

纸上荧光数码成像法快速测定花生壳中的木犀草素含量

乐薇, 曹艳蓉, 杨立

(武汉工商学院环境与生物工程学院, 湖北武汉 430065)

摘要: 本文利用木犀草素在乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 协同配合下可增强铕离子 (Tb^{3+}) 荧光强度的特征, 建立了一种快速测定木犀草素含量的纸上荧光数码成像法。将木犀草素溶液及 EDTA、 Tb^{3+} 、NaOH 等检测试剂点样于纸芯片的检测区, 用智能手机在紫外灯下采集并读取荧光图片的红 (R)、绿 (G)、蓝 (B) 颜色数值, 研究了该检测体系的显色条件、干扰物质、木犀草素浓度计算模型等。结果表明: 优化后的显色条件为依次在纸芯片检测区加入 0.4 μ L 1.0 mol/L NaOH 溶液、1.0 μ L 1.0×10^{-2} mol/L EDTA 溶液、6 μ L 木犀草素标准溶液、0.75 μ L 1.5 mmol/L Tb^{3+} 溶液, 室温下反应 5 min。在此条件下, 木犀草素的浓度在 0.05~4.0 mmol/L 时与 B/(R+G+B) 成良好的线性关系, $R^2=0.9954$; 用该法测定花生壳中木犀草素含量时, 回收率为 96.5%~106.3%, 相对标准偏差为 3.9%。该法快速、简便、成本低廉, 能用于复杂样品中木犀草素含量的现场测定。

关键词: 木犀草素; 纸上荧光法; RGB 值; 快速测定

文章编号: 1673-9078(2020)08-340-346

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0163

Rapid Quantification of Luteolin in Peanut Shells by Fluorescence Digital Imaging of Reactions Spotted on Filter Paper

YUE Wei, CAO Yan-rong, YANG Li

(College of Environmental and Biological Engineering Wuhan Technology and Business University, Wuhan 430065, China)

Abstract: A rapid luteolin quantification method based on fluorescence imaging of reagents spotted on filter paper was established in this study. The method was based on the ability of luteolin to significantly enhance the fluorescence intensity of Tb^{3+} in the presence of EDTA. Luteolin solution and detection reagent (including EDTA, Tb^{3+} , NaOH) were spotted onto a paper chip, then red (R), green (G), and blue (B) fluorescence intensities were captured and read under UV light using a smartphone. Image exposure conditions, interfering substances, and luteolin concentration calculation methods were examined using this quantification system. Optimal fluorescence development conditions were as follows: add sequentially 0.4 μ L 1.0 mol/L NaOH solution, 1.0 μ L 1.0×10^{-2} mol/L EDTA solution, 6 μ L luteolin solution, and 0.75 μ L 1.5 mmol/L Tb^{3+} solution to the paper chip, then allow reaction to proceed for 5 min at room temperature. Under these conditions, luteolin will have a good linear relationship with B/(R+G+B) at concentrations between 0.05 and 4.0 mmol/L, $R^2=0.9954$. When using this rapid quantification method to detect the luteolin content in peanut shells, recovery rates were between 96.5% and 106.3%, with a relative standard deviation of 3.9%. This method was rapid, simple, and economical, and allowed on-the-spot quantification of luteolin in complex samples.

Key words: luteolin; fluorescence imaging on filter paper; RGB value; rapid quantification

引文格式:

乐薇, 曹艳蓉, 杨立. 纸上荧光数码成像法快速测定花生壳中的木犀草素含量[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 340-346

YUE Wei, CAO Yan-rong, YANG Li. Rapid quantification of luteolin in peanut shells by fluorescence digital imaging of reactions spotted on filter paper [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 340-346

木犀草素是一种天然黄酮类化合物, 广泛分布于

收稿日期: 2020-02-22

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2019CF0920); 武汉工商学院学术团队资助项目 (SXTD2015003)

作者简介: 乐薇 (1979-), 女, 教授, 研究方向: 生物分析

植物界中^[1]。它具有消炎、抗过敏、抗肿瘤、抗菌、抗氧化等药理活性^[2-7], 同时还可用于食品的防腐^[8], 有广泛的应用价值和良好的开发前景。目前, 木犀草素的来源有天然提取和人工合成等方法。如木犀草素可从成本低廉的天然产物玉米须^[9]、花生壳^[10]中提取,

