

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

**К.И. Белоусов, А.А. Евстрапов,
И.В. Кухтевич, Я.С. Посмитная**
ОСНОВЫ НАНОТЕХНОЛОГИЙ. ЧАСТЬ 1

МИКРО- И НАНОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ
БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ. ЧАСТЬ 2

КАПЕЛЬНАЯ МИКРОФЛЮИДИКА

Учебное пособие

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург

2015

Оглавление

Введение.....	4
1. Микрофлюидика в капле.....	4
Вопросы для самоконтроля	5
2. Физика процесса. Образование капель	6
Вопросы для самоконтроля	11
3. Особенности «капельной» микрофлюидики.....	12
Вопросы для самоконтроля	13
4. Моделирование процессов в капельной микрофлюидике.....	13
Вопросы для самоконтроля	17
5. Создание стабильных макроэмульсий в микрофлюидных устройствах.....	17
Вопросы для самоконтроля	22
6. Обработка и модификация поверхности	22
Вопросы для самоконтроля	25
7. Устройства для генерации капель	25
Вопросы для самоконтроля	30
8. Устройства для слияния капель и смешивания в каплях.....	30
8.1. Коалесценция капель.	30
8.2. Пассивные устройства.	30
8.2.1. Коалесценция капель в каналах и реакционных камерах специальной геометрии.	30
8.2.2. Коалесценция капель за счет модификации поверхности канала.....	33
8.3. Активные устройства	34
8.3.1. Электрокоалесценция	34
8.3.2. Индуцируемая диэлектрофорезом коалесценция капель.....	34
8.3.3. Индуцируемая температурой коалесценция капель	35
8.3.4. Коалесценция капель пневматическими клапанами	35
Вопросы для самоконтроля	36
9. Материалы и технологии изготовления.....	36
9.1. Изготовление микрофлюидных устройств методом «мягкой» литографии в полидиметилсилоксане	39
Вопросы для самоконтроля	41
Заключение	42
Терминологический словарь	46
Литература	47

Введение

Развитие и совершенствование микро- и нанотехнологий, микрофлюидных технологий, высокочувствительных систем регистрации изображений, успехи в супрамолекулярной химии позволяют создавать малогабаритные устройства для формирования изолированных капель вещества в непрерывном потоке жидкости. Такие капли являются своеобразными реакционными камерами (объемом от 10^{-9} до 10^{-15} л), окруженными инертной средой, в которых могут быть проведены химические реакции или другие взаимодействия исследуемого объекта и изучаемого материала. Концепция проведения химических реакций в малых изолированных объемах может эффективно применяться в различных областях исследований, как на молекулярном уровне, так и при изучении клеток или других микроорганизмов.

1. Микрофлюидика в капле

Существуют и развиваются два магистральных направления, связанные с микрофлюидикой в капле: а) *цифровая микрофлюидика* (англ. *digital microfluidics, DMF*) – технология, позволяющая контролировать и управлять движением отдельных капель на подложке; б) *капельная микрофлюидика* (англ. *droplet microfluidics*), также относящаяся к категории цифровой микрофлюидики технология, позволяющая формировать капли в жидкой среде, осуществлять разнообразные манипуляции с ними и перемещать их по закрытым каналам в различные области микрочипа [1-3].

Схожей с *капельной микрофлюидикой* является гидродинамика сегментированного потока [4]. Различие между ними, в частности, заключается в степени взаимодействия пробы со стенками канала (рис. 1) [1], при этом капельная микрофлюидика имеет очевидное преимущество, так как исследуемая жидкая проба не взаимодействует со стенками канала, что предотвращает сорбцию молекул и возможность перекрестного загрязнения между дискретными объемами.

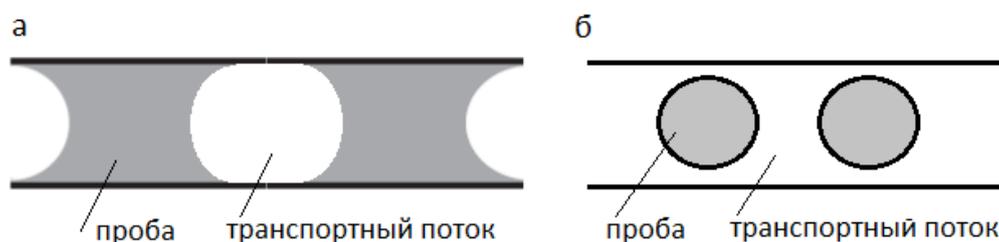


Рисунок 1 – Распределение в каналах несмешивающихся фаз для (а) сегментированной и (б) капельной микрофлюидики [1]

Методами капельной микрофлюидики можно осуществлять исследования отдельных микрообъектов биологической природы. Хотя идея изучения отдельных изолированных в оболочке минерального масла клеток была предложена в 1954 г. [5], но только с развитием

микрофлюидных технологий, обеспечивающих стабильное и воспроизводимое формирование монодисперсных микрокапель с заданными характеристиками, удалось создать платформу, подходящую для количественных исследований. К преимуществам микрофлюидных технологий следует отнести: высокие скорости формирования капель (с частотами генерации от нескольких Гц до десятков и сотен кГц), малый расход реагентов и пробы, возможность полного контроля условий формирования капель, реализация операций слияния или «дробления» капель и т.п.

Исследования в области капельной микрофлюидики свидетельствуют о возможности создания не только микросистем для химического и биохимического синтеза веществ [6-7], микро- и наночастиц [8], но и высокопроизводительной молекулярной диагностики методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) [9-11], исследования отдельных клеток и изучения процессов их функционирования [12-14], скрининга лекарственных средств [15] и т.д.

Ранний период развития капельной микрофлюидики (примерно 2000-2003 гг.) связан с демонстрацией возможностей для важных биотехнологических приложений. Но и сейчас, по мнению экспертов, потенциал капельной микрофлюидики еще не исчерпан [16-17].

Успешной является разработка медицинских диагностических систем для цифровой ПЦР (цПЦР) на основе принципов капельной микрофлюидики, так как такой подход позволяет создавать аналитические системы с высокой чувствительностью и производительностью [11]. Но отсутствие масштабируемых и доступных технологий для реализации цПЦР в капле и серийных приборов препятствует широкому распространению этого уникального метода, хотя в настоящее время имеются варианты зарубежных коммерческих систем для молекулярной диагностики методами ПЦР на основе принципов капельной микрофлюидики (например, выпускаемые компаниями *BioRad* [18] и *Rain Dance Tech* [19]).

Развитие и совершенствование технологий и методов, основанных на принципах капельной микрофлюидики, для анализа химических и биологических веществ, синтеза новых соединений в настоящее время является актуальной и востребованной задачей.

Вопросы для самоконтроля

1. Что подразумевается под термином «капельная» микрофлюидика?
2. Поясните, что такое «сегментированный поток».
3. Какие существуют преимущества капельной микрофлюидики над традиционными методами анализа биопроб?
4. Перечислите области применения капельной микрофлюидики?

2. Физика процесса. Образование капель

В микрофлюидных устройствах (МФУ) капли могут быть сформированы с использованием активных и пассивных методов. Для активных методов характерно применение внешних источников энергии (электрическое, электромагнитное излучение, тепловые поля, центробежные силы и т.п.), в пассивных формирование капель осуществляется за счет конструктивных особенностей устройства, подбора условий генерации капель и т.д. В непрерывном потоке жидкости создаются условия, при которых происходит «распад» струи и формирование регулярного и достаточно стабильного потока капель. Существуют следующие способы создания капель, основанные на различных физических механизмах:

- распад в соосных потоках (*англ. co-flowing streams*);
- распад при удлинении деформированных потоков (в устройствах с фокусировкой потока);
- распад в пересекающихся потоках (в Т-образных устройствах).

Формирование капли начинается, как только дисперсная фаза распространяется в канале, где течет непрерывная фаза. На границе раздела жидких сред действуют силы, влияющие на образование капель – вязкая сила напряжения сдвига, сила поверхностного натяжения и сила сопротивления потоку непрерывной фазы жидкости, которая внедряется в этот поток (сила сжатия). Баланс и соотношение этих сил определяют процессы, наблюдаемые при взаимодействии двух потоков.

Качественные модели процесса формирования капель могут быть построены с использованием характеристических чисел, что позволяет представить физику процесса и соотношение действующих сил. Некоторые безразмерные характеристические числа, применяемые в капельной микрофлюидике, приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Безразмерные характеристические числа, используемые в капельной микрофлюидике

Обозначение и наименование	Формула	Характеристика
Re Число Рейнольдса	$Re = \frac{V * \rho * L}{\eta}$	Соотношение инерционных и вязких сил
De Число Дина	$De = \frac{V}{\nu} \sqrt{\frac{L^3}{2r}} = Re \sqrt{\frac{L}{r}}$	Влияние центробежных сил на траекторию движения жидкости
Ca Капиллярное число	$Ca = \frac{\eta V}{\gamma}$	Соотношение вязких сил и сил поверхностного натяжения
We Число Вебера	$We = \frac{\rho V^2 L}{\gamma} = Re * Ca$	Соотношение инерционных сил и сил поверхностного натяжения
Bo Число Бонда	$Bo = \frac{\Delta \rho g L^2}{\gamma}$	Соотношение между гравитационными и силами

		поверхностного натяжения
Pe Число Пекле	$Pe = \frac{VL}{\chi}$	Соотношение конвективной и диффузной составляющими массопереноса
El Эластичность	$El = \frac{\tau_{polymer}\eta}{\rho h^2}$	Соотношение между эластичными и инерционными эффектами
Kn Число Кнудсена	$Kn = \frac{\lambda}{L}$	Соотношение длины свободного пробега к характерному размеру
Oh Число Онезорге	$Oh = \frac{\sqrt{We}}{Re} = \frac{\eta}{\sqrt{\rho\gamma L}}$	Отношение сил поверхностного натяжения к инерционным силам (с учетом вязких сил)
<p>Обозначения в формулах:</p> <p>η - динамическая вязкость среды, ρ - ее плотность, V – скорость потока, ν - кинематическая вязкость, r – радиус кривизны канала, γ - поверхностное натяжение между двумя фазами, ρ - плотность жидкости, $\Delta\rho$ - разница в плотности жидкости, g - ускорение свободного падения, χ - коэффициент температуропроводности, L - характерный размер канала: $L = \frac{4A}{P}$, где A – площадь сечения канала, P – периметр канала</p>		

Малые значения чисел Рейнольдса характеризуют ламинарные потоки с доминированием вязких сил и соответствуют плавному движению жидкости. Считается, что в микрофлюидных системах $Re < (1...10)$. При больших числах Re инерционные силы существенно влияют на течение потока и приводят к турбулентности.

Если жидкость течет по изогнутому каналу, на ее течение оказывают влияние силы реакции стенок канала, изменяя траекторию движения жидкости. Такие центробежные силы могут определять течение в искривленном канале при больших скоростях, а для их учета используется безразмерное число Дина De .

Размер капли связан со значением безразмерного капиллярного числа Ca , зависящего от отношения сил напряжения сдвига и поверхностного натяжения. Чем меньше поверхностное натяжение, тем легче генерировать мелкие капли. Если капиллярное число превышает определенную критическую величину, то происходит распад капель. При относительно высоких значениях Ca вязкие силы преобладают, что приводит к деформации капель и появлению асимметричных форм. Из

зависимости отношения капиллярных чисел для расходов используемых фаз можно построить диаграмму режимов течения жидкости в выбранной топологии МФУ [20]. При капиллярных числах $Ca < 10^{-2}$ силы поверхностного натяжения доминируют над вязкими силами, а формирование капель регулируется соотношением скоростей потоков между двумя несмешивающимися жидкостями. При этом капли имеют сферическую форму, если не происходит их деформация из-за геометрических параметров канала. Если $Ca > 10^{-2}$, то напряжение сдвига превалирует, геометрия и размеры канала, а также реологические свойства жидкости влияют на процесс распада потока на капли [21]. Методы пассивного формирования капель являются идеальными для экспериментов, где требуется большое число капель или высокая производительность анализа, как, например, в методах цПЦР [22] или при культивировании клеток [23].

Баланс инерционных, вязких и межфазных сил натяжения определяет образование капель и ограничивает их поток. Соотношение между инерционной составляющей сил и межфазным поверхностным натяжением в жидкой фазе можно охарактеризовать с помощью числа Вебера We . Если We превышает критическое значение 12 [24], то гидродинамические силы становятся больше, чем стабилизирующие силы поверхностного натяжения и может произойти распад потока на капли. Однако, такое значение числа We справедливо для жидкостей с низкой вязкостью. В зависимости от механизма образования капель различаются и критические числа We , так при режиме Релеевского распада $8 < We \leq 12$, а в режиме «*drop-on-demand*» – $12 < We \leq 40$ [25]. Недостатком числа Вебера является его независимость от вязкости жидкости, хотя известно, что вязкость влияет на формирование капель.

Для учета вязкости среды используют число Онезорге Oh , представляющее собой отношение сил вязкости и поверхностного натяжения [26].

В отдельных случаях требуется учитывать влияние гравитационных сил, для чего применяется число Бонда Bo , которое определяет соотношение между гравитационными и силами поверхностного натяжения. Для $Bo < 1$ гравитационными эффектами можно пренебречь.

В микрофлюидных системах при числах $Re < 1$ и соотношении $We/Ca < 1$ межфазные эффекты становятся доминирующими.

В капельной микрофлюидике при построении экспериментальных зависимостей применение находит безразмерная величина q – параметр, позволяющий оценить соотношение расходов непрерывной (Q_c) и дисперсной (Q_d) фаз:

$$q = \frac{Q_d}{Q_d + Q_c}$$

Традиционно учитывая, что процессы в микрофлюидике часто связаны с незначительной инерцией, во многих случаях пренебрегают

действием инерционных сил. Оказалось, что подобное допущение может привести к неверным результатам. Существует ряд практических применений, где используются инерционные эффекты в микроразмерных системах, например, возникновение вторичных потоков и движение частиц в «искривленных» каналах, инерционная миграция частиц. Так в [27] обсуждаются физические основы инерционной миграции частиц в микрофлюидных системах, что является важным аспектом развития капельной микрофлюидики. В исследовании [28] было показано, что инерциальная микрофлюидика дает возможность формировать контролируемые потоки так, что поток с конечной инерцией сопровождается определенной деформацией, а после прохождения нескольких препятствий эффект суммируется и, в конечном счете, становится возможным «конструирование» потоков с контролируемой геометрией.

Важным явлением в гидродинамике, вызывающим распад потоков жидкости, является неустойчивость Релея-Плато [29], приводящая к образованию капель в двухфазных системах. Поток жидкости внутри другой несмешивающейся жидкости (или газа) первоначально удлиняется, а затем из-за крошечного возмущения потока формируются узлы в жидкости, неоднородность которых возрастает, что приводит к распаду потока на капли. При этом могут формироваться помимо крупных капель и мелкие, называемые вторичными, что является нежелательным эффектом, так как для многих приложений требуется монодисперсность капель.

Таким образом, при определенных условиях на границе раздела фаз несмешивающихся жидкостей происходит деформация этой границы, вызывающая нестабильность и приводящая к образованию капель [17]. Размер капель определяется не только геометрией устройства, но и вязкостью фаз, свойствами смачивания поверхности канала, соотношением потоков (скорость, расход) несмешивающихся фаз и межфазным натяжением.

Авторы [30] исходя из численного моделирования предложили три варианта режимов течения, приводящих к образованию капель: а) сжатия (squeezing), б) капающий (dripping) и в) струйный (jetting). Механизм формирования капель в данных режимах поясняется на рис. 2. При низких капиллярных числах наблюдается формирование капель в режиме сжатия. Процесс распада потока начинается, когда давление потока непрерывной фазы сжимает поток дисперсной фазы. При высоких капиллярных числах образование капель происходит в соответствии с капающим режимом, когда дисперсная фаза частично заполняет канал, и при превышении сил напряжения сдвига над силами поверхностного натяжения происходит распад потока и формирование капель [31]. Струйный режим соответствует более высоким капиллярным числам. Из-за большого расхода компонентов этот режим реже используется в микрофлюидных приложениях. Упомянутые режимы подробно обсуждаются в работе [32].

