

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Направление подготовки: *Химия*

Образовательная программа: *Химия*

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Разработка бумажного чипа для многокомпонентного анализа биодизельных топлив

Студент 4 курса

Труфанов Иван Максимович
Уровень/ступень образования:

Бакалавриат

Научный руководитель:
к.х.н., ассистент Шишов Андрей
Юрьевич

Санкт-Петербург

2017

Оглавление

Условные сокращения и обозначения	4
Введение	5
I. Глава. Обзор литературы	7
1 Миниатюризация химического анализа на принципах бумажных чипов	7
2 Методы изготовления бумажных чипов	8
Методы, основанные на физической блокировке пор	10
Методы, основанные на создании гидрофобного покрытия на поверхности волокон целлюлозы	12
Методы, основанные на химической модификации поверхности бумаги	16
Другие методы	18
Трёхмерные устройства	19
3 Классификация по методам детектирования на чипе	21
Электрохимические методы	21
Хемилюминесцентные и электрохемилюминесцентные методы	23
4 Реализация колориметрии на бумажных чипах	24
5 Биодизельное топливо. Определение глицерина и металлов	27
6 Заключение	30
II. Глава. Экспериментальная часть	32
1 Средства измерения, оборудование, реактивы	32
Использованное оборудование	32
Приготовление растворов	32
2 Синтез биодизельного топлива	33
3 Изготовление бумажных чипов	34
4 Схема анализа	36
5 Регистрация аналитического сигнала. Методика обработки данных	38
6 Анализ реальных объектов. Проверка правильности результатов	39
III. Глава. Результаты и обсуждение	41
1 Оптимизация условий определения глицерина	41
Выбор оптимальной концентрации периодата натрия	41
Выбор оптимальной концентрации ацетилацетона	42
Выбор времени реакции	42

2	Оптимизация условий определения кальция и магния	43
	Выбор концентрации эриохрома чёрного Т	43
	Выбор концентрации карбоната натрия.....	45
3	Оптимизация времени экстракции	46
4	Анализ реальных объектов.....	47
	Выводы	48
	Список литературы.....	50

Условные сокращения и обозначения

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия

АКД – алкилкетендимер

АФ – аналитическая форма

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-ИАД – высокоэффективная жидкостная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-РД – высокоэффективная жидкостная хроматография с рефрактометрическим детектированием

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ПААС – атомно-абсорбционная спектроскопия с пламенем

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПДМС – полидиметилсилоксан

ПММА – полиметилметакрилат

ПО – предел обнаружения

ИВА – инверсионная вольтамперометрия

ИСП-АЭС – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой

СФМ – спектрофотометрия

ТЭОС – тетраэтилортосиликат

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭТИ-ИСП-АЭС – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой и электротермическим испарением пробы

Введение

В последние десятилетия миниатюризация и автоматизация химического анализа входят в число главных аспектов развития аналитической химии. За счёт уменьшения размеров аналитического оборудования снижется расход пробы и реагентов, сокращается стоимость и длительность анализа. Автоматизация обеспечивает повышение прецизионности и точности измерений, делает возможным осуществление сложных многостадийных процедур пробоподготовки, а также снижает трудоёмкость анализа.

Реализация принципа лаборатории на чипе объединяет направления миниатюризации и автоматизации химического анализа. Применение микрофлюидных устройств ограничено необходимостью использования в процессе анализа внешнего оборудования. Разработка аналитических чипов на основе бумаги позволяет преодолеть данное ограничение и представляет собой новую обширную и перспективную область исследований. Устройства на основе бумаги в силу простоты изготовления, дешевизны, а также возможности проведения с их помощью химического анализа без использования внешнего аналитического оборудования, расширяют область применения аналитических чипов, позволяя осуществлять измерения on-site, следуя другой важной тенденции современной аналитической химии – перемещению анализа из лабораторий к объектам анализа. Бумажные чипы нашли широкое применение в полевом химическом анализе для контроля качества водных сред и в клиническом анализе для скрининга.

В свою очередь, недостатком бумажных чипов является ограничение в их использовании при анализе образцов сложного состава, так как данные устройства в первую очередь ориентированы на анализ водных растворов. Расширение аналитических возможностей бумажных чипов возможно за счет разработки новых подходов для их использования при анализе сложных объектов. К таким объектам относится биодизельное топливо.

Биодизельное топливо является относительно новым экологически чистым и возобновляемым источником энергии, призванным заменить дизельное топливо нефтяного происхождения. Превышение предельно допустимых концентраций глицерина, а также суммарного содержания кальция и магния в биодизельном топливе ведёт к ухудшению эксплуатационных характеристик двигателя и может привести к

возникновению неисправностей. В силу того, что данные компоненты контактируют с топливом в процессе синтеза, определение их содержаний – неотъемлемая часть обязательного контроля качества биодизельного топлива.

Активное распространение биодизельного топлива вызывает необходимость разработки экспрессных методик многокомпонентного анализа для скрининга on-site. Между тем, существующие методики анализа биодизельного топлива предполагают отдельное определение аналитов и привязаны к лабораториям, оснащенным сложным дорогостоящим оборудованием. Большинство методик определения глицерина в биодизельном топливе, кроме того, обладают низкой экспрессностью, вследствие включения в процедуру пробоподготовки стадии жидкостно-жидкостной экстракции, сопряженной с необходимостью разделения устойчивых эмульсий.

Упростить и удешевить химический анализ биодизельного топлива возможно за счет разработки бумажных чипов, на которых возможна реализация не только стадии детектирования, но и стадия разделения эмульсий.

Целью настоящей работы является разработка бумажного чипа для экспрессного одновременного определения глицерина, кальция и магния в биодизельном топливе.

I. Глава. Обзор литературы

1 Миниатюризация химического анализа на принципах бумажных чипов

Принцип лаборатории на чипе заключается в выполнении полного цикла химического анализа в миниатюрной интегрированной автоматической системе [1]. Анализ может включать стадии пробоотбора, пробоподготовки, дериватизации, разделения, детектирования, выделения продукта и обработки данных. Сеть микроканалов, имеющих ширину обычно от 10 до 100 мкм, насосы, клапаны, датчики, электроника и т. д. расположены на чипе размером в несколько квадратных сантиметров [2]. Данный подход позволяет значительно сократить объем пробы и расход реагентов, сложность рабочих процедур и продолжительность анализа, не оказывая отрицательного влияния на специфичность и чувствительность. В то же время, способы изготовления большинства подобных устройств на основе привычных материалов – стекла и кремния, сложны и их реализация занимает много времени. Использование в качестве основы полимеров, таких как полиметилметакрилат (ПММА), позволяет упростить и ускорить процесс. Тем не менее, использование полимерных материалов не устраняет ограничений применения традиционных микрофлюидных устройств, связанных с необходимостью использования в процессе анализа специализированного внешнего оборудования (насосы, трубки и т. д.) для обеспечения транспорта жидкости [3], делающих подобные устройства малопригодными для измерений on-site [4]. Для применения в некоторых областях, таких как медицинская самодиагностика, скрининг состояния объектов окружающей среды, контроль качества пищевых продуктов и т. д. необходимы более доступные и дешёвые устройства, не требующие использования внешнего оборудования. Такими устройствами являются бумажные аналитические чипы.

Микрофлюидные аналитические устройства на основе бумаги – новая платформа, объединяющая некоторые возможности традиционных микрофлюидных устройств и простоту тест-методов [5]. Выбор бумаги в качестве основы чипа продиктован наличием у данного материала ряда достоинств, в том числе низкой цены и широкой распространенности, наличия трехмерной структуры волокон с большой удельной площадью, биоразлагаемости, способности обеспечивать быстрое перемещение жидкости под действием только капиллярных сил, избегая использования какого-либо внешнего оборудования [6]. Упомянутые преимущества

бумаги, при её использовании для изготовления микрочипов может сделать методы лаборатории на чипе недорогими, чувствительными, специфичными, удобными, быстрыми, надежными, не требующими внешнего оборудования и доступными конечным пользователям [7]. Вследствие низкой стоимости и простоты изготовления, большое число бумажных микрочипов было разработано для осуществления медицинской диагностики, контроля качества пищевых продуктов и экологического мониторинга. В особенности, для измерений в условиях ограниченных ресурсов, в сельской местности и в развивающихся странах [8].

В качестве основы чипа могут быть использованы различные виды целлюлозных материалов, выбор зависит от области применения будущего чипа и способа его производства. Как правило, применение находят хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, а также нитроцеллюлозные мембраны [9]. Фильтровальная бумага наиболее часто используется для создания бумажных микрочипов. Различные виды фильтровальной бумаги отличаются пористостью, удерживанием частиц и скоростью потока жидкости. Чаще предпочтение отдается материалу, обеспечивающему среднее удерживание и среднюю скорость движения потока жидкости. Хроматографическая бумага имеет более однородную структуру, что особенно важно для чипов с печатными электродами, так как помогает избегать их деформаций при смачивании бумаги, кроме того, хроматографическая бумага не содержит добавок, способных оказывать мешающие влияния при реализации электрохимических методов детектирования [10;11]. Гидрофобные нитроцеллюлозные мембраны обеспечивают более стабильное и воспроизводимое движение потока жидкости благодаря гладкой поверхности и одинаковому размеру пор. Нитроцеллюлозные мембраны используются для иммобилизации антигенов в силу проявления ими высокой степени неспецифического связывания с биомолекулами, делающей их применимыми для иммобилизации ферментов, белков, нуклеиновых кислот и клеток [12]. Помимо этого, поры нитроцеллюлозы способны обеспечивать очистку пробы от примесей, превосходящих аналит по размерам, вследствие фильтрации.

2 Методы изготовления бумажных чипов

Процесс изготовления бумажного микрочипа заключается в обеспечении различий в степени смачивания водной фазой различных участков бумаги, благодаря

которым формируются ограниченные гидрофобными стенками гидрофильные каналы и зоны [13]. Исключением являются техники, реализация которых предполагает физическое отделение части субстрата, вследствие которого, смачиваемые водой участки ограничиваются окружающим воздухом, играющим роль непроницаемого барьера [14].

За последнее десятилетие, после того, как в 2007 году впервые была предложена [15] концепция бумажных микрочипов, было разработано и описано в литературе множество способов производства подобных устройств. Представленные методы можно разделить на две группы, исходя из выбранной авторами стратегии создания гидрофильных областей с заданными формой и размерами [16]: 1) Прямая гидрофобизация определенных участков бумаги 2) Гидрофобизация всей поверхности, в сочетании с последующей избирательной дегидрофобизацией. Первый вариант предполагает одностадийный процесс, в результате которого обработанные участки становятся гидрофобными, а необработанные сохраняют гидрофильные свойства (распространенные методы изготовления микрочипов, реализующие данную стратегию - восковая печать, струйная печать). Во втором случае, процесс проводится в две стадии: первая - обработка заготовки с целью полной гидрофобизации, вторая – восстановление утраченных на первом этапе гидрофильных свойств бумаги на определенных участках тем или иным способом (обработка плазмой, травление). Двухстадийный процесс имеет недостаток, заключающийся в подвергании гидрофильных участков обработке растворителями и реагентом, которое может привести к изменению таких свойств бумаги, как цвет, форма, гибкость, размер пор [12] вследствие набухания бумаги. Помимо этого, возможно неполное удаление растворителя и/или реагента [15].

Еще одним критерием классификации техник создания бумажных микрочипов является способ фиксации гидрофобизирующего реагента с поверхностью бумаги. Данный критерий позволяет выделить среди всех подходов к производству три категории [8]: 1) Методы, основанные на физической блокировке (заполнении) реагентом пор в бумаге, такими реагентами могут быть полидиметилсилоксан (ПДМС) или фоторезист. 2) Методы, основанные на осаждении реагента на поверхности волокон целлюлозы, (воск, полистирол). 3) Методы, основанные на химической модификации поверхности волокон (обычно речь идет о связывании гидроксильных

групп целлюлозы с молекулами алкилкетендимера (АКД) или тетраэтилортосиликата (ТЭОС)). В последнем случае, как правило, гидрофильные свойства бумаги нельзя восстановить путем промывки растворителем.

Методы, основанные на физической блокировке пор

Фотолитография. Первый из предложенных методов. Основан на сшивке в порах бумаги фоточувствительного полимера при нагревании после облучения УФ-лампой. Включает ряд стадий: 1. Пропитка бумаги негативным фоторезистом (30 сек) 2. Удаление его избытка с помощью спин-коатера (30 сек) 3. Предварительное нагревание (5 мин, 95°C) с целью удаления входящего в состав растворителя 4. Облучение ультрафиолетовым светом (10 сек) с помощью УФ-лампы через маску, имеющую форму требуемых гидрофильных участков (шаблон может представлять собой рисунок, нанесенный с помощью принтера на прозрачную пленку) 5. Нагревание (5 мин, 95°C) с целью сшивки фоторезиста на засвеченных участках 6. Удаление несшитого фоторезиста с гидрофильных участков путем промывки растворителем (погружение на 5 мин в ацетат монометилового эфира пропиленгликоля, затем промывка изопропанолом) 7. Обработка всей поверхности плазмой с целью полного восстановления гидрофильных свойств бумаги [15]. Схема процесса представлена на **рис. 1.1а**.

Главное достоинство метода – высокое разрешение, - с помощью фотолитографии можно получить микрочипы с каналами минимальной шириной 200 мкм, имеющими четкие, ровные, соответствующие заданной форме и размерам с точностью до 1 мкм, границы [18]. Недостатки метода - многостадийность, трудоемкость, необходимость использования дорогостоящего оборудования и фоторезиста, органических растворителей, а также потеря бумагой гибкости в процессе изготовления чипа. Использование самостоятельно приготовленного фоторезиста вместо коммерчески доступного, а также солнечного света вместо УФ-лампы, помогает снизить стоимость производства [17]. Однако, это не помогает избежать всех недостатков метода, кроме того, самостоятельно изготовленный фоторезист обеспечивает худшее разрешение.

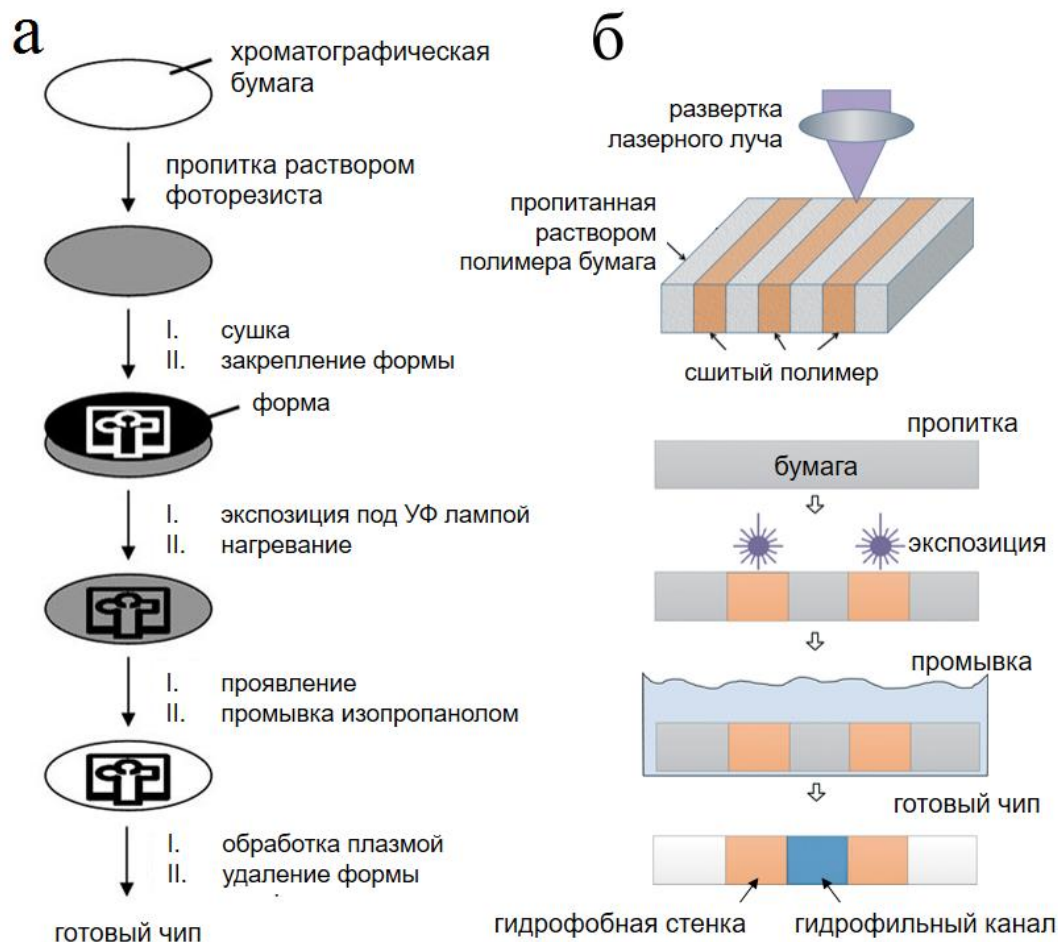


Рисунок 1.1. Принципы реализации методов: **а)** фотолитографии; **б)** прямой лазерной печати.