也可以芦丁为原料半合成获得^[11]。天然提取和人工合成中木犀草素含量的测定都是必不可少的环节。目前木犀草素含量测定方法主要为高效液相色谱法^[12-15]，该方法需要精密仪器，且耗时较长。因此研究一种快速简便测定木犀草素含量的方法具有现实意义。

纸芯片是近年发展起来的一种具有广阔应用前景的微流控分析器件^[16,17]，它使用纤维素材料作为基底，在纸表面加工出具备一定流体通路的分析器件，具有便携、装置简单、样品量少、可同时进行多种物质检测等优点^[18]，是微流控芯片领域的最新发展方向^[19-23]。纸上荧光成像是将待测物质点样于纸芯片的检测区，在黑暗环境中利用紫外灯照射，对滤纸上产生荧光的样点进行拍摄成像^[24]。该方法仅需紫外灯和拍摄装置（如智能手机）即可检测，通过图片三原色（红色 R、绿色 G、蓝色 B）数值的读取，可现场快速定量测定。陈传燕指出在 EDTA 协同配合下，木犀草素具有增强稀土铽离子荧光强度的特征^[25]，并以此建立了荧光光度法测定木犀草素含量的方法，本文在此基础上，结合纸芯片和数码成像技术，研究了一种纸上荧光数码成像快速测定花生壳中木犀草素含量的方法，以期在现场快速测定方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料

木犀草素（标准品），北京市酷尔化学科技有限公司；乙二胺四乙酸二钠（分析纯），天津市百世化工有限公司；氧化铽（分析纯），天津兰翼生物科技有限公司；定性滤纸（中速），杭州沃华滤纸有限公司；所有实验用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

JY02S 型紫外分析仪，北京君意东方电泳设备有限公司；小米 MI 8 SE 智能手机，小米科技有限责任公司；F96S 荧光光度计，上海精密仪器仪表厂。

1.3 试验方法

1.3.1 纸芯片的设计

采用剪切-粘贴法获得纸芯片。具体如下：在长方形定性滤纸上用 6 mm 打孔器每隔一定距离打孔若干个。将打完孔的滤纸在饱和石蜡庚烷溶液中完全浸没 1 min 左右，取出，70 °C 下加热 5 min，然后冷却至室温，获得疏水性滤纸基底。将打孔获得的 6 mm 亲水圆形滤纸片（即检测区）用双面胶重新粘回处理后的滤纸上（图 1），按照此方法制作若干滤纸片保存备用。

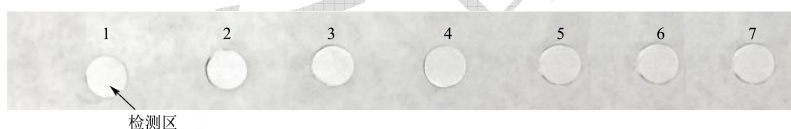


图 1 制备的纸芯片实物图

Fig.1 Product pictures for paper chip

1.3.2 图像采集及取色

使用 2244×1080 像素的小米手机在紫外灯下采集纸芯片荧光显色图像。将待测纸芯片水平放置于箱式紫外分析仪的载物台中央，在 365 nm 波长下显色，手机镜头紧贴紫外分析仪的相机拍照口，并与纸芯片平行，以保证每次拍照距离一定，拍摄均采用夜景模式。另在手机上安装颜色识别器 APP（免费，5.3 M），利用该 APP 对拍摄照片进行 RGB 的取色，读取同一检测区中心区域、边缘区域、中心与边缘之间区域共 3 个不同位点的 RGB，取平均值，以此平均值作为该检测区的 RGB 读数。

为减小光线、手机光源等拍照条件对 RGB 值的影响，以下各实验项目的平行实验应同时进行操作并同步拍照。

1.3.3 纸芯片测定木犀草素的显色条件优化

1.3.3.1 木犀草素溶液点样体积的影响

按照 1.3.1 制备 3×6 阵列的纸芯片，每个木犀草

素点样体积重复 3 次实验。在 1~6 号纸芯片检测区域内均准确加入 0.4 μL 1.0 mol/L NaOH 溶液和 1.0 μL 1.0×10⁻² mol/L EDTA 溶液，然后依次滴加 0、2、4、6、8、10 μL 0.10 mmol/L 木犀草素标准溶液，再各加入 0.75 μL 1.5 mmol/L Tb³⁺溶液，室温反应 5 min，进行图像采集及取色。