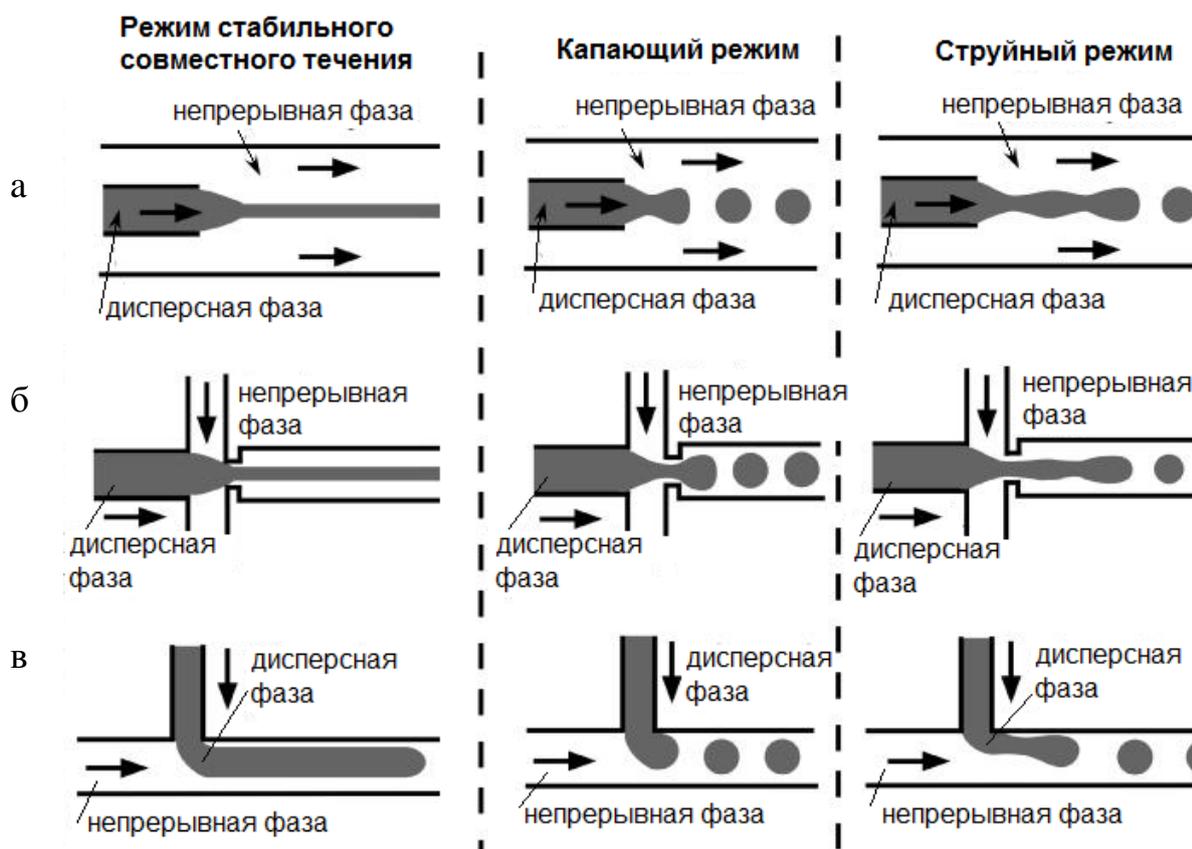


Рисунок 2 – Режимы течения потоков и формирования капель в базовых топологиях генератора капель: а – соосных потоков, б – фокусировки потока, в – Т-инжекции [33]

Важной характеристикой жидкости на границе раздела сред является величина поверхностного натяжения, зависящая от сил сцепления между молекулами. Поверхностное натяжение связано с дисбалансом межмолекулярных сил притяжения в жидкости, которые могут быть обусловлены водородными связями в случае полярных молекул или силами Ван-дер-Ваальса для других молекул. На границе раздела сред твердой фазы, жидкой и газообразной образуется устойчивый мениск при локальном равновесии всех сил. Если слой молекул жидкости абсорбируются на поверхности канала, то изменяются углы динамического контакта и может наблюдаться движение жидкости в канале [34]. Минимизация поверхностного натяжения на границе раздела жидких сред – одна из важных задач при создании стабильных капель, для этого приходится подбирать соответствующие эмульгаторы – поверхностно-активные вещества (ПАВ).

В работе [35] было выявлено, что при низкой концентрации ПАВ частичное смачивание поверхности вызывает нарушение генерации капель, в то время как при определенной концентрации ПАВ краевой угол воды и подложки, погруженной в непрерывную фазу жидкости, становится близким к 180° , и достигается стабильное формирование капель. Те же

авторы [35] предполагают, что критерием формирования стабильной эмульсии «вода-в-масле» является условие равенства этого краевого угла 180° . Позже Ли и др. [36] была показана важная роль кинетических эффектов. С использованием дистиллированной воды в качестве дисперсной фазы и минерального масла (с добавлением 2% ПАВ Span 80) в качестве непрерывной фазы были поставлены эксперименты на генераторах капель с фокусировкой потока, изготовленных из полидиметилсилоксана (ПДМС). Каналы генератора капель были модифицированы разными способами. Эксперименты свидетельствовали, что при движении краевой угол воды на стенках канала должен превышать $\theta_A \approx 92^\circ$ для генерации эмульсии «вода-в-масле» и оставаться ниже этого значения для формирования капель «масло-в-воде».

Исследования взаимосвязи между динамикой образования капель, составом среды и геометрией инжекторов привели к созданию аналитических и феноменологических моделей, которые были экспериментально подтверждены (в частности, для Т-инжектора [37-38]).

Для многих приложений требуется формирование двойных или более сложных эмульсий. Вариант МФУ для генерации двойных эмульсий, в котором совмещены две топологии с фокусировкой потока, представлен на рис. 3.

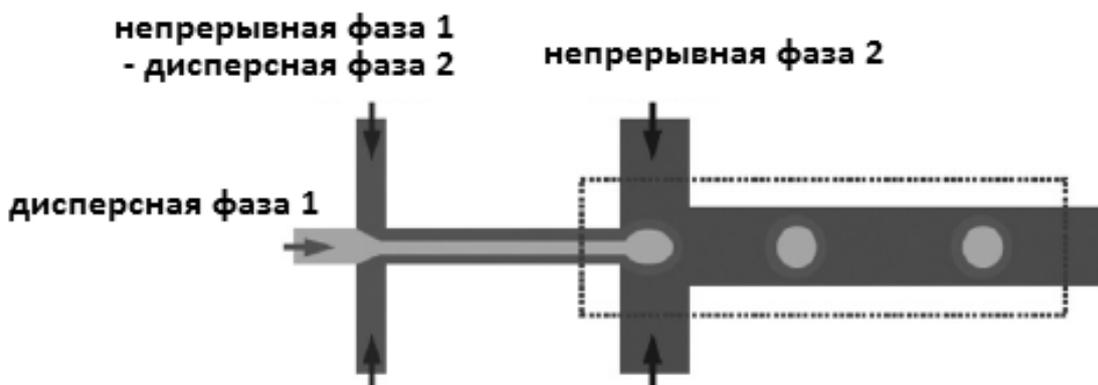


Рисунок 3 – Микрофлюидное устройство для формирования двойных эмульсий

Вопросы для самоконтроля

1. Какие способы создания капель (макроэмульсий) Вам известны?
2. Поясните механизмы формирования капель.
3. Какие безразмерные характеристические числа используются в капельной микрофлюидике?
4. Какие силы соотносятся в числах Рейнольдса, Дина, Пекле, Онезорге, Вебера, Бонда?
5. Что характеризует число Кнудсена?
6. Что характеризует капиллярное число?

7. Какие эффекты приводят к «распаду» потока жидкости и вызывают образование капель?
8. Назовите известные Вам режимы течения потоков, приводящие к образованию капель.
9. Какие условия необходимы для формирования капель в микрофлюидном устройстве?
10. Поясните, с помощью какой топологии микрофлюидного устройства можно сформировать двойную эмульсию и какие условия при этом должны соблюдаться?

3. Особенности «капельной» микрофлюидики

Выполнение аналитических операций (дискретизация пробы, манипуляции с ней и измерение информативного сигнала) методами капельной микрофлюидики позволяет существенно ускорить анализ пробы. МФУ могут производить монодисперсные капли объемом от 0,05 пл до 1 нл или от 5 мкм до 120 мкм в диаметре [39], что позволяет экономить реагенты. Капли могут содержать клетки, биомолекулы, ДНК или РНК и другие частицы или молекулы, находящиеся в водной фазе [40-41].

Вещества или микрочастицы из разных капель могут быть объединены путем коалесценции капель, что позволяет смешать их содержимое [42]. После проведения необходимых манипуляций и реакций капли могут быть отсортированы по определенным признакам, а их компоненты извлечены из масляной оболочки. Широкие возможности для различных вариантов манипуляций с каплями позволяют реализовать практически любые стадии анализа изучаемого объекта или синтеза сложного вещества. Показано, что многие из часто используемых в биологических исследованиях анализов можно реализовать на основе принципов и методов капельной микрофлюидики [43].

За счет использования капель (малого объема детектирования) достигается низкий уровень шума регистрируемого сигнала, так как любой фоновый шум, присутствующий в растворе будет уменьшен пропорционально объему.

Масло, которое применяется в качестве непрерывной фазы – носителя потока капель, предотвращает нежелательное взаимодействие между реагентами и твердыми поверхностями и способствует манипуляции с каплями при их разделении. Таким образом достигается минимизация загрязнения и перекрестной контаминации дискретных объемов пробы.

В случае применения капельной микрофлюидики для синтеза и проведения реакций, учитывая, что скорость реакции возрастает в зависимости от эффективной концентрации, а реакционное пространство в капле мало, то время реакции, которые обычно в макросистемах составляет несколько часов, в капле может снизиться до нескольких секунд или минут [44]. Кроме того, минимальная концентрация продуктов

реакции, необходимая для обнаружения, будет достигнута («наработана») быстрее в малых объемах, а, следовательно, детектирование также может быть выполнено оперативнее [45].

Формирование капель в различных жидкостях во многих случаях является сложной задачей. Для системы, позволяющей создавать стабильные капли (термостабильность, монодисперсность, форма капель), необходимо осуществлять модификацию поверхности с использованием методов «мокрой» химии, химии силанов, плазменной обработки и других способов, обеспечить стабильные условия. Гидродинамические условия формирования капель и конструкция генератора эмульсии также влияют на размер и форму капель.

С точки зрения физики, контроль границ раздела сред в динамике является определяющим при формировании капель в МФУ. При этом наблюдаются нелинейные динамические явления [46], которые существенны в широком диапазоне размеров – от сотен микрометров до нанометров [47]. Т.е. в диапазоне почти пяти порядков нелинейные эффекты могут играть решающую роль, что в значительной степени объясняет сложности, с которыми сталкиваются исследователи при создании устройств капельной микрофлюидики.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите особенности *формирования* капель с помощью микрофлюидных устройств.
2. Какие особенности *детектирования* результатов реакций в каплях Вы можете отметить?
3. Какую роль играют граничные эффекты при формировании капель?

4. Моделирование процессов в капельной микрофлюидике

При изучении эволюции капель главными предметами рассмотрения являются процессы их формирования, транспорта, слияния и стабильности. Задача теоретического моделирования двухфазной системы является достаточно сложной в связи с необходимостью учета деформируемой границы капель, сил поверхностного натяжения и их изменения, что добавляет ряд нелинейных эффектов при ее рассмотрении [48]. Существенным проявлением нелинейности является то, что малейшие изменения условий движения могут привести к изменению характера потока [49]. Подобные переходы возможны, потому что изменения в геометрии капель в свою очередь воздействуют на скоростные профили потоков, усиливая изначально малые изменения. Поэтому получение точных аналитических решений достаточно затруднительно, и при их построениях используют ряд допущений.

Характер движения капель в каналах можно определить в зависимости от отношения их диаметра к характерным размерам самих каналов. Тогда возможны варианты, когда диаметр капель меньше размеров канала, и они движутся свободно по всему его сечению; когда

канал имеет большое аспектное отношение, и капли ограничены только с одной стороны; и когда капли занимают все сечение канала, ограниченные по ширине и высоте. Таким образом, можно говорить о трехмерных, двумерных и одномерных системах переноса капель.

При анализе трехмерных систем обычно полагают, что капли движутся со скоростью непрерывной фазы, следуя ее линиям тока [50]. Но с ростом плотности количества капель выясняется, что они возмущают поток вокруг себя, создавая $(1/r)$ дальнедействующие гидродинамические взаимодействия [51]. На качественном уровне движение капель проявляется в сильной дальнедействующей корреляции и завихрениях, которые зависят от граничных условий [52]. Однако теоретически коллективное движение остается неясным вследствие расхождения суммы $(1/r)$ сил по мере увеличения количества участвующих во взаимодействии капель [53] и расходимости результирующих флуктуаций [54]. Получаемые в ходе наблюдений данные еще полностью теоретически не объяснены [55, 56].

В двумерных, ограниченных с одной стороны системах, гидродинамические силы уменьшаются как $1/r^2$, что избавляет систему от описанных выше несходимостей. Таким образом, взаимодействие капель друг с другом можно описать как взаимодействие гидродинамических диполей, аналогичных диполям из электростатики, что позволяет проводить теоретический анализ их поведения [57]. Так, по цепочке капель распространяются «акустические моды», которые сродни твердотельным фононам обладают соответствующими дисперсионными соотношениями и которые могут приводить к различным неустойчивостям. Учет дипольного взаимодействия между каплями позволяет предсказать дисперсионные отношения и прогнозировать появление нелинейных неустойчивостей [58].

В одномерном случае, когда капля ограничена с двух сторон, главную роль начинают играть капиллярные эффекты и деформация поверхности капли. При этом в качестве основного критерия на первый план выходит капиллярное число.

При движении капли в канале между ней и стенкой канала образуется тонкий слой непрерывной фазы [59]. Относительно капли стенки канала движутся в обратном направлении и увлекают несущую жидкость в пространство между каплей и каналом. С другой стороны более высокое давление в капле по сравнению с окружающей жидкостью сдавливает слой, находящийся между каплей и каналом.

Брезертон [60] вывел нелинейный закон, оценивающий толщину слоя для газовых пузырей, движущихся с малым капиллярным числом ($Ca < 0.01$) в цилиндрическом канале:

$$\frac{\delta}{R} = 1,34Ca^{2/3},$$

где δ – толщина пленки, м; R – радиус капилляра, м.

Схожие зависимости, отличающиеся только численным коэффициентом перед Ca , были получены для вязких капель [61] и

многоугольных сечений канала [47]. Эти теоретические результаты были подтверждены экспериментально [62] и данными численного моделирования [63], а в [64] предложена эмпирическая зависимость, описывающая толщину слоя на интервале значений до $Ca \sim 1$:

$$\frac{\delta}{R} = \frac{1,34Ca^{2/3}}{1+3,35Ca^{2/3}}$$

Присутствие тонкого слоя напрямую влияет на среднюю скорость движения капель. В [65] отмечается, что расход жидкости в слое может быть рассчитан, исходя из разности средних скоростей капель и несущей жидкости между ними. Поскольку жидкость в тонком слое течет со скоростью меньшей скорости капли, для сохранения баланса массы капля должна двигаться с большей скоростью, чем несущая жидкость, при этом:

$$\frac{V_d - V_{ext}}{V_d} \sim Ca^{2/3},$$

где V_d – средняя скорость капли, м/с; V_{ext} – средняя скорость несущей жидкости между каплями, м/с. Данное соотношение экспериментально проверено в [62]. В [66] было получено более общее решение для гидродинамики пузырей в цилиндрическом капилляре, позволяющее рассчитывать профили скорости в пузыре, в слое вокруг него и в жидкости между пузырями, а также распределение касательных напряжений и продольную составляющую градиента давления, которая хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Для квадратных микроканалов картина несколько меняется, так как капли не заполняют полностью сечение канала, оставляя в углах канала пространство, в котором несущая жидкость может свободно двигаться. В [47] показано, что поток Q_c в углах движется в направлении движения капли и пропорционален:

$$Q_c \sim Ca^{-1/3} AV_d,$$

Таким образом, скорость капли меньше скорости несущей жидкости:

$$\frac{V_{ext} - V_d}{V_d} \sim Ca^{-1/3},$$

что согласуется с результатами моделирования [67]. Тем не менее, различие в скоростях не превышает 6% для капиллярных чисел $10^{-6} < Ca < 1$ [68].

Для предсказания скоростей движения капель и несущей жидкости необходимо установить связь между ними и перепадом давления в канале ΔP . При этом перепад давлений происходит в несущей жидкости между каплями, в самих каплях и в их криволинейных частях, продуцирующих Лапласово давление. ΔP зависит от значений капиллярного числа, вязкостей непрерывной и дисперсной фазы, их скоростей, геометрических параметров канала, числа капель [69]. Однако, отношение между давлением и скоростью потока слишком сложное для общего использования, поскольку входящие в выражения константы, зависящие от геометрии канала, должны каждый раз пересчитываться при изменении

канала. Кроме того, зависимость от капиллярного числа перестает выполняться при средних и больших Ca [70], а наличие ПАВ значительно влияет на процессы каплеобразования [71]. По этой причине часто используются упрощенные эмпирические зависимости [72, 73].

Еще сложнее описать процесс формирования капель. Существует ряд эмпирических формул, позволяющих оценить размер капель в зависимости от капиллярного числа и отношения величин потоков фаз для различных топологий [74-76]. Однако они все являются *частными*, таким образом, при создании новых устройств для капельной микрофлюидики важную роль играет численное моделирование процессов в создаваемых топологиях генераторов капель.

Принцип численного моделирования заключается в приближительном решении на дискретном пространстве расчетной сетки уравнений, описывающих эволюцию системы. Существует два основных подхода при моделировании мультифазной системы: с *явным выделением границы раздела фаз (interface tracking)* и *сквозного счета (interface capturing)* [77].

В методах с *явным выделением границы фаз* элементы расчетной сетки лежат прямо на границе фаз. К таким методам относятся: метод граничных интегралов [78], метод погруженной границы [79], метод конечных элементов с деформируемой сеткой [80].

В методе граничных интегралов разбиение сетки происходит только по границе раздела фаз, а выражения, описывающие движение жидкостей, проецируются на нее, уменьшая таким образом размерность решаемой задачи.

В методе конечных элементов, в отличие от метода граничных интегралов, расчетная сетка присутствует в доменах, описывающих жидкие фазы, как следствие, с изменением границы происходит деформация элементов во всем объеме моделирования.

В методе погруженной границы межфазные силы рассчитываются на границе, отделенной от основной области моделирования, где решаются уравнения потока, вследствие чего необходима сшивка решений. Эти методы достаточно точны и эффективны, так как межфазная граница является частью расчетной сетки, а выражения с граничными условиями точно формулируются. При этом, в то время как они отлично справляются с моделированием разделения и слияния капель, они имеют проблемы с дальнейшим расчетом движения жидкости.