Метод **прямой лазерной печати** также основан на индуцированной светом полимеризации. При применении данного подхода, бумажная заготовка пропитывается раствором светочувствительного полимера и высушивается (без специальных условий). Затем, осуществляется развертка лазерного луча на поверхности бумаги. На участках, освещаемых лазером, происходит сшивка светочувствительного полимера. Таким образом, происходит разметка гидрофобных стенок и ограничиваемых ими гидрофильных областей. Завершается процесс промывкой изопропанолом с целью удаления несшитого полимера. Схема представлена на **рис. 1.1б**. Преимущества этого метода – бесконтактность, свойство, которое может иметь значение при производстве биологических и биомедицинских устройств, позволяя избегать перекрестного загрязнения, также отсутствие необходимости использования какой-либо маски или трафарета, возможность масштабировать производство, помимо всего прочего, данный способ позволяет сократить минимальную ширину каналов до значений порядка 80 мкм [19].

Недостатками являются необходимость использования лазера, а также использование органических растворителей.

Плоттерная печать. Более прямой метод, в сравнении с описанными выше. Метод предполагает печать на плоттере с помощью заправленного раствором ПДМС модифицированного пера. Субстрат во время плоттерной печати не подвергается деформациям, что обеспечивает возможность работы с медленно высыхающими растворами, такими как раствор ПДМС в гексане, практически на любом целлюлозном материале. В процессе печати возможна автоматическая смена пера, что делает метод более универсальным. После печати бумагу сушат в течение 1 часа при 70°C. Метод требует меньшего количества реактивов, чем литография. Также преимуществами плоттерной печати раствором ПДМС перед фотолитографией является гибкость получаемых микрочипов, их низкая стоимость, большая доступность используемых реактивов. [20]. Для реализации данного метода можно использовать множество других полимеров, выбор ПДМС продиктован надежностью, доступностью, лёгкостью растворения в органических растворителях, отсутствием токсического воздействия, запаха, а также проницаемостью для видимого света. Вместе с тем, разрешение плоттерной печати сильно уступает разрешению фотолитографии в силу неконтролируемой диффузии раствора ПДМС после печати в течении долгой сушки. Минимальная ширина канала – 1 мм, однако, на практике необходимо использовать каналы шириной 2-4 мм, так как их границы неровные [21], кроме того, процесс длителен и его осуществление требует модификации плоттера.

Методы, основанные на создании гидрофобного покрытия на поверхности волокон целлюлозы

Жидкостное травление. Подход заключается в обработке бумаги путем погружения на два часа в раствор полимера (полистирола), высушивании и последующем травлении части поверхности растворителем с помощью струйной печати с целью получения гидрофильных зон желаемых размеров и форм [22]. На **рис. 1.2** представлена схема создания чипов данным методом. Процедура жидкостного травления имеет ряд недостатков, основными из них являются необходимость многократной печати, необходимость модификации принтера и продолжительность процесса. Вместе с тем, данный метод позволяет с помощью одного принтера не только ограничивать гидрофильные участки определенной формы, но и наносить растворы

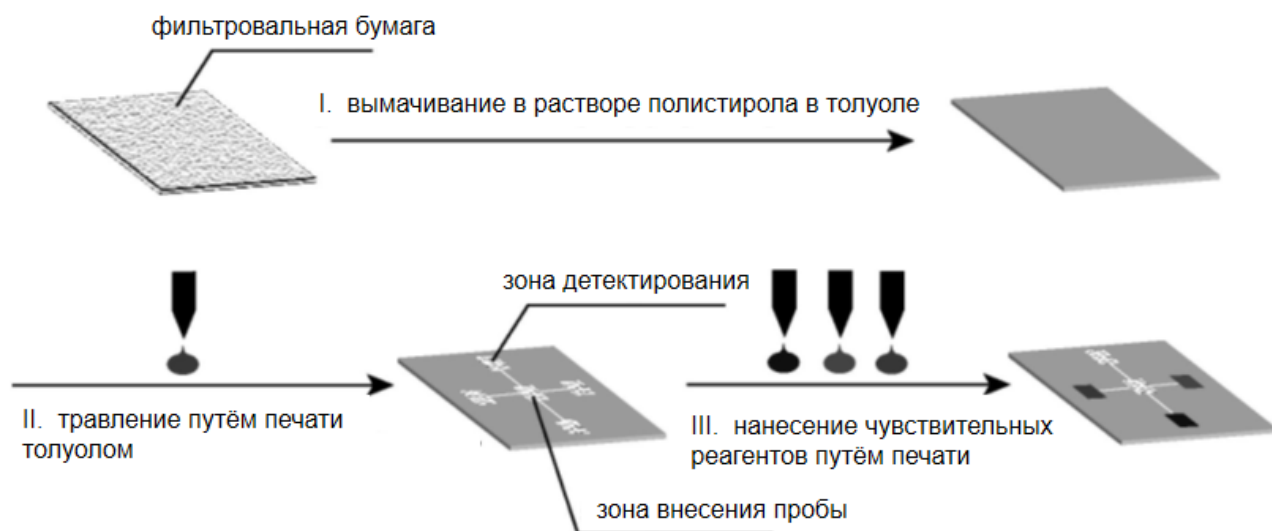


Рисунок 1.2. Изготовление чипов методом жидкостного травления

реагентов с высокой точностью, получая готовый чип. Также к достоинствам метода относятся низкая стоимость, отсутствие необходимости использования дорогостоящего оборудования, возможность контролировать глубину каналов, изменяя количество повторений печати (уменьшая таким образом необходимый объем пробы) и гибкость чипов.

Флексографическая печать. Флексографическая печать раствором полистирола - простой метод изготовления, который может быть реализован с использованием оборудования многих существующих типографий, что делает его идеальным для массового производства. Метод совместим со многими полимерами (АКД, ПММА и т. д.). Полистирол выбран на основании его низкой цены, широкой доступности, биосовместимости и отсутствии необходимости нагревания как дополнительной стадии изготовления. Схема флексографической печати представлена на **рис. 1.3**. Данный подход позволяет регулировать глубину проникновения гидрофобных барьеров в толщу бумаги, варьируя концентрацию полистирола и выбирая растворитель. Благодаря этому, также, как и струйная печать, флексографическая печать дает возможность создавать каналы заданной глубины, и, кроме того, наносить на микрочип растворы реагентов, однако, в данном случае, каждая смена чернил требует дополнительной стадии печати. Минимальная ширина канала – 500 мкм. Недостатки – необходимость двукратной печати, необходимость использования чистого помещения, использование органических растворителей,

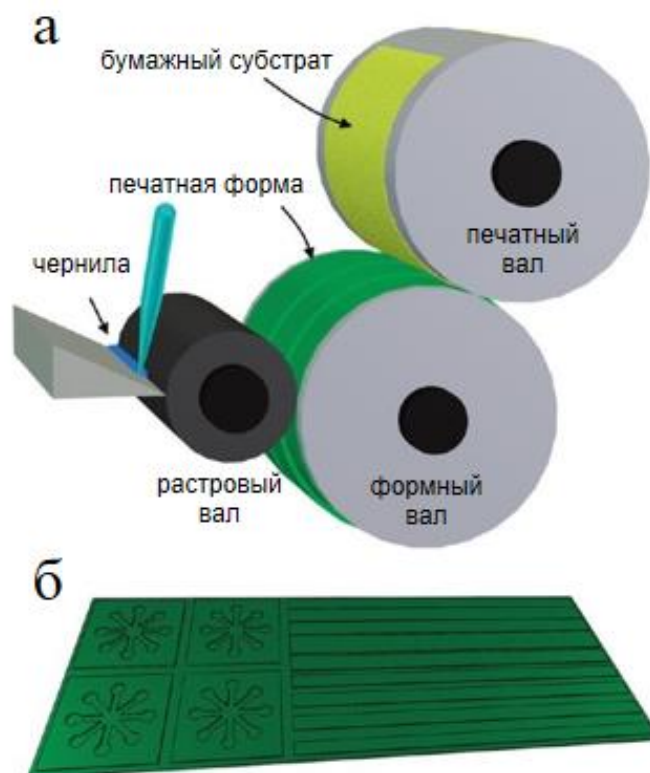


Рисунок 1.3. Реализация метода флексографической печати: **а)** схема печати; **б)** вид печатной формы.

необходимость часто выполнять чистку оборудования, зависимость качества печати от гладкости бумаги [23].

Восковая печать. Наиболее широко распространенный метод [9]. Его реализация включает две стадии: 1. Нанесение воска на поверхность бумаги 2. Нагрев заготовки для плавления воска и обеспечения его проникновения в толщу бумаги (см. **рис. 1.4**). Нанесение воска производится путем печати на восковом принтере, либо с помощью восковой ручки. Во втором случае, для увеличения точности, на бумаге, до нанесения воска, могут быть напечатаны с помощью офисного принтера контуры гидрофильных зон [24]. Минимальная ширина канала составляет 561 ± 45 мкм. Создание гидрофобных барьеров и гидрофильных каналов с установленными размерами методом восковой печати осложняется тем, что в процессе распространения в толще бумаги, расплавленный воск движется не только по вертикали, но и по горизонтали, уменьшая площадь гидрофильных участков. Вместе с тем, предложены два простых уравнения, которые предсказывают конечную ширину гидрофобных барьеров [25].

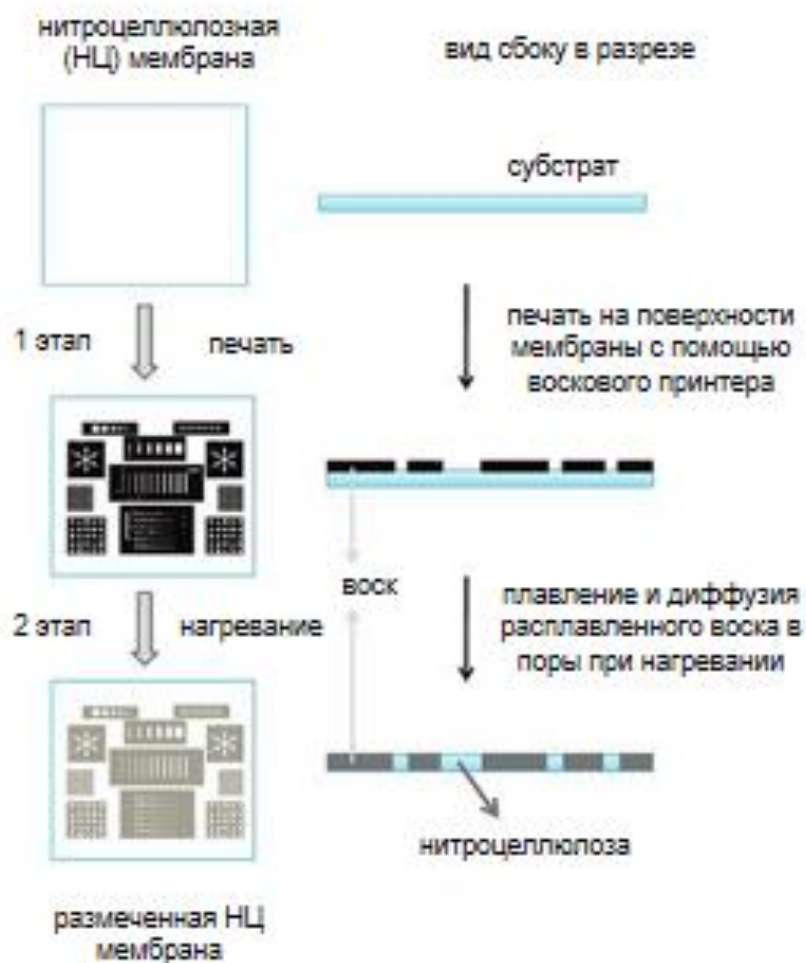


Рисунок 1.4. Принципиальная изготовления бумажных чипов методом восковой печати.

Преимуществами данного метода являются: скорость (весь процесс изготовления занимает не более 10 минут) и простота процесса. Кроме того, метод имеет такие достоинства как широкая доступность и низкая цена расходных материалов, экологическая чистота (процесс не предполагает использования токсичных материалов и органических растворителей, а сами чипы могут быть утилизированы путем сжигания). Данный метод хорошо подходит для проведения анализа в полевых условиях, и изготовления чипов большими партиями. Недостатками метода являются: низкое разрешение, необходимость использования дорогостоящего воскового принтера, необходимость производить нагревание после печати, сравнительно плохая воспроизводимость, и неустойчивость при высоких температурах.

Трафаретная печать. Восковая печать сочетает высокую скорость, простоту, универсальность, адаптируемость и дешевизну, возможность производства в больших масштабах, тем не менее, для восковой печати необходим дорогостоящий восковый

принтер, в то время как для реализации метода восковой трафаретной печати достаточно дешевых трафаретов [26]. В остальном, как показано на **рис. 1.5**, применение восковой трафаретной печати для изготовления чипов производится аналогично применению восковой печати с помощью принтера. Минимальная ширина канала составляет 650 ± 71 мкм. В отличие от ручного нанесения воска с помощью восковой ручки, данный подход дает более воспроизводимые результаты и лучше приспособлен к масштабному производству, тем не менее, воспроизводимость размеров гидрофильных зон, размеченных на бумаге данным методом, сильно уступает показателям, достигаемым при использовании печати с помощью принтера в силу того, что тяжело контролировать давление на воск с большой точностью.

Погружение в расплавленный воск. Данный подход заключается в погружении бумажной заготовки, зажатой между формой и стеклянной подложкой в расплавленный воск. Это быстрый (один чип может быть изготовлен быстрее, чем за минуту) и дешевый способ, в то же время обеспечивающий хорошее разрешение и хорошую воспроизводимость [27]. Минимальная ширина канала – приблизительно 640 мкм. К недостаткам техники можно отнести необходимость плавления воска, а также необходимость использования формы. Метод проиллюстрирован на **рис. 1.6**.

Методы, основанные на химической модификации поверхности бумаги

Обработка плазмой. Фильтровальная бумага погружается в раствор АКД в гептане и немедленно извлекается. Затем, высушивается и нагревается до 100°C на 5 минут для обеспечения связывания АКД с целлюлозой. После чего, зажимается между двух одинаковых металлических форм и подвергается обработке плазмой в вакууме [21]. Обработка плазмой предварительно гидрофобизованной бумаги, ведет к тому, что подвергнутые воздействию участки восстанавливают свои гидрофильные свойства.

Преимущество метода обработки плазмой перед методами, предполагающими создание барьеров, заключается в том, что в микрожидкостную систему легко можно встроить простые функциональные элементы, такие как переключатели, фильтры, сепараторы [28]. Еще одно достоинство метода – низкая стоимость материалов. Недостатки – длительность процедуры, растяжение заготовки под действием плазмы, приводящее к увеличению площади, подвергаемой обработке [29], необходимость использования генератора плазмы.

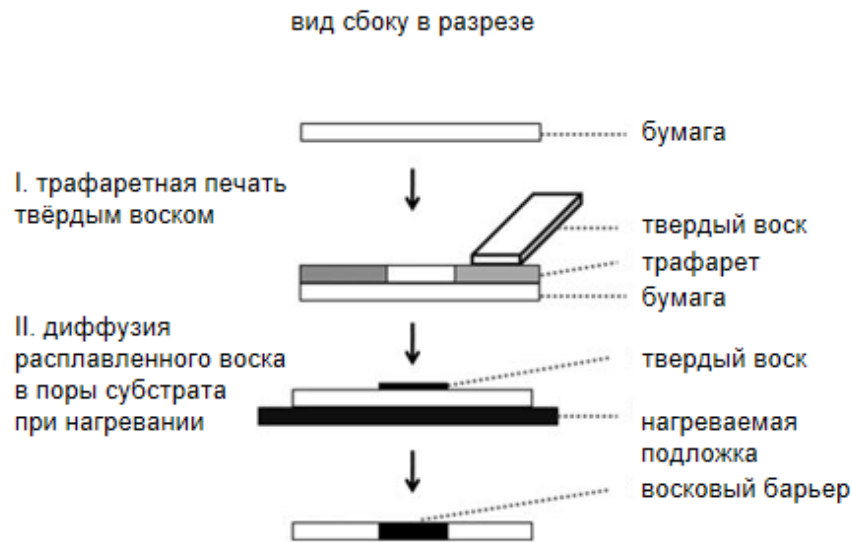


Рисунок 1.5. Принципиальная схема изготовления бумажных чипов методом восковой трафаретной печати.

