
**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**

УДК 543.9+532.5.01+532.6+544.7

© И. В. Кухтевич, Я. С. Посмитная, К. И. Белоусов,
А. С. Букагин, А. А. Евстапов

**ПРИНЦИПЫ, ТЕХНОЛОГИИ И УСТРОЙСТВА
"КАПЕЛЬНОЙ" МИКРОФЛЮИДИКИ. Ч. 2
(ОБЗОР)**

Обзор представлен в нескольких частях. В первой части обзора изложены следующие темы.

- Физика процесса. Образование капель.
- Моделирование процессов в "капельной" микрофлюидике.
- Устройства для формирования капель.

Во второй части приведены разделы:

- устройства для слияния капель: пассивные методы и активные методы;
- обработка и модификация поверхности;
- создание стабильных эмульсий в микрофлюидных устройствах.

Здесь подробно обсуждаются базовые топологии микроустройств для слияния капель. Особое внимание уделяется методам и способам модификации рабочей поверхности полидиметилсилоксана — материала, наиболее часто применяемого для прототипирования микрофлюидных чипов. В отдельном разделе представлены способы создания стабильных эмульсий с использованием поверхностно-активных веществ.

Кл. сл.: коалесценция капель, полидиметилсилоксан, модификация поверхности, эмульсия, поверхностно-активное вещество

1. УСТРОЙСТВА ДЛЯ СЛИЯНИЯ КАПЕЛЬ

1.1. Коалесценция капель

Одной из важных операций для решения аналитических и технологических задач является смешивание различных жидкостей путем слияния двух или более капель. При слиянии капель главную роль играют поверхностные силы, т. к. по отдельности капли имеют большую площадь поверхности, чем капля того же объема [1].

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 этого две капли входят в плотный контакт друг с другом с образованием тонкого жидкостного мостика между каплями, что является следствием притяжения между молекулами капель [2]. Вокруг мостика формируется мениск с большой кривизной и создает дисбаланс поверхностного натяжения, что приводит к слиянию капель [3].

Подходы, реализующие коалесценцию можно разбить на две группы: пассивные и активные. В случае первой группы не требуется приложения энергии извне, слияние капель происходит за счет

использования специальных структур в каналах [2] и свойств поверхности [4]. Для активной коалесценции требуется энергия, генерируемая внешними источниками (приложение электрических, температурных полей и т. д.). Существует несколько наиболее распространенных подходов, которые реализуются в микрофлюидных устройствах для решения задачи слияния капель и которые мы рассмотрим ниже.

1.2. Пассивные методы

Коалесценция капель в каналах и реакционных камерах специальной геометрии

Принцип пассивного задерживания капель [5, 6] в простейшем случае заключается в размещении в канале элемента, изменяющего гидравлическое сопротивление для задерживания (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 удержание капли дисперсной фазы. Такой принцип реализуется в четыре стадии: захват капли, остановка пойманной капли, слияние двух капель и высвобождение капли, полученной в результате слияния.