В методах *сквозного счета* сама граница фаз движется по расчетной сетке, которая остается неподвижной и не деформируется. К этим методам можно отнести: метод решеточных уравнений Больцмана [81], интерполяционного профиля [82], объема жидкости (*volume of fluid, VOF-метод*) [83], фазового поля [84], функции уровня [85]. Разрывы в параметрах среды на границе двух фаз (плотность, вязкость) сглаживаются, а сила поверхностного натяжения распределяется по тонкому слою на двухфазной границе, являясь объемной (массовой) силой.

Метод решеточных уравнений Больцмана рассматривает течение жидкости как движение ансамбля псевдо-частиц, усреднение параметров которых дает представление о движении всей жидкости. В методах интерполяционного профиля, объема жидкости и функции уровня распределение фаз описывается при помощи вспомогательных функций, а смещение границы между ними определяется путем решения уравнений массопереноса. Методы сквозного счета идеальны для моделирования больших перемещений фазовой границы и проектирования структуры микроканалов, однако приближенное задание границы уменьшает их точность. Повысить точность позволяет использование адаптивной сетки, уменьшающей свое разбиение в области границы фаз [86].

Вопросы для самоконтроля

1. Как соотносятся скорости движения капли и несущей жидкости в капиллярах с круглым сечением? С прямоугольным?

2. Назовите два основных подхода, используемых при моделировании мультифазной системы. В чем их принципиальное различие? Их преимущества и недостатки.

3. На каком принципе основывается моделирование с использованием метода фазового поля и его отличие от методов интерполяционного профиля, объема жидкости и функции уровня?

5. Создание стабильных макроэмульсий в микрофлюидных устройствах

Эмульсия – дисперсная система, состоящая из микроскопических капель жидкости (дисперсной фазы), распределенных в другой жидкости (дисперсионной или непрерывной среде) [87]. Эмульсии могут быть образованы любыми несмешивающимися жидкостями (например, водой и жидкими углеводородными жирами). Существуют прямые (капли неполярной жидкости в полярной среде – «масло-в-воде», М/В) и обратные («вода-в-масле», В/М) эмульсии. Также встречаются однократные и множественные (мультифазные) эмульсии, в которых капли дисперсной фазы содержат в своем объеме более мелкие капли дисперсионной среды («вода-в-масле-в-воде», В/М/В; «масло-в-воде-в-масле», М/В/М и так далее). В эмульсиях самопроизвольно протекает процесс слияния капель – коалесценция, зависящая от разницы в плотностях фаз, концентрации дисперсной фазы и отсутствия эмульгатора.

Так как две несмешивающиеся жидкости не могут образовывать *устойчивую* эмульсию, то для ее стабилизации используются различные способы. Стабилизация капель может быть реализована: (I) с помощью сил отталкивания между молекулами на границе раздела сред вследствие электростатических и/или стерических эффектов; (II) замедлением гидродинамического потока вдоль границы с помощью эффекта Марангони или при изменении вязкости [88]. В обоих случаях

определяющую роль играет состав непрерывной и дисперсной фаз, а также характеристики окружающей среды.

Чаще всего для стабилизации капель используют компонент, стабилизирующий систему – эмульгатор, в качестве которого применяют поверхностно-активное вещество, снижающее поверхностное натяжение между двумя жидкостями путем формирования на границе раздела жидкость-жидкость ориентированной пленки. ПАВ состоит из гидрофобного хвоста и полярной гидрофильной головы, которые могут быть как ионными, так и не ионными. Одним из условий выбора стабилизатора является его лучшая растворимость в той жидкости, которую предполагается сделать непрерывной фазой. Стабилизатор также должен обладать хорошей адсорбционной способностью на границе раздела для выбранных жидкостей и располагаться между ними (рис. 4), а не в объеме одной из них, т.е. содержать группы, обладающие сродством к обеим фазам, и уменьшать свободную энергию системы. Кроме того, молекулы эмульгатора должны иметь достаточную длину, чтобы образовавшийся со стороны внешней фазы адсорбционный слой не допускал сближения капель на расстояние, где наблюдается преобладание ван-дер-ваальсовых сил притяжения.

Стабилизаторами прямых эмульсий являются водорастворимые ПАВ с высокими значениями гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ, *англ.* HLB) более 8: анионные (мыла щелочных металлов), неионогенные (твины, этоксилаты спиртов), катионные (алкилимидазолины, четвертичные аммониевые соли), высокомолекулярные ПАВ природного (лецитины, полисахариды, липопротеины, белки) и синтетического (поливиниловый спирт, полиакрилаты и др.) происхождения. Для стабилизации обратных эмульсий используют моноалканоламиды, неионогенные ПАВ с низким ГЛБ (например, Span 80, этиленоксилаты высших спиртов и кислот).

Природа ПАВ может определять тип эмульсии. ПАВ, которые лучше растворимы в воде, чем в масле, как правило, формируют эмульсии М/В, а ПАВ, которые лучше растворимы в масле, как правило, формируют эмульсии В/М [89].

В зависимости от размера капли, эмульсии классифицируют на три группы: макроэмульсии, миниэмульсии и микроэмульсии. Макроэмульсии термодинамически неустойчивы, но могут быть кинетически стабилизированы ПАВ и иметь размеры капель в диапазоне от единиц до сотен микрон. Использование ПАВ позволяет получать размеры капель до ~ 100 нм – такие эмульсии называются «миниэмульсиями» [90]. Дополнительно ПАВ добавляют в дисперсную фазу, чтобы повысить устойчивость миниэмульсий. Если межфазное натяжение уменьшается до очень низких уровней, то могут быть получены капли с размером вплоть до ~ 10 нм, такие эмульсии являются прозрачными из-за их малого размера, и называются микроэмульсиями [91]. Свойства микроэмульсий в значительной степени определяются свойствами монослоя ПАВ.

Эмульсии, которые стабилизируют с помощью небольших твердых частиц, адсорбирующихся на границе раздела фаз, называют эмульсии Пикеринга (Pickering, см рис. 4 б). Чтобы такая эмульсия была стабильной, необходимо, чтобы краевые углы смачивания твердофазной частицы обеими фазами были примерно одинаковыми. Даже малые различия в свойствах смачивания определяют тип формируемой эмульсии – если частица смачивается водой лучше, чем маслом, то возникает эмульсия типа М/В и наоборот. Такие свойства, как смачивание, форма, размер и концентрация частиц, могут оказывать влияние на стабильность эмульсии. Частицы, которые являются отчасти гидрофобными (т.е. краевой угол приблизительно 90°) – более эффективные стабилизаторы, потому что они частично смачиваемы обеими жидкостями и, следовательно, лучше связываются с поверхностью капель.

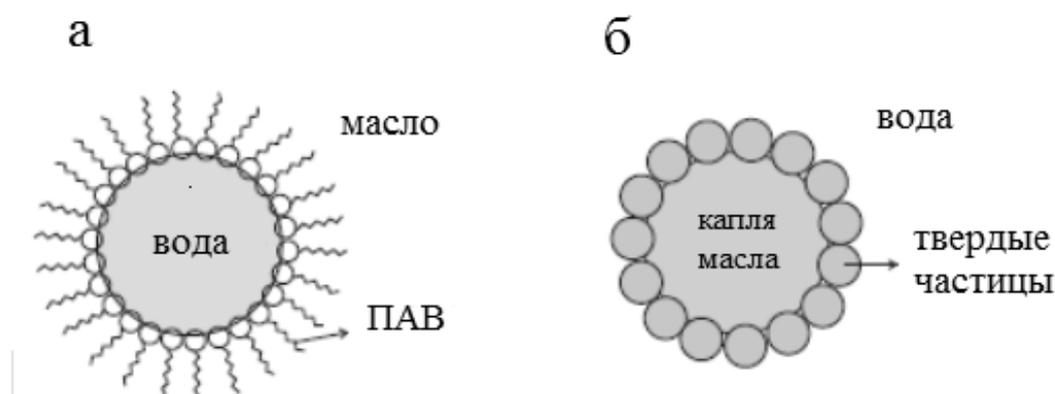


Рисунок 4 – Эмульсии, стабилизированные ПАВ (а) и твердофазными микрочастицами (б)

Для каждого конкретного случая эмульгатор подбирается опытным путем, но при его выборе часто используются эмпирические зависимости и характеристики, например гидрофильно-липофильный баланс, оценивающий баланс между действием полярной и неполярной частями молекул и позволяющий предсказать тип получаемой эмульсии. В 1949 г. Гриффин [92] ввел понятие ГЛБ как способ прогнозирования типа эмульсии исходя из молекулярного состава поверхностно-активного вещества. Количество ГЛБ в терминах числовых значений, присвоенных химическим группам в ПАВ, определяется следующим образом:

$$HLB = 7 + X (\text{hydrophilic group numbers}) - Y (\text{lipophilic group numbers})$$

Эта оценка не характеризует устойчивость получаемых эмульсий. Для адекватной оценки эмульгирующей способности ПАВ следует: сравнить устойчивость формируемых защитных слоев на границе раздела фаз (для этого определяют постоянную коалесценции); оценить поверхность, которую способна стабилизировать единица объема раствора

ПАВ, и нижний предел концентрации эмульгатора, при которой еще происходит стабилизация.

Для того чтобы выполнять операции с каплями, такие как воспроизводимая генерация, инкубация их при разной температуре, транспортировка и слияние, важно использовать стабильные ПАВ [93]. В качестве ПАВ, как правило, выбирают амфифильные молекулы с гидрофобными и гидрофильными группами [94]. ПАВ адсорбируются на границе раздела масло-вода и снижают поверхностное натяжение, что препятствует слиянию капель и придает им метастабильность. Поверхностно-активные вещества не являются существенными для генерации капель, но капли, не стабилизированные ПАВ, сливаются при их контакте после формирования. Метастабильность капель означает, что они имеют ограниченное время жизни до слияния, которое может варьироваться от миллисекунд до нескольких лет в зависимости от стабилизирующих характеристик ПАВ и физических условий окружающей среды [95]. ПАВ для микрофлюидных технологий должны удовлетворять различным требованиям и иметь необходимые свойства для обеспечения эффективности выбранной методики анализа или технологии синтеза. Так, в случае скрининга лекарственных средств, они должны быть совместимы с клетками в течение длительного времени, необходимого для эксперимента, быть инертными по отношению к компонентам в капле, регулировать молекулярный обмен между каплями и предотвращать миграцию биомолекул к границе [93]. Изучение капель в МФУ позволяет получить ценную информацию о свойствах эмульсий, их реологии, процессах на границах раздела сред, механизмах действия ПАВ и т.д.

Широко распространенными ПАВ, применяемыми в капельной микрофлюидике, являются неионные ПАВ Span и Tween, которые имеют хорошую стабильность в широком диапазоне pH и толерантность к электролитам.

Для формирования капель В/М, как правило, используются коммерчески доступные углеводородные и фтористоуглеродные масла. Капли в углеводородном масле, таком как гексадекан, так называемом минеральном масле, обычно стабилизируют коммерчески доступными ПАВ, такими как Span 80 [96] или ABIL EM90 [97].

ABIL EM90 является биосовместимым, и используется в косметических продуктах [98]. В микрофлюидных системах минеральное масло с добавлением ABIL EM90 применяется для цПЦР в каплях [96], что обеспечивает хорошую температурную стабильность. Однако высокая вязкость раствора обуславливает обратное давление при длительной инкубации капель в канале и приводит к нестабильности капель. Поэтому ABIL EM90 в ряде случаев непригоден для микрофлюидных приложений, требующих длительного инкубационного времени и сложных операций с каплями. Другой ПАВ ABIL EM180 [99], являющийся универсальным высокомолекулярным эмульгатором для В/М эмульсий, также успешно используется в капельной микрофлюидике. Он обладает хорошей

термостабильностью и совместимостью с электролитами и также используется в парфюмерной промышленности, что свидетельствует о хорошей биосовместимости.

Перфторированные масла и ПАВ являются предпочтительными для формирования микрокапель для биохимических приложений, поскольку они липофильны, инертны, не растворимы в воде и совместимы со многими биохимическими молекулами. Но такие капли являются нестабильными и объединяются друг с другом под давлением [100].

Фторуглеродные масла имеют преимущества по сравнению с углеводородными маслами из-за хорошего транспорта кислорода и не смешивания с органическими и водными растворителями. Микроэмульсии во фторуглеродных маслах могут быть получены с использованием Fluorinert FC-40, FC-77 или аналогичных масел в качестве непрерывной масляной фазы и стабилизированы перфторполиэфирами на основе ПАВ, таких как Krytox (*DuPont*) и др. [93].

Некоторые компании специализируются в области синтеза фторированных материалов, поэтому у зарубежных исследователей существует возможность заказать необходимые вещества у них. Например, компания RAN Biotechnologies [101], основанная в 2012 году, разрабатывает и синтезирует ПАВ для капельной микрофлюидики (инкапсуляция ДНК, РНК, белков и клеток) и эмульсионной ПЦР.

Из-за большого отношения поверхности к объему микрокапель поверхностные взаимодействия на границе раздела вода-масло имеют существенное значение в выборе системы масло-ПАВ для изоляции клеток и биологических молекул в капле. Неспецифическая сорбция белка на границе раздела фаз может негативно влиять на результаты ферментного анализа или специфических взаимодействий при скрининге лекарственных средств. Хотя капли в некоторых случаях могут быть рассмотрены как замкнутые пространства (реакторы), это не всегда отражает реальные процессы. В работах [102, 103] был обнаружен перенос малых молекул из водного раствора в масляную фазу. Этот эффект зависит от концентрации ПАВ и может быть уменьшен при добавлении биомолекул, приводящих к образованию пленки на границе раздела сред.

При выборе компонентов для создания эмульсий должно быть изучено влияние масла и ПАВ на вещества дисперсной фазы (находящиеся в капле). Так взаимодействие биологических молекул (белков, ДНК, РНК) с границей раздела вода-масло часто приводит к дезактивации, денатурации и локализации молекул на поверхности [104]. Чтобы уменьшить взаимодействие с биомолекулами, следует использовать неионные ПАВ [105]. Диффузия молекул в масляную фазу может привести к потере чувствительности при обнаружении, неправильности экспериментальных результатов и перекрестной контаминации капель [106]. Токсичность масла и ПАВ для клеток также должна быть тщательно изучена. Например, в работе [43] сообщается о потерях до 15% жизнеспособности клеток при использовании фторуглеродного масла в

качестве жидкости-носителя, что может быть обусловлено напряжением сдвига в процессе инкапсуляции клетки.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое «эмульсия» и какие типы эмульсий Вам известны?
2. Перечислите основные условия образования устойчивых эмульсий.
3. Что такое «поверхностно-активное вещество»?
4. Поясните, что подразумевается под термином «гидрофильно-липофильный баланс»?
5. Какие требования предъявляются к ПАВ при формировании эмульсий для исследования биологических молекул?

6. Обработка и модификация поверхности

Одним из важных условий устойчивой генерации капелек является не смачивание дисперсной фазой поверхности канала и смачивание непрерывной. Если диаметр формируемых капелек больше ширины канала, то следует обеспечить несмачиваемость, иначе генерация капелек будет нестабильной (рисунок 5). Даже частичная смачиваемость вещества в дисперсной фазе приводит к нестабильности.

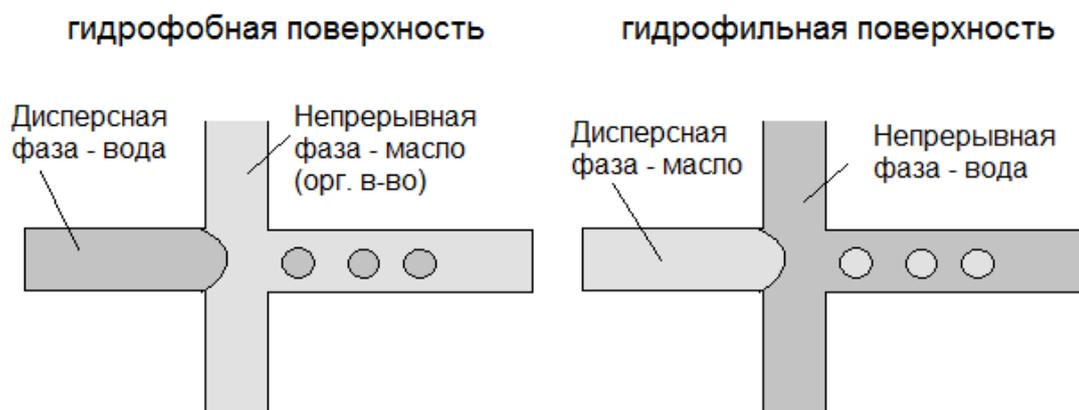


Рисунок 5 – Формирование капелек в зависимости от смачиваемости поверхности.

Методы модификации поверхности микрофлюидных чипов (МФЧ) с целью придания требуемых свойств зависят от материала микрочипа, условий его использования и решаемых задач. Здесь рассмотрены методы и подходы, применяемые при модификации поверхности ПДМС, как наиболее популярного материала для прототипирования в микрофлюидике.

Методы модификации можно разделить на два вида: основанные на процессе физической адсорбции (неионные ПАВ, осаждение пленок полиэлектролита); и основанные на образовании ковалентной связи (самоорганизующиеся монослои или ковалентные полимерные покрытия).