Жидкостное травление. Первая стадия – погружение бумаги в раствор триметоксиоктадецилсилана (ТМОС) в гексане на 10 секунд, высушивание на воздухе в течение 5 минут и нагрев в течение часа до 100 гр. Спустя 2 часа после извлечения, гидрофобизированная бумага может быть подвергнута травлению. Оно осуществляется с помощью пропитанного водным раствором NaOH (содержащим 30% глицерина) бумажного шаблона. Он прижимается к заготовке, затем вся конструкция зажимается между двух стекол и нагревается в течение 5 минут до 60°C обеспечивая травление силанизированной фильтровальной бумаги после промывки водой устройство готово [30].

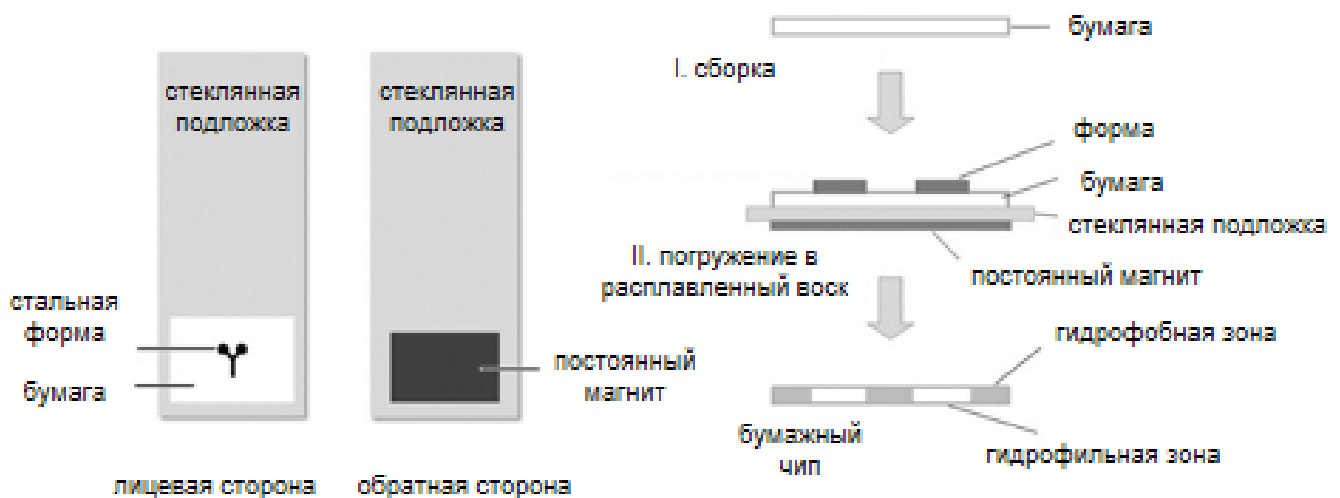


Рисунок 1.6. Изготовление бумажных чипов методом «погружения в расплавленный воск».

Принцип травления также лежит в основе метода [31] обработки поверхности бумаги, предварительно гидрофобизированной с помощью гексаметилдисилазана (ГМДС) или тетраэтилортосиликата (ТЭОС), раствором соляной кислоты путем струйной печати. Этот подход позволяет быстро изготовить чипы с высоким разрешением, проводя однократную печать. Процесс первоначальной гидрофобизации, благодаря использованию микроволновой обработки вместо нагревания, удалось сократить до 7 минут.

Струйная печать. Данный метод предполагает нанесение на бумагу с помощью струйного принтера раствора алкилкетендимера (АКД) в гептане и последующее нагревание, обеспечивающее протекание реакции между реагентом и целлюлозой [32]. Как и в случае травления, с помощью принтера на зоны детектирования наносятся растворы чувствительных реагентов.

Данный метод позволяет производить большие объемы чипов по низкой цене, объединяя достоинства ПДМС-печати (доступность и гибкость) с высоким разрешением фотолитографии и отсутствием необходимости использования дорогостоящего оборудования. Недостатки метода - необходимость модификации принтера, проницаемость гидрофобных стенок для жироподобных веществ и жидкостей с низким поверхностным натяжением, дополнительная стадия нагревания после печати.

Другие методы

Резка и обклеивание бумаги. Простейший метод изготовления. При его реализации роль стенок создаваемых каналов играют воздушные зазоры. Резка – быстрый метод, требующий лишь режущего инструмента, например, ножниц или, для выполнения чипов, обладающих более сложной формой и структурой – лазера [14], плоттера [33] или высекальной машины [10]. Скотч необходим для фиксации отдельных элементов, что вынуждает прибегать к дополнительной стадии в процессе изготовления. Вырезанная двухмерная основа, полученная путем резки бумаги, размещается между слоёв полимерной плёнки для минимизации испарения и защиты от внешних загрязнителей. Эта техника простая, быстрая, прямая и подходит для массового изготовления так же, как и для производства прототипов, кроме того, совместима с любыми видами целлюлозных материалов. Наименьшие возможные размеры элементов чипа, полученного с использованием плоттерной резки: ширина

канала – 1 мм, диаметр отверстия - 0.7 мм. Существенным и главным недостатком методики является высокая стоимость плоттера.

Лазерная печать – одностадийный процесс создания с помощью углекислотного лазера необходимого узора гидрофильных областей на бумаге, имеющей гидрофобное покрытие, такой как пергамент или восковая бумага. На обработанных участках поверхности образуются полярные гидрофильные группы, пригодные для иммобилизации тех или иных соединений, но не обеспечивающие диффузию потока жидкости. Для создания бокового потока могут быть применены микрочастицы силикагеля. Данный подход обеспечивает высокую скорость и высокое разрешение (минимальная ширина канала - 62 ± 1 мкм) [34].

Трёхмерные устройства

Рассмотренные выше техники позволяют изготовить планарные чипы, направляющие поток жидкости в пределах плоскости в одном или двух измерениях. Трёхмерные чипы, обеспечивающие перемещение потока жидкости, как в плоскости, так и в вертикальном направлении, могут быть получены посредством объединения нескольких плоских слоев бумаги, имеющих разграниченные одним из рассмотренных ранее методов гидрофильные и гидрофобные области, чередующихся со слоями водонепроницаемого полимерного материала, в качестве такого материала может быть использован двухсторонний скотч. В тех областях, где предполагается переход потока жидкости на выше- или нижележащий уровень, в полимерном материале выполняются отверстия. На **рис 1.7** представлена схема изготовления трехмерного устройства путём объединения с помощью двухстороннего скотча нескольких слоёв бумаги, предварительно размеченных методом фотолитографии. Отверстия в полимерной пленке, для обеспечения высокой скорости процесса вертикальной диффузии, были заполнены целлюлозной пастой. Реагенты наносятся до сборки всей конструкции, что помогает избежать нежелательного процесса диффузии реагентов вглубь трехмерной структуры.

Описанный принцип помогает значительно расширить возможности производимых устройств, обеспечивая быстрое, надежное и воспроизводимое распределение небольшого объема пробы по множеству зон детектирования [35], делающее простым построение градуировочных кривых. Также данный подход способствует уменьшению размеров устройства и замедлению испарения пробы.

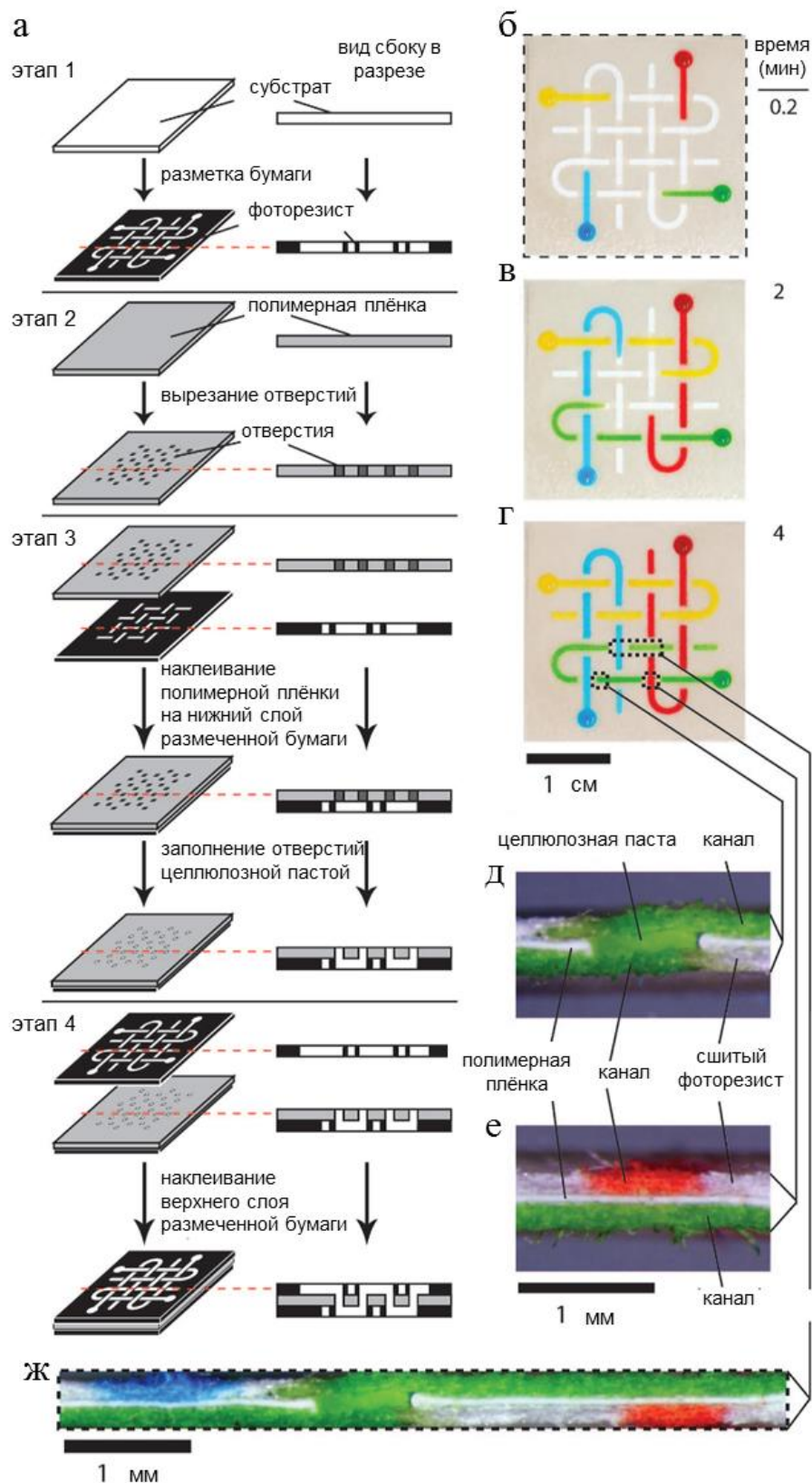


Рисунок 1.7. Трёхмерные бумажные чипы: **а)** создание путём объединения нескольких слоёв предварительно размеченной бумаги с помощью полимерной плёнки; **б)** фотография чипа, сделанные спустя 10 с после нанесения на зоны пробы водных растворов красного, жёлтого, зелёного и синего красителей; **в, г)** фотографии чипа, сделанные после нанесения растворов красителей спустя 2 и 4 мин, соответственно, потоки пересекаются несколько раз в областях, выделенных на рис. (г), при этом не смешиваясь; **д, е, ж)** изображения устройства в разрезе для участков пересечения потоков, обозначенных на рис. (г) [35].

Кроме того, подобные устройства способны обеспечивать пересечение не смешивающихся потоков жидкости, что облегчает распределение пробы и проведение многокомпонентного анализа [3]. Еще одно преимущество трёхмерных устройств – возможность изготовления чипов с использованием нескольких различных видов бумаги для одного устройства, обеспечивая, таким образом, сочетание различных функций каждого из типов материала [35]. Еще один способ объединения нескольких слоев разграниченной бумаги в трёхмерное устройство - использованием в качестве клея воска [37]. Также существует «метод оригами» [38]. Использование динамического фотоотверждения через трафарет, реализованного с помощью настольного стереолитографического трехмерного принтера для производства трехмерных чипов позволило совершить скачок вперед с точки зрения экономии времени. С того момента, как все гидрофобные барьеры созданы, процесс производства может быть завершен в течение двух минут, вне зависимости от сложности структуры [39].

3 Классификация по методам детектирования на чипе

Полученный бумажный чип представляет собой лишь совокупность ограниченных гидрофильных зон. Для получения готового аналитического инструмента, необходимо выбрать технологию регистрации аналитического сигнала. Кроме соответствия типу и концентрации аналита, составу объекта анализа, требуемой точности определения, стратегия также должна соответствовать общему принципу бумажных устройств – быть простой, массовой, энергонезависимой и недорогой. Оптические и электрохимические методы детектирования являются самыми простыми, компактными и недорогими. Поэтому они лучше всего подходит для реализации анализа на бумажных чипах и наиболее распространены [9]. В то же время в литературе описаны шесть методов детектирования на бумажных чипах: колориметрический, электрохимический, хемилюминесцентный, электрохемилюминесцентный, флуоресцентный и фотоэлектрохимический [27].

Электрохимические методы

Несмотря на достоинства колориметрического метода детектирования, электрохимические методы являются более универсальными и лучше подходят для количественного определения [40]; ЭХ методы обладают высокой чувствительностью,

позволяя производить точное количественное определение концентрации аналитов вплоть до нмоль/л. Кроме того, электрохимическое детектирование, в отличие от колориметрического, нечувствительно к условиям освещения, а также менее восприимчиво к определенным видам примесей в пробе, таким как взвешенные частицы или окрашенные вещества [13]. ЭХ методы детектирования основаны на протекающих в трехэлектродной ячейке окислительно-восстановительных процессах. На бумажных чипах электроды могут быть напечатаны методом трафаретной печати проводящими чернилами, рабочий и вспомогательный – углеродными, электрод сравнения – хлоридсеребряными. Преимущество чипов с печатными электродами – одноразовость и легкость функционирования путем химической дериватизации. Тем не менее, для реализации обычных методов, используемых для ЭХД – амперометрии и кулонометрии существует препятствие – необходимость использования громоздкого внешнего детектирующего оборудования. Однако, его количество минимально, оно энергоэкономично и в дальнейшем может быть миниатюризовано [41].

Альтернативный метод, требующий лишь простого мультиметра – контроль потенциалов течения, эти потенциалы чувствительны по отношению к присутствию заряженных полимеров, адсорбированных на поверхности бумаги. Предложена модификация целлюлозных каналов для связывания аналита и детектирование связанного аналита путем фиксации изменений потенциала течения [42]. Другая техника использует измерение электрической проводимости с помощью простого внешнего инструмента. Но большинство исследований в этой области были ограничены применениями в газовой фазе, такими как сенсоры этанола [43].

Первый бумажный чип, реализующий ЭХ метод детектирования, был предназначен для одновременного количественного определения глюкозы, лактатов и мочевой кислоты в биологических образцах. После печати электроды были химически модифицированы с помощью прусского синего для улучшения селективности к пероксиду водорода, после чего наносились определенные ферменты, катализирующие окисление аналитов, попутно восстанавливая кислород до пероксида водорода. Когда капля пробы, размещаемая в центре чипа, достигает зоны детектирования, происходит хроноамперометрия с использованием оптимального потенциала для образования пероксида водорода. Были установлены низкие пределы обнаружения в пределах клинической значимости с показателями, сравнимыми с показателями традиционных

диагностических средств [24]. Определение глюкозы с использованием хроноамперометрии обеспечивает в пять раз более низкий ПО, чем у традиционных глюкометров, и в два раза более низкий, чем у колориметрических тестов [8]. Также было предложено бумажное устройство с четырьмя электродами для использования с коммерческим ручным глюкометром [45].