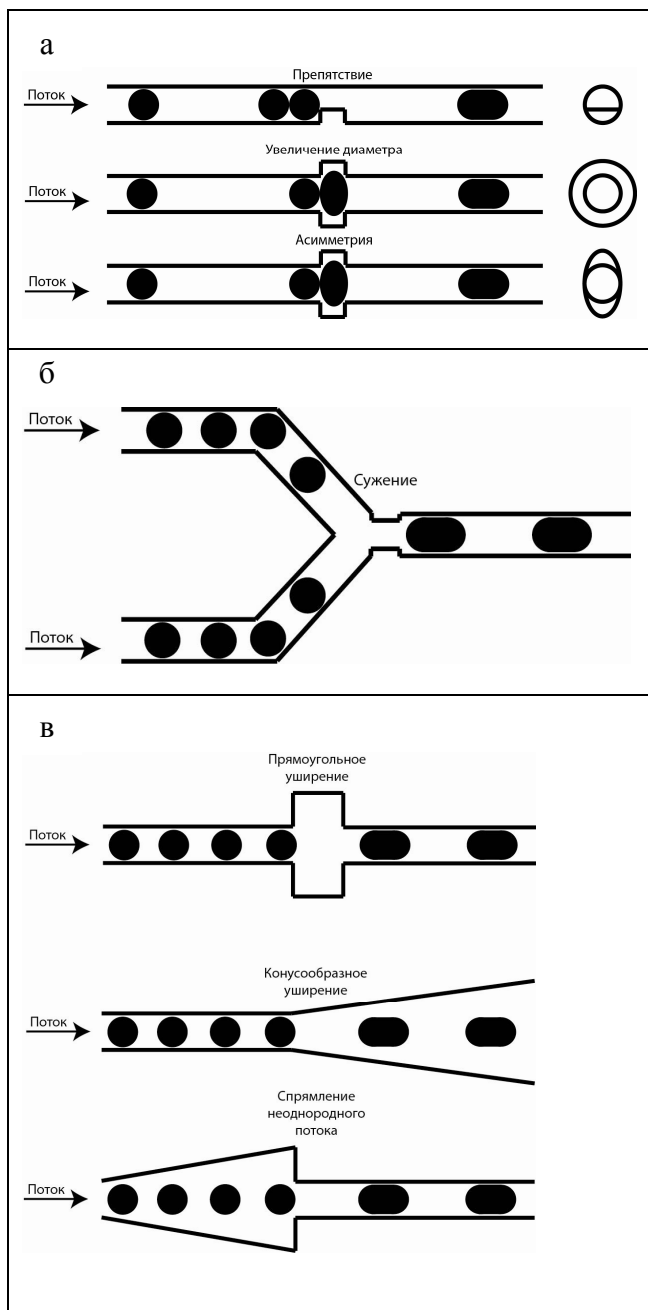


Рис. 3. Устройства для слияния капель. Пассивные методы.

а — размещение в канале элемента, изменяющего гидравлического сопротивления; б — использование эффектов на пересечении каналов; в — использование прямоугольного и конического расширений канала или выравнивания неоднородного по скорости потока

Существует три различных типа ловушек, основанные на этом принципе (рис. 3, а): с препятствием внутри канала, с локальным увеличением размера канала, с локальной асимметрией сечения канала. Слияние капель также может быть реализовано в перекрестии каналов (рис. 3, б). В отли-

чие от введения в систему элементов, изменяющих гидродинамическое сопротивление, данный подход требует синхронизации движения капель таким образом, чтобы они доставлялись к перекрестию в одно время.

Существуют и другие подходы, построенные на изменении геометрии каналов [2]: прямоугольное расширение канала, коническое расширение канала и "спрямление" неоднородного по скорости потока (рис. 3, в). Конструкция, базирующаяся на прямоугольном расширении канала, позволяет замедлять капли при уширении канала. Объем непрерывной фазы между соседними каплями уменьшается, капли входят в контакт и сливаются. Ограничением данного подхода является то, что он применим только при определенных расходах и соотношениях потоков дисперсной и непрерывной фаз. 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 расширениями данный подход может обеспечивать отвод непрерывной фазы с контролируемой скоростью.

В работе [7] было проведено изучение характеристик слияния капель в микроканале с прямоугольным расширением. Установлено, что две следующие в одну линию капли, и сталкивающиеся 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 микрофлюидное устройство было предложено в работе [8] (рис. 4, а). Устройство имеет три входных канала (один для непрерывной фазы, два дисперсной), которые пересекаются и образуют двойной Т-инжектор с общим каналом для непрерывной фазы, на входе из которого располагается конусообразное уширением. Генерирование капель, содержащих дисперсную фазу различного состава, происходит поочередно на двойном Т-инжекторе. Затем полученные капли поступают в конусообразное расширение. На данном участке капли имеют возможность подойти друг к другу вплотную, однако между ними остается тонкий слой 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 [9]. Суть предлагаемого подхода