Например, обработка плазмой в среде кислорода приводит к окислению гидрофобной поверхности ПДМС, что обеспечивает гидрофильные свойства. Тем не менее, модифицированная гидрофильная поверхность восстанавливает исходные свойства из-за перестройки полимерных цепей на поверхности. Требования, предъявляемые к свойствам смачивания, зависят от типа формируемой эмульсии. Для формирования двойной эмульсии требуются два последовательно расположенных генератора, поверхность которых имеет различные свойства смачивания. Для формирования эмульсии В/М необходимо придать поверхности гидрофобные свойства (хотя ПДМС в своем исходном состоянии уже обладает гидрофобными свойствами, но после плазменной обработки, используемой для герметизации, поверхность становится гидрофильной). Для получения эмульсии М/В рабочие поверхности микроканалов подвергаются различным видам обработки для достижения гидрофильных свойств. Наиболее часто применяемыми методами обработки для получения гидрофобных свойств является модификация при помощи коммерчески доступного водоотталкивающего агента *Aquapel* (PPG Industries, США), а также силанизация. Более трудоемкой является модификация устройств для производства двойных эмульсии. При этом сочетаются различные методы с последовательной обработкой. Наиболее популярными являются методы, основанные на осаждении слоев полиэлектролита, а также с использованием метода УФ-структурирования (полимеризация под действием УФ-излучения), которые позволяют получить гидрофильную пленку на поверхности канала.

Метод графтинга (прививки) полимерного покрытия – один из широко используемых методов для создания функциональных слоев. В данном методе молекулы полимера ковалентно связываются с поверхностью через «якорный» слой. Во многих работах применяется методика иммобилизации слоев поливинилового спирта (ПВС), заключающаяся в заполнении канала МФЧ раствором ПВС с последующей термической обработкой.

В [13] сообщается о применении монодисперсной двойной эмульсии, производимой на одном МФУ с частично гидрофильными и гидрофобными каналами для количественного проточно-цитометрического анализа. МФУ для формирования двойной эмульсии (два последовательных генератора с фокусировкой потока) были изготовлены из ПДМС Sylgard[®] 184 (Dow Corning, США). Для того чтобы получить частично гидрофильные и гидрофобные участки в устройстве, использовалась двухэтапная обработка, описанная в [107]. На первом этапе для получения гидрофильного покрытия канала производилось последовательное осаждение слоев полиэлектролита на поверхность микроканала непосредственно после герметизации устройства. Чтобы избежать распространения полиэлектролита по другим каналам, через другой порт подавался поток деионизированной воды. На втором этапе для получения гидрофобных свойств применялась локализованная обработка

модифицируемой поверхности с помощью водоотталкивающего агента *Aquapel*. При этом гидрофильное покрытие в смежных каналах было защищено встречным потоком фторуглеродного масла. Интеграция двух генераторов капель на одном чипе позволяет синхронизировать два процесса формирования капель в отличие от использования для этих целей двух отдельных чипов. Однако процесс модификации поверхности становится сложным, и требуется двухэтапная обработка.

В работе [107] предложен новый метод структурирования поверхности МФУ из ПДМС с использованием интегрированных резервуаров с кислородом, получаемых одновременно с репликацией микроканалов, которые служат в качестве «хемо-маски». За счет газопроницаемости материала кислород диффундирует через ПДМС в близлежащие участки канала и ингибирует процесс функционализации поверхности. При соответствующем размещении «хемо-маски» становится возможным контроль полимеризации. Данный метод является простым, масштабируемым и совместимым с различными химическими методами модификации поверхности. Авторами были изготовлены тестовые структуры из ПДМС методом «мягкой» литографии, герметизированные стеклянной пластиной после плазменной обработки и содержащие один канал шириной 30 мкм и два резервуара справа и слева от канала – набор «хемо-масок» с различными вариантами размеров (200, 400 и 800 мкм²). Толщина перемычки (стенки) между каналом и резервуарами была выбрана экспериментально на основе компромисса между структурной стабильностью и газопроницаемостью и составила 20 мкм. Функционализация поверхности канала выполнялась в два этапа. Первый этап заключался в использовании стекловидного покрытия, полученного с использованием золь-гель метода. Это покрытие является поликонденсированным силаном с двумя видами функциональных групп: фторуглеродных, которые придают поверхности гидрофобные свойства, и групп фотоинициатора, которые обеспечивают поверхностно-связанные радикалы, инициирующие процесс полимеризации. На втором этапе канал заполняли раствором мономеров акриловой кислоты и подвергали все устройство воздействию УФ-излучения. В процессе обработки на поверхности образуется слой полиакриловой кислоты, который придает каналу гидрофильные свойства кроме участка, расположенного рядом с «хемо-маской». Кислород, находящийся внутри резервуаров во время герметизации, диффундирует через тонкие стенки в канал и ингибирует процесс полимеризации. Если необходимо, то возможно подавление ингибирования путем предварительного заполнения резервуаров маски водой, что позволяет процессу полимеризации проходить по всей длине канала. После УФ-обработки канал промывали водой для удаления несвязанных мономеров. Описанный подход авторы использовали для модификации МФУ с двумя генераторами типа «простой крест» для получения двойных эмульсий. В устройстве для формирования эмульсии В/М/В маска находилась рядом с первым перекрестием и последующим

участком канала, чтобы придать этим элементам гидрофобные свойства, тогда как второй генератор и остальная часть устройства приобретали гидрофильные свойства. Для получения эмульсии М/В/М использовали устройство, в котором маска располагалась вблизи второго генератора и выходного канала, чтобы сохранить их гидрофобными, в то время как остальная часть устройства подвергалась обработке.

В работе [108] авторы использовали комбинацию ковалентной пришивки силана и фотополимеризации акриловых кислот под действием УФ-излучения, чтобы выборочно изменять свойства поверхности на определенных участках готового устройства. Данный подход использовался для МФЧ, предназначенного для получения двойной монодисперсной эмульсии (В/М/В и М/В/М) и многократной эмульсии, содержащей различные количества капель внутри.

Вопросы для самоконтроля

1. Для чего нужно проводить модификацию рабочих поверхностей микрочипа для капельной микрофлюидики?
2. Какими свойствами поверхности должны обладать генераторы капель для формирования эмульсий типа «вода-в-масле» и «масло-в-воде»?
3. Перечислите основные методы модификации для создания гидрофильной и гидрофобной поверхности.
4. Поясните, с какой целью применяются «хемо-маски».
5. В чем заключаются преимущества и недостатки применения микрочипов для формирования двойных эмульсий в отличие от применения двух отдельных чипов для однократной эмульсии?

7. Устройства для генерации капель

Существует несколько базовых топологий генераторов капель, основанных на разных способах инъекции дисперсной фазы в непрерывный поток [1]: Т-инъекция (в англ. литературе: T-injector, T-junction); соосное течение потоков (в англ. литературе: Co-flowing); фокусировка потока (в англ. литературе: Flow focusing).

Топология Т-инжектора (таблица 2) представляет собой два канала, которые пересекаются, как правило, под прямым углом [21]. Канал, по которому движется дисперсная фаза, соединяется с транспортным каналом, обеспечивающим поток непрерывной фазы, а в месте пересечения создаются условия для формирования капель, которые затем перемещаются в потоке непрерывной фазы по транспортному каналу. В Т-инжекторе может быть реализован режим движения непрерывной и дисперсной фаз навстречу друг другу по транспортному каналу, а в месте пересечения каналов образуется макроэмульсия, которая затем движется по перпендикулярному каналу в потоке непрерывной фазы [1]. Размер/объем генерируемых капель в этой топологии ограничен площадью

пересекающихся каналов. Кроме того, имеют место два режима формирования капель, реализуемых на Т-инжекторе: «капание» (*dripping*); «выдавливание» (*squeezing*). В первом случае образуются капли сферической формы, в то время как в случае «выдавливания» образуются пробки дисперсной фазы (в отечественной литературе такой режим также называют «снарядным течением»). Данная топология является самой простой с точки зрения практической реализации.

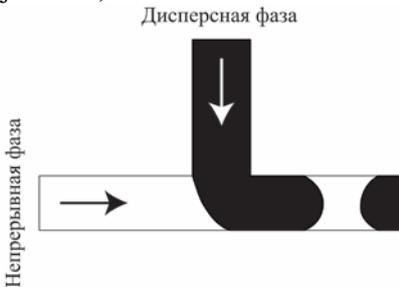
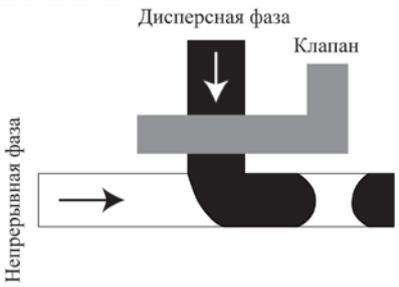
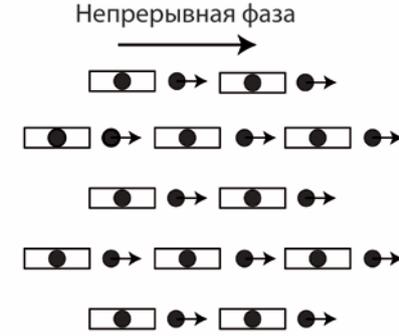
В работе [109] описывается ПДМС-стеклянное устройство с Т-инжектором и интегрированными электродами для электрохимического детектирования компонентов капель. Данное устройство было апробировано при изучении кинетики ферментов.

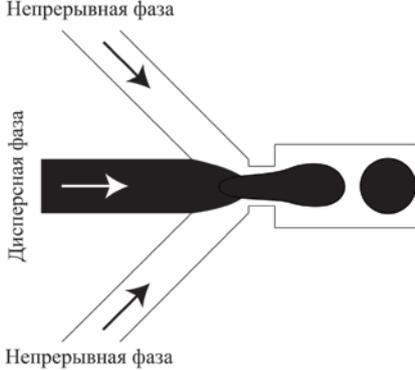
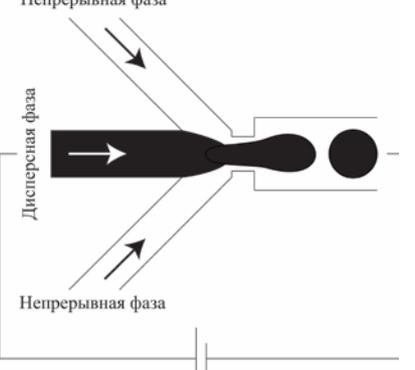
Развитием топологии Т-инжектора является его интеграция с пневматическими клапанами (таблица 2), где клапаны выполняют функцию дозирования, т.е. определяют размер/объем капель и частоту их генерации. Такая реализация инжектора нашла применение в задачах, где требуется последовательное смешивание нескольких капель, например, как это представлено в статье [110]. Авторы предложили МФУ в виде размещенных один за другим Т-инжекторов, отделенных между собой клапанами, что позволяло контролировать процесс движения и слияния капель.

Для многих аналитических методов и методов синтеза критичной является скорость формирования капель. В связи с этим были разработаны различные высокопроизводительные генераторы капель, например основанные на эффекте просачивания дисперсной фазы через массив из множества одинаковых отверстий (Т-инжекторов), который располагается в широком канале или реакционной камере, где осуществляется направленный транспорт непрерывной фазы (таблица 1). МФУ [111] является примером реализации данной топологии и содержит массив из 23489 вертикальных микроканалов специальной формы, через которые осуществлялось выдавливание капель дисперсной фазы в большую реакционную камеру с непрерывной фазой. По мнению авторов устройство позволит решить проблемы высокопроизводительного синтеза в капле. Форма поперечного сечения сквозных отверстий играет чрезвычайно важную роль в процессе эмульгирования, и только через продолговатые каналы с соотношением сторон выше критической величины (около трех) удастся производить монодисперсные капли. Использование десятков тысяч продолговатых каналов размером в несколько микрометров позволяет достигнуть скорости генерации капель более 10^5 в секунду.

Формирование капель при соосном течении потоков (таблица 2) может быть выполнено при размещении хроматографического капилляра малого размера в центре капилляра с большим внутренним размером, т.е.

Таблица 2. Топологии генераторов капель микрофлюидных чипов.

Название / Схематическое представление	Характерные размеры каналов	Объем (V _к) и размер/диаметр (D _к) капле	Частота генерации и капле (f _к)	Особенности	Ссылки
<p>T-инжектор (T-injector, T-junction)</p> 	<p>Ширина каналов: дисперсной фазы: 15-200 мкм непрерывной фазы: 15-400 мкм Глубина каналов: 15-100 мкм</p>	<p>4 пЛ - 50 мкЛ 10-450 мкм</p>	1-5300	Простая конструкция, размер/объем капле лимитирован площадью перекрестия, два режима формирования капле: «капание» (dripping) и «выдавливание» (squeezing).	[21, 109]
<p>Инжектор с пневматическим клапаном</p> 	<p>Ширина каналов: 200 Ширина каналов пневматических клапанов: 100</p>	0,1-2,5 нЛ		Контроль объема пневматическим клапаном.	[110]
<p>Мембранный инжектор (просачивание дисперсной фазы через множество отверстий)</p>  <p>● - Дисперсная фаза подаваемая снизу через слоты</p>	<p>23 489 вертикальных канала из: микрослотов размером 10x50 мкм и глубиной 30 мкм; круглые каналы диаметром 10 мкм и глубиной 70 мкм</p>	26-29 мкм	28 000 – 32 000 Гц	Вариация капле составляет ~5%. Для высокопроизводительного синтеза в капле Не подходят для упаковки биологических объектов и биохимических реакций.	[111]
<p>Соосное течение (Co-flowing)</p> 	<p>Канал: дисперсной фазы: внутренний размер – 50-100 мкм; внешний размер – 80-130 мкм</p>	<p>Жидкость в газе: 8-20 нЛ; 250-320 мкм Вода в масле:</p>		Простота конструкции. Три режима формирования капле: «капающий» (dripping); «сужающейся»	[112, 113]

	<p>непрерывной фазы:</p> <p>внутренний размер – 200-500 мкм</p>	10-1800 мкм		<p>струй» (narrowing jetting); «уширяющей струи» (widening jetting). Могут формироваться капли-сателлиты с диаметром не более 0,5 % от диаметра капли</p>	
<p>Фокусировка потока (Flow focusing)</p> 	<p>Ширина каналов: подводящих - 20-300 мкм</p> <p>сужения в перекрестии каналов - 30-100 мкм</p> <p>Длина сужения: 100 мкм</p> <p>Ширина камеры: 120-400 мкм</p> <p>Глубина каналов: 1,7 -150 мкм</p>	<p>Вода в масле: 20 фЛ – 20 нЛ; 5-120 мкм</p> <p>Газ в жидкости : 50 фЛ – 1 нЛ; 13-120 мкм</p>	<p>Вода в масле: 1-10000</p> <p>Газ в жидкости : Max>100 000-1000 000</p>	<p>Параметры капли достигаются путем регулирования расхода дисперсной и непрерывной фазы</p> <p>Четыре режима генерации капель: «контролируемый геометрией отрыв капель» (Geometrically controlled break up); «капающий» (dripping); «сужающейся струй» (narrowing jetting); «уширяющей струи» (widening jetting)</p>	[75, 114]
<p>С внешним электрическим полем (потенциал на загрузочных/сливных резервуарах)</p> 	<p>Ширина: каналов подводящих - 100 мкм</p> <p>отводящего канала - 150 мкм</p> <p>Ширина и длина сужения: по 50 мкм</p> <p>Глубина ~ 61,4 мкм</p>	1 – 37 мкм	1000 Гц	<p>Дополнительное использование источника постоянного напряжения (до 2000В).</p>	[115]

соосным размещением более узкого канала внутри широкого канала [112]. Данная топология позволяет реализовать основные режимы формирования капель: «капающий» (dripping); «сужающейся струи» (narrowing jetting).

Проводятся работы по изучению формирования капель воды в потоке газа. Например, в [113] было предложено МФУ с топологией соосного течения для формирования упорядоченных водных капель в потоке газа (воздух, азот), изготовленное в виде системы из двух стеклянных капилляров разного размера, помещенных один в другой. Через внутренний капилляр осуществлялась подача жидкости, а через внешний подача газа. Для генерации капель жидкости при использовании газа в качестве непрерывной фазы можно выделить два режима: а) капающий (происходит наращивание объема до тех пор, пока сила вязкого трения не превысит поверхностное натяжение, удерживающее жидкость на выходе капилляра, что вызовет отделение капли и движение ее по каналу, – такой режим имеет место при большом расходе газа); б) формирования сателлитов (происходит формирование большой капли, но при определенном размере капля разделяется на меньшие капли-сателлиты. Этот режим наблюдается при меньшем расходе газа). При генерации капель в капающем режиме удастся существенно снизить разброс капель по диаметру в отличие от режима формирования сателлитов. Кроме того, размер капель для капающего режима будет определяться внутренним диаметром капилляра.

Формирование капель при фокусировке потока (таблица 2) происходит в системе пересекающихся каналов («простой крест»), в которой дисперсная фаза подается через центральный канал, а непрерывная фаза подается через два канала, расположенных по обе стороны от него, тем самым сжимая или фокусируя поток дисперсной фазы, что при определенных гидродинамических условиях приводит к образованию капель, которые, как правило, формируются в отводящем канале [75, 114]. Контролируя отношение расходов дисперсной и непрерывной фазы можно получать капли с требуемыми параметрами. В такой топологии возможна реализация четырех режимов генерации капель: «контролируемый геометрией отрыв капель» (geometrically controlled break up); «капающий» (dripping); «сужающейся струи» (narrowing jetting); «уширяющейся струи» (widening jetting).

