.
- [145] Piech T L, Wycislo K L. Importance of urinalysis[J]. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 2019, 49(2): 233-245.
- [146] 唐文君. 尿液有形成分基本检验方法浅析[J]. *中外医学研究*, 2011, 9(17): 54.
- [147] 刘军. 尿常规亚硝酸盐测定与尿沉渣细菌计数对尿路感染的筛查探析[J]. *中国社区医师 (医学专业)*, 2013, 15(6): 266-267.
- [148] Anthimopoulos M, Gupta S, Arampatzis S, et al. Smartphone-based urine strip analysis[C]. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2018, 20: A117-A118.
- [149] Ye J, Li N, Lu Y, et al. A portable urine analyzer based on colorimetric detection[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(16): 2464-2471.
- [150] Yang R, Cheng W, Chen X, et al. Color space transformation-based smartphone algorithm for colorimetric urinalysis[J]. *ACS Omega*, 2018, 3(9): 12141-12146.
- [151] Adrover-Jaume C, Rojo-Molinero E, Clemente A, et al. Mobile origami immunosensors for the rapid detection of urinary tract infections[J]. *Analyst*, 2021, 145(24): 7916-7921.
- [152] Jalal U M, Jin G J, Shim J S. Paper-Plastic Hybrid microfluidic device for smartphone-based colorimetric analysis of urine[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(24): 13160-13166.
- [153] 曾照芳. 临床检验仪器学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [154] ROC 曲线学习总结[EB/OL]. (2019-08-19) [2022-04-09]. https://blog.csdn.net/qq_30992103/article/details/99730059.
- [155] Clegg, D L. Paper chromatography[J]. *Analytical Chemistry*, 1950, 22(1): 48-59.
- [156] Bracher P J, Gupta M, Whitesides G M. Patterning precipitates of reactions in paper[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20(24): 5117.
- [157] Martinez A W, Phillips S T, Butte M J, et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(8): 1318-1320.

- [158] Morbioli G G, Mazzu-Nascimento T, Milan L A, et al. Improving sample distribution homogeneity in three-dimensional microfluidic paper-based analytical devices by rational device design[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(9): 4786-4792.
- [159] Ge L, Yu J, Ge S, et al. Lab-on-paper-based devices using chemiluminescence and electrogenerated chemiluminescence detection[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(23): 5613-5630.
- [160] Tian T, Bi Y, Xu X, et al. Integrated paper-based microfluidic devices for point-of-care testing[J]. *Analytical methods*, 2018, 1(29): 3567-3581.
- [161] Wang H, Wang D M, Gao M X, et al. Potassium-induced G-quadruplex DNAzyme as a chemiluminescent sensing platform for highly selective detection of K[J]. *Analytical methods*, 2014, 6(18): 7415-7419.
- [162] Sones C L, Katis I N, He P J, et al. Laser-induced photo-polymerisation for creation of paper-based fluidic devices[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(23): 4567-4574.
- [163] Zhang Y, Zhou C, Nie J, et al. Equipment-free quantitative measurement for microfluidic paper-based analytical devices fabricated using the principles of movable-type printing[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(4): 2005-2012.
- [164] Morbioli G G, Mazzu-Nascimento T, Milan L A, et al. Improving Sample Distribution Homogeneity in Three-Dimensional Microfluidic Paper-Based Analytical Devices by Rational Device Design[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(9): 4786-4792.
- [165] Choi J R, Hu J, Tang R, et al. An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(3): 611-621.
- [166] 郭雪英. 氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的研制和心肌标志物的检测[D]. 南京:南京工业大学. 2019 [2022-04 -09].
- [167] Mei Z, Tang L. Surface-plasmon-coupled fluorescence enhancement based on ordered gold nanorod array biochip for ultrasensitive DNA analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(1): 633-639.
- [168] Liu J, Li S, Bhethanabotla V R. Integrating metal-enhanced fluorescence and surface acoustic waves for sensitive and rapid quantification of cancer biomarkers from real matrices[J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(1): 222-229.
- [169] Della Ventura B, Gelzo M, Battista E, et al. Biosensor for Point-of-Care analysis of immunoglobulins in urine by metal enhanced fluorescence from gold nanoparticles[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(4): 3753-3762.
- [170] Botequim D, Silva I I R, Serra S G, et al. Fluorescent dye nano-assemblies by thiol attachment directed to the tips of gold nanorods for effective emission enhancement[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(11): 6334-6345.
- [171] Li X, Wang Y, Zhao C, et al. Paper-based piezoelectric touch pads with hydrothermally grown zinc oxide nanowires[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(24): 22004-22012.
- [172] Li X, Wang Y, Lu A, et al. Controllable hydrothermal growth of ZnO nanowires on cellulose paper for flexible sensors and electronics[J]. *IEEE Sensors Journal*, 2015, 15(11): 6100-6107.
- [173] Ladanov M, Algarin-Amaris P, Matthews G, et al. Microfluidic hydrothermal growth of ZnO nanowires over high aspect ratio microstructures[J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(37): 375301.
- [174] Sang C, Chou S, Pan F M, et al. Fluorescence enhancement and multiple protein detection in ZnO nanostructure microfluidic devices[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 75: 285-292.
- [175] Du Pasquier A, Chen H, Lu Y. Dye sensitized solar cells using well-aligned zinc oxide nanotip arrays[J]. *Applied Physics Letters*, 2006, 89(25): 253513.
- [176] Jiang C Y, Sun X W, Lo G Q, et al. Improved dye-sensitized solar cells with a ZnO-nanoflower