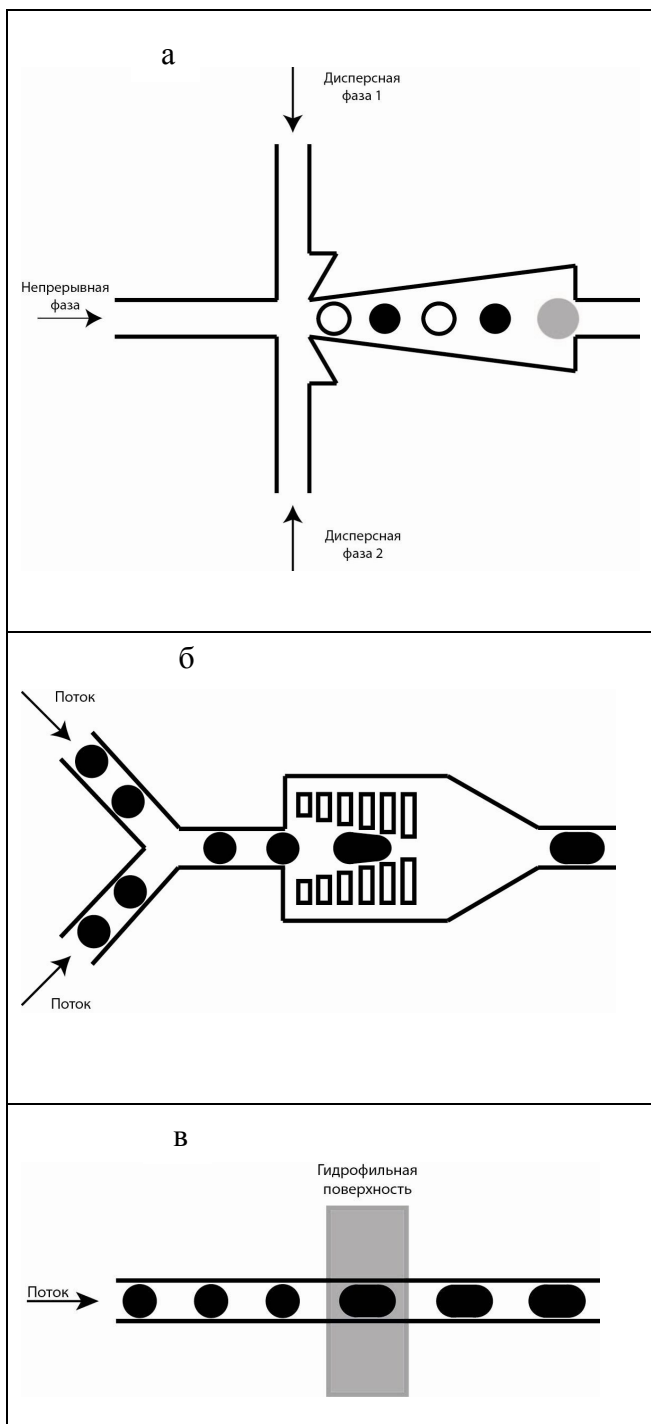


Рис. 4. Устройства для слияния капель. Пассивные методы.

а — применение двойного Т-инжектора с конусообразным уширением и сужением канала; б — размещение препятствий специальной формы в камере; в — модификация участка поверхности

заключается в размещении столбиков специальной формы в реакционной камере (рис. 4, б). Столбики размещаются симметрично с образова-

нием протока между ними, куда попадает капля на выходе из канала и начинает замедляться вплоть до полной остановки из-за последовательного изменения гидродинамического сопротивления системы. Затем в этот проток попадает еще одна капля, излишки масла между каплями отводятся через боковые каналы между столбиками. Капля вводится в контакт и сливается с удерживаемой каплей, создавая дополнительное давление на нее, что приводит к выдавливанию вновь образованной капли.

Коалесценция капель за счет модификации поверхности

Кроме подходов, реализующих слияние капель за счет специальной геометрии функциональных элементов, существуют пассивные подходы, построенные на изменении поверхностных свойств стенок каналов. Например, в работе [4] представлено микрофлюидное устройство из ПДМС, у которого заданный участок канала, через который осуществляется транспорт капель, был гидрофилизирован полиакриловой кислотой при помощи УФ-полимеризации для замедления и улавливания водных капель (рис. 4, в). В данном случае процесс слияния капель можно условно разделить на две стадии: а) захват капли и слияние со следующей за ней каплей; б) отделение вновь образованной капли. Механизм этого подхода заключается в использовании разницы между вязкими и поверхностными силами. В общем случае капля входит в заданную область, где была проведена модификация поверхности, замедляется и останавливается. Следующая за ней капля входит с удерживаемой в контакт и плавно сливается с ней до тех пор, пока вязкие силы не начинают превосходить поверхностные силы, после чего происходит отрыв сформированной после слияния капли.