Развитием топологии фокусировки потока является дополнение конструкции электродами в загрузочных/сливных резервуарах МФУ (таблица 2), при приложении потенциала к которым создается электрическое поле, приводящее к формированию конуса Тейлора в перекрестии (острие на конце конуса ведет себя как емкость). Увеличение напряжения на электродах приводит к вытягиванию острия в направлении потока, что позволяет формировать капли меньшего объема. В работе [115] представлены результаты изучения метода эмульсификации под действием электрического поля с использованием топологии МФУ описанного выше.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие базовые топологии генераторов капель Вы знаете, и в чем их принципиальные отличия?
2. Какие режимы формирования капель существуют, и в чем их особенности?
3. Для чего могут применяться пневматические клапаны в комбинации с генераторами капель?
4. Что такое нестабильность Рэля-Плато и когда она возникает?
5. Каким образом можно добиться формирования капель наименьшего размера/объема?

8. Устройства для слияния капель и смешивания в каплях

8.1. Коалесценция капель.

Одной из важных операций для решения ряда задач является смешивание различных жидкостей путем слияния двух или более капель. [116].

Коалесценция – слияние капель дисперсной фазы внутри транспортной (непрерывной) фазы или на подложке. Для слияния двух капель в микроканале непрерывная фаза, отделяющая две капли, должна быть удалена. После того, как это условие выполнено, две капли входят в плотный контакт друг с другом с образованием тонкого жидкостного мостика между каплями, что является следствием притяжения между молекулами капель [50]. Мениск большой кривизны формируется вокруг мостика и создает дисбаланс поверхностного натяжения, что приводит к слиянию капель [117].

Подходы, позволяющие реализовать коалесценцию, можно разбить на две группы: пассивные и активные. Для первой группы не требуется приложение энергии извне, слияние капель происходит за счет использования специальных структур в каналах [50] и свойств поверхности [118]. В случае активной коалесценции затрачивается энергия, генерируемая внешними источниками (приложение электрических, температурных полей и т.д.). Существует несколько наиболее распространенных подходов, которые реализуются в МФУ для решения задачи слияния капель и которые рассмотрены ниже.

8.2. Пассивные устройства.

8.2.1. Коалесценция капель в каналах и реакционных камерах специальной геометрии.

Принцип пассивного улавливания капель [119] в простейшем случае заключается в размещении в канале элемента, изменяющего гидравлическое сопротивление для задержки (улавливания) на нем капли на время, необходимое для обеспечения контакта со следующей за ней каплей. Элемент гидравлического сопротивления должен быть выполнен таким образом, чтобы обеспечивать эффективный отвод непрерывной фазы и удерживание капли дисперсной фазы. Этот принцип, в общем случае,

включает четыре шага: захват капли, остановка пойманной капли, слияние двух капель и высвобождение капли, полученной в результате слияния. Существует три различных типа ловушек, реализующих подобный принцип (рис. 6 а): препятствие внутри канала, локальное увеличение диаметра канала, локальная асимметрия канала в сечении. Слияние капель также может быть реализовано в перекрестии каналов (рис. 6 б), но такой подход требует синхронизации движения капель таким образом, чтобы они доставлялись к перекрестию в одно время.

Существуют и другие подходы, построенные на изменении геометрии каналов [50]: прямоугольное расширение канала, коническое расширение и выравнивание неоднородного по скорости потока (рис. 6 в). Конструкция, базирующаяся на прямоугольном расширении канала, позволяет замедлять капли в уширении. Объем непрерывной фазы между соседними каплями уменьшается, капли входят в контакт и сливаются. Ограничением такого подхода является то, что он применим только при работе на определенных расходах и отношениях дисперсной и непрерывной фаз, которые определяются геометрическими размерами уширения. Коническое расширение канала можно рассматривать как комбинацию последовательно расположенных прямоугольных расширений, что обеспечивает широкий диапазон возможных расходов фаз и их отношений.

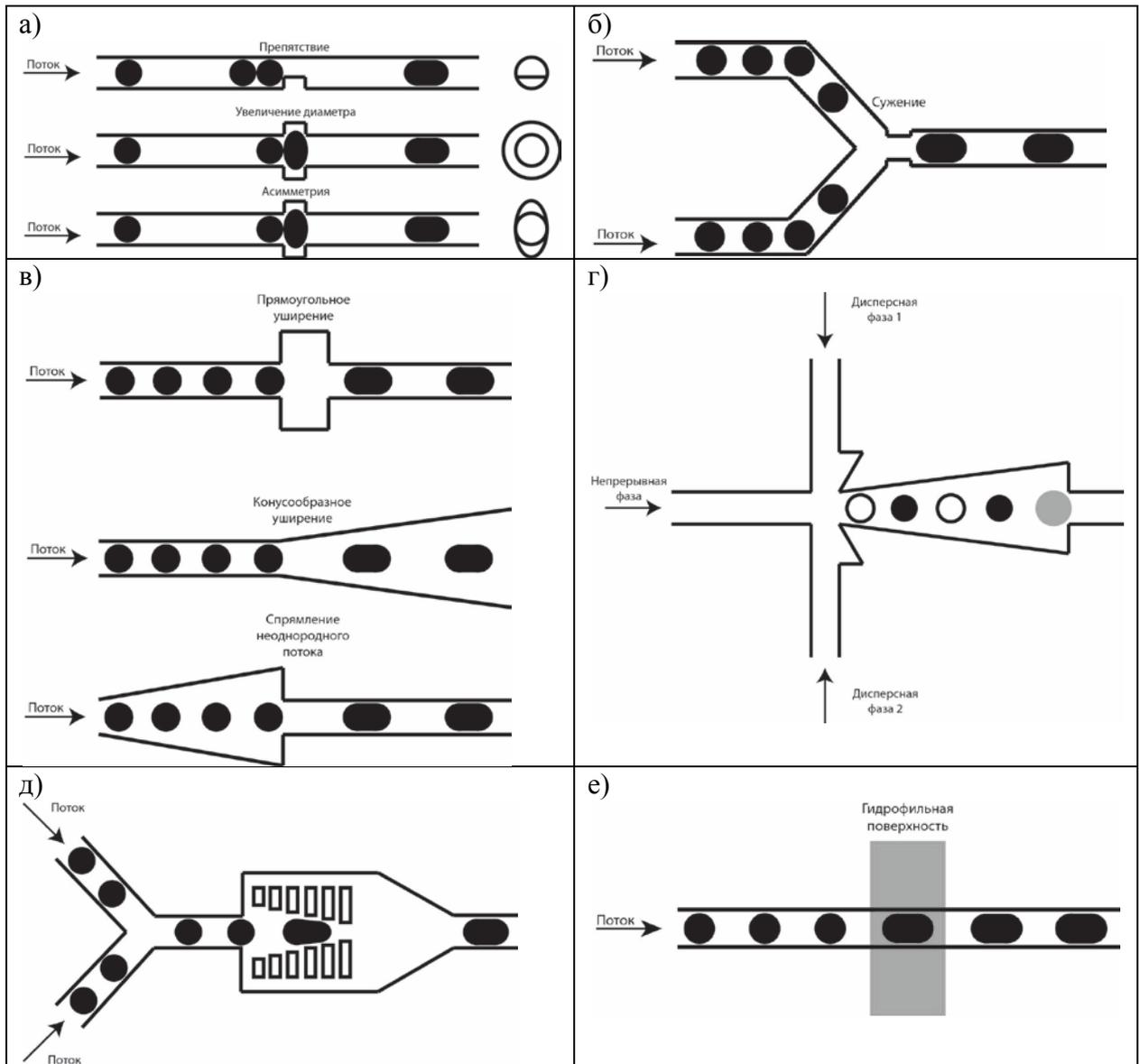
Подход, построенный на выравнивании неоднородного по скорости потока, является наиболее эффективным с точки зрения слияния следующих друг за другом капель. В сравнении с прямоугольным и коническим расширением данный подход может обеспечивать отвод непрерывной фазы с контролируемой скоростью.

В работе [120] было проведено изучение характеристик слияния капель в микроканале с прямоугольным расширением. Установлено, что две следующие в одну линию капли, сталкивающиеся затем друг с другом в уширении, не сливаются. Слияние имеет место на выходе из прямоугольного расширения, т.к. увеличивается площадь контакта между каплями.

Многофункциональное и высокоэффективное МФУ было предложено в работе [121] (рис. 6 г). Устройство имеет три входных канала (один для непрерывной фазы, два для дисперсной), которые пересекаются и образуют двойной Т-инжектор с общим каналом для непрерывной фазы, на выходе из которого располагается конусообразное уширение. Генерирование капель, содержащих дисперсную фазу различного состава, происходит поочередно на двойном Т-инжекторе (двух Т-инжекторах, расположенных друг за другом). Затем полученные капли поступают в конусообразное расширение. На этом участке капли имеют возможность подойти друг к другу вплотную, однако между ними остается тонкая пленка непрерывной фазы. Поэтому само слияние происходит непосредственно на выходе из канала, где возрастает давление жидкости.

Еще один подход к слиянию капель за счет использования особенностей геометрии был представлен в работе [122]. Суть предлагаемого подхода заключается в размещении столбиков специальной формы в

реакционной камере (рис. 6 д). Столбики размещаются таким образом, чтобы между ними образовывался проток, куда попадает капля и начинает замедляться вплоть до полной остановки из-за последовательного изменения гидродинамического сопротивления системы. Затем в проток попадает еще одна капля. Излишки масла между каплями отводятся через боковые каналы между столбиками. Таким образом, капли приводятся в контакт и сливаются, при этом создается дополнительное давление, что приводит к выдавливанию вновь образованной капли.



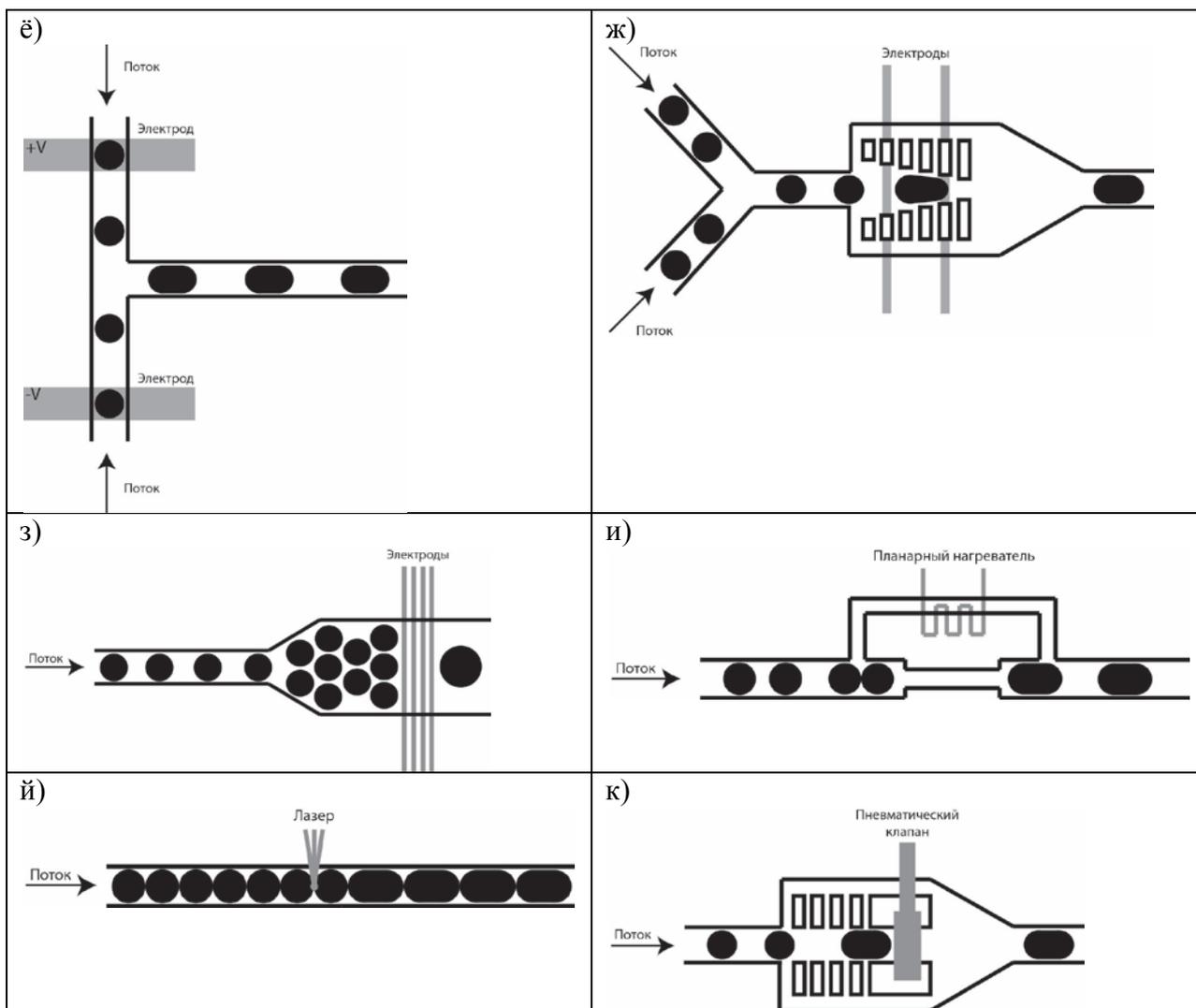


Рисунок 6 – Пассивные (а-е) и активные (е-к) способы слияния капель: а) размещение в канале элемента, изменяющего гидродинамическое сопротивление; б) использование перекрестия; в) использование расширения канала или спрямления неоднородного по скорости потока; г) применение двойного Т-инжектора с конусообразным уширением; д) размещение микроструктур в реакционной камере; е) модификация участка поверхности; ё) электрокоалесценция; ж) сочетание массива упорядоченных структур и электрокоалесценции; з) сочетание конусообразного уширения и электрокоалесценции; и) использование планарного нагревательного элемента; й) применение лазера для локального нагрева; к) использование пневматического клапана.

8.2.2. Коалесценция капель за счет модификации поверхности канала

Другие пассивные подходы построены на изменении поверхностных свойств стенок каналов. Например, в работе [118] представлено МФУ из ПДМС, у которого участок канала, через который осуществляется транспорт капель, был гидрофилизирован раствором полиакриловой кислоты при помощи УФ-полимеризации для замедления и улавливания водных капель (рис. 6 е). Капля входит в область, где была проведена модификация

поверхности, ее движение замедляется, и она останавливается. Следующая за ней капля входит в контакт и сливается с ней, а новообразовавшаяся капля за счет полученного дополнительного импульса проходит гидрофилизированную область.

8.3. Активные устройства

8.3.1. Электрокоалесценция

Электрокоалесценция является активным подходом, который широко используется для слияния капель под действием электрического поля. Впервые подход был предложен в работе [123], в которой рассматривалось слияние капель под действием электрического поля переменного тока. Для того чтобы реализовать электрокоалесценцию, проводимость капель должна быть много больше, чем проводимость непрерывной фазы. Под действием электрического поля происходит поляризация капель. Затем две капли подходят друг к другу, притягиваются вследствие действия кулоновских сил и сливаются.

В работе [124] было продемонстрировано МФУ для проведения электрокоалесценции под действием поля, создаваемого постоянным электрическим током (рис. 6 ё). В данном случае вода выступает в роле проводника, а масло ведет себя как изолятор. Под действием электрического поля верхняя и нижняя капли приобретают противоположные заряды. Чем ближе две капли подходят к Т-инжектору, тем сильнее они притягиваются друг к другу. Таким образом происходит их слияние.

Следует отметить работы, которые являются комбинацией пассивных подходов и электрокоалесценции. В статье [125] было рассмотрено МФУ, оснащенное массивом упорядоченных столбиков и электродами, размещенными в реакционной камере (рис. 6 ж). Столбики играли роль элементов, на которых происходило замедление и удерживание капель. Затем на электроды прикладывалось напряжение, что способствовало скорейшему удалению тонкой масляной пленки между каплями и приводило к их слиянию. В данном случае комбинация пассивного и активного подхода позволяет сократить время, требуемое для слияния капель. В другой статье [126] было описано МФУ, позволяющее производить слияние одновременно нескольких капель. Рабочая зона устройства была выполнена в виде канала с конусообразным уширением, в котором размещались электроды (рис.1, з). Слияние происходило в две стадии. На первой стадии слияние капель активировалось электрическим полем только на смежных электродах и при приложении высокого напряжения. Образовывалась крупная капля. Из-за наличия большой капли имеет место локальное снижение давления между соседними каплями меньших размеров. В результате происходила коалесценция.

8.3.2. Индуцируемая диэлектрфорезом коалесценция капель

Ключевое отличие применения диэлектрфореза для слияния капель от электрокоалесценции заключается в том, что в случае диэлектрфореза

применяется только неоднородное электрическое поле, в то время как при электрокоалесценции можно использовать как однородные, так и неоднородные электрические поля. Диэлектрофорез основан на различии в диэлектрических проницаемостях капель и непрерывной фазы, в то время как электрокоалесценция основана на различии в проводимости. Подробно ознакомиться с манипуляциями капель при помощи диэлектрофореза можно в работах [127, 128].

8.3.3. Индуцируемая температурой коалесценция капель.

В основе данного подхода лежит использование зависимости вязкости и поверхностного натяжения используемых сред от температуры. Увеличение температуры приводит к уменьшению вязкости непрерывной фазы и возрастанию скорости ее течения. Кроме того, поверхностное натяжение капель будет уменьшаться с увеличением температуры, поэтому добиться слияния капель становится проще.

Пример МФУ для индуцируемой температурой коалесценции капель был представлен в работе [129]. В устройстве использовался элемент с высоким гидравлическим сопротивлением – узкий канал, подключенный к основному каналу, имеющему сужение в поперечном сечении (рис. 6 и). Тонкий пленочный нагревательный элемент был встроен в элемент с высоким гидродинамическим сопротивлением. При работе устройства часть непрерывной фазы будет проходить через узкий канал. В случае активации нагревательного элемента температура в узком канале возрастает, и, как следствие, вязкость непрерывной фазы в канале уменьшается. Из-за отвода непрерывной фазы из основного канала также повышается вероятность контакта капель друг с другом. Когда слияние капель завершается, нагревательный элемент выключается для обеспечения возможности транспорта образованных капель по основному каналу.