- photoanode[J]. Applied Physics Letters, 2007, 90(26): 263501.
- [177] Adalsteinsson V, Parajuli O, Kepics S, et al. Ultrasensitive detection of cytokines enabled by nanoscale ZnO arrays[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(17): 6594-6601.
- [178] Guo X, Zong L, Jiao Y, et al. Signal-enhanced detection of multiplexed cardiac biomarkers by a paper-based fluorogenic immunodevice integrated with Zinc oxide nanowires[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(14): 9300-9307.
- [179] Guo L, Shi Y, Liu X, et al. Enhanced fluorescence detection of proteins using ZnO nanowires integrated inside microfluidic chips[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 99: 368-374.
- [180] Lin Y, Yeh Y. Rapid synthesis of microwave-assisted zinc oxide nanorods on a paper-based analytical device for fluorometric detection of l-dopa[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 207: 111995.
- [181] Romano G, Mantini G, Di Carlo A, et al. Piezoelectric potential in vertically aligned nanowires for high output nanogenerators[J]. Nanotechnology, 2011, 22(46): 465401.
- [182] 张春梅, 姚凤兰, 齐磊, 等. 聚乙烯亚胺对氧化锌纳米阵列形貌的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(10): 2762-2765.
- [183] Zhou Y, Wu W, Hu G, et al. Hydrothermal synthesis of ZnO nanorod arrays with the addition of polyethyleneimine[J]. Materials Research Bulletin, 2008, 43(8-9): 2113-2118.
- [184] 卢斯媛, 蔡绍哲, 蒋稼欢. 微流控芯片在细胞微环境研究中的应用[J]. 生物医学工程学杂志, 2010, 27(3): 675-679.
- [185] Zhu Y, Xu X, Brault N D, et al. Cellulose paper sensors modified with zwitterionic poly(carboxybetaine) for sensing and detection in complex media[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(6): 2871-2875.
- [186] Abe K, Suzuki K, Citterio D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(18): 6928-6934.
- [187] Nery E W, Kubota L T. Sensing approaches on paper-based devices: a review[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(24): 7573-7595.
- [188] Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, et al. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping[J]. Talanta, 2011, 85(5): 2587-2593.
- [189] Xue Y, Zhang W, Zhang M, et al. Development of a paper-based microfluidic analytical device by a more facile hydrophobic substrate generation strategy[J]. Analytical Biochemistry, 2017, 525: 100-106.