Чипы, реализующие ЭХД также пригодны для экологического мониторинга, например, предложено устройство, демонстрирующее хорошую селективность по отношению качественного определения Pb(II) на уровне ppb в растворах, содержащих Zn(II) и Pb(II) методом анодной вольтамперометрии. ЭХД может быть легко совмещены с этапом разделения для улучшения чувствительности, например с хроматографическим разделением. Эффективность разделения зависит от толщины, длины и качества бумаги, находящейся на пути образца. Подобный подход предложен для одновременного определения мочевой кислоты и аскорбиновой кислоты с помощью бумажного чипа [46].

Для преодоления другого препятствия ЭХД – неспособность детектирования определенных аналитов и/или предупреждения перекрытия сигналов загрязнителей и аналита можно использовать стратегию двойного детектирования ЭХД/КД на одном чипе. Данный подход использовался для одновременного контроля содержания Au(III) и Fe(III), чьи токи восстановления перекрываются [47]. Они определяли Au(III) используя квадратноволновую вольтамперометрию в среде царской водки, и Fe(III) используя колориметрическое определение, основанное на реакции между железом и фенантролином. Бумажные чипы, реализующие электрохимический метод детектирования сочетают простоту, умеренную стоимость, портативность, экспрессность, точность, высокую чувствительность и высокую селективность при разумном выборе материала электрода и потенциала [8; 41];

Хемилюминесцентные и электрохемилюминесцентные методы.

ХЛ и ЭХЛ методы детектирования – простые, высокочувствительные методы, независимые от окружающего света, поскольку анализ производится в темноте. Разработан бумажный чип для совместного анализа глюкозы и мочевой кислоты методом хемилюминесцентной реакции между производными родамина и пероксидом водорода [48]. Перекись водорода образуется с помощью двух окислительных ферментов, иммобилизованных на отдельных каналах. Электрохемилюминесцентное

детектирование связано с ХЛ-реакцией в ходе которой люминесценция возникает и контролируется путем наложения электрического потенциала. Этот метод наследует преимущества ХЛ, такие как испускание света вне зависимости от внешнего освещения, с улучшением чувствительности и возрастанием динамического диапазона вследствие лучшего контроля реакции с помощью электрохимии [49; 50; 51]. ЭХЛ также имеет преимущества ЭХ детектирования, а именно высокую чувствительность и хороший контроль длительности и пространственного расположения реакции [49]. Первый бумажный чип с ЭХЛД был изготовлен с использованием печатных электродов и хроноамперометрии для возбуждения ЭХЛ реакции между биологическим соединением, никотинамидадениндинуклеотидом и ЭХЛ реагентом, *трис*-(бипиридин)рутением, которая приводит к эмиссии оранжевого света. С использованием камеры мобильного телефона в качестве фотосенсора, была получена градуировочная зависимость с пределом обнаружения ниже, чем предел обнаружения колориметрического измерения. Ограничением методов ХЛ и ЭХЛ детектирования – сложность подбора люминесцентной реакции, обуславливающая относительно низкую распространенность данных методов детектирования.

4 Реализация колориметрии на бумажных чипах

Большинство опубликованных работ на тему бумажных чипов посвящено методикам, предусматривающим колориметрический метод детектирования [52]. Колориметрический анализ основан на изменении окраски вследствие протекания хромогенных реакций между аналитом и фотометрическим реагентом. Колориметрические методы детектирования идеальны для простых полуколичественных и качественных измерений, в том числе для биохимических анализов. Так как позволяют фиксировать изменение окраски визуально, достаточно устойчивы и недороги. Большинство коммерчески доступных бумажных тест-полосок используют изменение окраски для качественного определения аналитов [53]. Данные факты объясняют широкую распространенность колориметрических средств самодиагностики [54].

Различные реактивы и ферменты размещаются на конечном этапе изготовления на зонах детектирования, а затем высушиваются. Первые бумажные чипы были применены для колориметрического определения глюкозы и белка в концентрациях, определение которых актуально в клинической практике [12]. Определение

содержания глюкозы было произведено с помощью реакции пробы с иодидом калия, смешанного с несколькими ферментами, которая ведет к изменению окраски зоны детектирования белая бумага становится коричневой пропорционально концентрации глюкозы. Определение содержания белка было произведено с использованием тетрабромфенолового синего, в результате взаимодействия белка с которым, наблюдается изменение окраски от желтой к синей. Эти хорошо известные колориметрические реакции обычны в анализе мочи.

Тот же метод определения был опробован на чипах изготовленных различными методами: ПДМС-печать [17], восковая печать [22], погружение в воск [25], и струйная печать самого чипа также как и реагентов [19]. Были реализованы и другие колориметрические тесты: тест на нитриты основанный на принципе реакции Грисса [26]; тест на мочевую кислоту [53]; тест на кетоны с применением пространственно разделенной онлайн двойной химической дериватизации [55]; тест на общее содержание ионов железа с использованием 1,10-фенантролина [24]; и анализ на иммуноглобулины класса IgG, открывающий двери к определению патогенов [56].

Главный недостаток визуальной фиксации изменений окраски – низкая точность. Визуальное сравнение интенсивности окраски реакционных зон ненадежно в силу множества факторов, включая ошибки восприятия цвета, невоспроизводимость освещения, различия между цветом напечатанного на этикетке образца и цветом влажной окрашенной реакционной зоны [41]. Это существенное препятствие для количественного колориметрического определения на бумажном чипе. Решение проблемы увеличения точности количественного определения – оцифровка полученного цвета. Используя ручной оптический колориметр, исследование бумаги на просвет [57], фотографирований мобильным телефоном [54], и сканерами [47; 55]. Использование программного обеспечения для обработки изображений даёт возможность фиксировать изменение интенсивности окраски, связанное с концентрацией аналита более точно, чем человеческий глаз [55]. Использование для оцифровки сканера позволяет также избежать ошибок, связанных с различным освещением. Еще один вариант - on-site измерения, фиксация сигнала с помощью камеры мобильного телефона и отправка цифрового изображения для последующей обработки off-site экспертом [54].

Широкая распространенность инфраструктуры для мобильной связи и повсеместное присутствие оснащенных фотокамерами мобильных телефонов делает подобный обмен возможным. Это позволяет улучшить эффективность сбора данных при использовании меньшего количества персонала, для лучшего разворачивания ресурсов. Однако, условия эксперимента такие как освещение, чувствительность камеры и фоновый цвет бумаги, которые могут меняться с течением времени или между партиями чипов остаются источниками интерпритационных ошибок. Данные ошибки могут быть минимизированы если параллельно с пробой используя внутренний калибровочный стандарт на том же устройстве в тех же условиях [57].

Описано использование струйной печати АКД для разметки шестизонного чипа для определения нитрит-ионов и мочевой кислоты и дешёвого настольного сканера для оцифровки изображения. Неизвестный раствор был размещен в зоне детектирования и в пять раз разбавленный стандартный на остальном чипе, затем вводились индикаторные реагенты в центральную зону. Было продемонстрировано увеличение надежности и точности, приближающее их к показателям традиционной электронной спектроскопии. Аналогично, разработан древовидный дизайн чипа, позволяющий устройству самокалиброваться для исключения систематической погрешности [58].

Чип обеспечивает одинаковый поток водной фазы из «ствола» во множество «ветвей», в каждой из которых имеет место определение одного аналита. После завершения анализа пользователю легко сравнить цвет неизвестного образца с контрольным. Другой подход для увеличения точности и помощи в визуальном чтении – использование множества индикаторов для одного аналита, имеющих различную окраску и реагирующих с различными концентрациями аналита [52]. Данный подход может быть завершён внесением фермента окисления, образующего пероксид водорода в количестве, пропорциональном концентрации аналита, и размещением индикаторов, реагирующих с различными концентрациями пероксида водорода. Этот метод был использован для разработки девятиканального чипа для совместного определения глюкозы, лактатов и мочевой кислоты в концентрациях, актуальных в клинической практике и продемонстрировал значительное улучшение в точности регистрации [52].

Наночастицы золота и серебра обладают высокими коэффициентами светопоглощения. Так как их цвет сильно зависит от их размера, их агрегация и

диссоциация ведет к изменению цвета, что даёт возможность использовать их в качестве индикаторов. Показано, что молекулы ДНК, сшитые наночастицами золота, могут быть использованы на бумаге для биодетектирования [59]. При добавлении раствора аналита, агрегированные наночастицы диссоциируют в результате чего изменяется окраска. Бумажная основа служит защитой от неспецифических взаимодействий, делающих агрегаты наночастиц стабильными. Чувствительное определение аденозина и эндонуклеазы было произведено и с использованием ДНК аптамеров. Анализ может быть обобщен для многих аналитов. Для производства детектора меди, наночастицы серебра были функционализированы с помощью гомоцистеина и дитиотреитола и размещены на бумажном чипе. Были зафиксированы изменения окраски наночастиц серебра при добавлении меди, вызванные агрегацией через карбоксильные и аминогруппы связывающих наночастицы молекул гомоцистеина и дитиотреитола [60]. Данная методика продемонстрировала высокую чувствительность: предел обнаружения составляет 7.8 нмоль/л.

5 Биодизельное топливо. Определение глицерина и металлов

Биодизельное топливо является относительно новым, возобновляемым и экологически безопасным альтернативным источником энергии, используемым, как правило, в виде смесей с ископаемым топливом, реже – в чистом виде. Данный вид топлива биоразлагаем, минимально токсичен, способен заменить дизельное топливо нефтяного происхождения как горючее для бойлеров и двигателей внутреннего сгорания после некоторой модификации силовых установок (при использовании в смесей биодизеля с топливом нефтяного происхождения модификация не требуется), не вызывая существенного падения производительности. Кроме того, сжигание биодизельного топлива не приводит к выбросам сульфатов, ароматических соединений и прочих разрушающих окружающую среду веществ. Вклад в выбросы диоксида углерода незначителен при условии реализации полного цикла производства, включающего получение растительного сырья, производство масла и синтез топлива [61].

Главный промышленный способ синтеза биодизельного топлива основан на реакции переэтерификации растительных, реже – животных жиров с низшим спиртом (как правило, метиловым, реже – этиловым или изопропиловым) в присутствии катализатора [62]. В качестве побочного продукта образуется большое количество

глицерина. Несмотря на то, что глицерин практически нерастворим в биодизельном топливе, в фазе сложных эфиров после реакции могут оставаться следы глицерина. Присутствие глицерина в составе биодизельного топлива может стать причиной снижения производительности и выхода из строя двигателя вследствие образования в узлах силовой установки твёрдых отложений [63]. Кроме того, содержание в сжигаемом топливе глицерина может стать причиной выбросов в атмосферу токсичного акрилового альдегида [64].

В качестве упомянутого выше катализатора могут выступать соединения магния или кальция, также, соединения этих металлов часто используются в качестве водоотнимающих агентов при сушке готового топлива [65]. Присутствие в топливе значительных количеств металлов, так же, как и присутствие значительного количества глицерина, может вести к образованию твердых отложений в узлах двигателя, наличие которых снижает производительность, ускоряет износ деталей, и впоследствии может стать причиной выхода силовой установки из строя [66].

Таким образом, содержание глицерина, а также содержание кальция и магния – важные показатели качества биодизельного топлива. На территории Европейского Союза предельно допустимые концентрации в биодизельном топливе установлены соответствующими нормативными актами на уровне 200 мкг/г для глицерина [67] и 5 мкг/г для суммарного содержания кальция и магния [68].

В виду ряда упомянутых ранее достоинств, которыми обладает биодизельное топливо, его производство и использование составляют перспективную и динамично развивающуюся отрасль энергетики. Следовательно, контроль качества биодизельного топлива, в том числе определение содержания глицерина, кальция и магния – актуальная аналитическая задача. Для её решения на настоящий момент предложен широкий спектр аналитических методик. Сравнение ряда существующих методик проиллюстрировано в **табл 1.1**.

Для определения кальция и магния в биодизельном топливе применяются в основном методы атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектроскопии, позволяющие производить быстрое и точное одновременное определение малых содержаний аналитов. Пробоподготовка биодизеля при использовании данных методов, как правило, заключается в растворении образца в органическом растворителе или образовании эмульсий. Данные процедуры производятся с целью

Таблица 1.1. Аналитические характеристики некоторых существующих методов определения глицерина, кальция и магния в биодизельном топливе.

Аналит	Масса пробы	Пробоподготовка	Метод анализа	ПО	Ссылка
Ca, Mg	-	Растворение образца в ксилоле	ИСП-АЭС	6 мкг/г (Ca), 0.3 мкг/г (Mg)	[69]
Ca, Mg	2.5 г	Растворение образца в этаноле	ЭТИ-ИСП-АЭС	0.03 мкг/г (Ca), 0.005 мкг/г (Mg)	[70]
Ca, Mg	1 г	Образование эмульсии	ПААС	0,03 мкг/г (Ca), 0,11 мкг/г (Mg)	[71]
Ca, Mg	10 мг	Растворение образца в изопропанолe	СФМ	0.6 мкг/г (Ca), 0.4 мкг/г (Mg)	[66]
Mg	-	Жидкостно-жидкостная экстракция	ИВА	0,007 мкг/г	[72]
Ca, Mg	10 г	Жидкостно-жидкостная экстракция под действием УЗ	Ионная хроматография	0,11 мкг/г (Mg), 0,23 мкг/г (Ca)	[73]
Ca, Mg, глицерин	200 мг	Жидкостно-жидкостная экстракция	Капиллярный электрофорез	0.07 мкг/г (Mg), 0.12 мкг/г (Ca), 0.12 мкг/г (глицерин)	[74]
Глицерин	4 г	Жидкостно-жидкостная экстракция	ВЭЖХ-ИАД	1.0 мкг/г	[75]
Глицерин	0,1 г	Разбавление в гептане и силирование	ГХ	20 мкг/мл	[76]
Глицерин	25 г	Жидкостно-жидкостная экстракция	ВЭЖХ-РД	30 мкг/мл	[77]
Глицерин	20 мг	Сорбционное выделение	ГХ-МС	0,04 мкг/мл	[78]
Глицерин	15.4 мг	Жидкостно-жидкостная экстракция	Флуориметрия	0.036 мкг/мл	[79]
Глицерин	1 г	Жидкостно-жидкостная экстракция	СФМ	1.0 мкг/мл	[80]

уменьшения вязкости пробы. Также существует ряд публикаций, посвященных применению для определения кальция и магния в биотопливе спектрофотометрии, ионной хроматографии, капиллярного электрофореза и электрохимических методов. В этих случаях пробоподготовка включает стадию жидкостно-жидкостной экстракции.

Для определения глицерина описано применение хроматографических, электрохимических, биосенсорных, спектрофотометрических, люминесцентных и хемилюминесцентных методов анализа [81]. Наибольшее распространение имеют хроматографические методы. Как ВЭЖХ, так и ГХ в сочетании с подходящими детекторами, обеспечивают низкие ПО и широкие диапазоны определяемых концентраций. Однако, хроматографические методы имеют существенный недостаток: обычно их применение для определения глицерина в биотопливе сопряжено с

длительной и трудоёмкой процедурой пробоподготовки, включающей стадии жидкостно-жидкостной экстракции и центрифугирования для разделения образующихся стойких эмульсий. Кроме того, в случае ГХ необходимо проведение предварительной дериватизации.

В целом, все предложенные методики определения кальция, магния и глицерина в биодизельном топливе основаны на применении дорогостоящих аналитических проборов, предполагают раздельное определение аналитов, и как правило, включают длительные процедуры пробоподготовки.

6 Заключение

В литературном обзоре были описаны основные методы создания бумажных чипов, используемые в настоящее время и наиболее распространенные методы детектирования, реализуемые при практическом применении подобных устройств. Также рассмотрены существующие методики определения глицерина, кальция и магния в биодизельном топливе. Основными методами определения содержания в составе биодизельного топлива кальция и магния являются методы атомной спектроскопии, для определения глицерина наиболее часто применяются методы газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В результате анализа представленного обзора литературы в контексте поиска путей достижения ранее обозначенной цели работы, были сделаны выводы, согласно которым:

- наиболее простым методом изготовления бумажных чипов, не предполагающим использования дорогих или труднодоступных материалов, не требующим применения труднодоступного оборудования, и в тоже время, обеспечивающим хорошее разрешение и хорошую воспроизводимость является метод погружения в расплавленный воск; наиболее доступным материалом является фильтровальная бумага;
- Оптимальным методом детектирования на чипе, предназначенном для многокомпонентного анализа on-site является колориметрический метод. В качестве средства регистрации аналитического сигнала предпочтительно использование сканера;

- проведение анализа биодизельного топлива на бумажном чипе требует выделения целевых аналитов в водную фазу методом жидкостно-жидкостной экстракции.