Вместо планарных нагревательных элементов можно применять сфокусированное лазерное излучение [130] для локального нагрева жидкости непрерывной фазы между двумя каплями с целью обеспечения слияния капель (рис. 6 й). При загрузке капель в канал активируется мембранный клапан, который играет роль блокиратора, препятствующего движению капель. Капля замедляется и «ожидает» следующую за ней каплю. Когда две капли входят в контакт друг с другом, образовавшаяся пара сдвигается по каналу, т.к. на одну из капель действует поток, создаваемый непрерывной фазой, и попадает в зону воздействия сфокусированного лазерного излучения, приходящегося на границу раздела сред между каплями. Происходит слияние капель. После этого мембранный клапан открывается для отвода полученной капли из зоны облучения.

8.3.4. Коалесценция капель пневматическими клапанами

Еще один активный подход, реализующий слияние капель, заключается в применении пневматических клапанов [131]. В подобных устройствах мембранные клапаны, приводимые в действие пневматической системой, как

правило, размещаются над каналом (рис. 6 к). Когда капля попадает в реакционную камеру специальной формы, клапан активируется и исполняет роль элемента, препятствующего движению капли. Капля замедляется вплоть до полной остановки и дожидается следующую каплю, которая под действием непрерывной фазы оказывает давление на первую каплю. Происходит контакт капель и их слияние. Затем клапан открывается, и полученная в результате коалесценции капля отводится из реакционной камеры.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое коалесценция капель?
2. Какие подходы, позволяющие реализовать коалесценцию капель, Вы знаете?
3. Что такое принцип пассивного улавливания капель, и сколько типов ловушек, реализующих данный принцип, Вы можете назвать?
4. Поясните принципы коалесценции капель за счет модификации поверхности канала?
5. Каким образом реализуется электрокоалесценция?
6. На чем основан принцип работы индуцируемой диэлектрофорезом коалесценции капель?
7. Что такое температурная коалесценция капель?
8. В чем суть индуцируемой пневматическими клапанами коалесценции капель?

9. Материалы и технологии изготовления

При создании и производстве МФУ для медицинской диагностики применяется сочетание различных материалов: для датчиков и детекторов используются полупроводниковые материалы, металлы, полимеры; для упаковки применяются преимущественно полимерные материалы; в качестве подложки, на которой формируются микроразмерные каналы и другие функциональные элементы для манипуляций с жидкой пробой, буферными растворами и реагентами, используются стеклянные и полимерные материалы. Стоимость материалов, элементов устройства и технологий формирования функциональных структур определяет себестоимость устройства в целом. В МФУ основная доля используемого материала приходится на подложку, на которой расположены функциональные элементы. Выбор материала предполагает и определение подходящего технологического процесса с учетом требуемых точностных характеристик получаемых структур, экономических затрат при организации необходимого объема производства устройств.

Кремний был первым материалом, использованным в микрофлюидике [132]. Технология изготовления структур в кремнии схожа с технологиями обработки стекла. Для формирования структур используют методы влажного или сухого травления или металлизации поверхности, методы осаждения из

паровой фазы и др. [133]. Кремний имеет высокий модуль упругости 130-180 ГПа. Модификация кремния может осуществляться с применением химии силанов, т.к. на его поверхности находятся силанольные группы (-Si-OH), и приводит к снижению неспецифической адсорбции [134]. Но непрозрачность кремния для УФ и видимого диапазона затрудняет использование устройств для методов оптического детектирования. Хотя этот недостаток может быть устранен, если с кремнием связать оптически прозрачный материал (полимер или стекло) – изготовить гибридный чип [135]. Кремний использовался при создании МФЧ для ПЦР в капле [136].

Стекло также имеет большой модуль упругости, низкую фоновую флуоресценцию. Его поверхность может быть модифицирована с применением химии силанов. Стекло совместимо с биологическими образцами, имеет относительно низкую неспецифическую адсорбцию и не проницаемо для газов. Стекланные МФЧ используются исследователями при создании генераторов капель [137]. В настоящее время стекланные МФУ поставляются фирмами Dolomite [138], Micralyne, Agilent и Caliper.

Хотя и кремний, и стекланные материалы востребованы в микрофлюидике, но все более важную роль играют полимеры, т.к. для них отработаны технологии массового производства (например, горячее тиснение, литье под давлением и т.д.) и их состав может быть адаптирован к любым требованиям путем изменения химической модификации, что позволяет создавать недорогие и доступные системы и устройства широкого применения.

Часто при изготовлении МФУ используются сочетания материалов, например стекло и полимеры, кремний и полимеры. Такие гибридные конструкции идеально подходят для исследовательских лабораторий, если требуется разработать прототип устройства или системы за относительно короткое время и провести на нем исследование, так как большинство современных лабораторий оснащено технологическим оборудованием для формирования микроразмерных элементов в полимерных материалах. Здесь особую роль играют технологии «мягкой» литографии.

В МФУ применяют как термопластичные, так и терморезистивные полимеры. С точки зрения серийного производства МФУ основные преимущества термопластов заключаются в том, что они: могут формоваться при температуре, близкой к температуре плавления (размягчения); имеют высокую жесткость, что обеспечивает защиту микроразмерных каналов, реакторов и прочих элементов; обладают отработанными технологиями изготовления. Существуют коммерческие варианты МФУ из термопластов, предназначенные для применения в медицинской диагностике. Наиболее часто в микрофлюидике применяются: полиметилметакрилат (ПММА), поликарбонат (ПК) и циклический олефиновый сополимер. Однако многие растворители, используемые в химическом анализе и при исследовании биомолекул, растворяют термопласты, что приводит к необходимости применения терморезистивных полимеров. Основными преимуществами терморезистивных полимеров для МФУ являются стабильность

геометрических размеров формируемых микроструктур и устойчивость ко многим растворителям. Примерами таких полимеров являются: полидиметилсилоксан, фоторезист SU-8 (MicroChem, США), оптический клей NOA81 (Norland Products, Inc, США) [139] и т.д.

Среди наиболее часто используемых методов изготовления микроструктур являются: литография (лазерная, УФ) [140], литье [141], горячее тиснение [142] и фрезерование [143] (для жестких материалов, как, например, ПК).

Химический состав материала (наличие функциональных групп), а также его физические свойства, такие как жесткость и температура стеклования (T_g), играют важную роль в процессе герметизации микроструктур.

Наиболее часто используемые методы соединения (герметизации) могут быть разделены на: (I) термический, (II) химический и (III) клеевой. При термическом методе используют сжатие соединяемых изделий друг с другом при температуре, близкой к температуре стеклования (T_g). Этот метод применяется для соединения пластин, изготовленных из жестких полимеров (ПК или ПММА) [144], а также тонких пленок (ламинирование) [141]. Для улучшения соединения проводится обработка поверхности материала в водном растворе или органическом растворителе. Термическое соединение является простым и недорогим способом получения прочного соединения. Недостатком является необходимость применения высоких температур и агрессивных сред, которые могут существенно влиять на структуру микроканалов и свойства поверхности.

Химический метод основан на применении различных химических и физико-химических методов модификации с целью получения на поверхности соединяемых материалов особых функциональных групп, при контакте которых происходит образование химической связи, что позволяет создать неразъемное герметичное соединение. Наиболее распространенным методом герметизации конструкций ПДМС-ПДМС, ПДМС-стекло является плазменная обработка в кислородной или аргоновой среде. Для этих же сочетаний материалов может использоваться обработка различными кислотными растворами, называемыми «пиранья».

Клеевое соединение содержит этап нанесения слоя клея или смолы на поверхность подложки [145]. Этот метод позволяет связать вместе различные типы материалов, но может изменить и геометрию микроканалов, и химию поверхности. Метод является достаточно трудоемким, важно подобрать необходимую толщину наносимого слоя, вязкость композиции для предотвращения затекания клея в микроструктуры, а также убедиться в том, что клей не влияет на эффективность проходящих реакций.

Стоит отметить, что в лабораторных условиях, если в экспериментах не требуется применять высокие давления и температуры, используют герметизацию за счет адгезионных сил между поверхностями стекла и ПДМС, позволяющих получать разъемные конструкции и многократно

использовать пленку полимера со структурами после очистки и регенерации поверхности, если это требуется.

9.1. Изготовление микрофлюидных устройств методом «мягкой» литографии в полидиметилсилоксане

Среди терморезистивных эластомеров ПДМС является доминирующим материалом для создания прототипов МФУ. Материал обладает эластичностью, но является достаточно прочным для различного рода манипуляций, хорошо биосовместим, химически инертен, имеет высокую оптическую прозрачность, хорошую адгезию к кремнию и стеклу. ПДМС проницаем для растворителей и газов. Это свойство полезно для обеспечения функционирования культур клеток в камерах, так как к ним можно организовать доступ газов. В процессе полимеризации ПДМС испытывает умеренную усадку (1-3%) [146], и в нем можно формировать даже структуры нанометровых размеров. ПДМС устойчив к высоким температурам, ко многим химическим и биологическим средам. Упругие механические свойства ПДМС позволяют создавать пневматические клапаны и элементы для микронаносов и интегрировать их в МФЧ.

Существенным недостатком ПДМС является сложность модификации поверхности, обусловленная высокой подвижностью полимерных цепей. Кроме того, полимерная структура в виде сети обладает способностью поглощать небольшие молекулы [147], наблюдается вымывание молекул неотвержденных мономеров [148], а в растворителях происходит набухание полимера [149]. Так как ПДМС может претерпевать существенные трансформации в присутствии сильных органических растворителей, то проводятся исследования, направленные на улучшение свойств ПДМС, в частности разработки фотоотверждаемого полимера [150]. Отдельные недостатки ПДМС устраняются путем покрытия внутренней поверхности каналов и функциональных элементов МФЧ другими полимерами или неорганическими материалами, блокирующими или устраняющими диффузию малых молекул [151].

Широко распространенным методом прототипирования в микрофлюидике является репликация микроструктур. Мастер-форму получают методами литографии (фотолитографии и травления, ионно-реактивной литографии и т.д.), причем к точности изготовления микроструктур предъявляются более высокие требования, чем к микроструктурам чипа. Мастер-формы могут быть изготовлены из стекла с напыленным слоем хрома, а также кремния и фоторезиста SU-8.

Основные стадии изготовления МФУ с использованием «мягкой» литографии представлены на рисунке 7.

Мастер-форму, расположенную в формочке (или чашке Петри), заливают жидким раствором ПДМС (рис. 7 а). Чаще всего для исследований в микрофлюидике применяется двухкомпонентный набор Sylgard[®] 184 (Dow Corning, США). В состав входят основа и отвердитель, которые следует смешивать в соотношении 10:1 по инструкции производителя. Затем

осуществляют дегазацию полимера, устраняя пузырьки растворенного газа. После этого происходит отверждение полимера в термошкафу. Производителем заявлены следующие режимы отверждения: 48 часов при комнатной температуре, 1 час при 80 °С, 45 минут при 100 °С, 20 минут при 125 °С, 10 минут при 150 °С.

Полученные реплики отделяются от мастер-формы, в них формируются отверстия для гидравлических интерфейсов (капилляров). Герметизация изготовленных микроструктур осуществляется при соединении ПДМС реплики с защитной пластиной (рис. 8 б) после предварительной обработки.

ПДМС имеет низкую межфазную свободную энергию, поэтому молекулы большинства полимеров не будут вступать в реакцию с его поверхностью, что не позволяет получить герметичное соединение. В таком случае необходимо использовать сочетание физических и химических методов обработки. При химическом связывании сначала требуется провести активацию поверхности материала, для чего используются такие физико-химические методы, как УФ- или плазменная обработка. Далее происходит введение активных функциональных групп химическими методами.

Плазменная обработка в основном используется для соединения ПДМС с ПДМС (рис. 9) или стеклом [152, 153]. После обработки ПДМС в среде кислорода происходит замена метильных групп ($\equiv\text{Si}-\text{CH}_3$) на поверхности на гидроксильные ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$), которые взаимодействуют с гидроксильными группами на поверхности стекла, что приводит к формированию сильной связи ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) и образованию молекул воды. Поэтому после такой обработки может быть получено прочное неразъемное соединение ПДМС-стекло.

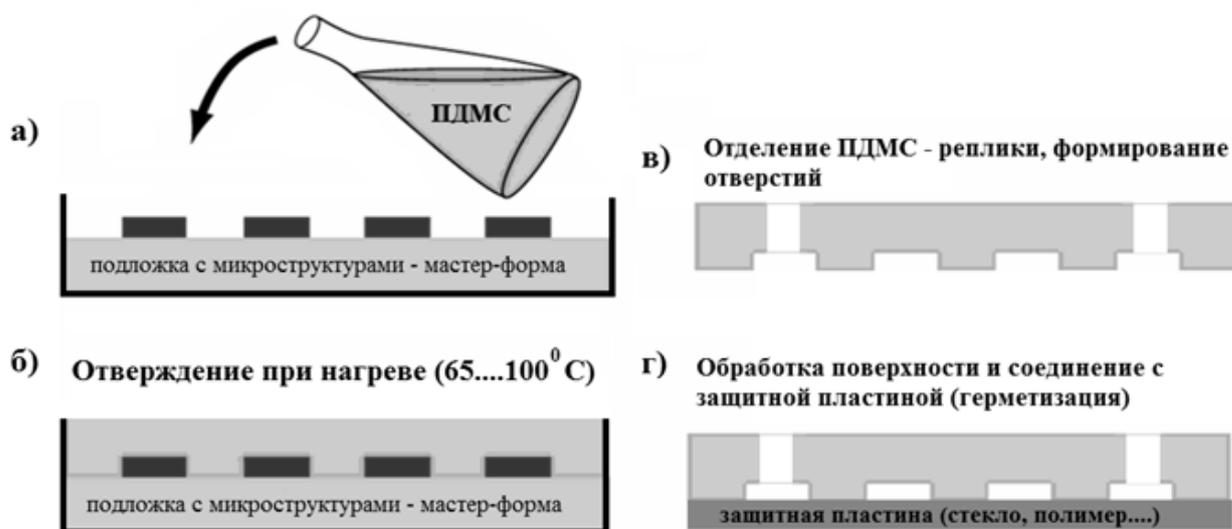


Рисунок 7 – Основные стадии изготовления микрофлюидного устройства с применением метода «мягкой» литографии в ПДМС

Соединение материалов должно быть выполнено сразу после модификации или активации поверхности, так как поверхность быстро

изменяет свои свойства при контакте с воздухом (рис. 8 а). Введение химически активных групп приводит к образованию сильной связи [154, 155], но в то же время это приводит к изменению смачивания поверхности микроструктур [156].

В статье [157] представлен метод соединения ПММА и ПДМС, позволяющий осуществлять герметизацию микрофлюидных чипов с использованием (3-аминопропил)триэтоксидилана. Прочность соединения характеризовали с точки зрения прочности на разрыв и изменения давления для разных условий обработки поверхности. Средняя прочность сцепления при применении силана составила 2,5 МПа.

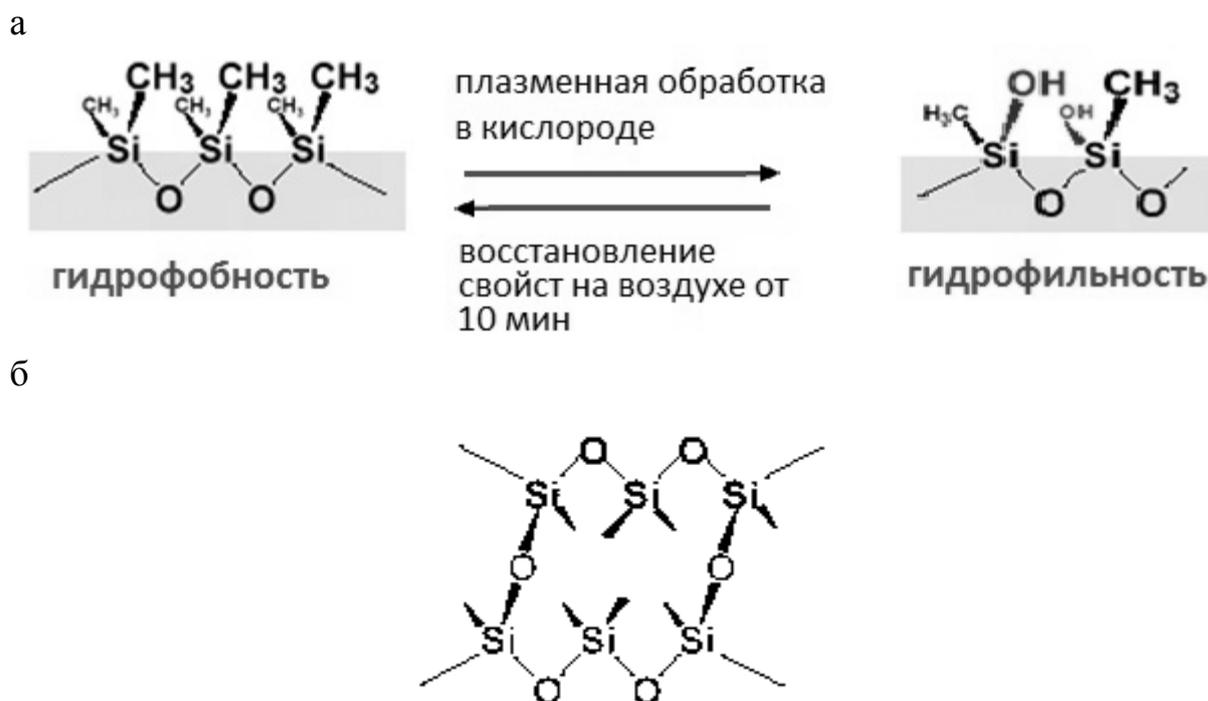


Рисунок 8 – Формирование гидроксильных групп на поверхности ПДМС при плазменной обработке и восстановление метильных групп (а); ковалентные связи, образующиеся при соединении пластин ПДМС (б)

Вопросы для самоконтроля

1. Какие материалы используются при создании устройств для капельной микрофлюидики?
2. Каковы особенности этих материалов?
3. Какие методы соединения (герметизации) микроустройств Вам известны?
4. Какие особенности использования полидиметилсилоксана в микрофлюидных устройствах Вам известны?
5. В чем заключается метод «мягкой» литографии?
6. Какие эффекты наблюдаются на поверхности полидиметилсилоксана при обработке в кислородной плазме и при соединении пластин?

