

**Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова**

Химический факультет



**Методические указания к лабораторным работам
с использованием микрофлюидных аналитических
систем на основе бумаги**

Методические указания подготовил:

Фурлетов Алексей Алексеевич

к.х.н., доцент кафедры аналитической химии
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Москва – 2026

Содержание

Пояснительная записка	3
Методики выполнения экспериментов	4
Эксперимент 1. Определение кислотности столового уксуса	4
Эксперимент 2. Полуколичественное определение общей жесткости воды	7
Эксперимент 3. Определение нитрита в маринованных овощах	9

Пояснительная записка

В настоящем документе представлены методики, составленные на основе экспериментальных разделов опубликованных научных статей. Текст предназначен для непосредственного выполнения экспериментов: приведены состав и способы приготовления растворов, архитектура бумажных микрофлюидных систем (БМФС), необходимые объемы и последовательность нанесения реагентов, условия регистрации аналитического сигнала и порядок обработки экспериментальных данных. Все упрощения, внесенные в исходные методики для их применения в условиях школьной лаборатории, отдельно оговорены в тексте документа.

Во всех экспериментах используют калиброванные пипеточные дозаторы. Для точного дозирования объемов в диапазоне 0.5–10 мкл необходим дозатор, рабочий диапазон которого включает соответствующие значения. Капельницы и некалиброванные шприцы для этой цели не применяют, поскольку они не обеспечивают требуемой точности и повторяемости. Стандартные растворы, раствор контрольного опыта и анализируемый образец следует наносить на БМФС, изготовленные в рамках одной партии. Все БМФС следует фотографировать при одинаковом освещении и неизменном положении камеры, а также через одинаковое время после начала реакции. До проведения занятия учитель должен полностью воспроизвести каждый эксперимент с использованием той же бумаги, тех же реактивов и того же оборудования, которые имеются в распоряжении учащихся.

Работы проводят в защитных очках, лабораторных халатах и химически стойких перчатках. Растворы, содержащие метиловый спирт, гидроксид натрия, соляную кислоту, нитрит натрия и N-(1-нафтил)этилендиамин, готовит исключительно учитель. Пищевые продукты и воду, использованные в качестве анализируемых образцов, после контакта с химическими реактивами употреблять строго запрещается. Полученные результаты носят исключительно учебный характер и не заменяют анализа, выполненного в аккредитованной лаборатории.

Автор настоящего документа не проводил самостоятельной экспериментальной апробации изложенных ниже методик и не гарантирует их воспроизводимость в конкретных условиях. Перед использованием все методики необходимо предварительно проверить и при необходимости адаптировать с учетом имеющегося оборудования, доступных реактивов и используемого типа бумаги.