- В качестве референтных методов анализа целесообразно использовать метод ВЭЖХ-РД для определения глицерина, и метод ИСП-АЭС для определения металлов.

Изучение литературных данных позволило уточнить цель работы, а также сформулировать задачи, решение которых позволит достичь поставленной цели.

Цель работы: разработка бумажного чипа для экспрессного колориметрического одновременного определения глицерина, кальция и магния в биодизельном топливе.

Задачи работы:

- Разработка топологии бумажного чипа для одновременного колориметрического определения глицерина, магния и кальция в биодизельном топливе.

- Оптимизация технологии изготовления бумажного чипа методом погружения в расплавленный воск.

- Разработка общей схемы колориметрического определения глицерина, магния и кальция в биодизельном топливе на бумажном чипе.

- Оптимизация условий жидкостно-жидкостного выделения аналитов.

- Проверка работоспособности разработанной схемы при анализе реальных объектов и подтвердить правильность полученных результатов референтными методами (ВЭЖХ-РД, ИСП-АЭС).

II. Глава. Экспериментальная часть

1 Средства измерения, оборудование, реактивы

Использованное оборудование

1. Электронные весы «Pioneer PA-214C» (Ohaus, США), 2-ой класс точности, предел взвешивания 210 г, дискретность 0,1 мг.
2. Атомно-эмиссионный спектрометр ICPE-9000 с индуктивно-связанной плазмой (Shimadzu, Япония).
3. Ультразвуковая ванна «УЗВ-1,3» (Сапфир, Россия).
4. Шкаф сушильный «LF-25/350-VS2» (ЛОИП, Россия).
5. Система ВЭЖХ «LC-20 Prominence», (Shimadzu, Япония).
6. Многофункциональное устройство «Brother DCP7030R», (Brother, США)
7. Колбы мерные вместимостью 50, 100, 200 мл (ГОСТ 1770-74).
8. Дозаторы пипеточные 0,1 – 1 мл, 10 – 100 мкл, 1 – 5 мл (Ленпипет, Россия).
9. Химические стаканы вместимостью 50, 250, 1000 мл (ГОСТ 25336).
10. Флаконы пенициллиновые (ГОСТ 53416-2009).
11. Деионизатор воды «ДВ-1» (ЦветХром, Россия).
12. Плита нагревательная «ЛН-302» (ЛОИП, Россия). Максимальная температура нагрева 375 °С.

Приготовление растворов

Ацетатно-аммиачный буферный раствор с $\text{pH}=4,73$ готовили путём растворения 1,224 г ледяной уксусной кислоты и 2,5676 г ацетата аммония тригидрата в деионизованной воде в мерной колбе на 200 мл. Раствор устойчив в течение нескольких недель.

Раствор гидроксида натрия концентрацией 0,1 М был приготовлен растворением 0,2 г гидроксида натрия в 10 мл деионизованной воды. Данный раствор устойчив в течение 2 недель.

Раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) с концентрацией 0,03 моль/л и $\text{pH}=9$ готовили путём растворения 2,52 г динатриевой соли ЭДТА в 250 мл деионизованной воды. Затем pH корректировали добавлением необходимого объема 0,1 моль/л раствора NaOH. Изменение pH контролировали с помощью индикаторной бумаги.

Раствор ацетилацетона концентрацией 150 г/л в ацетатно-аммиачном буферном растворе были приготовлены путём растворения 1,5 г ацетилацетона в 10 мл буферного раствора. Растворы с концентрациями 50; 80; 120 г/л получали путем разбавления исходного 150 г/л раствора буферным раствором. Растворы ацетилацетона готовили каждый день.

Раствор периодата натрия концентрацией 4 г/л был приготовлен растворением 0,4 г кристаллической соли в 100 мл буферного раствора. Растворы с концентрациями 1; 2; 3 г/л получали путем разбавления исходного 4 г/л раствора буферным раствором. Растворы периодата натрия готовились каждый день.

Раствор карбоната натрия концентрацией 10 г/л был приготовлен растворением 1 г кристаллической соли в 100 мл деионизованной воды. Растворы с концентрациями 1; 2,5; 5 г/л получали путем разбавления исходного 10 г/л раствора деионизованной водой.

Растворы эриохрома чёрного Т (ЭХЧТ) с концентрацией 5,5 г/л были приготовлены растворением четырёх навесок по 0,055 г сухого реактива в четырех порциях по 10 мл растворов карбоната натрия с различными концентрациями. Серии растворов с концентрациями ЭХЧТ 0,4; 0,7; 1; 1,5; 2,0; 2,5; 3,5 г/л получали путем разбавления исходных 5,5 г/л ЭХЧТ растворов растворами карбоната натрия с теми же концентрациями.

Раствор глицерина в биодизельном топливе концентрацией 200 мкг/г готовили растворяя 200 мг глицерина в 10 мл метанола, затем 1 мл полученного метанольного раствора глицерина смешивали с 99 г биотоплива.

Раствор кальция в биодизельном топливе концентрацией 50 мкг/г был приготовлен путём растворения 31,9 мг 2-этилгексаноата кальция в 50 г биодизельного топлива при перемешивании.

Раствор магния в биодизельном топливе концентрацией 50 мкг/г был приготовлен путём растворения 20,4 мг 2-этилгексаноата магния в 50 г в биодизельного топлива при перемешивании.

2 Синтез биодизельного топлива

Биодизельное топливо было синтезировано из рапсового масла по реакции переэтерификации с метиловым спиртом в присутствии гидроксида натрия в качестве щелочного катализатора. Синтез проводили в стеклянном химическом стакане, куда

помещали 300 мл метилового спирта и при постоянном перемешивании добавляли 1 г гидроксида натрия. Перемешивание продолжали до полного растворения NaOH с помощью магнитной мешалки. Термостойкий стеклянный химический стакан использовали для нагревания до температуры 60°C 500 г рапсового масла. Затем, полученные растворы смешивали в стакане на мешалке для проведения реакции переэтерификации. Синтез биодизельного топлива производили при температуре 60°C и при постоянном перемешивании в течение 4 часов. По окончании реакции смесь реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разделяли образовавшиеся фазы глицерина и метиловых эфиров с помощью делительной воронки. Нижнюю фазу глицерина отбрасывали, а верхнюю, преимущественно состоящую из смеси метиловых эфиров высших жирных кислот, промывали 0,1 М раствором соляной кислоты и несколько раз дистиллированной водой. Промывание повторяли до тех пор, пока промывные воды не становились прозрачными. После этого смесь метиловых эфиров переносили в термостойкий стакан и нагревали на плитке с постоянным перемешиванием до температуры 80°C с целью удаления следов метанола, после чего биодизельное топливо подвергали сушки над молекулярными ситами (Туре 3А, SAFC) для удаления остаточной воды.

3 Изготовление бумажных чипов

В качестве основы для изготовления чипов была использована фильтровальная бумага. В доступных образцах фильтровальной бумаги были обнаружены следы Са и Mg, оказывающие мешающее влияние при определении данных металлов с помощью бумажных чипов. Для удаления следов металлов фильтровальную бумагу перед изготовлением чипов промывали 0,03 М раствором ЭДТА с рН=9, а затем 2-3 раза деионизованной водой. После промывки бумагу высушивали в сушильном шкафу.

Предлагаемая методика изготовления бумажного чипа основана на описанном в литературе методе погружения в расплавленный воск. Вместо воска был использован парафин, близкий по свойствам и химическому составу к воску. Нами предложена предварительная процедура спекания бумажного субстрата с полимерной плёнкой. Проведение предложенной предварительной стадии преследует следующие цели:

- уменьшение площади контакта пробы с внешней средой для предотвращения преждевременного высыхания и случайных загрязнений;

- предотвращение деформаций поверхности фильтровальной бумаги при смачивании;
- увеличение жесткости конструкции чипа.

Следовательно, модифицированная методика включает два этапа: 1) спекание фильтровальной бумаги с полимерной плёнкой 2) погружение бумажной заготовки, зажатой между формой и стеклянной подложкой в расплавленный парафин. Форма выполнена из стеклотекстолита путем фрезирования. На **рис. 2.1** изображена схема реализации данного процесса.

На первой стадии плёнка Parafilm® помещается между предварительно очищенной от следов металлов фильтровальной бумагой и любым другим пористым материалом, например, любым видом бумаги, данный элемент не контактирует с пробой и его роль ограничивается обеспечением жесткости конструкции. Затем заготовка сжимается двумя стёклами и помещается в сушильный шкаф, нагретый до 60°C на 10 минут. Данные продолжительность и температура являются оптимальными: увеличение температуры или длительности нагревания приводит к чрезмерной диффузии компонентов состава плёнки в поры бумаги. Уменьшение, в свою очередь – к недостаточной. В первом случае на фильтровальной бумаге возникают гидрофобные по всей толщине области, во втором адгезия плёнки недостаточна: при смачивании бумага на некоторых участках отслаивается и деформируется.

На второй стадии полученную заготовку зажимают между стеклянной подложкой и формой, погружают в расплавленный и нагретый до 130-135°C парафин и немедленно извлекают. При этом происходит гидрофобизация непокрытых формой участков бумажной заготовки, обеспечивающая создание гидрофильной области заданной геометрии. Температура в диапазоне 130-135°C оптимальна. Большие значения приводят к диффузии расплава под форму, меньшие – к недостаточной диффузии на непокрытых формой участках. Топология чипа представлена на **рис 2.2**. Чип состоит из зоны нанесения водной эмульсии и двух зон для детектирования, соединенных гидрофильными каналами. Процесс изготовления бумажного чипа завершается нанесением на зоны детектирования растворов фотометрических реагентов. В зону детектирования, предназначенную для определения глицерина вносится раствор ацетилацетона в ацетатно-аммиачном буфере (pH=4,73), В зону детектирования, предназначенную для определения металлов вносится раствор

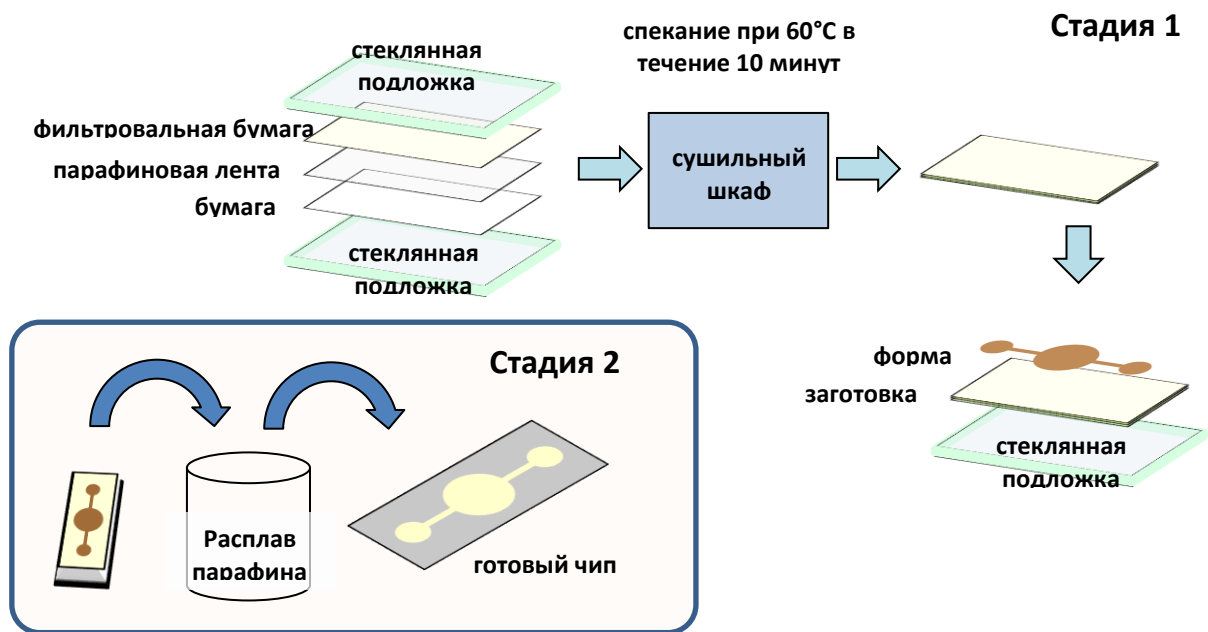


Рисунок 2.1 Принципиальная схема реализации предложенной методики изготовления бумажного чипа.

эриохрома чёрного Т в растворе карбоната натрия. Объем раствора, обеспечивающий

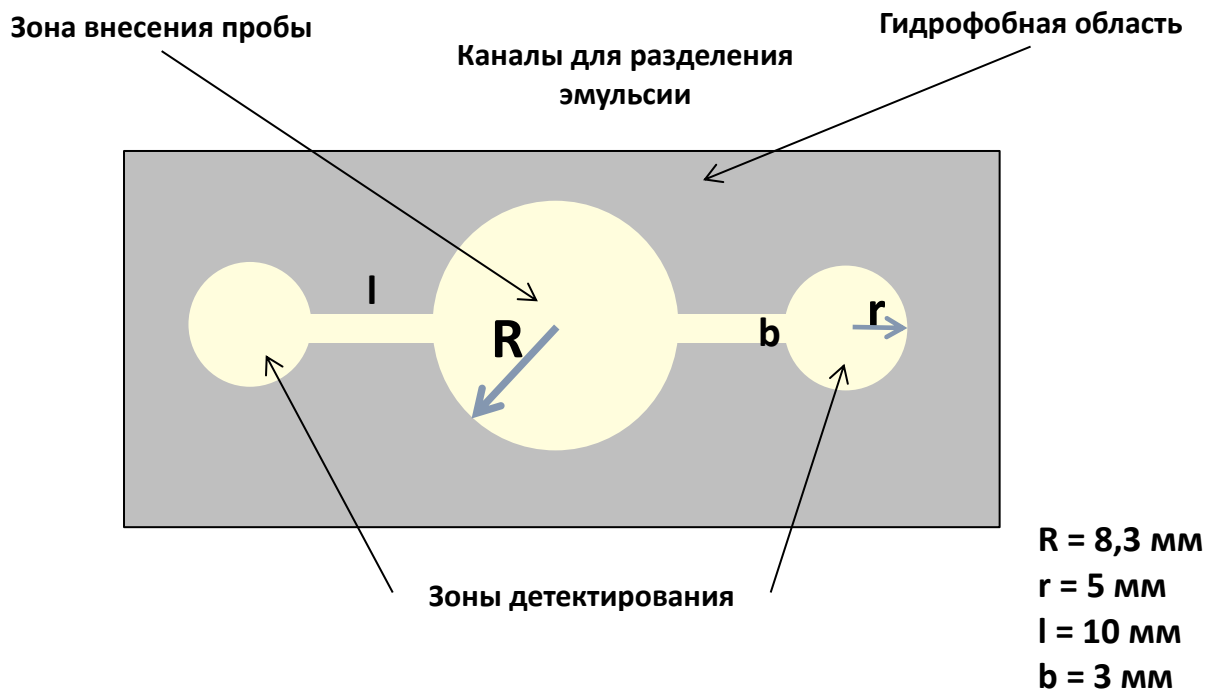


Рисунок 2.2 Предложенная топология чипа

наиболее равномерное окрашивание и позволяющий избежать диффузии реагентов за пределы реакционных зон, в обоих случаях составляет 5 мкл.