Заключение

Микрофлюидные системы являются высокоэффективными технологическими платформами, позволяющими автоматизировать и повысить производительность лабораторных анализов, ускорить скрининг лекарственных средств, разработать новые диагностические системы [158]. Компании по продвижению и коммерциализации микрофлюидных технологий, созданные за последние несколько лет, утверждают, что эффективное потребление реагентов, высокая скорость анализов, миниатюризация компонентов, а также доступность МФУ, изготовленных из недорогих материалов, позволит сократить расходы по сравнению с обычным лабораторным оборудованием. Хотя в микрофлюидике было предложено множество эффективных и полезных устройств, но только ограниченное их число было доведено до серийного выпуска [159]. Даже после приобретения коммерческого МФУ пользователи могут столкнуться с трудностями в совместимости с соответствующим оборудованием, например с внешними насосами и пневматическими системами для управления потоками жидкости. Требуется также базовая подготовка пользователей для работы с такими системами. Необходимым является и дополнительное оборудование, а в ряде случаев должны быть адаптированы методики анализа. В результате многие исследователи не готовы изменить свои привычки и предпочитают использовать обычное и привычное лабораторное оборудование [159].

Рынок микрофлюидных систем в 2013 году был оценен в 1,6 млрд. долларов и, по прогнозам Yole Development [160], достигнет 3.6-5.7 млрд. долларов к 2018 году. Такие высокие темпы роста в значительной степени обусловлены недавними достижениями в биотехнологии, в частности при секвенировании генома и разработке методов диагностики в пробирке [161].

Одними из известных компаний, которые продвигают микрофлюидные технологии, являются *Illumina Inc.* [162] и *Fluidigm Corp.* [163]. В 2013 году *Illumina* приобрела *Advanced Liquid Logic Inc.*, которая разрабатывала цифровые микрофлюидные платформы на основе технологий электросмачивания, что позволяет манипулировать отдельными каплями в устройстве без насосов и клапанов.

Компания *Fluidigm Corp.* была основана для продвижения на рынок интегрированных микрожидкостных устройств на основе технологии эластомерных клапанов, разработанной в лаборатории С. Квэйка (Stephen Quake, Калифорнийский технологический институт) [164]. Благодаря этой технологии *Fluidigm* стала первой компанией, которая коммерциализовала цПЦР в 2006 году.

Raindance Technologies Inc. [19] разработала высокопроизводительную систему для одномолекулярной цПЦР в каплях пиколитровых объемов, предназначенную для геномных исследований. Компания занимается разработкой систем на основе цифровой капельной микрофлюидики для генетических исследований. Созданная компанией *Raindance* система *RainDrop Digital PCR System* способна производить более миллиарда ПЦР

реакций в течение одного дня, что существенно улучшает возможности молекулярного анализа, позволяя оперативно осуществлять масштабные исследования по целому ряду важных приложений. Потребителями продуктов этой компании являются: ведущие научные исследовательские учреждения, онкологические центры, биологические банки, коммерческие лаборатории, фармацевтические и биотехнологические компании, сельскохозяйственные и промышленные организации, а также государственные учреждения.

Другая компания, также специализирующаяся на микрофлюидных одномолекулярных исследованиях – *Sphere Fluidics Ltd.* [165] обладает патентом на технологическую платформу, позволяющую проводить высокоскоростной анализ отдельных клеток с последующей их изоляцией в пиколитровых каплях. После этого возможно проведение генетических исследований клеток, так как платформа совместима с ПЦР-системами и секвенаторами нового поколения. Эта компания продает МФУ для формирования капель *Pico-GenTM Picodroplet Formation Biochips*, выполненное из ПДМС. Исходя из релиза продукции, данное устройство является разработкой другой компании – *Dolomit microfluidics*.

Основанная в 2005 году компания *Dolomit microfluidics* [166] разрабатывает, изготавливает и поставляет широкий спектр продукции для микрофлюидики. В том числе модульные системы для генерации капель, инкапсуляции в капли различных объектов, устройства для формирования двойных эмульсий, для смешивания и слияния капель, системы для синтеза наночастиц. Компания ориентирована на создание продукции для академических и государственных институтов, биотехнологических лабораторий, фармацевтических компаний, университетов и других организаций, в которых проводятся научные исследования.

Компания *Micronit Microfluidics* (Нидерланды) [167] занимается проектированием, разработкой и производством на заказ МФУ с применением современных микро- и нанотехнологий. В частности, компания предлагает готовые решения конструкций МФУ для капельной микрофлюидики, электрофоретических методов разделения пробы, культивирования клеток и т.д.

Одним из удачных коммерческих приборов на принципах капельной микрофлюидики является система для цПЦР *QX200TM*, выпускаемая фирмой *Bio-Rad* (США) [18]. Надежная технология формирования капель и проведения в них ПЦР позволяет осуществлять исследования онкологических маркеров, обнаруживать инфекционные заболевания, геномные изменения и т.д.

Барьерами, препятствующими широкой коммерциализации микрофлюидных систем, являются стандартизация и интеграция – этим двум важным факторам уделяется недостаточное внимание. Воспроизводимость и другие статистические оценки при анализе объектов на МФУ, изготовленных из разных партий (существенен разброс характеристик от партии к партии), редко приводятся в исследовательских статьях. Отсутствует единый подход к

созданию стандартных протоколов при изготовлении и контроле изделий, согласованных требований к материалам для конкретных приложений и т.д. Например, ПДМС является доминирующим материалом при изготовлении МФУ в лабораторных условиях [168], но большинство компаний, за исключением *Fluidigm Corp.*, воздерживается от использования ПДМС из-за проблем с масштабированием производства и технологичностью. ПДМС имеет относительно высокую стоимость материала по сравнению с рентабельными полимерами, такими как ПММА и ПК. Но некоторые возможности, достигаемые на эластичных полимерах, трудно перенести на экономически эффективные жесткие полимеры. Таким образом, одной из целей научных исследований является разработка масштабируемых экономичных производств МФУ из эластомерных материалов в сочетании с другими полимерами.

Список сокращений и аббревиатур

ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс

МФУ – микрофлюидное устройство

МФЧ – микрофлюидный чип

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПДМС – полидиметилсилоксан

ПК – поликарбонат

ПММА – полиметилметакрилат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

цПЦР – цифровая полимеразная цепная реакция

Терминологический словарь

Эмульсия – дисперсная система, состоящая из микроскопических капель жидкости (дисперсной фазы), распределенных в другой жидкости (дисперсионной среде).

Дисперсная система – это образования из двух или большего числа фаз, которые практически не смешиваются и не реагируют друг с другом химически. Первое из веществ (*дисперсная фаза*) мелко распределено во втором (*дисперсионная среда*).

Смачиваемость (смачивание) – поверхностное явление, возникающее на границе соприкосновения фаз, одна из которых твёрдое тело, а другие – несмешивающиеся жидкости или жидкость и газ.

Поверхностно-активные вещества – вещества, адсорбция которых из жидкости на поверхности раздела с другой фазой (жидкой, твердой или газообразной) приводит к значительному понижению поверхностного натяжения.

Коалесценция – слияние частиц (например, капель или пузырей) внутри подвижной среды (жидкости, газа) или на поверхности тела. Сопровождается укрупнением капель (пузырей) и обусловлена действием сил межмолекулярного притяжения.

Литература

1. Seemann R. et al. Droplet based microfluidics //Reports on progress in physics. 2012. V. 75. №. 1. P. 016601.
2. Guo M. T. et al. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays // Lab on a Chip. 2012. V. 12. P. 2146-2155.
3. Günther A., Jensen K. F. Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis //Lab on a Chip. 2006. V. 6. №. 12. P. 1487-1503.
4. Stanley C. E., Wootton R. C. R., deMello A. J. Continuous and segmented flow microfluidics: Applications in high-throughput chemistry and biology //CHIMIA International Journal for Chemistry. 2012. V. 66. №. 3. P. 88-98.
5. Lederberg J. A simple method for isolating individual microbes //Journal of bacteriology. 1954. V. 68. №. 2. P. 258.
6. Günther P. M. et al. Formation of monomeric and novolak azo dyes in nanofluid segments by use of a double injector chip reactor //Chemical engineering & technology. 2005. V. 28. №. 4. P. 520-527.
7. Lee C.C. et al. A microfluidic oligonucleotide synthesizer // Nucleic Acids Research. 2010. V. 38. № 8. P. 2514-2521.
8. Shestopalov I., Tice J. D., Ismagilov R. F. Multi-step synthesis of nanoparticles performed on millisecond time scale in a microfluidic droplet-based system //Lab on a Chip. 2004. V. 4. №. 4. P. 316-321.
9. Schaerli Y., Hollfelder F. The potential of microfluidic water-in-oil droplets in experimental biology //Molecular Biosystems. 2009. V. 5. №. 12. P. 1392-1404.
10. Baret J. C. et al. Droplets and emulsions: very high-throughput screening in biology //Medecine sciences: M/S. 2008. V. 25. №. 6-7. P. 627-632.
11. Hindson B. J. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number //Analytical chemistry. 2011. V. 83. №. 22. P. 8604-8610.
12. Guo M. T. et al. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays // Lab on a Chip. 2012. V. 12. P. 2146-2155.
13. Jing Yan et al. Monodisperse Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) Double Emulsion Droplets as Uniform Compartments for High-Throughput Analysis via Flow Cytometry // Micromachines. 2013. V. 4. P. 402-413.
14. Rakszewska A., Tel J., Chokkalingam V., Huck W. T.S. One drop at a time: toward droplet microfluidics as a versatile tool for single-cell analysis// NPG Asia Materials. 2014. V. 6. P. e133.
15. Wootton R.C.R., De Mello A. J. Analog-to-digital drug screening // Nature. 2012. V. 483. P. 43-44.
16. Tabeling P. Recent progress in the physics of microfluidics and related biotechnological applications // Current Opinion in Biotechnology. 2014. V. 25. P. 129-134.
17. Baroud C.N., Gallaire F., Dangla R. Critical review: dynamics of microfluidic droplets // Lab on a Chip. 2010. V. 10. P. 2032-2045.
18. <http://www.bio-rad.com>

19. <http://raindancetech.com>
20. Cubaud T., Mason T.G. Capillary threads and viscous droplets in square microchannels // *Physics of Fluids*. 2008. V. 20. P. 5.
21. Garstecki P. et al. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up // *Lab on a Chip*. 2006. V. 6. P. 437-446.
22. Markey A. L., Mohr S., Day P. J.. High-throughput droplet PCR. // *Methods*. 2010. V. 50. P. 277-281.
23. Clausell-Tormos J. et al. Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of mammalian cells and multicellular organisms // *Chemistry & biology*. 2008. V. 15. №. 5. P. 427-437.
24. Pilch M., Erdman C. A. Use of breakup time data and velocity history data to predict the maximum size of stable fragments for acceleration-induced breakup of a liquid drop // *International Journal of Multiphase Flow*. 1987. V. 13. №. 6. P. 741-757.
25. Lin S. P., Reitz R. D. Drop and spray formation from a liquid jet // *Annual Review of Fluid Mechanics*. 1998. V. 30. №. 1. P. 85-105.
26. Liu H. *Science and Engineering of Droplets: Fundamentals and Applications*. William Andrew Publishing, LLC. 1981. 539 p.
27. Di Carlo D. Inertial microfluidics // *Lab on a Chip*. 2009. V. 9. P. 3038-3046.
28. Amini H. et al. Engineering fluid flow using sequenced microstructures // *Nature communications*. 2013. V. 4. P. 1826.
29. Eggers J. Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows // *Reviews of modern physics*. 1997. V. 69. P. 865.
30. De Menech M. et al. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction // *Journal of fluid mechanics*. 2008. V. 595. P. 141-161.
31. Teh S. Y. et al. Droplet microfluidics // *Lab on a Chip*. 2008. V. 8. №. 2. P. 198-220.
32. Liu H., Zhang Y. Droplet formation in a T-shaped microfluidic junction // *Journal of applied physics*. 2009. V. 106. №. 3. P. 034906.
33. Stefan Holm *Experimental Biophysics*, FFFN20, FYST23, FAF010F. Lund University. 2013. Интернет ресурс <http://nanobio.ftf.lth.se/~biokurs/>. http://nanobio.ftf.lth.se/~biokurs/labs/Lab5_Droplets.pdf.
34. Arya S. et al. *Microfluidic Mechanics and Applications: a Review* // *Journal of Nano-& Electronic Physics*. 2013. V. 5. №. 4. P. 04047.
35. Dreyfus R., Tabeling P., Willaime H. Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels // *Physical review letters*. 2003. V. 90. №. 14. P. 144505.
36. Li W. et al. Screening of the effect of surface energy of microchannels on microfluidic emulsification // *Langmuir*. 2007. V. 23. №. 15. P. 8010-8014.
37. Leshansky A. M., Pismen L. M. Breakup of drops in a microfluidic T junction // *Physics of Fluids*. 2009. V. 21. №. 2. P. 023303.
38. Leshansky A. M. et al. Obstructed breakup of slender drops in a microfluidic T junction // *Physical review letters*. 2012. V. 108. №. 26. P. 264502.

39. Anna S. L., Bontoux N., Stone H. A. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels // *Applied physics letters*. 2003. V. 82. №. 3. P. 364-366.
40. Köster S. et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells // *Lab on a Chip*. 2008. V. 8. №. 7. P. 1110-1115.
41. Edd J. F. et al. Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops // *Lab on a Chip*. 2008. V. 8. №. 8. P. 1262-1264.
42. Ahn K. et al. Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels // *Applied Physics Letters*. 2006. V. 88. №. 26. P. 264105.
43. Brouzes E. et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. V. 106. №. 34. P. 14195-14200.
44. Love J. C. et al. A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies // *Nature biotechnology*. 2006. V. 24. №. 6. P. 703-707.
45. Zhu Y., Fang Q. Analytical detection techniques for droplet microfluidics - A review // *Analytica chimica acta*. 2013. V. 787. P. 24-35.
46. Eggers J. Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows // *Reviews of modern physics*. 1997. V. 69. P. 865.
47. Wong H., Radke C. J., Morris S. The motion of long bubbles in polygonal capillaries. Part 1. Thin films // *Journal of Fluid Mechanics*. 1995. V. 292. P. 71-94.
48. Raven J. P., Marmottant P. Periodic microfluidic bubbling oscillator: Insight into the stability of two-phase microflows // *Physical review letters*. 2006. V. 97. №. 15. P. 154501.
49. Guillot P. et al. Stability of a jet in confined pressure-driven biphasic flows at low Reynolds numbers // *Physical review letters*. 2007. V. 99. №. 10. P. 104502.
50. Tan Y. C. et al. Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting // *Lab on a Chip*. 2004. V. 4. №. 4. P. 292-298.
51. Guazzelli É., Hinch J. Fluctuations and instability in sedimentation // *Annual review of fluid mechanics*. 2011. V. 43. P. 97-116.
52. Brenner M. P. Screening mechanisms in sedimentation // *Physics of Fluids*. 1999. V. 11. №. 4. P. 754-772.
53. Batchelor G. K. Sedimentation in a dilute dispersion of spheres // *Journal of fluid mechanics*. 1972. V. 52. №. 02. P. 245-268.
54. Caflisch R. E., Luke J. H. C. Variance in the sedimentation speed of a suspension // *Physics of Fluids*. 1985. V. 28. №. 3. P. 759-760.
55. Mucha P. J. et al. A model for velocity fluctuations in sedimentation // *Journal of Fluid Mechanics*. 2004. V. 501. P. 71-104.
56. Tee S. Y. et al. Velocity fluctuations of initially stratified sedimenting spheres // *Physics of Fluids (1994-present)*. 2007. V. 19. №. 11. P. 113304.