Методики выполнения экспериментов

Эксперимент 1. Определение кислотности столового уксуса

- **Источник:** статья *Berasarte I., Bordagaray A., Garcia-Arrona R., Ostra M., Reis de Araujo W., Vidal M.* Microscale titration of acetic acid using digital colorimetry and paper-based analytical devices. // *Talanta*. 2024. V. 276. Article 126254. DOI: 10.1016/j.talanta.2024.126254.
- **Принцип определения.** На отдельные реакционные зоны наносят одинаковое количество лакмуса и последовательно возрастающие количества раствора гидроксида натрия NaOH. Затем на все реакционные зоны наносят одинаковый объем разбавленного столового уксуса. После высушивания получают ряд пятен с различной окраской индикатора. Эквивалентный объем NaOH находят визуально по границе изменения цвета или по точке перегиба зависимости интенсивности красного цветового канала изображения от объема NaOH. В статье использовали несколько точек в диапазоне 1.00–6.00 мкл NaOH. Ниже приведен упрощенный школьный вариант из шести точек с шагом 1.00 мкл.
- **Приготовление рабочих растворов и образца.** Рабочий раствор NaOH должен иметь концентрацию 0.1000 моль/л. Его готовит учитель и при необходимости стандартизует по первичному стандартному веществу, например, по дигидрату щавелевой кислоты $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Раствор лакмуса готовят растворением 0.1 г индикатора в небольшом количестве этанола с последующим доведением дистиллированной водой до 100.0 мл. В исходной работе использовали 4%-ный раствор уксусной кислоты, разбавленный водой в десять раз до концентрации 0.40% (масса/объем). Коммерческий уксус перед анализом разбавляют так, чтобы номинальная кислотность конечного раствора составляла около 0.40 г CH_3COOH в 100 мл жидкости. Коэффициент разбавления D рассчитывают как отношение кислотности столового уксуса, указанной на этикетке, к 0.40%. Например, 4%-ный уксус разбавляют в 10 раз, 6%-ный — в 15 раз, а 9%-ный — в 22.5 раза. Для 9%-ного уксуса можно внести 4.44 мл образца в мерную колбу объемом 100.0 мл и разбавить дистиллированной водой до метки. Точный коэффициент D записывают для последующего расчета. Для надежного дозирования удобно приготовить шестикратные или десятикратные порции реакционных смесей в отдельных микропробирках. При приготовлении десятикратных порций в первую пробирку вносят 50.0 мкл 0.10%-ного лакмуса, 10.0 мкл 0.1000 М NaOH и 50.0

мкл воды. Во вторую пробирку вносят 50.0 мкл лакмуса, 20.0 мкл NaOH и 40.0 мкл воды. В третью пробирку вносят объемы 50.0, 30.0 и 30.0 мкл соответственно; в четвертую — 50.0, 40.0 и 20.0 мкл соответственно; в пятую — 50.0, 50.0 и 10.0 мкл соответственно; в шестую — 50.0 мкл лакмуса и 60.0 мкл NaOH без добавления воды. После перемешивания каждая пробирка содержит 110 мкл смеси. В расчете на одну реакционную зону это соответствует 5.00 мкл лакмуса, 1.00–6.00 мкл NaOH и воде до общего объема 11.0 мкл. Увеличение объема смесей в 10 раз является только техническим упрощением; состав смеси в расчете на одну реакционную зону соответствует оригинальной методике.

- **Изготовление БМФС.** На листе фильтровальной бумаги размечают 18 круглых реакционных зон диаметром 5 мм: шесть положений для разных объемов NaOH и три параллельных повтора для каждого положения. Расстояние между краями соседних зон должно исключать их взаимное смачивание. В статье гидрофобный рисунок наносили восковым принтером, после чего лист фильтровальной бумаги выдерживали в течение 15 с при температуре 100 °С для проникновения воска через толщу бумаги. Обратную сторону БМФС закрывали прозрачной клейкой лентой. Если воскового принтера нет, контуры можно выполнить восковым карандашом, но перед аналитической серией необходимо подобрать режим прогрева на пробной БМФС и убедиться с помощью подкрашенной воды, что жидкость не пересекает гидрофобные границы.
- **Последовательность нанесения реагентов.** На каждую из трех реакционных зон первого положения вносят по 11.0 мкл смеси из первой пробирки. Аналогично во второе, третье, четвертое, пятое и шестое положения вносят по 11.0 мкл смесей из соответствующих пробирок. Реагент наносят в центр зоны, не касаясь бумаги кончиком дозатора. Сразу после этого в центр каждого пятна добавляют по 4.00 мкл разбавленного образца столового уксуса. После внесения образца БМФС немедленно помещают в сушильный шкаф. Высушивание проводят в течение 30 мин при 50 °С. Затем БМФС вынимают, охлаждают в течение нескольких минут в закрытой чистой коробке и фотографируют целиком.
- **Регистрация аналитического сигнала.** Телефон закрепляют перпендикулярно БМФС; вспышку, автоматические фильтры и HDR отключают. Из центральной части каждого пятна получают среднее значение красного канала R, после чего рассчитывают среднее для трех повторов. Строят зависимость R от объема 0.1000