1.3.3.2 Tb³⁺浓度的影响

每个 Tb³⁺浓度在 4×6 阵列的纸芯片上重复 3 次实验，第 4 列为不加木犀草素标准溶液的空白对照组。在 1~6 号纸芯片检测区均准确加入 0.4 μL 1.0 mol/L NaOH 溶液、1.0 μL 1.0×10⁻² mol/L EDTA 溶液和 6 μL 0.10 mmol/L 木犀草素标准溶液，再分别加入 0.75 μL 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L Tb³⁺溶液，反应 5 min，进行图像采集及取色。

1.3.3.3 NaOH 溶液用量的影响

每个 NaOH 溶液用量在 3×6 阵列的纸芯片上重复 3 次实验。在 1-6 号纸芯片检测区域内依次加入 0、0.2、

0.4、0.6、0.8、1.0 μL 1.0 mol/L NaOH 溶液, 再在每个检测区加入 1.0 μL 1.0×10^{-2} mol/L EDTA、6 μL 0.10 mmol/L 木犀草素标准溶液和 0.75 μL 1.5 mmol/L Tb^{3+} 溶液, 室温反应 5 min, 进行图像采集及取色。

1.3.3.4 显色时间的影响

在纸芯片检测区加入 0.4 μL 1.0 mol/L NaOH 溶液, 1.0 μL 1.0×10^{-2} mol/L EDTA 溶液、6 μL 0.10 mmol/L 木犀草素标准溶液和 0.75 μL 1.5 mmol/L Tb^{3+} 溶液, 平行操作 3 份。待显色 0.5、2、4、6、8、10、30、60、120 min 后分别进行图像采集及取色。

1.3.4 标准曲线的绘制

每个已知浓度木犀草素标准溶液在 3×6 阵列的纸芯片上重复 3 次实验。在 1~6 号检测区均加入 0.4 μL 1.0 mol/L NaOH 溶液、1.0 μL 1.0×10^{-2} mol/L EDTA 溶液, 再分别加入 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mmol/L 的木犀草素标准溶液 6 μL , 再加入 0.75 μL 1.5 mmol/L Tb^{3+} 溶液, 室温下反应 5 min, 进行图像采集及取色。建立各种 RGB 值对木犀草素浓度的数学模型, 通过比较相关系数 (r), 获得最优的标准曲线方程。

1.3.5 干扰物质的影响

每种干扰物质在 3×7 阵列的纸芯片上重复 3 次实验, 固定木犀草素浓度为 0.20 mmol/L。其中 1~6 号检测区为加入干扰物质的待测定木犀草素荧光显色体系溶液, 7 号检测区为未加干扰物质的木犀草素荧光显色体系溶液, 室温下反应 5 min 后, 进行图像采集及取色。

1.3.6 花生壳中木犀草素含量的测定

1.3.6.1 木犀草素提取液的制备

将 2 g 花生壳粉碎过 40 目筛, 加入 60 mL 70% (V/V) 的乙醇水溶液, 浸泡 24 h, 在 80 MHz、60 $^{\circ}\text{C}$ 下进行超声提取 30 min^[26], 提取完毕后, 过滤, 弃去固体残渣, 用 70%乙醇水溶液稀释至 100 mL, 得木犀草素提取液, 备用。

1.3.6.2 标准曲线法

按 1.3.4 的方法, 在 3×7 阵列纸芯片的 1~6 号检测区加入各试剂。同时在 7 号检测区加入对应的 NaOH 溶液、EDTA 溶液、6 μL 木犀草素提取液和 Tb^{3+} 溶液, 各木犀草素溶液及木犀草素提取液均重复 3 次实验。取 3 次实验的 RGB 平均值绘制标准曲线, 计算木犀草素的含量。

1.3.6.3 标准加入法

在纸芯片 1~6 号检测区依次准确加入 6 μL 0、0.05、0.1、0.15、0.20、0.25 mmol/L 的木犀草素溶液, 晾干, 再加入 0.4 μL 1.0 mol/L NaOH 溶液、1.0 μL 1.0×10^{-2} mol/L EDTA 溶液、6 μL 木犀草素提取液和

0.75 μL 1.5×10^{-3} mol/L Tb^{3+} 溶液。室温显色 5 min 后, 进行图像采集及取色。于 3×7 阵列纸芯片上平行操作 3 次, 取 3 次实验的 RGB 平均值绘制标准曲线, 计算出花生壳中木犀草素的含量。

1.3.7 花生壳中木犀草素含量的计算

$$\text{含量}/\% = (C \times D \times \text{Mr}/W) \times 100$$

式中: C 为由标准曲线方程计算得到的木犀草素浓度 (mmol/L); D 为稀释体积 (mL); Mr 为木犀草素的相对分子量 (286.23 g/mol); W 为称取的花生壳的质量 (mg)。