57. Beatus T., Tlustý T., Bar-Ziv R. Phonons in a one-dimensional microfluidic crystal // *Nature Physics*. 2006. V. 2. №. 11. P. 743-748.
58. Beatus T., Bar-Ziv R., Tlustý T. Anomalous microfluidic phonons induced by the interplay of hydrodynamic screening and incompressibility // *Physical review letters*. 2007. V. 99. №. 12. P. 124502.
59. Taylor G. I. Deposition of a viscous fluid on the wall of a tube // *Journal of Fluid Mechanics*. 1961. V. 10. №. 02. P. 161-165.
60. Bretherton F. P. The motion of long bubbles in tubes // *Journal of Fluid Mechanics*. 1961. V. 10. №. 02. P. 166-188.
61. Hodges S. R., Jensen O. E., Rallison J. M. The motion of a viscous drop through a cylindrical tube // *Journal of fluid mechanics*. 2004. V. 501. P. 279-301.
62. Schwartz L. W., Princen H. M., Kiss A. D. On the motion of bubbles in capillary tubes // *Journal of Fluid Mechanics*. 1986. V. 172. P. 259-275.
63. Hazel A. L., Heil M. The steady propagation of a semi-infinite bubble into a tube of elliptical or rectangular cross-section // *Journal of Fluid Mechanics*. 2002. V. 470. P. 91-114.
64. Aussillous P., Quéré D. Quick deposition of a fluid on the wall of a tube // *Physics of Fluids*. 2000. V. 12. №. 10. P. 2367-2371.
65. Fairbrother F., Stubbs A. E. 119. Studies in electro-endosmosis. Part VI. The "bubble-tube" method of measurement // *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1935. P. 527-529.
66. Абиев Р. Ш. Моделирование гидродинамики снарядного режима течения газожидкостной системы в капиллярах // *Теоретические основы химической технологии*. 2008. Т. 42. №. 2. С. 115-127.
67. Sarrazin F. et al. Hydrodynamic structures of droplets engineered in rectangular micro-channels // *Microfluidics and Nanofluidics*. 2008. V. 5. №. 1. P. 131-137.
68. Jousse F. et al. Compact model for multi-phase liquid-liquid flows in microfluidic devices // *Lab on a Chip*. 2005. V. 5. №. 6. P. 646-656.
69. Sessoms D. A. et al. Droplet motion in microfluidic networks: Hydrodynamic interactions and pressure-drop measurements // *Physical Review E*. 2009. V. 80. №. 1. P. 016317.
70. Vanapalli S. A. et al. Hydrodynamic resistance of single confined moving drops in rectangular microchannels // *Lab on a Chip*. 2009. V. 9. №. 7. P. 982-990.
71. Fuerstman M. J. et al. The pressure drop along rectangular microchannels containing bubbles // *Lab on a Chip*. 2007. V. 7. №. 11. P. 1479-1489.
72. Labrot V. et al. Extracting the hydrodynamic resistance of droplets from their behavior in microchannel networks // *Biomicrofluidics*. 2009. V. 3. №. 1. P. 012804.
73. Adzima B. J., Velankar S. S. Pressure drops for droplet flows in microfluidic channels // *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2006. V. 16. №. 8. P. 1504-1510.

74. Xu J. H. et al. Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: from squeezing to dripping // *Microfluidics and Nanofluidics*. 2008. V. 5. №. 6. P. 711-717.
75. Ganán-Calvo A. M. Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing: An alternate physical description and universal scaling // *Physical Review E*. 2004. V. 69. №. 2. P. 027301.
76. Tan J. et al. Gas–liquid flow in T-junction microfluidic devices with a new perpendicular rupturing flow route // *Chemical Engineering Journal*. 2009. V. 146. №. 3. P. 428-433.
77. Cristini V., Tan Y. C. Theory and numerical simulation of droplet dynamics in complex flows—a review // *Lab on a Chip*. 2004. V. 4. №. 4. P. 257-264.
78. Hou T. Y., Lowengrub J. S., Shelley M. J. Boundary integral methods for multicomponent fluids and multiphase materials // *Journal of Computational Physics*. 2001. V. 169. №. 2. P. 302-362.
79. Shin S., Juric D. Modeling three-dimensional multiphase flow using a level contour reconstruction method for front tracking without connectivity // *Journal of Computational Physics*. 2002. V. 180. №. 2. P. 427-470.
80. Prosperetti A., Tryggvason G. *Computational methods for multiphase flow*. Cambridge university press, 2007. 470 p.
81. Zhang J. *Lattice Boltzmann method for microfluidics: models and applications* // *Microfluidics and Nanofluidics*. 2011. V. 10. №. 1. P. 1-28.
82. Жамбалова Д.Б., Черный С.Г. Метод интерполяционного профиля решения уравнений переноса // *Вестник НГУ. Сер.: Информационные технологии*. 2012. Т. 10. С. 33-54.
83. Lee J., Lee W., Son G. Numerical study of droplet breakup and merging in a microfluidic channel // *Journal of Mechanical Science and Technology*. 2013. V. 27. №. 6. P. 1693-1699.
84. De Menech M. Modeling of droplet breakup in a microfluidic T-shaped junction with a phase-field model // *Physical Review E*. 2006. V. 73. №. 3. P. 031505.
85. Yan Y., Guo D., Wen S. Z. Numerical simulation of junction point pressure during droplet formation in a microfluidic T-junction // *Chemical Engineering Science*. 2012. V. 84. P. 591-601.
86. Anderson A., Zheng X., Cristini V. Adaptive unstructured volume remeshing—I: The method // *Journal of Computational Physics*. 2005. V. 208. №. 2. P. 616-625.
87. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Эмульсия>.
88. Amarouchene Y., Cristobal G., Kellay H. Noncoalescing drops // *Physical Review Letters*. 2001. V. 87. №. 20. P. 206104.
89. Schramm L. L. *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2005. 463 p.
90. Landfester K. Recent developments in miniemulsions — formation and stability mechanisms // *Macromolecular Symposia*. 2000. V. 150. №. 1. P. 171-178.

91. Goodwin G. W. *Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers. An Introduction*. John Wiley & Sons Ltd. 2004. 289 p.
92. Griffin W. C. Hydrophilic-lipophilic balance // *J Soc Cosmet Chem*. 1949. V. 1. P. 311-326.
93. Baret J. C. Surfactants in droplet-based microfluidics // *Lab on a Chip*. 2012. V. 12. №. 3. P. 422-433.
94. Zhang R., Somasundaran P. Advances in adsorption of surfactants and their mixtures at solid/solution interfaces // *Advances in colloid and interface science*. 2006. V. 123. P. 213-229.
95. Joensson H. N., Andersson Svahn H. Droplet Microfluidics — A Tool for Single-Cell Analysis // *Angewandte Chemie International Edition*. 2012. V. 51. №. 49. P. 12176-12192.
96. Schaerli Y. et al. Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets // *Analytical chemistry*. 2008. V. 81. №. 1. P. 302-306.
97. Hatch A. C. et al. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR // *Lab on a chip*. 2011. V. 11. №. 22. P. 3838-3845.
98. Saint-Jaimes A., Zemb T., Langevin D. *Trends in Colloid and Interface Science XV*. Springer Berlin Heidelberg, 2001. 299 p.
99. <http://www.surfachem.com/abil-em180>.
100. Song H., Tice J. D., Ismagilov R. F. A microfluidic system for controlling reaction networks in time // *Angewandte Chemie*. 2003. V. 115. №. 7. P. 792-796.
101. <http://www.ranbiotechnologies.com/>.
102. Courtois F. et al. Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays // *Analytical chemistry*. 2009. V. 81. №. 8. P. 3008-3016.
103. Woronoff G. et al. New generation of amino coumarin methyl sulfonate-based fluorogenic substrates for amidase assays in droplet-based microfluidic applications // *Analytical chemistry*. 2011. V. 83. №. 8. P. 2852-2857.
104. Roach L. S., Song H., Ismagilov R. F. Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorophilic-phase surfactants // *Analytical chemistry*. 2005. V. 77. №. 3. P. 785-796.
105. Holtze C. et al. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions // *Lab on a Chip*. 2008. V. 8. №. 10. P. 1632-1639.
106. Derkach S. R. Rheology of emulsions // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009. V. 151. №. 1. P. 1-23.
107. Romanowsky M. B. et al. Functional patterning of PDMS microfluidic devices using integrated chemo-masks // *Lab on a Chip*. 2010. V. 10. №. 12. P. 1521-1524.
108. Hwang S., Choi C. H., Lee C. S. Regioselective surface modification of PDMS microfluidic device for the generation of monodisperse double emulsions // *Macromolecular Research*. 2012. V. 20. №. 4. P. 422-428.

109. Lin X. et al. A microfluidic chip capable of switching W/O droplets to vertical laminar flow for electrochemical detection of droplet contents //Analytica chimica acta. 2014. V. 828. P. 70-79.
110. Guo Z. X. et al. Valve-based microfluidic droplet micromixer and mercury (II) ion detection //Sensors and Actuators A: Physical. 2011. V. 172. №. 2. P. 546-551.
111. Vladislavljević G. T., Kobayashi I., Nakajima M. Generation of highly uniform droplets using asymmetric microchannels fabricated on a single crystal silicon plate: effect of emulsifier and oil types //Powder Technology. 2008. V. 183. №. 1. P. 37-45.
112. Utada A. S. et al. Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams //Physical review letters. 2007. V. 99. №. 9. P. 094502.
113. Jiang K. et al. Microfluidic generation of uniform water droplets using gas as the continuous phase //Journal of colloid and interface science. 2015. V. 448. P. 275-279.
114. Hsiung S. K., Chen C. T., Lee G. B. Micro-droplet formation utilizing microfluidic flow focusing and controllable moving-wall chopping techniques //Journal of Micromechanics and Microengineering. 2006. V. 16. №. 11. P. 2403-2410.
115. Kim H. et al. Controlled production of emulsion drops using an electric field in a flow-focusing microfluidic device //Applied Physics Letters. 2007. V. 91. №. 13. P. 133106.
116. Riegler H., Lazar P. Delayed coalescence behavior of droplets with completely miscible liquids //Langmuir. 2008. V. 24. №. 13. P. 6395-6398.
117. Eggers J., Lister J. R., Stone H. A. Coalescence of liquid drops //Journal of Fluid Mechanics. 1999. V. 401. P. 293-310.
118. Wilhelm T. S. et al. Surface-induced droplet fusion in microfluidic devices //Lab on a Chip. 2007. V. 7. №. 8. P. 984-986.
119. Chokkalingam V. et al. Optimized droplet-based microfluidics scheme for sol-gel reactions //Lab on a Chip. 2010. V. 10. №. 13. P. 1700-1705.
120. Bremond N., Thiam A. R., Bibette J. Decompressing emulsion droplets favors coalescence //Physical review letters. 2008. V. 100. №. 2. P. 024501.
121. Hung L. H. et al. Alternating droplet generation and controlled dynamic droplet fusion in microfluidic device for CdS nanoparticle synthesis //Lab on a Chip. 2006. V. 6. №. 2. P. 174-178.
122. Niu X. et al. Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits //Lab on a chip. 2008. V. 8. №. 11. P. 1837-1841.
123. Chabert M., Dorfman K. D., Viovy J. L. Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels //Electrophoresis. 2005. V. 26. №. 19. P. 3706-3715.
124. Link D. R. et al. Electric control of droplets in microfluidic devices //Angewandte Chemie International Edition. 2006. V. 45. №. 16. P. 2556-2560.
125. Niu X. et al. Electro-coalescence of digitally controlled droplets //Analytical chemistry. 2009. V. 81. №. 17. P. 7321-7325.

126. Zagnoni M., Baroud C. N., Cooper J. M. Electrically initiated upstream coalescence cascade of droplets in a microfluidic flow //Physical Review E. 2009. V. 80. №. 4. P. 046303.
127. Singh P., Aubry N. Transport and deformation of droplets in a microdevice using dielectrophoresis //Electrophoresis. 2007. V. 28. №. 4. P. 644-657.
128. Wang W., Yang C., Li C. M. On-demand microfluidic droplet trapping and fusion for on-chip static droplet assays //Lab on a Chip. 2009. V. 9. №. 11. P. 1504-1506.
129. Köhler J. M. et al. Digital reaction technology by micro segmented flow - components, concepts and applications //Chemical Engineering Journal. 2004. V. 101. №. 1. P. 201-216.
130. Baroud C. N., de Saint Vincent M. R., Delville J. P. An optical toolbox for total control of droplet microfluidics //Lab on a Chip. 2007. V. 7. №. 8. P. 1029-1033.
131. Lin B. C., Su Y. C. On-demand liquid-in-liquid droplet metering and fusion utilizing pneumatically actuated membrane valves //Journal of Micromechanics and Microengineering. 2008. V. 18. №. 11. P. 115005.
132. Anderson R. R. et al. Transient deflection response in microcantilever array integrated with polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidics //Lab on a Chip. 2011. V. 11. №. 12. P. 2088-2096.
133. Iliescu C. et al. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon //Biomicrofluidics. 2012. V. 6. №. 1. P. 016505.
134. Li L. et al. Anti-biofouling sulfobetaine polymer thin films on silicon and silicon nanopore membranes //Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2011. V. 22. №. 1-3. P. 91-106.
135. Washburn A. L., Gunn L. C., Bailey R. C. Label-free quantitation of a cancer biomarker in complex media using silicon photonic microring resonators //Analytical chemistry. 2009. V. 81. №. 22. P. 9499-9506.
136. Wang F., Burns M. A. Performance of nanoliter-sized droplet-based microfluidic PCR //Biomedical microdevices. 2009. V. 11. №. 5. P. 1071-1080.
137. Nisisako T., Torii T. Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles //Lab on a Chip. 2008. V. 8. №. 2. P. 287-293.
138. http://www.dolomite-microfluidics.com/webshop/microfluidic-chips-droplet-chips-1-reagent-c-17_19_21.
139. Bartolo D. et al. Microfluidic stickers //Lab on a Chip. 2008. V. 8. №. 2. P. 274-279.
140. Martynova L. et al. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods //Analytical chemistry. 1997. V. 69. №. 23. P. 4783-4789.
141. McCormick R. M. et al. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates //Analytical Chemistry. 1997. V. 69. №. 14. P. 2626-2630.

142. Yang S., DeVoe D. L. Microfluidic device fabrication by thermoplastic hot-embossing //Microfluidic Diagnostics. Humana Press, 2013. P. 115-123.
143. Rodrigues E. R. G. O., Lapa R. A. S. Development of flow systems by direct-milling on poly (methyl methacrylate) substrates using UV-photopolymerization as sealing process //Analytical Sciences. 2009. V. 25. №. 3. P. 443-448.
144. Shadpour H. et al. Multichannel microchip electrophoresis device fabricated in polycarbonate with an integrated contact conductivity sensor array //Analytical chemistry. 2007. V. 79. №. 3. P. 870-878.
145. Chen H. Y. et al. Solventless adhesive bonding using reactive polymer coatings //Analytical chemistry. 2008. V. 80. №. 11. P. 4119-4124.
146. Lee S. W., Lee S. S. Shrinkage ratio of PDMS and its alignment method for the wafer level process //Microsystem Technologies. 2008. V. 14. №. 2. P. 205-208.
147. Toepke M. W., Beebe D. J. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications //Lab Chip. 2006. V. 6. №. 12. P. 1484-1486.
148. Yunus S. et al. Diffusion of oligomers from polydimethylsiloxane stamps in microcontact printing: Surface analysis and possible application //Surface and Interface Analysis. 2007. V. 39. №. 12-13. P. 922-925.
149. Lee J. N., Park C., Whitesides G. M. Solvent compatibility of poly (dimethylsiloxane)-based microfluidic devices //Analytical chemistry. 2003. V. 75. №. 23. P. 6544-6554.
150. Choi K. M., Rogers J. A. A photocurable poly (dimethylsiloxane) chemistry designed for soft lithographic molding and printing in the nanometer regime //Journal of the American Chemical Society. 2003. V. 125. №. 14. P. 4060-4061.
151. Kim B. Y. et al. Solvent-Resistant PDMS Microfluidic Devices with Hybrid Inorganic/Organic Polymer Coatings //Advanced Functional Materials. 2009. V. 19. №. 23. P. 3796-3803.
152. McDonald J. C., Whitesides G. M. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices //Accounts of chemical research. 2002. V. 35. №. 7. P. 491-499.
153. Zhang W. et al. PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics //Lab on a Chip. 2009. V. 9. №. 21. P. 3088-3094.
154. Lee N. Y., Chung B. H. Novel poly (dimethylsiloxane) bonding strategy via room temperature "chemical gluing" //Langmuir. 2009. V. 25. №. 6. P. 3861-3866.
155. Lee K. S., Ram R. J. PlasticPDMS bonding for high pressure hydrolytically stable active microfluidics //Lab on a Chip. 2009. V. 9. №. 11. P. 1618-1624.
156. Derzsi L. et al. Hydrophilic polycarbonate for generation of oil in water emulsions in microfluidic devices //Lab on a Chip. 2011. V. 11. №. 6. P. 1151-1156.
157. Kim K., Park S. W., Yang S. S. The optimization of PDMS-PMMA bonding process using silane primer //BioChip Journal. 2010. V. 4. №. 2. P. 148-154.

158. Sackmann E. K., Fulton A. L., Beebe D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research //Nature. 2014. V. 507. №. 7491. P. 181-189.
159. Blow N. Microfluidics: the great divide //Nature Methods. 2009. V. 6. №. 9. P. 683-686.
160. Yole Development, Research and Markets. Microfluidic applications in the pharmaceutical, life sciences, in-vitro diagnostic and medical device markets report. 2013. http://www.researchandmarkets.com/reports/2633004/microfluidic_applications_in_the_pharmaceutical.
161. Volpatti L. R., Yetisen A. K. Commercialization of microfluidic devices //Trends in biotechnology. 2014. V. 32. №. 7. P. 347-350.
162. <http://www.illumina.com/>.
163. <https://www.fluidigm.com/>.
164. Marc A Unger, Hou-Pu Chou, Todd A Thorsen, Axel Scherer, Stephen R Quake Microfabricated elastomeric valve and pump systems. Патент WO 2001001025 А3. 27 июня 2000.
165. <http://www.spherefluidics.eu>
166. <http://www.dolomite-microfluidics.com>
167. <http://www.micronit.com>
168. Nge P. N., Rogers C. I., Woolley A. T. Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications //Chemical reviews. – 2013. V. 113. №. 4. P. 2550-2583.