М NaOH. Для полуколичественного результата отмечают интервал, в котором окраска переходит от красной или розовой к синей. Для количественного результата по полученной кривой титрования рассчитывают первую и вторую численные производные, например, методом конечных разностей в электронной таблице. Точке эквивалентности соответствует минимум первой производной и переход второй производной через нуль. Для уточнения эквивалентного объема выбирают точки максимума и минимума второй производной, строят по ним линейную зависимость и находят объем V , при котором значение этой зависимости равно нулю. Расчет выполняют по собственной кривой титрования; численные данные, полученные авторами статьи, не используют, поскольку результат зависит от бумаги, индикатора, камеры и освещения.

- **Выполнение расчетов.** Если найденный эквивалентный объем 0.1000 М NaOH равен V мкл, а объем разбавленного столового уксуса на пятне составляет 4.00 мкл, то кислотность разбавленного образца, выраженную в процентах (масса/объем), то есть в граммах уксусной кислоты на 100 мл раствора, рассчитывают по формуле:

$$c_{\text{разб.}}, \% = 0.1501 \cdot V$$

Кислотность исходного уксуса равна $c_{\text{исх.}} = D \cdot c_{\text{разб.}}$, где D — записанный коэффициент разбавления. Например, $V = 2.70$ мкл соответствует кислотности разбавленного образца около 0.405% и кислотности исходного 4%-ного уксуса около 4.05% при $D = 10$. Если переход окраски индикатора наблюдается вне диапазона 1.00–6.00 мкл NaOH, образец разбавляют иначе и выполняют измерение заново.

- **Меры предосторожности.** Раствор NaOH раздражает кожу и особенно опасен при попадании в глаза. Этанол огнеопасен. Приготовление и стандартизацию раствора NaOH, а также приготовление раствора лакмуса выполняет учитель. Использованные БМФС и остатки реакционных смесей собирают отдельно и утилизируют в соответствии с правилами кабинета химии.

Эксперимент 2. Полуколичественное определение общей жесткости воды

- **Источник:** статья *Oyewunmi O.D., Safiabadi-Tali S.H., Jahanshahi-Anbuhi S.* Dual-modal assay kit for the qualitative and quantitative determination of the total water hardness using a permanent marker fabricated microfluidic paper-based analytical device. // *Chemosensors*. 2020. V. 8. Article 97. DOI: 10.3390/chemosensors8040097.
- **Принцип определения.** БМФС содержит пять параллельных дорожек, обозначенных как C, S, MN, H и VH. В индикаторных зонах находится эриохром черный Т, а в реакционные зоны S, MN, H и VH заранее внесены возрастающие количества ЭДТА. После погружения нижнего края БМФС в воду проба поднимается по бумаге за счет капиллярных сил. Если количество ионов кальция и магния в воде превышает количество ЭДТА в соответствующей дорожке, индикаторная зона изменяет цвет с синего на розовый. Число последовательно порозовевших зон задает диапазон общей жесткости.
- **Приготовление рабочих растворов.** Буферный раствор CAPS с pH 10 готовят растворением 11.0 г CAPS (3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) в 100.0 мл дистиллированной воды. Затем при перемешивании небольшими порциями добавляют раствор NaOH с концентрацией 0.100 моль/л до достижения pH 10. Конечный объем буферного раствора до фиксированного значения не доводят. Раствор эриохрома черного Т с концентрацией 0.10% (масса/объем) готовят растворением 0.1 г индикатора в метаноле и доведением метанолом до объема 100.0 мл. Раствор готовят и используют в вытяжном шкафу. Для приготовления исходного раствора ЭДТА с концентрацией 10.00 ммоль/л точно взвешивают 0.3722 г дигидрата динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора в мерной колбе до 100.0 мл. Для приготовления 10.00 мл рабочих растворов ЭДТА с концентрациями 0.40, 1.22, 2.42 и 3.62 ммоль/л в четыре мерные колбы объемом 10.00 мл вносят соответственно 0.400, 1.220, 2.420 и 3.620 мл исходного раствора ЭДТА и разбавляют дистиллированной водой до метки.
- **Изготовление БМФС.** БМФС изготавливают из фильтровальной бумаги Whatman Grade 4 или аналогичной, предварительно проверенной на скорость капиллярного подъема. На бумаге размечают пять одинаковых параллельных дорожек с общей нижней зоной погружения. На каждой дорожке располагают нижнюю реакционную зону в виде круга диаметром 7 мм, переходный канал