2 结果与讨论

据陈传燕报道在一定浓度范围内, 木犀草素的浓度与对应检测体系的荧光强度成正比例, 可用于木犀草素的定量分析^[25]。本研究也发现在紫外灯照射下, 木犀草素显色斑点颜色的深浅与木犀草素浓度呈相关性, 经智能手机图像采集及取色后, 可将颜色深浅转化为 RGB 值, 从而建立 RGB 值与木犀草素浓度的关系。

2.1 显色条件的优化

2.1.1 木犀草素溶液点样体积的影响

不同木犀草素溶液点样体积下的木犀草素检测体系荧光显色图片及 RGB 值如图 2 所示。从显色图片看, 当点样体积小于 4 μL 时, 样斑边界不清晰; 从 RGB 值来看, 点样体积小于 4 μL 或大于 8 μL 时 RGB 值相对标准偏差较大 (超过 5%), 这是由于点样体积过小时, 溶液未完全浸没检测区, 而点样体积过大时, 则会造成边界的显色物质聚集, 即点样体积过小或过大都会引起斑点显色不均匀, 造成读取的 R、G、B 值重现性下降。综合考虑, 选择点样体积为 6 μL 。

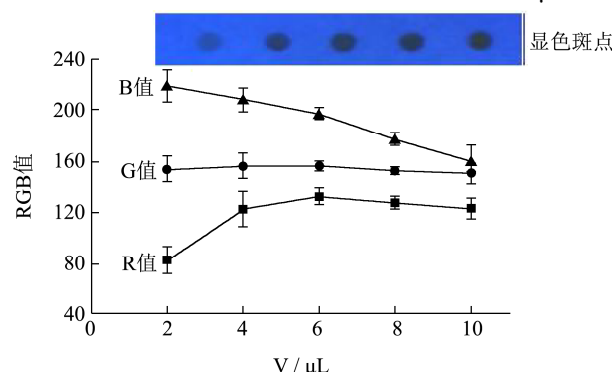


图2 木犀草素溶液点样体积对 RGB 值的影响

Fig.2 The influence of volume of luteolin solution on RGB value

2.1.2 Tb^{3+} 溶液的浓度对荧光图片 RGB 值的影响

实验发现 Tb^{3+} 本身有微弱荧光, 在实验浓度范围

下 Tb^{3+} 自身的荧光图片 RGB 值变化较小, 故 Tb^{3+} 自身的荧光对木犀草素测定体系的荧光影响可忽略。不同浓度 Tb^{3+} 溶液下木犀草素检测体系的荧光显色图片及 RGB 值如图 3 所示。可知, R、G、B 值均随着 Tb^{3+} 溶液浓度的增大而呈现上升趋势, 当 Tb^{3+} 溶液的浓度达到 0.15 mmol/L 时, R、G、B 值基本趋于稳定。因此后续实验中选择 Tb^{3+} 溶液的浓度为 0.15 mmol/L。