4 Схема анализа

Пробоподготовка биодизельного топлива для одновременного определения глицерина, магния и кальция предполагает жидкостно-жидкостную экстракцию

аналитов в водную фазу без последующего центрифугирования с целью разделения эмульсии. Согласно разработанной схеме анализа на чипе, изображенной на **рис. 2.3**, в эппендорф помещают 150 мкг пробы биодизельного топлива и 150 мкл раствора периодата натрия в ацетатно-аммиачном буферном растворе. Затем, эппендорф помещается в УЗ-ванну, где подвергается УЗ-обработке. При этом происходит жидкостно-жидкостная экстракция аналитов в водную фазу и окисление глицерина до формальдегида. По завершении экстракции со дна эппендорфа отбирают 100 мкл водной эмульсии и наносят на зону чипа, предназначенную для внесения пробы. При нанесении водной эмульсии биодизельного топлива в центральную зону начинается процесс диффузии по каналам в направлении реакционных зон. При этом скорость диффузии водной фазы существенно больше, чем скорость потока органической фазы. Кроме того, органические компоненты удерживаются на гидрофобных парафиновых стенках бумажного чипа. Это обеспечивает разделение водной и органической фаз. Достигнув зон детектирования, металлы и формальдегид вступают в хромогенные реакции, образуя окрашенные аналитические формы. Затем, с помощью сканера

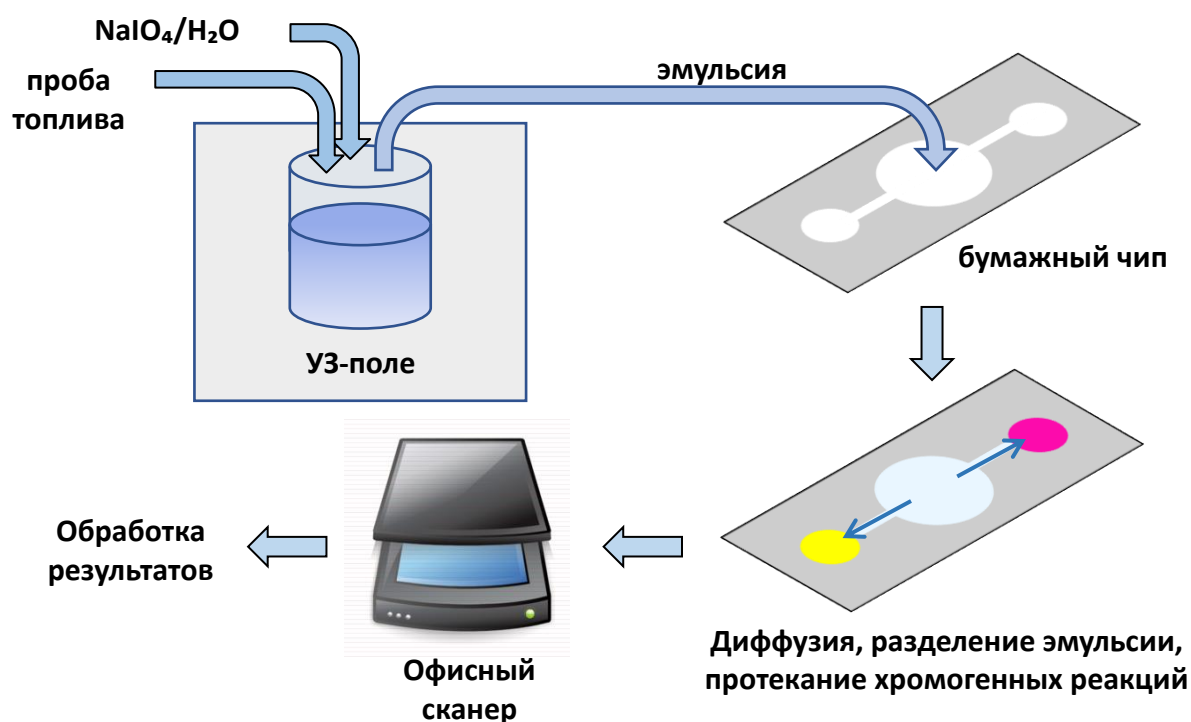


Рисунок 2.3 Предложенная схема анализа.

получают изображение чипа с окрашенными зонами. Полученные изображения обрабатываются с помощью программы Corel® PHOTO-PAINT™ X7.

Ионы кальция и магния в щелочной среде на чипе образуют с эриохромом чёрным Т интенсивно окрашенные в пурпурный цвет (максимум спектра поглощения

наблюдается при длине волны 540 нм) хелаты по уравнению (1) на **рис. 2.4**. Формальдегид образуется в результате окисления глицерина периодатом натрия в среде ацетатно-аммиачного буферного раствора по реакции (2). В зоне детектирования раствор формальдегида смешивается с раствором ацетилаcetона (также в ацетатно-аммиачном буферном растворе), в результате, согласно механизму синтеза пиридинов по Ганчу, образуется аналитическая форма (3,5-диацетил-1,4-дигидро-2,6-лутидин) по

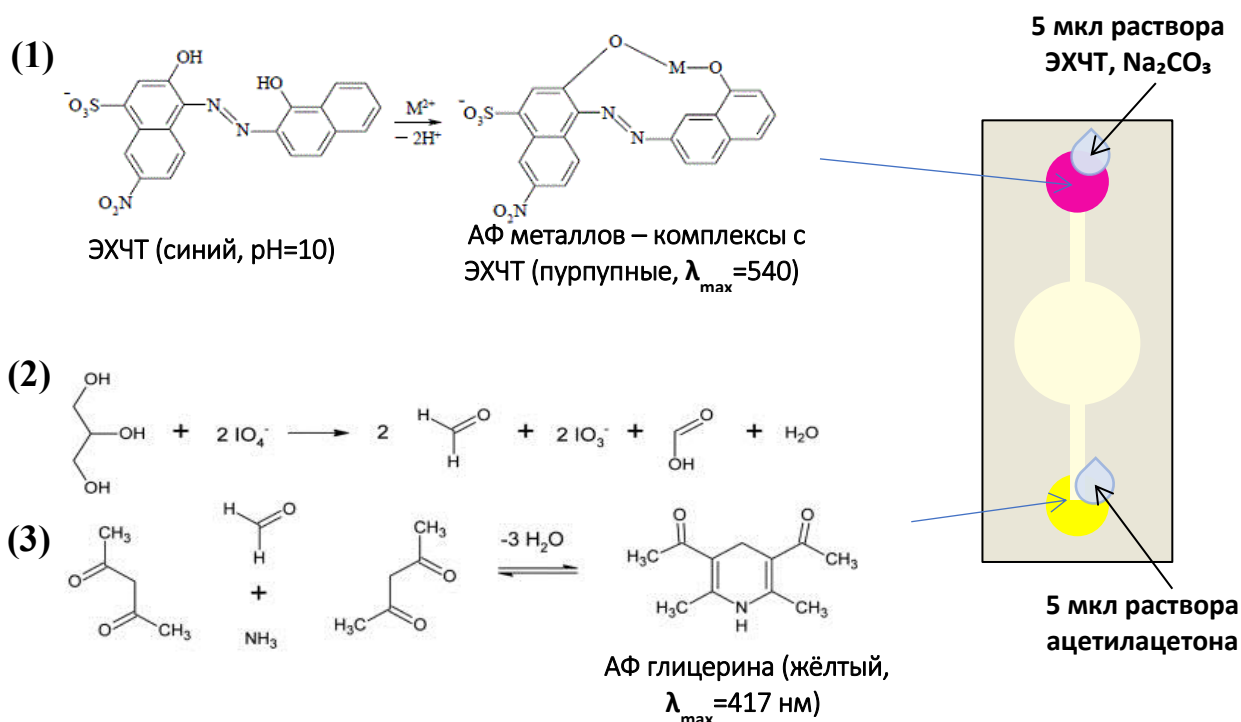


Рисунок 2.4 Используемые хромогенные реакции.

уравнению (3), интенсивно окрашенная в желтый цвет (максимум спектра поглощения наблюдается при длине волны 417 нм).

5 Регистрация аналитического сигнала. Методика обработки данных

Изображение чипа с окрашенными зонами фиксируется с помощью офисного сканера. Полученные изображения обрабатываются в программе Corel® PHOTO-PAINT™ X7 согласно схеме, приведенной на **рис. 2.5**.

Обработка изображений включает конвертацию из цветовой модели RGB в цветовую модель CMYK. Затем, для каждой зоны детектирования производится разложение цвета на составляющие компоненты. Программные средства позволяют охарактеризовать каждый компонент (каждый канал) рядом параметров, таких как: максимальная и средняя интенсивности, а также медиана интенсивности. Сравнение доступных характеристик каждого канала для каждой их зон, содержащих различные

концентрации аналитической формы, позволяет выбрать канал, характеристики которого проявляют значительный воспроизводимый отклик на изменение содержания аналитической формы в зоне детектирования, а также конкретный параметр данного канала, используемый в дальнейшем в качестве аналитического сигнала. В случаях аналитических форм, образующихся в результате хромогенных реакций, использование которых предусмотрено предложенной схемой анализа, на

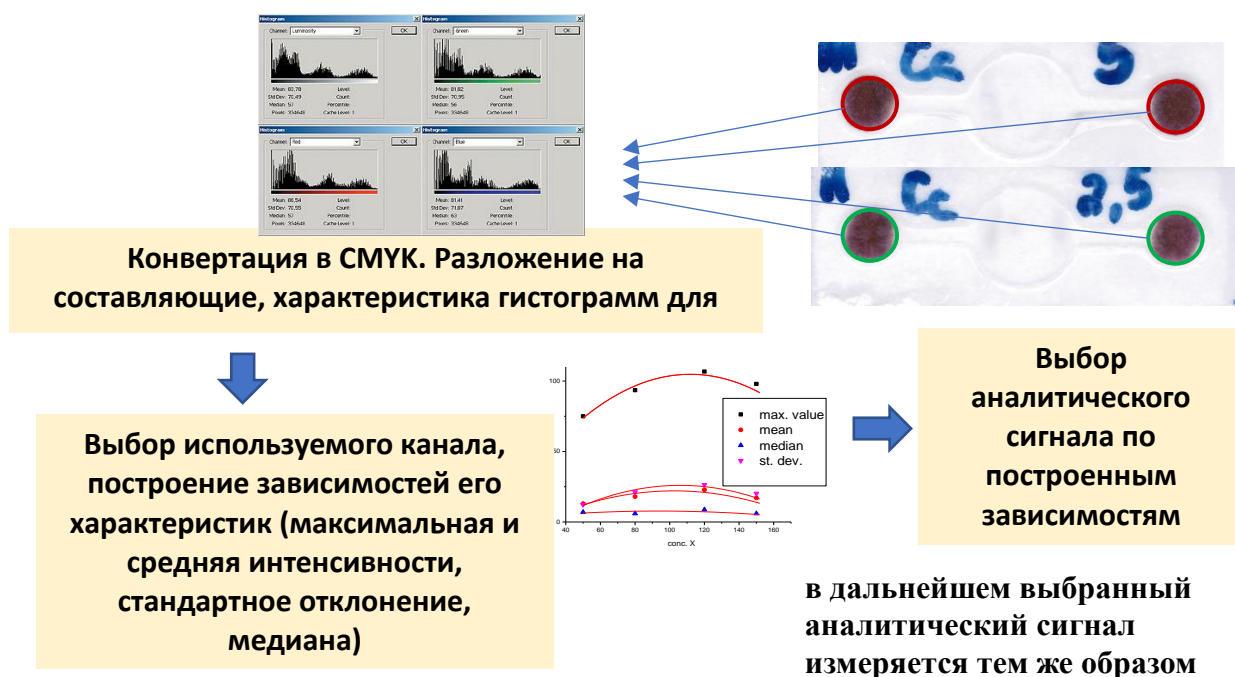


Рисунок 2.5 Обработка данных.

концентрацию каждой из них существенный отклик проявляет лишь один канал. Для АФ глицерина – жёлтый, для АФ Са и Mg – пурпурный.

6 Анализ реальных объектов. Проверка правильности результатов

Предложенная схема анализа была апробирована на реальных объектах: пробах биодизельного топлива. Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено» и методом ВЭЖХ-РД для глицерина и методом ИСП-АЭС для кальция и магния.

Был исследован реальный образец, затем, для осуществления проверки методики методом «введено-найдено», были введены добавки аналитов. Внесение добавки Са и Mg было произведено путём растворения в образце биодизельного топлива 2-этилгексанатов соответствующих металлов.

Условия ВЭЖХ определения глицерина: колонка ODS Hypersil 2,1x100 мм, 5 мкм, изократический режим элюирования, состав подвижной фазы: 90% ацетонитрил 10% вода, рефрактометрический детектор.

III. Глава. Результаты и обсуждение

1 Оптимизация условий определения глицерина

При оптимизации условий определения глицерина проводился анализ модельного раствора биодизельного топлива с концентрацией глицерина 200 мкг/г.

Выбор оптимальной концентрации периодата натрия

Периодат служит для окисления глицерина в формальдегид в процессе экстракции в водной фазе: при возрастании концентрации периодата в экстрагенте увеличивается количество образующегося формальдегида. Однако, использование растворов с высокой концентрацией приводит к протеканию побочных реакций, вследствие чего уменьшается интенсивность окраски соответствующей зоны на чипе.

Было исследовано влияние концентрации периодата натрия на величину аналитического сигнала. Время анализа – 20 минут. Концентрация ацетилацетона – 120 г/л. Полученная зависимость представлена на рис. 3.1. наибольшее значение аналитического сигнала наблюдается при использовании раствора периодата натрия с концентрацией 3 г/л.

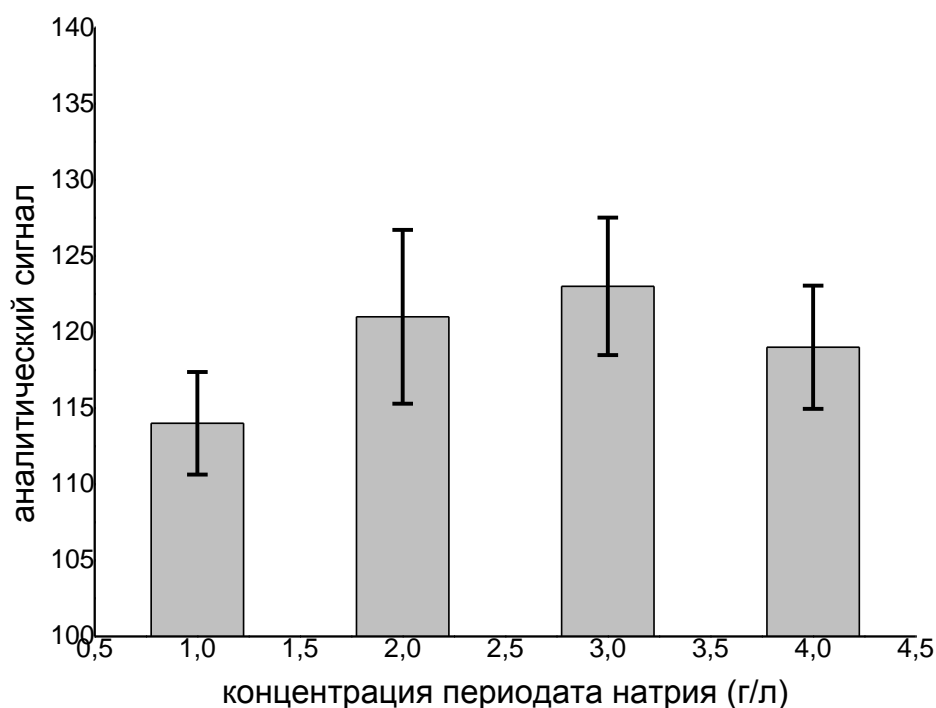


Рисунок 3.1 Зависимость аналитического сигнала от концентрации раствора периодата натрия.

Выбор оптимальной концентрации ацетилацетона

Ацетилацетон выступает в роли фотометрического реагента для определения глицерина. Формальдегид, образующийся в результате окисления глицерина периодатом натрия в зоне детектирования вступает в хромогенную реакцию с ацетилацетоном и аммиаком с образованием 3,5-диацетил-1,4-дигидро-2,6-лутидина.

Было исследовано влияние концентрации ацетилацетона на величину аналитического сигнала. Время анализа – 20 минут. Концентрация раствора периодата натрия – 3 г/л. Полученная зависимость представлена на рис. 3.2. Аналитический сигнал выходит на плато при концентрации ацетилацетона, равной 120 г/л. Концентрации ацетилацетона, равной 120 г/л достаточно для количественного перевода формальдегида в аналитическую форму. Дальнейшее увеличение концентрации реагента на чипе не приводит к увеличению аналитического сигнала.