длиной 5.4 мм и шириной 1.0 мм, верхнюю индикаторную зону диаметром 7 мм и короткую отходную зону длиной 2 мм и шириной 1 мм. Общий размер пятидорожечной БМФС в исходной статье составлял 15.88×12.70 см. Точные размеры общей зоны погружения и каналов, соединяющих ее с реакционными зонами, авторы не привели; эту часть геометрии необходимо проверить на пробном макете. Дорожки обозначают как С, S, МН, Н и VН. Гидрофобные границы печатают в виде двух близких параллельных линий, после чего промежуток между ними закрашивают, проводя перманентным маркером не более двух раз. В статье зеленый и синий маркеры на бумаге Grade 4 не допускали заметной утечки в течение 4 мин, а черный и красный оказались менее подходящими. Поскольку состав маркеров различается, каждую новую марку проверяют подкрашенной водой. БМФС считается пригодной, если при смачивании в течение четырех минут вода движется только внутри дорожек и не пересекает боковые границы.

- **Последовательность нанесения реагентов.** Сначала во все десять круглых зон БМФС, то есть в пять реакционных и пять индикаторных зон, наносят по 4.5 мкл буферного раствора CAPS с pH 10. Реагент наносят точно в центр каждой зоны. БМФС оставляют на горизонтальной чистой поверхности примерно на 5 мин до высыхания. После высыхания буферного раствора в каждую из пяти верхних индикаторных зон наносят по 3.0 мкл 0.10%-ного раствора эриохрома черного Т в метаноле. БМФС вновь оставляют до полного испарения растворителя. После высыхания индикаторные зоны должны иметь синюю окраску примерно одинаковой интенсивности. Затем в нижнюю реакционную зону дорожки S наносят 5.5 мкл раствора ЭДТА с концентрацией 0.40 ммоль/л. В реакционную зону МН наносят 5.5 мкл раствора ЭДТА с концентрацией 1.22 ммоль/л, в зону Н — 5.5 мкл 2.42 ммоль/л раствора ЭДТА, в зону VН — 5.5 мкл 3.62 ммоль/л раствора ЭДТА. В реакционную зону С раствор ЭДТА не наносят. После этого БМФС высушивают и хранят в закрытой упаковке до проведения анализа.
- **Регистрация аналитического сигнала.** Пробу воды наливают в чистую небольшую емкость. Общую нижнюю часть БМФС погружают в воду только до отмеченной линии, не смачивая реакционные зоны напрямую. БМФС удерживают вертикально около 3 мин, пока жидкость не заполнит дорожки. После окончания смачивания фиксируют, какие индикаторные зоны изменили

цвет с синего на розовый, просматривая их последовательно от контрольной зоны С. После полного заполнения БМФС извлекают из пробы и сразу оценивают окраску; все системы фотографируют спустя одинаковое время после заполнения.