攻读学位期间取得的研究成果

一、学术论文

- [1] **Haiqin Li**, Xiaoyuan Wang, Xiaochun Li, Hua-Zhong Yu. Quantitative pH determination based on the dominant wavelength analysis of commercial test strips. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(46): 15452-15458. (SCI 一区 (TOP), 对应论文第 2 章)
- [2] **李海琴**, 张校亮, 谭慷, 李晓春. 基于智能手机数字图片比色法的生化检测技术研究进展. *生命科学仪器*, 2019, 1, 3-10. (封面兼亮点文章)
- [3] **李海琴**, 张校亮, 谭慷, 李晓春. 基于智能手机的超灵敏高精度 pH 检测, *仪表技术与传感器*. 2019, 4, 70-74. (北大核心, 对应论文第 2 章)
- [4] 晁晓欣, **李海琴**, 杨泽华, 张校亮, 谭慷, 李晓春. 智能手机微孔板分析仪的开发与 HSA 的定量检测. *分析测试学报*, 2020, 39(7): 838-843. (北大核心, 对应论文第 3 章)
- [5] 王乐, **李海琴**, 王美玲, 张校亮, 李晓春. 基于纳米金-适体结构的智能手机补色波长法检测磺胺二甲嘧啶, *分析测试学报*, 2018, 37(8): 967-971. (北大核心, 对应论文第 2 章)
- [6] **Haiqin Li**, Rong Deng, Hamed Tavakoli, Xiaochun Li, Xiu-Jun Li. Highly sensitive detection of acephate based on enzyme inhibition method-fluorescence internal filtration effect (IFE), *Talanta*, 修改中. (对应论文第 4 章)
- [7] Smartphone-based multi-index quantitative detection of array urine test paper, to be submitted *Analytical Chemistry*. (SCI 一区 (TOP), 对应论文第 3 章)

二、国家发明专利

- [1] 李晓春, **李海琴**, 张校亮, 于化忠. 一种基于适体链-黑磷纳米片荧光能量共振转移的砷离子检测方法. 国家发明专利. CN 109239040 B, 2020-12-15.
- [2] 李晓春, **李海琴**, 张校亮, 于化忠. 基于智能设备的现场快速 pH 高精度定量检测装置和方法. 国家发明专利. CN 107727651 A, 2018-02-23.
- [3] 李晓春, **李海琴**, 张校亮, 陈雨生, 于化忠. 基于智能设备比色分析的阵列式尿液多指标检测装置与方法. 国家发明专利. CN 109254000 A, 2019-01-22.

三、软件著作权

- [1] 基于颜色主波长的分子比色定量检测平台, 登记号: 2017SR342444.
- [2] 基于比色分析的尿液多指标一键式快速定量检测平台, 登记号: 2018SR947826.

四、科研项目

- [1] 2019 年太原理工大学创新创业重点扶持项目, 基于智能手机的慢性疾病长期监测技术, 太原理工大学, 主持.

- [2] 2021 年太原理工大学创新创业重点扶持项目, AI 掌超影像及分子检测联合辅助诊断系统, 太原理工大学, 主持.
- [3] 国家自然科学基金应急管理项目, 基于蓝光光盘的便携式高通量新生儿感染性疾病敏感指标联合快速检测技术研究, 81741095, 国家自然科学基金, 2018-01 至 2018-12, 参与.
- [4] 国家自然科学基金面上项目, 生育健康的多标志物智能点阵成像及定量检测, 21874098, 国家自然科学基金, 2019-01 至 2022-12, 参与.
- [5] 山西省高等学校科技成果转化培育项目, 基于智能手机的食品安全快速检测技术及产业化推广, 山西省教育厅, 2019-06 至 2021-06, 参与.

五、学术会议

- [1] 中国科协第 330 次青年次青年科学家论坛 (沈阳, 2017 年 11 月);
- [2] 中国化学会第十三届全国分析化学年会 (西安, 2018 年 6 月), 作海报展示;
- [3] 第十四届中国电子学会信息技术年会会议资料 (合肥, 2019 年 4 月);
- [4] 第二届航天大会—长期月面驻留人的生存与工作国际论坛 (长沙, 2019 年 4 月);
- [5] 2019 中国 POCT 年会 (杭州, 2019 年 6 月);
- [6] 2020 中国生命电子学术年会 (佛山, 2020 年 11 月), 作海报展示;
- [7] 中国化学会第 32 届学术年会 (珠海, 2021 年 4 月).

六、攻读博士期间的奖励情况

- [1] 2021 年获第七届中国国际 “互联网+” 创新创业大赛产业赛道全国总决赛金奖 (项目负责人);
- [2] 2021 年获山西省第七届 “互联网+” 创新创业大赛产业赛道金奖 (项目负责人);
- [3] 2021 年获山西省第七届 “互联网+” 创新创业大赛银奖 (项目负责人);
- [4] 2019 年获山西省第五届 “互联网+” 创新创业大赛金奖 (项目负责人);
- [5] 2020 年获山西省第六届 “互联网+” 创新创业大赛银奖 (项目负责人);
- [6] 2020 年获第六届 “创青春” 太原青年创业创新大赛意向创业组二等奖 (学生第一);
- [7] 2021 年获山西省科教文卫体系统 “五小” 创新大赛二等奖;
- [8] 2021 年被评为太原理工大学生物医学工程学院 “科技创新创业优秀个人”;
- [9] 2020 年被评为太原理工大学生物医学工程学院 “科技创新创业优秀个人”.