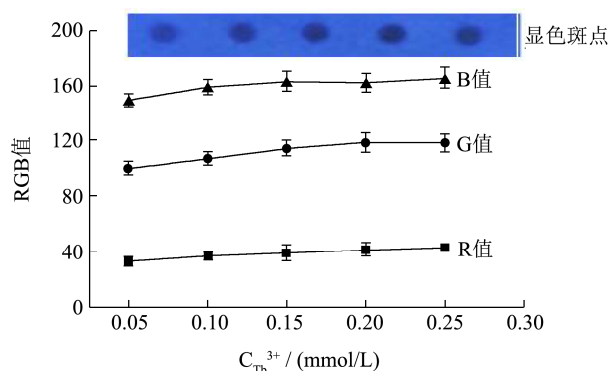


图 3 Tb^{3+} 溶液的浓度对荧光图片 RGB 值的影响

Fig.3 The influence of volume of Tb^{3+} solution on RGB value

2.1.3 NaOH 用量的影响

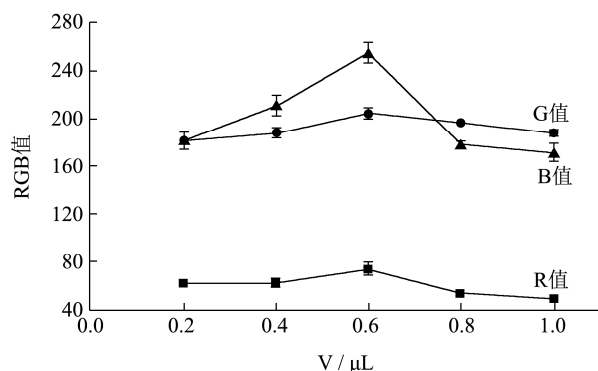


图 4 NaOH 用量对 RGB 值的影响

Fig.4 The influence of volume of NaOH solution on RGB value

不同 NaOH 用量对木犀草素检测体系荧光显色图片的 RGB 值影响如图 4 所示。可知, 随着 NaOH 溶液用量的增加, 显色斑点的 R、G、B 值均呈现先上升后下降的趋势, 在 0.6 μ L 时数值达到最大, 即荧光强度也最强。这是因为在碱性溶液中, 木犀草素酚羟基上的氢离子容易发生解离, 有利于和 Tb^{3+} 、EDTA 生成三元配合物, 强化了 Tb^{3+} 的特征荧光, 但碱性太强又会生成 $Tb(OH)_3$ 沉淀, 造成荧光强度下降。因此为增强检测过程的灵敏度, 选择 NaOH 溶液的用量为 0.6 μ L。

2.1.4 显色时间的影响

不同显色时间下的木犀草素检测体系的 RGB 值如图 5 所示。可知显色 4 min 后, R、G、B 值趋于稳定, 在后续 10 min、30 min、60 min、120 min 拍照处理得到的 R、G、B 值仍较稳定, 证明该体系荧光能

够长时间稳定存在, 长时间放置结果依旧有效。本实验选择显色时间为 5 min。

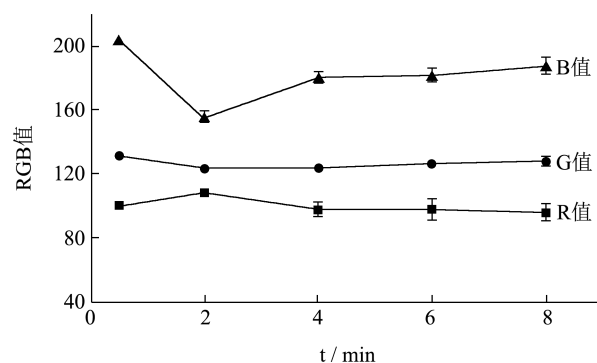


图 5 显色时间对 RGB 值的影响

Fig.5 The influence of time on RGB value

2.2 标准曲线方程的建立

对不同浓度下木犀草素荧光显色的 RGB 值进行多种数学模型的处理, 并进行线性拟合, 其结果如表 1 所示。通过比较相关系数, 可知采用 $B/(R+G+B)$ 对木犀草素浓度的拟合方程线性最好, $R^2 > 0.99$, 木犀草素浓度 C 与 $B/(R+G+B)$ 呈负相关性, 由此建立的标准曲线方程为 $B/(R+G+B) = -0.4851 C + 0.5322$ 。继续呈梯度增加木犀草素标准溶液浓度, 观察木犀草素浓度与 $B/(R+G+B)$ 值的线性关系, 发现当木犀草素浓度在 0.05~4.0 mmol/L 时, 荧光样点的 $B/(R+G+B)$ 与木犀草素浓度依旧成线性关系。对空白溶液进行 11 次重复实验, 按照检出限 $LOD = \text{空白测定值标准差的 } 3 \text{ 倍/标准曲线斜率}$, 得到检测限为 0.028 mmol/L。

表 1 各种数学模型拟合方程及相关系数

Table 1 The fitted equations of mathematical model and correlation coefficients

	拟合方程	R^2
1	$R+G+B=310 C+299.9$	0.9777
2	$R/(R+G+B)=0.5827 C+0.1571$	0.9847
3	$G/(R+G+B)=-0.0976 C+0.3107$	0.7723
4	$B/(R+G+B)=-0.4851 C+0.5322$	0.9954
5	$\Delta R+\Delta G+\Delta B=310 C+46.9$	0.9777
6	$\Delta R/(\Delta R+\Delta G+\Delta B)=1.901 C+0.0542$	0.9412
7	$\Delta G/(\Delta R+\Delta G+\Delta B)=-0.3086 C+0.3234$	0.732
8	$\Delta B/(\Delta R+\Delta G+\Delta B)=-1.5925 C+0.6224$	0.9412