- **Выполнение расчетов.** Если розовой стала только контрольная зона С, общая жесткость ориентировочно ниже 0.20 ммоль/л в пересчете на CaCO_3 ; такую воду также относят к мягкой. Если розовыми стали индикаторные зоны С и S, воду относят к мягкой, а общую жесткость считают находящейся приблизительно в диапазоне 0.20–0.60 ммоль/л в пересчете на CaCO_3 . Если розовыми стали индикаторные зоны С, S и МН, жесткость находится в диапазоне 0.61–1.20 ммоль/л в пересчете на CaCO_3 . Если розовыми стали индикаторные зоны С, S, МН и Н, жесткость составляет 1.21–1.80 ммоль/л в пересчете на CaCO_3 . Если розовыми стали все пять индикаторных зон С, S, МН, Н и VН, жесткость воды превышает 1.80 ммоль/л в пересчете на CaCO_3 . Для пересчета в мг/л используют соотношение $1.00 \text{ ммоль/л } \text{CaCO}_3 = 100.09 \text{ мг/л } \text{CaCO}_3$.
- **Меры предосторожности.** Метанол токсичен и легко воспламеняется, а растворы NaOH могут вызывать химические ожоги. Учитель готовит все растворы и в вытяжном шкафу наносит на БМФС буферный раствор CAPS, раствор индикатора и растворы ЭДТА. Учащиеся получают полностью высушенные БМФС и работают только с пробами воды. Остатки метанольного раствора и загрязненные материалы собирают в предназначенную для этого емкость.

Эксперимент 3. Определение нитрита в маринованных овощах

- **Источник:** статья *Xu C., Zhong M., Wu Y., Cai L., Hong J., Huang Y.* Paper-based microfluidic device for determination of nitrite in pickled vegetables. // Asian J. Chem. 2014. V. 26. P. 4330–4334. DOI: 10.14233/ajchem.2014.16408.
- **Принцип определения.** Нитрит-ион взаимодействует со смешанным реактивом Грисса, содержащим сульфаниловую кислоту и N-(1-нафтил)этилендиамин, с образованием окрашенного продукта. На шестиканальной БМФС одновременно размещают пять стандартов нитрита и один экстракт овощей. Интенсивность окраски образца сопоставляют с калибровочной зависимостью, построенной по стандартам на той же БМФС.

- Приготовление рабочих растворов.** Раствор сульфаниловой кислоты с концентрацией 4.0 г/л готовят растворением 0.4 г сульфаниловой кислоты и доведением 20%-ным раствором HCl до объема 100.0 мл. Раствор N-(1-нафтил)этилендиамина с концентрацией 0.40 г/л готовят растворением 0.1 г реактива и доведением дистиллированной водой до объема 250.0 мл. Непосредственно перед нанесением смешивают семь объемных частей приготовленного ранее раствора сульфаниловой кислоты и три объемные части раствора N-(1-нафтил)этилендиамина. Полученный смешанный реагент содержит 2.8 г/л сульфаниловой кислоты и 0.12 г/л N-(1-нафтил)этилендиамина. Исходный стандартный раствор нитрита с концентрацией 1.000 мг/мл в пересчете на нитрит-ион готовят растворением 0.1500 г нитрита натрия NaNO_2 в 100.0 мл дистиллированной воды. Для приготовления 10.00 мл рабочих стандартов с концентрациями 15.0, 30.0, 45.0 и 60.0 мкг/мл нитрит-иона в отдельные мерные колбы вносят соответственно 150, 300, 450 и 600 мкл исходного стандарта нитрита и разбавляют водой до метки. Нулевой стандарт представляет собой воду. Все стандартные растворы готовит учитель.
- Изготовление БМФС.** БМФС состоит из центральной зоны, шести одинаковых распределительных каналов и шести внешних зон детектирования. Каждый канал имеет ширину 2 мм и длину 5 мм; диаметр каждой внешней зоны составляет 6 мм. Точный диаметр центральной зоны авторы статьи не указали, но она должна удерживать 20 мкл жидкости и обеспечивать равномерное заполнение всех шести каналов. Поэтому перед работой размер центральной зоны обязательно проверяют на пробной БМФС с 20 мкл раствора пищевого красителя. Все внешние зоны должны смачиваться примерно одинаково, а жидкость не должна выходить за восковые границы. Рисунок устройства печатают на фильтровальной бумаге, затем вручную обводят восковым карандашом по напечатанным линиям. БМФС помещают на нагревательную плитку при 135 °C на 1 мин. За это время расплавленный воск должен пройти через всю толщину бумаги и сформировать гидрофобные стенки. После охлаждения проверяют обратную сторону бумаги и проводят пробу на герметичность водой.
- Подготовка образца.** Около 10 г измельченных соленых или маринованных овощей точно взвешивают и записывают массу m . Пробу растирают в ступке, количественно переносят в стакан и добавляют 80 мл дистиллированной воды.