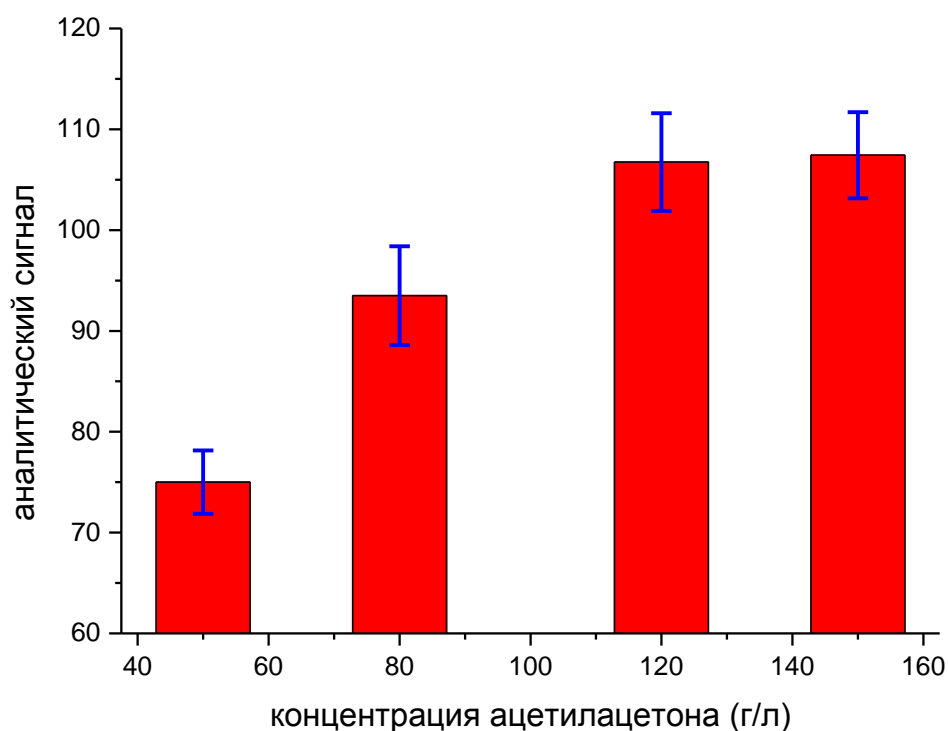


Рисунок 3.2 Зависимость аналитического сигнала от концентрации раствора ацетилацетона.

Выбор времени реакции

Реакция Ганча является кинетически замедленной, кроме того, требуется время для транспорта формальдегида из зоны пробы в зону детектирования. Следовательно, время реакции также нуждается в оптимизации.

Была изучена зависимость аналитического сигнала от времени реакции при концентрации периодата натрия 3 г/л и концентрации ацетилацетона 120 г/л. Полученная зависимость представлена на **рис 3.3**. Наиболее интенсивная окраска зоны детектирования наблюдается спустя 20 минут после размещения водной эмульсии биодизельного топлива в зоне пробы. Дальнейшее уменьшение аналитического сигнала является следствием высыхания зоны детектирования, приводящего к окислению аналитической формы кислородом воздуха.

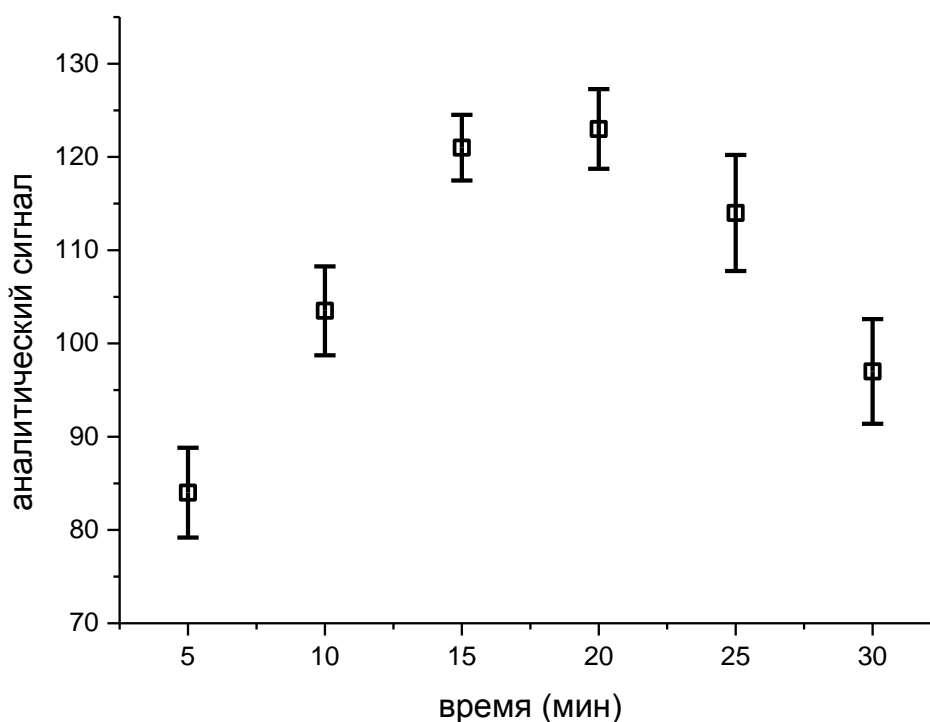


Рисунок 3.3 Зависимость аналитического сигнала от времени

2 Оптимизация условий определения кальция и магния

При оптимизации условий определения кальция и магния проводился анализ модельных растворов биодизельного топлива с концентрациями кальция и магния 5 мкг/г.

Выбор концентрации эриохрома чёрного Т

Было исследовано влияние концентрации ЭХЧТ на величину аналитического сигнала. Фотометрический реагент растворяли в растворе карбоната натрия концентрацией 5 г/л. Полученные зависимости изображены на **рис. 3.4** и **рис. 3.5** для кальция и магния, соответственно.

Концентрация ЭХЧТ, равная 3,5 г/л достаточна для количественного протекания реакций комплексообразования между ЭХЧТ и определяемыми металлами.

Кальций

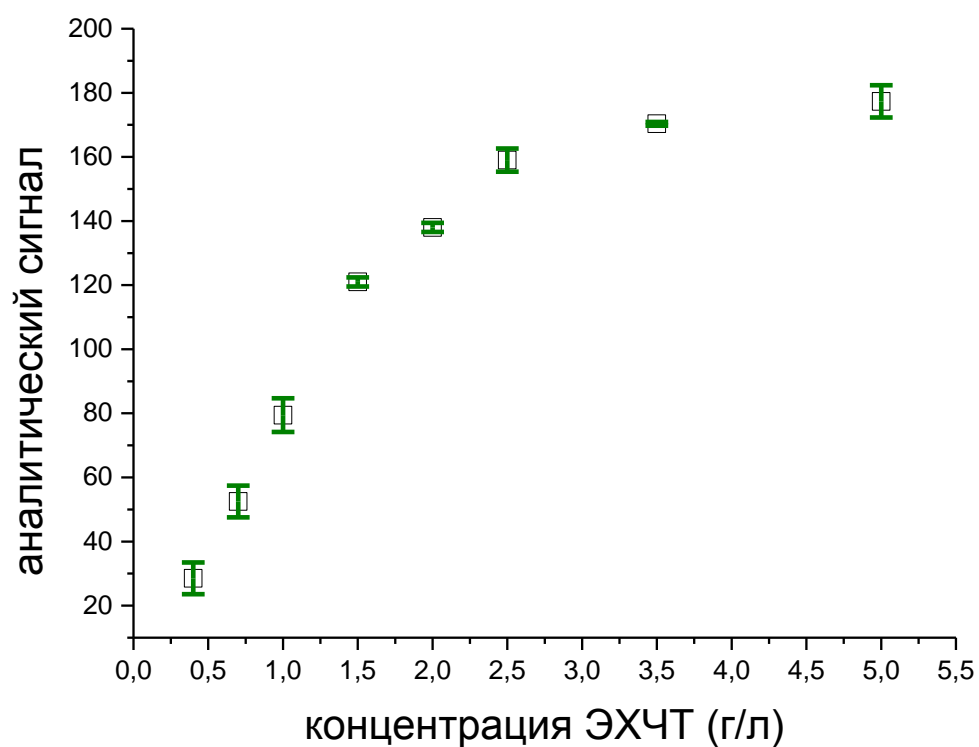


Рисунок 3.4 Зависимость аналитического сигнала от концентрации ЭХЧТ для кальция.

Магний

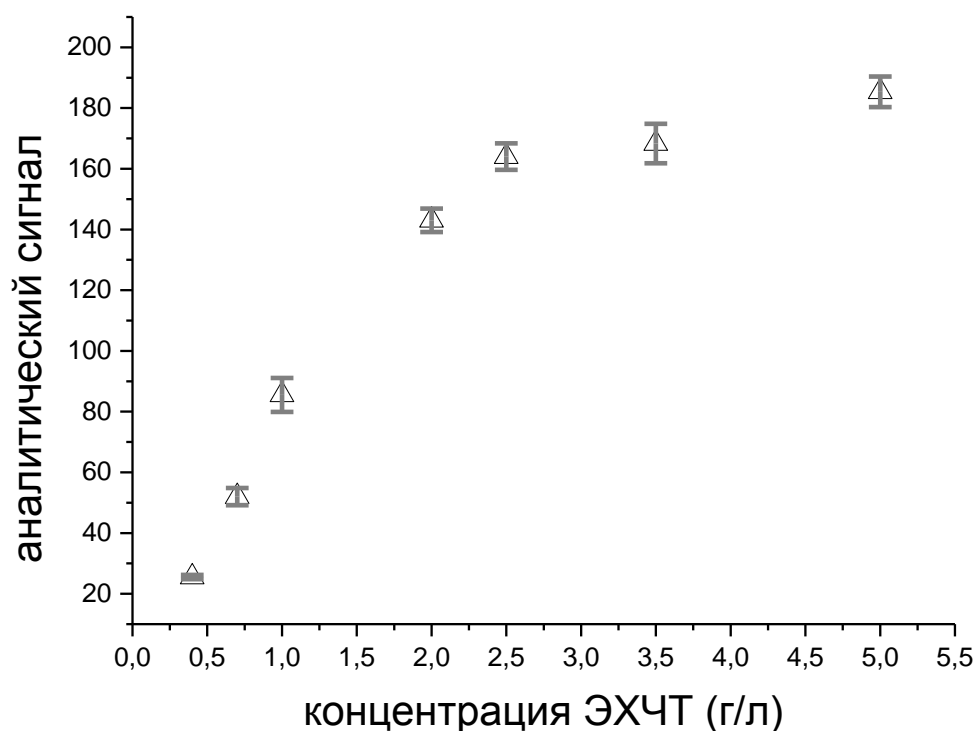


Рисунок 3.5 Зависимость аналитического сигнала от концентрации ЭХЧТ для магния.

Дальнейшее увеличение концентрации не приводит к увеличению аналитического сигнала. Кроме того, при высоких концентрациях реагента на чипе уменьшается контрастность аналитической реакции.

Выбор концентрации карбоната натрия

Было исследовано влияние концентрации карбоната натрия на величину аналитического сигнала при концентрации ЭХЧТ, равной 3,5 г/л. Полученная зависимость представлена на **рис. 3.6**.

При растворении фотометрического реагента в растворе карбоната натрия с концентрацией, равной 1 г/л, в зоне детектирования обеспечивается рН, при котором константы устойчивости комплексов Са и Mg с ЭХЧТ соотносятся так, что интенсивность окрашивания зон детектирования чипа наиболее близка для двух металлов при равных массовых концентрациях. В этом случае обеспечиваются наиболее адекватные условия для одновременного колориметрического определения Са и Mg.

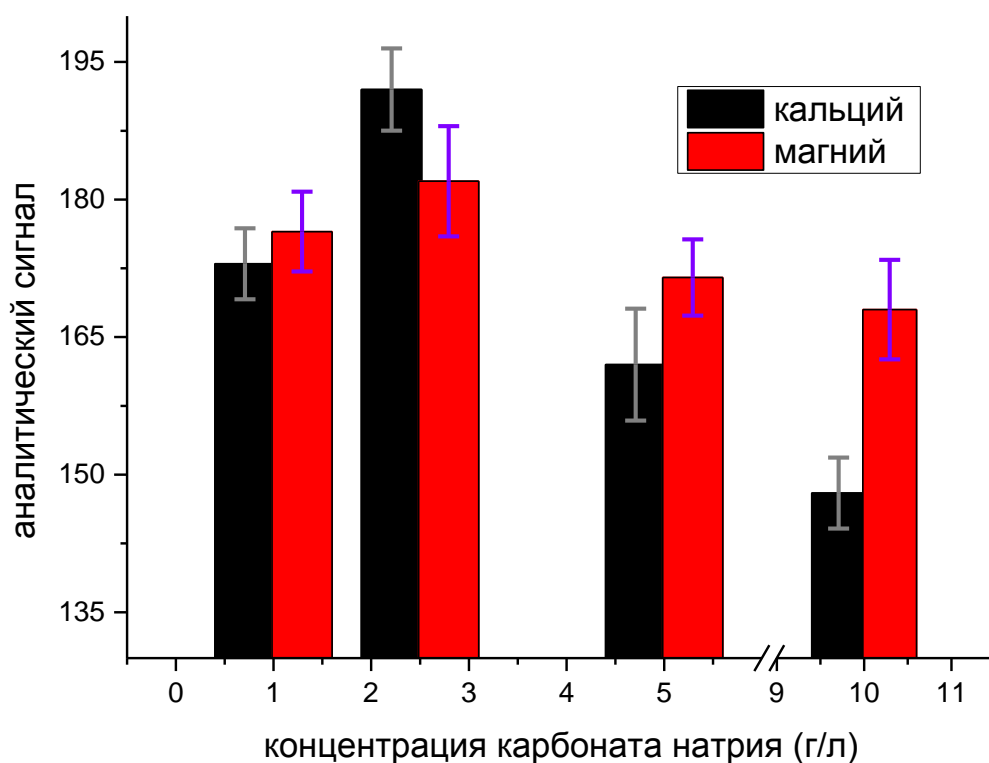


Рисунок 3.6 Зависимость аналитического сигнала от концентрации карбоната натрия для кальция и магния.

3 Оптимизация времени экстракции

Было показано, что в УЗ-поле при массовом соотношении фаз вода/проба 1:1 происходит эффективное диспергирование пробы в водной фазе. Была изучена зависимость аналитического сигнала от продолжительности УЗ-обработки. Зависимость имеет вид, представленный на **рис. 3.7**. Продолжительность, УЗ-воздействия, равная 10 минутам достаточна для выделения целевых аналитов в водную фазу.

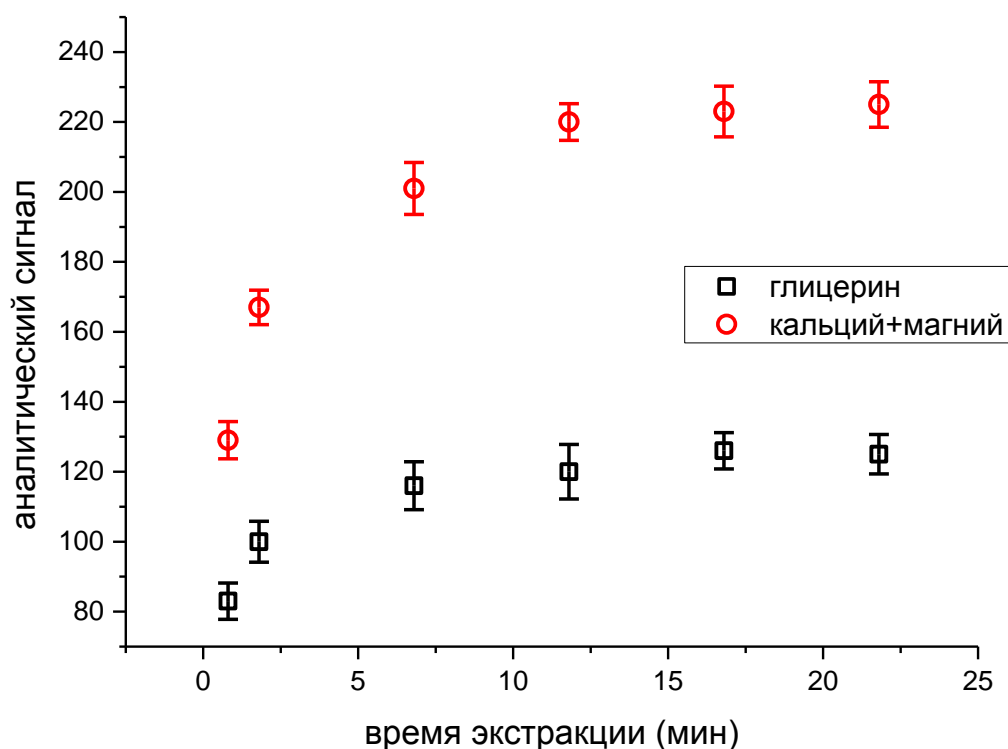


Рисунок 3.7 Зависимость аналитического сигнала от времени экстракции.