注: C 为木犀草素标准溶液的浓度 (mmol/mL), $\Delta R=R-R_{\text{blank}}$, $\Delta G=G-G_{\text{blank}}$, $\Delta B=B-B_{\text{blank}}$ 。

2.3 共存物质的影响

固定木犀草素浓度为 0.20 mmol/L, 测定了金属离

子、葡萄糖、氨基酸和黄酮类化合物对木犀草素荧光显色图片 RGB 值的影响, 由于标准曲线是以 B/(R+G+B) 为纵坐标, 因此以 B/(R+G+B) 的变化量为考察指标, 结果如表 2 所示。

由表 2 可知, Zn^{2+} 、 Al^{3+} 以及葡萄糖对体系的 B/(R+G+B) 值影响相对较大。可能是因为木犀草素在 EDTA 的协同和碱性条件下才能显著增强 Tb^{3+} 的荧光强度从而引起 RGB 值的显著变化, 本体系中 EDTA 的用量明显过量, 因此显著影响体系碱性和木犀草素浓度的因素是造成干扰的主要因素。葡萄糖对检测体

系的影响可能是由于其会消耗 NaOH, 造成检测体系的碱性下降; Zn^{2+} 、 Al^{3+} 对实验的影响则可能是由于 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 能与木犀草素形成配合物, 造成与 Tb^{3+} 反应的木犀草素的量变少。实验也发现牡荆苷、芦丁、儿茶素、葛根素等黄酮类物质对该检测体系干扰较小, 在测定体系中, 这些黄酮类物质可以与木犀草素高浓度共存。说明该测定方法具有一定的选择性, 能适合于复杂混合样品中木犀草素的含量测定, 但在实验过程中要注意避免能与木犀草素发生配位作用的离子干扰和体系碱度的控制。

表 2 共存物质的影响情况

Table 2 The influence of coexistent matter

共存物质	加入的共存物质浓度/(mol/L)	共存物质与木犀草素的摩尔数比	B/(R+G+B)的变化量/%
Na^{+} 、 Cl^{-}	0.1	500:1	+4.2
NH_4^{+} 、 Cl^{-}	0.1	500:1	+3.1
K^{+} 、 Cl^{-}	0.1	500:1	-2.5
Mg^{2+} 、 Cl^{-}	0.1	500:1	-3.0
Ca^{2+} 、 Cl^{-}	0.1	500:1	+2.7
Zn^{2+} 、 SO_4^{2-}	0.02	100:1	-4.5
Al^{3+} 、 Cl^{-}	0.02	100:1	-5.6
BSA	0.1	500:1	+2.1
酪氨酸	0.02	100:1	-3.4
甘氨酸	0.02	100:1	+2.1
芦丁	0.02	100:1	+2.9
牡荆苷	0.02	100:1	+3.0
儿茶素	0.02	100:1	-2.1
葛根素	0.02	100:1	-2.7
葡萄糖	0.02	100:1	+5.0

表 3 纸上荧光数码成像法和荧光光度法测定木犀草素含量的重复性实验结果

Table 3 The results of two methods for luteolin concentration

方法	花生壳中木犀草素的含量/%					含量的平均值/%	RSD/%
	1	2	3	4	5		
纸上荧光数码成像-标准曲线法	0.491	0.417	0.450	0.483	0.442	0.457	6.7
纸上荧光数码成像-标准加入法	0.474	0.486	0.501	0.462	0.510	0.487	4.1
荧光光度法-标准曲线法	0.478	0.451	0.494	0.483	0.465	0.474	3.5

2.4 花生壳中木犀草素含量的测定

2.4.1 重复性实验

按 1.3.6 操作, 分别采用纸上荧光数码成像-标准曲线法和纸上荧光数码成像-标准加入法测定花生壳中木犀草素含量, 平行 5 次, 并与荧光光度法(按文献^[25]操作)平行测定 5 次的结果进行比较, 如表 3 所示。可知, 荧光光度法与纸上荧光数码成像-标准加入法的重复性良好, RSD 均在 4% 左右, 而纸上荧光数码成像-标准曲线法的重复性略低。此外从木犀草素含

量的平均值来看, 各种测定方法的结果较为接近。

2.4.2 加标回收实验

为验证纸上数码成像法测定花生壳中木犀草素含量的准确性, 针对标准曲线法和标准加入法分别进行了加标回收实验, 如表 4 所示。可知, 标准曲线法的样品回收率在 90.4%~110.4% 之间, RSD 为 7.1%; 标准加入法的样品回收率在 96.5%~106.3%, RSD 为 3.9%。表明标准加入法的精密度和准确度均优于标准曲线法。这是因为花生壳木犀草素提取液的组分较复杂, 相对于标准曲线法, 标准加入法能消除一些基本