致 谢

时光荏苒，岁月如梭。不知不觉我的博士研究生生活已经步入了尾声。蓦然回首，过往岁月，仍历历在目。六年的硕博连读生活使我在方方面面有了很大的提升，给我留下了宝贵的财富，是我人生中最难忘的时光。感恩之心，时刻不能忘怀。这一切的成长离不开老师同学们的帮助，谨借此机会，向六年来给予我帮助和鼓励的所有人表达无限的感激之情，并致以最诚挚的谢意。

首先我要衷心地感谢我的导师李晓春教授，还记得第一次与李老师见面的时候，老师学识渊博、雷厉风行的气质就深深地吸引了我，我想这就是我心目中理想的导师。从硕士研究生到博士研究生，李老师培养了我各方面的能力。科研上，李老师从查阅文献、开展实验到论文的撰写每一个过程都对我悉心指导，极大提升了我的科研素养；生活上，李老师对我关怀备至，时常关心我在生活上有没有什么困难，教我调整好自己的心态，正能量的面对生活中遇到的挫折，我们不仅是师生，更像是朋友。老师对科研工作的认真严谨、对学生的负责、对事情的以身作则，这终将让我受益一生。在这里我再次向您说一声：老师，感谢您的辛苦培养！您不仅是我科研上的导师，更是我人生的导师。

要感谢的还有于化忠教授，于老师虽然远在加拿大，但是每年都会回课题组好几次，还没倒时差就开始听我们每个人的课题进展汇报，指导我们的科研工作。疫情以来，于老师虽然无法回到国内，也经常远程会议跟我讨论课题研究进展、修改论文，由于时差问题，老师经常是深夜 12 点多了还在认真的帮我修改论文，指出问题所在。虽然每次和于老师相处的时间不长，但老师的每一次指导都让我醍醐灌顶，老师对科研的精益求精更是我学习的榜样。

还要感谢课题组的张校亮副教授给予我的指导和帮助，每次与张老师讨论问题，老师总能考虑到细节，从不同的角度给出指导。感谢邓荣老师、高晓光老师、王颖倩老师、邸会霞老师、孟雪娟老师、张玲玲老师、王建花老师在科研上的指导和生活中的帮助。感谢山西白求恩医院任小军主任，在我课题中的指导和提供实验中使用的实际样本。

感谢实验室里已经毕业的师兄师姐师弟师妹们，感谢你们在科研和生活上给予的帮助，感谢王晓元师兄及徐鹏涛师兄，在我刚开始课题的时候教我做实验，改程序，处理实验数据，谢谢你们。感谢王乐师姐和王海荣师姐在我实验遇到困难的时候提出宝贵意见并教我学会了 3D 设计软件。感谢和我一届的任双宝、张宇航、陈小红、贾红青，我们在一起经历了很多，学习了很多，感谢那些与你们一起努力的时光，谢谢你

们的照顾与帮助。感谢实验室其他的师弟师妹们在我读博期间对我的帮助和支持，相信我们的大家庭——生物医学精准检测与仪器研究所，在你们的努力下会不断发展壮大，做出更好的成果。还要感谢我的好朋友侯梦迪，在我每次遇到困难的时候你总能随时出现给我鼓励和支持。感谢我的舍友：孟洁、王丹、武敏、张颖、武敏、张雪慧，你们让我的博士生活变得更加美好、更加有意义。

感谢我的家人，你们的鼓励和支持让我有勇气和信心一直坚持自己的初心，一直走到现在。这一路走来，我得到了很多人的帮助与支持，衷心地对你们说一声感谢。

此外，本课题得到国家自然科学基金（21874098；81741095；21505098；21575098；61775157），山西重点研发计划（国际科技合作）项目（201903D421053），山西省高等学校科技成果转化培育项目，山西省应用基础研究面上青年基金（201801D221194），山西省平台基地和人才专项-优秀人才科技创新项目（201605D211033），山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划等项目的资助，感谢他们对我们研究课题的支持。

感谢太原理工大学！

最后，谨向在百忙之中参加本论文评审和答辩工作的各位老师表示崇高的敬意和深深的感谢，您在评审过程中提出的宝贵意见是对我重要的支持和鼓励。

李海琴

2022年6月于太原理工大学