4 Анализ реальных объектов

Предложенная схема анализа была апробирована на реальных объектах: пробах биодизельного топлива. Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено» и методом ВЭЖХ-РД для глицерина и методом ИСП-АЭС для кальция и магния. В пробе биотоплива было обнаружено присутствие глицерина, а также кальция и магния. Содержания аналитов не превысило соответствующие ПДК. Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено» и референтными методами - ВЭЖХ-РД и ИСП-АЭС. В **табл. 3.1** представлены результаты проверки правильности полученных результатов. Сравнение рассчитанных значений F- и t-критериев с критическими значениями свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отличий между результатами, полученными при использовании предложенной методики и результатами, полученными референтными методами. Аналитические характеристики разработанной методики представлены в **табл. 3.2**.

Таблица 3.1. Проверка правильности полученных результатов методом «введено-найдено», а также референтными методами. ($n = 6$, $P = 0,95$, $t_{кр.} = 2,45$, $F_{кр.} = 19,2$).

Глицерин, мкг/г					
Проба	Введено	найдено		F-тест	T-тест
		Чип	ВЭЖХ-РД		
1	0	<ПО	20,1±5,8	-	-
2	50	69,8±6,2	71,2±3,6	2,18	2,97
3	100	121,3±9,1	119,8±4,4	2,46	4,28
Кальций+магний, мкг/г					
Проба	Введено	найдено		F-тест	T-тест
		Чип	ИСП-АЭС		
1	0	3,9±1,1	3,5±0,8	2,15	1,90
2	10	13,5±1,1	13,8±0,6	1,83	3,36

Таблица 3.2. Аналитические характеристики предложенной методики.

Аналит	Время анализа, мин	Объем пробы, мкл	Объем реагентов, мкл	ПО (3σ), мкг/г	Диапазон определяемых концентраций, мкг/г
Глицерин	30	200	5	30	100 – 300
Кальций + Магний			5	1	4-12

Достигнут предел обнаружения глицерина, равный 30 мкг/г. ПО представленных в литературе хроматографических и спектрофотометрических методик определения глицерина в биотопливе существенно ниже. Тем не менее, данное значение составляет лишь 15% ПДК, что позволяет применять предложенную методику для определения глицерина. Для суммарного содержания кальция и магния достигнут ПО, равный 1 мкг/г, что также выше значений ПО, характеризующих большинство традиционных методик определения данных аналитов (основанных на методах атомной спектроскопии). Однако, данное значение также ниже ПДК для данных аналитов, что делает методику пригодной для осуществления контроля качества биодизеля и по суммарному содержанию кальция и магния.

Выводы

Предложенная схема одновременного колориметрического определения содержания глицерина кальция, магния в биодизельном топливе на бумажном чипе продемонстрировала ПО аналитов на уровне ниже соответствующих ПДК, что делает возможным её применение для контроля содержания данных аналитов в биодизельном

топливе. Важными преимуществами предложенной методики являются: возможность одновременного определения аналитов, отсутствие необходимости в использовании дорогостоящего аналитического оборудования, экспрессность, низкий расход пробы и реагентов, низкая стоимость. Кроме того, бумажные чипы – одноразовый инструмент, это помогает избежать перекрёстного загрязнения.

Наличие упомянутых достоинств делает предложенную методику подходящей для скрининга содержания глицерина, кальция и магния в биодизельном топливе в условиях on-site. Таким образом расширяются возможности для осуществления контроля качества биодизельного топлива в полевых условиях, а также расширяется область применения бумажных чипов.

Список литературы

1. Jakeway S. C., de Mello A. J., Russell E. L. Miniaturized total analysis systems for biological analysis //Fresenius' journal of analytical chemistry. – 2000. – Т. 366. – №. 6. – С. 525-539.
2. Abgrall P., Gue A. M. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review //Journal of Micromechanics and Microengineering. – 2007. – Т. 17. – №. 5. – С. R15.
3. Hu J. et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics //Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – Т. 54. – С. 585-597.
4. Ríos Á., Zougagh M., Avila M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review //Analytica Chimica Acta. – 2012. – Т. 740. – С. 1-11.
5. Hawkins K. R., Weigl B. H. Microfluidic diagnostics for low-resource settings //MOEMS-MEMS. – International Society for Optics and Photonics, 2010. – С. 75930L-75930L-15
6. Dou M. et al. Low-cost bioanalysis on paper-based and its hybrid microfluidic platforms //Talanta. – 2015. – Т. 145. – С. 43-54.
7. Wang P. et al. Paper-based three-dimensional electrochemical immunodevice based on multi-walled carbon nanotubes functionalized paper for sensitive point-of-care testing //Biosensors and Bioelectronics. – 2012. – Т. 32. – №. 1. – С. 238-243.
8. Nie Z. et al. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices //Lab on a Chip. – 2010. – Т. 10. – №. 4. – С. 477-483.
9. Benhabib M., Li X. J. 14-Low-cost assays in paper-based microfluidic biomedical devices //Microfluidic Devices for Biomedical Applications. – 2013. – С. 492-528e.
10. Nuchtavorn N., Macka M. A novel highly flexible, simple, rapid and low-cost fabrication tool for paper-based microfluidic devices (μ PADs) using technical drawing pens and in-house formulated aqueous inks //Analytica chimica acta. – 2016. – Т. 919. – С. 70-77.
11. Nie J. et al. One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices //Analyst. – 2013. – Т. 138. – №. 2. – С. 671-676.

12. Martinez A. W. et al. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – T. 46. – C. 1318-1320.
13. Li X., Ballerini D. R., Shen W. A perspective on paper-based microfluidics: current status and future trends // *Biomicrofluidics*. – 2012. – T. 6. – №. 1. – C. 011301
14. Ahmed S., Bui M. P. N., Abbas A. Paper-based chemical and biological sensors: Engineering aspects // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – T. 77. – C. 249-263.
15. Martinez A. W. et al. FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices // *Lab on a Chip*. – 2008. – T. 8. – №. 12. – C. 2146-2150
16. Sones C. L. et al. Laser-induced photo-polymerisation for creation of paper-based fluidic devices // *Lab on a Chip*. – 2014. – T. 14. – №. 23. – C. 4567-4574.
17. Bruzewicz D. A., Reches M., Whitesides G. M. Low-cost printing of PDMS barriers to define microchannels in paper // *Analytical chemistry*. – 2008. – T. 80. – №. 9. – C. 3387.
18. Li X. et al. Paper-based microfluidic devices by plasma treatment // *Analytical chemistry*. – 2008. – T. 80. – №. 23. – C. 9131-9134.
19. Abe K., Suzuki K., Citterio D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper // *Analytical chemistry*. – 2008. – T. 80. – №. 18. – C. 6928-6934.
20. Olkkonen J., Lehtinen K., Erho T. Flexographically printed fluidic structures in paper // *Analytical chemistry*. – 2010. – T. 82. – №. 24. – C. 10246-10250.
21. Lin Y. et al. Detection of heavy metal by paper-based microfluidics // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – T. 83. – C. 256-266.
22. Lu Y. et al. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay // *Electrophoresis*. – 2009. – T. 30. – №. 9. – C. 1497-1500.
23. Carrilho E., Martinez A. W., Whitesides G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics // *Analytical chemistry*. – 2009. – T. 81. – №. 16. – C. 7091-7095.MLA
24. Dungchai W., Chailapakul O., Henry C. S. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing // *Analyst*. – 2011. – T. 136. – №. 1. – C. 77-82.
25. Songjaroen T. et al. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping // *Talanta*. – 2011. – T. 85. – №. 5. – C. 2587-2593.

26. Li X., Tian J., Shen W. Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors //Cellulose. – 2010. – T. 17. – №. 3. – C. 649-659.
27. Xia Y., Si J., Li Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review //Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – T. 77. – C. 774-789.
28. Cai L. et al. A simple paper-based sensor fabricated by selective wet etching of silanized filter paper using a paper mask //Biomicrofluidics. – 2014. – T. 8. – №. 5. – C. 056504.
29. Malekghasemi S., Kahveci E., Duman M. Rapid and alternative fabrication method for microfluidic paper based analytical devices //Talanta. – 2016. – T. 159. – C. 401-411
30. Li X. et al. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – T. 76. – №. 2. – C. 564-570.
31. Fenton E. M. et al. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping //ACS applied materials & interfaces. – 2008. – T. 1. – №. 1. – C. 124-129.
32. Chitnis G. et al. Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform //Lab on a Chip. – 2011. – T. 11. – №. 6. – C. 1161-1165.
33. Martinez A. W., Phillips S. T., Whitesides G. M. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – T. 105. – №. 50. – C. 19606-19611.
34. Lin G., Lee A. P. Microfluidics: an emerging technology for food and health science //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2010. – T. 1190. – №. 1. – C. 186-192.
35. Martinez A. W. et al. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. – 2009.
36. Martinez A. W. et al. Programmable diagnostic devices made from paper and tape //Lab on a Chip. – 2010. – T. 10. – №. 19. – C. 2499-2504.
37. Gong X. et al. Wax-bonding 3D microfluidic chips //Lab on a Chip. – 2010. – T. 10. – №. 19. – C. 2622-2627.
38. He Y., Wu W., Fu J. Rapid fabrication of paper-based microfluidic analytical devices with desktop stereolithography 3D printer //RSC Advances. – 2015. – T. 5. – №. 4. – C. 2694-2701.

39. Liu H., Crooks R. M. Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami //Journal of the American Chemical Society. – 2011. – T. 133. – №. 44. – C. 17564-17566.
40. Arduini F. et al. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – T. 79. – C. 114-126.
41. Dungchai W., Chailapakul O., Henry C. S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics //Analytical chemistry. – 2009. – T. 81. – №. 14. – C. 5821-5826.
42. Apilux A. et al. Lab-on-paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron //Analytical chemistry. – 2010. – T. 82. – №. 5. – C. 1727-1732.] [Leung V. et al. Streaming potential sensing in paper-based microfluidic channels //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2010. – T. 364. – №. 1. – C. 16-18.
43. Arena A. et al. Flexible ethanol sensors on glossy paper substrates operating at room temperature //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2010. – T. 145. – №. 1. – C. 488-494.
44. Steffens C. et al. Low-cost sensors developed on paper by line patterning with graphite and polyaniline coating with supercritical CO₂ //Synthetic Metals. – 2009. – T. 159. – №. 21. – C. 2329-2332.
45. Nie Z. et al. Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers //Lab on a Chip. – 2010. – T. 10. – №. 22. – C. 3163-3169.
46. Carvalhal R. F. et al. Electrochemical detection in a paper-based separation device //Analytical chemistry. – 2010. – T. 82. – №. 3. – C. 1162-1165.
47. Yu J. et al. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid //Lab on a Chip. – 2011. – T. 11. – №. 7. – C. 1286-1291.
48. Delaney J. L. et al. Electrogenated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors //Analytical chemistry. – 2011. – T. 83. – №. 4. – C. 1300-1306.
49. Ge L. et al. Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence immunodevice for multiplexed measurement of biomarkers and point-of-care testing //Biomaterials. – 2012. – T. 33. – №. 4. – C. 1024-1031.

50. Yan J. et al. Paper- Based Electrochemiluminescent 3D Immunodevice for Lab-on- Paper, Specific, and Sensitive Point- of- Care Testing //Chemistry-A European Journal. – 2012. – T. 18. – №. 16. – C. 4938-4945.
51. Morbioli G. G. et al. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs)-A review //Analytica Chimica Acta. – 2017.
52. Dungchai, W., Chailapakul, O. and Henry, C. S. (2010). Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. *Anal Chim Acta*, 674, 227–233.
53. Martinez A. W. et al. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis //Analytical chemistry. – 2008. – T. 80. – №. 10. – C. 3699.
54. Klasner, S. A., Price, A. K., Hoeman, K. W., Wilson, R. S., Bell, K. J. and Culbertson, C. T. (2010). Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Anal Bioanal Chem*, 397, 1821–1829.
55. Abe, K., Kotera, K., Suzuki, K. and Citterio, D. (2010). Inkjet-printed paperfluidic immuno-chemical sensing device. *Anal Bioanal Chem*, 398, 885–893.
56. Ellerbee, A. K., Phillips, S. T., Siegel, A. C., Mirica, K. A., Martinez, A. W., Striehl, P., Jain, N., Prentiss, M. and Whitesides, G. M. (2009). Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. *Anal Chem*, 81, 8447–8452.
57. Li, X., Tian, J. and Shen, W. (2010c). Quantitative biomarker assay with microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Bioanal Chem*, **396**, 495–501.
58. Wang, W., Wu, W. Y. and Zhu, J. J. (2010). Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration. *J Chromatogr A*, 1217, 3896–3899.
59. Zhao, W., Ali, M. M., Aguirre, S. D., Brook, M. A. and Li, Y. (2008). Paper-based bioassays using gold nanoparticle colorimetric probes. *Anal Chem*, 80, 8431–8437.
60. Ratnarathorn, N., Chailapakul, O., Henry, C. S. and Dungchai, W. (2012). Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices. *Talanta*, 99, 552–557.

61. Atabani A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics //Renewable and sustainable energy reviews. – 2012. – T. 16. – №. 4. – C. 2070-2093.
62. Shahid EM, Jamal J. Production of biodiesel: a technical review. Renew Sustain Energy Rev 2011;15(9):4732–45.
63. Pêgas M. M. et al. Analysis of free glycerol in biodiesel using an electrochemical assay based on a two-enzyme platinum microelectrode system //Journal of applied electrochemistry. – 2010. – T. 40. – №. 11. – C. 2061-2063.
64. Lourenço L. M., Stradiotto N. R. Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique //Talanta. – 2009. – T. 79. – №. 1. – C. 92-96.
65. Martyanov I. N., Sayari A. Comparative study of triglyceride transesterification in the presence of catalytic amounts of sodium, magnesium, and calcium methoxides //Applied Catalysis A: General. – 2008. – T. 339. – №. 1. – C. 45-52.
66. Shishov A. Y. et al. Fully automated spectrophotometric procedure for simultaneous determination of calcium and magnesium in biodiesel //Talanta. – 2015. – T. 135. – C. 133-137.
67. Ribeiro M. S., Rocha F. R. P. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel //Microchemical Journal. – 2013. – T. 106. – C. 23-26.
68. Chaves E. S. et al. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2011. – T. 66. – №. 9. – C. 733-739.
69. J.R. De Souza, E.F. dos Santos, C.B. Duyck, T.D. Saint'Pierre, Comparison of parallel flow and concentric micronebulizers for elemental determination in lubricant oil, residual fuel oil and biodiesel by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, Spectrochimica Acta Part B, 66 (2011) 356–361.
70. dos Santos E. J. et al. Simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry with internal standardization after multivariate optimization //Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2007. – T. 22. – №. 10. – C. 1300-1303.

71. de Jesus A. et al. Determination of calcium and magnesium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry using microemulsions as sample preparation //Energy & Fuels. – 2010. – T. 24. – №. 3. – C. 2109-2112.
72. de Caland L. B., Silveira E. L. C., Tubino M. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations in biodiesel by ion chromatography //Analytica chimica acta. – 2012. – T. 718. – C. 116-120.
73. Piovezan M. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples //Analytica chimica acta. – 2010. – T. 673. – №. 2. – C. 200-205.
74. Nogueira T., do Lago C. L. Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfate, phosphate, formate, acetate, propionate, and glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection //Microchemical Journal. – 2011. – T. 99. – №. 2. – C. 267-272.
75. Lozano P. et al. Measurement of free glycerol in biofuels //Fresenius' journal of analytical chemistry. – 1996. – T. 354. – №. 3. – C. 319-322.
76. Dias, A.N. Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography / A.N. Dias, M.B.R.Cerqueira, R.R. de Moura, M.H.S. Kurz, R.M. Clementin, M.G.M. D' Oca, E.G. Primel // Fuel - 2012. - 94. - P. 178-183
77. Yang, Z. Determination of polar impurities in biodiesels using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry / Z. Yang, B.P. Hollebone Z. Wang, C.Yang, M. Landriault // J. Sep. Sci. - 2011. - 34. - P. 409-421
78. Hájek, M. Determination of free glycerol in biodiesel / M. Hájek, F.S. J. Machek // Eur. J. Lipid Sci. Technol. - 2006. - 108. - P. 666-669.
79. Dias A. N. et al. Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography //Fuel. – 2012. – T. 94. – C. 178-183.
80. Bondioli, P. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel / P. Bondioli, L.D. Bella // Eur. J. Lipid Sci. Technol. - 2005. 107. - P. 153-157

81. [Arévalo F. J. et al. Development of an electrochemical sensor for the determination of glycerol based on glassy carbon electrodes modified with a copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2017. – T. 244. – C. 949-957.].