Экстракцию проводят 3 ч при комнатной температуре. Затем экстракт фильтруют, собирая фильтрат в мерную колбу объемом 100.0 мл. Стакан и остаток на фильтре промывают небольшими порциями дистиллированной воды, присоединяя промывные воды к фильтрату, после чего содержимое колбы разбавляют дистиллированной водой до метки и перемешивают. Таким образом, конечный объем экстракта составляет 100.0 мл. Полученный раствор используют для анализа. Если экстракт сильно окрашен или мутен, выполняют дополнительное разведение и обязательно учитывают его коэффициент D в расчете.

- **Последовательность нанесения реагентов.** В центральную зону сухой БМФС вносят 20.0 мкл свежеприготовленного смешанного реагента Грисса. Жидкость должна пройти по всем шести каналам и равномерно смочить внешние зоны. БМФС оставляют на горизонтальной поверхности и сушат в течение 10 мин. После высыхания смешанного реагента в пять внешних зон наносят по 1.00 мкл стандартов нитрита. В первую зону вносят нулевой стандарт, во вторую — 15.0 мкг/мл, в третью — 30.0 мкг/мл, в четвертую — 45.0 мкг/мл и в пятую — 60.0 мкг/мл. В шестую внешнюю зону наносят 1.00 мкл подготовленного экстракта. Наконечник микропипетки меняют перед каждым раствором. После нанесения стандартов и образца БМФС выдерживают 15 мин при комнатной температуре. По окончании выдержки БМФС сразу фотографируют.
- **Обработка изображения и выполнение расчетов.** БМФС фотографируют целиком при равномерном освещении. Изображение сохраняют в формате JPEG без фильтров и дополнительной цветовой коррекции. В ImageJ или другой программе изображение переводят в оттенки серого и при необходимости инвертируют так, чтобы увеличение концентрации нитрита соответствовало увеличению аналитического сигнала. Для каждой внешней зоны выбирают центральную круглую область одинакового размера и определяют среднюю интенсивность серого. Из сигналов стандартов и образца вычитают сигнал нулевого стандарта. По пяти стандартам 0, 15.0, 30.0, 45.0 и 60.0 мкг/мл строят собственную линейную зависимость аналитического сигнала от концентрации нитрита и по ней находят концентрацию c в экстракте. Содержание нитрита в овощах рассчитывают по формуле:

$$\omega(\text{NO}_2^-), \text{ мкг/г} = c \cdot V \cdot D / m$$

В этой формуле c — найденная концентрация нитрита в экстракте, мкг/мл; V — конечный объем экстракта, равный 100.0 мл; D — коэффициент дополнительного разведения экстракта; m — точная масса навески овощей, г. Если дополнительное разведение не проводили, $D = 1.00$.

- **Меры предосторожности.** 20%-ный раствор HCl вызывает химические ожоги. N-(1-нафтил)этилендиамин и нитрит натрия вредны при проглатывании, попадании на кожу и вдыхании пыли. Все растворы, необходимые для проведения эксперимента, готовит учитель; смешанный реагент Грисса учитель наносит на БМФС в вытяжном шкафу. Стандартные растворы нитрита и экстракты учащиеся наносят на высушенные БМФС только в защитных очках и перчатках, под непосредственным контролем учителя. Остатки растворов, экстракты после контакта с реагентами, наконечники и БМФС собирают в маркированную емкость для химических отходов.