表 4 标准曲线法和标准加入法的回收率结果

Table 4 The result of standard curve method and standard addition method for recoveries									
样品	加标量 /μmol	标准曲线法				标准加入法			
		测得量 /μmol	加标后测得量 /μmol	回收率 /%	RSD/%	测得量 /μmol	加标后测得量 /μmol	回收率 /%	RSD/%
1	0.25	0.321	0.544	95.3	7.1	0.342	0.574	96.5	3.9
2	0.25	0.321	0.516	90.4		0.342	0.584	98.6	
3	0.25	0.321	0.563	98.6		0.342	0.612	103.4	
4	0.5	0.321	0.864	105.2		0.342	0.895	106.3	
5	0.5	0.321	0.906	110.4		0.342	0.876	104.0	
6	0.5	0.321	0.841	102.4		0.342	0.826	98.1	

注：标准曲线法测得量指按 1.3.6.2 操作得到的 5 次测定结果的平均值，标准加入法的测得量指按 1.3.6.3 操作得到的 5 次测定结果的平均值。

表 5 纸上荧光数码成像法与荧光光度法的比较

Table 5.The Comparison of Fluorometer method and Fluorescence Digital Imaging method Based on Filter Paper		
比较项目	纸上荧光数码成像法	荧光光度法
线性范围	5.0×10 ⁻⁵ ~5.0×10 ⁻³ mol/L	5.0×10 ⁻⁹ ~5.0×10 ⁻⁶ mol/L
相关系数	0.9954	0.9999
检测限	3.7×10 ⁻⁵ mol/L	1.0×10 ⁻⁹ mol/L
所需检测试剂	NaOH、EDTA、Tb ³⁺	NaOH、EDTA、Tb ³⁺
试剂用量的数量级	μL	mL
检测仪器	剪贴法自制的纸芯片、紫外灯、智能手机	荧光光度计

2.5 纸上荧光数码成像法与荧光光度法的比较

对本文研究的纸上荧光数码成像法和陈传燕报道的荧光光度法^[25]进行了比较，结果如表 5 所示。可知，荧光光度法具有线性范围更广、检测限更低的特点，但纸上荧光数码成像法试剂消耗量极少、除智能手机外检测设备可自制、成本更低廉，因此在一些条件相对简陋的现场测定中，纸上荧光数码成像法更具有优势。

3 结论

本研究利用智能手机数码成像的功能，开发了一种纸上荧光成像法快速测定木犀草素含量的方法，在优化的实验条件下，木犀草素的浓度在 0.05~4.0 mmol/L 时与其荧光显色图片的 B/（R+G+B）成良好的线性关系，R²=0.9954。该方法仅需滤纸、相应试剂、紫外灯和智能手机即可开展检测，试剂消耗量极少，成本低廉，简便快速，能满足现场快速测定分析。但应注意荧光图片受拍照条件的影响，因此样品和标准系列溶液的测定应在同一纸芯片上同步拍照进行，要注意避免 Zn²⁺、Al³⁺等离子的干扰，同时测定复杂样品时采用标准加入法更合适。

参考文献

[1] 张伟敏,张盛林,钟耕.木犀草素的研究概况[J].中国食品添加剂,2005,2:11-16
ZHANG Wei-min, ZHANG Sheng-lin, ZHONG Gen. The study survey of luteolin [J]. China Food Additives, 2005, 2: 11-16

[2] D Romanová, A Vachálková, L Cipák, et al. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method [J]. Neoplasma, 2001, 48(2): 104-107

[3] Ueda H, Yamazaki, Chikako, et al. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens* [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(9): 1197

[4] Ashok Kumar P, Norhaizan Mohd E. Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: a review [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2014, 15(14): 5501-5508

[5] Mingde Zang, Lei Hu, Baogui Zhang, et al. Luteolin suppresses angiogenesis and vasculogenic mimicry formation through inhibiting Notch1-VEGF signaling in gastric cancer [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications,

- 2017, 490(3): 913
- [6] Kang K A, Piao Mei Jing, Ryu Yea Seong, et al. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells [J]. International Journal of Oncology, 2017, 51(4): 1169-1178
- [7] Ou H C, Pandey S, Hung M Y, et al. Luteolin: A natural flavonoid enhances the survival of HUVECs against oxidative stress by modulating amPK/PKC pathway [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2019, 47(3): 1-17
- [8] 郑瑞, 扶雄, 赵振刚, 等. 木犀草素肝保护作用的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(11): 16-22
- ZHENG Rui, FU Xiong, ZHAO Zhen-gang, et al. Hepatocyte-protective effect of luteolin [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(11): 16-22
- [9] 仇洋, 徐艳阳, 刘辉, 等. 微波-超声辅助提取玉米须木犀草素的工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1637-1644
- QI Yang, XU Yan-yang, LIU Hui, et al. Optimization of microwave-ultrasonic assisted extraction process for luteolin from corn silk [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(4): 1637-1644
- [10] Daigle D J, Conkerton E J, Sanders T H, et al. Peanut hull flavonoids: Their relationship with peanut maturity [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1988, 36(6): 1179-1181
- [11] 张艳. 花生壳中木犀草素的分离纯化及其化学合成[D]. 西安理工大学, 2010
- ZHANG Yan. Study on extraction and purification process of luteolin from peanut shell and its synthesization [D]. Xi'an: Xi'an University of Technology, 2010
- [12] 胥秀英, 郑一敏, 傅善权, 等. 高效液相色谱法测定金银花中木犀草素的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 221-222
- XU Xiu-ying, ZHENG Yi-min, FU Shan-quan, et al. Quantitative determination of luteolin from flowers of *Lonicera japonica* by HPLC [J]. Food Science, 2006, 27(5): 221-222
- [13] 木合塔尔·吐尔洪, 楚刚辉, 尹学博, 等. 高效液相色谱法测定野生和人工种植库鲁木提草中柚皮苷和木犀草素的含量[J]. 分析科学学报, 2018, 34(2): 186-190
- M UHETAER·Tu'erhong, CHU Gang-hui, YIN Xue-bo, et al. Determination of Naringin and Luteolin in *Hymenolyma nan* by High Performance Liquid Chromatography [J]. Journal of Analytical Science, 2018, 34(2): 186-190
- [14] Li L, Huidi Jiang, Haohao Wu, et al. Simultaneous determination of luteolin and apigenin in dog plasma by RP-HPLC [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2005, 37(3): 615-620
- [15] 王笑笑, 方一超, 周勇, 等. RP-HPLC 法测定肾炎四味片中黄芩苷、木犀草素和山柰素的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(10): 1857-1861
- WANG Xiao-xiao, FANG Yi-chao, ZHOU Yong, et al. Determination of baicalin, luteolin and kaempferide in Shenyansiwei tablets by RP-HPLC [J]. Chin J Pharmaceutical Anal, 2015, 35(10): 1857-1861
- [16] Martinez A W, Phillips Scott T, Whitesides George M, et al. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(1): 3-10
- [17] Asl YA, Yamini Y, Seidi S. Development of a microfluidic-chip system for liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents for the extraction and preconcentration of some hormonal drugs [J]. Talanta, 2016, 160: 592-599
- [18] Martinez A, Phillips S, Butte M, et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays [J]. Angewandte Chemie, 2010, 119(8): 1340-1342
- [19] Cinti S, Basso M, Moscone D, et al. A paper-based nanomodified electrochemical biosensor for ethanol detection in beers [J]. Anal Chim Acta, 2017, 960: 123-130
- [20] Wu J, Wang X, Lin Y, et al. Peroxynitrous-acid-induced chemiluminescence detection of nitrite based on microfluidic chip [J]. Talanta, 2016, 154: 73-79
- [21] Busa LSA, Mohammadi S, Maeki M, et al. Advances in microfluidic paper-based analytical devices for food and water analysis [J]. Micromachines, 2016, 7(5): 86
- [22] Cinti S, Basso M, Moscone D, et al. A paper-based nanomodified electrochemical biosensor for ethanol detection in beers [J]. Anal Chim Acta, 2017, 960: 123-130
- [23] Krafft D, Lopez-Castellanos S, Dimova R, et al. Compartments for synthetic cells: osmotically assisted separation of oil from double emulsions in microfluidic chip [J]. Chem Bio Chem, 2019, 20: 1-6
- [24] 张飞雪, 李胜清, 陈浩. 纸上荧光成像-数码比色法快速测定维生素 B₂ [J]. 分析试验室, 2014, 33(8): 889-892
- ZHANG Fei-xue, LI Shen-qing, CHEN Hao. Rapid determination of VB₂ by fluorescence imaging based on filter paper-digital colorimetric analysis [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2014, 33(8): 889-892