1.3. Активные методы

Электрокоалесценция

Электрокоалесценция является активным подходом, который широко используется для слияния капель под действием электрического поля. Впервые он был рассмотрен в работе [10], где изучалось 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 и заряд капель. Затем две капли подходят друг к другу, притягиваются вследствие действия кулоновских сил и сливаются.

В работе [11] было продемонстрировано микрофлюидное устройство для электрокоалесценции

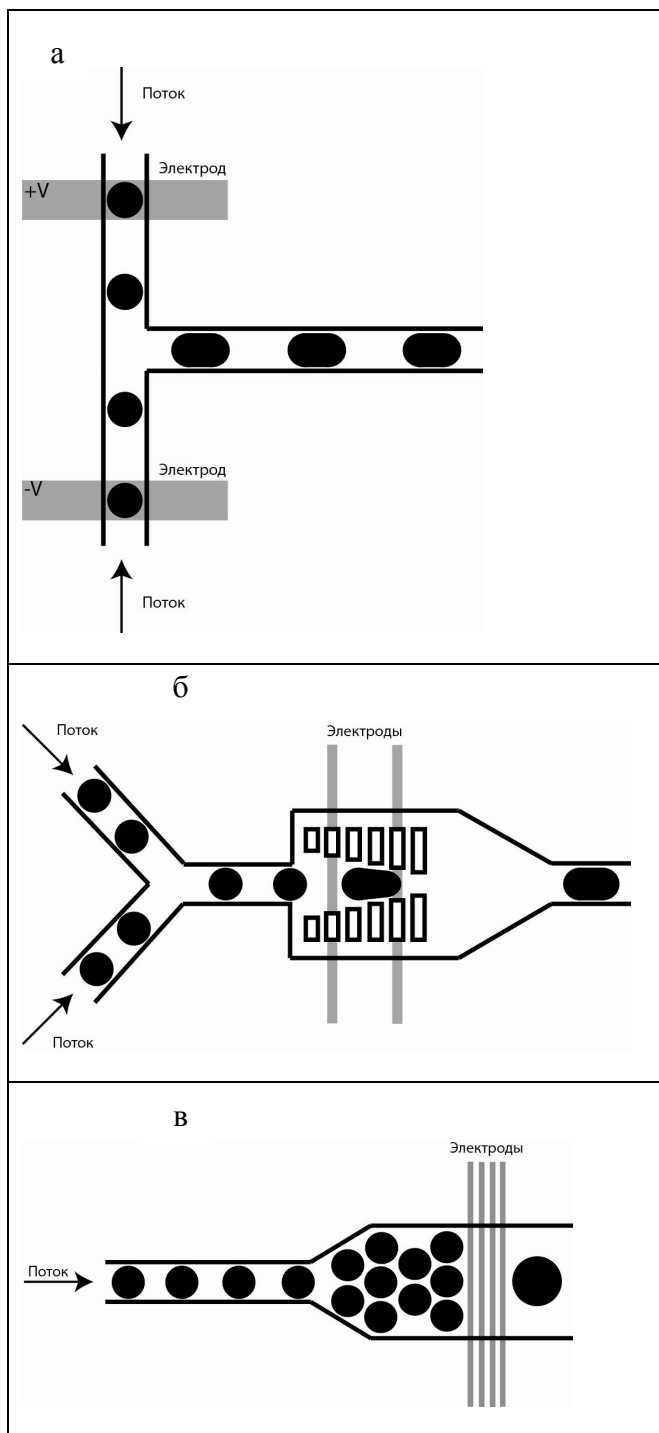


Рис. 5. Устройства для слияния капель. Активные методы.
 а — электрокоалесценция; б — сочетание массива упорядоченных столбиков и электрокоалесценции; в — сочетание конусообразного уширения и электрокоалесценции

под действием поля, создаваемого постоянным электрическим током. Вода выступает в роли про-

водника, а масло — изолятора. Под действием электрического поля, верхняя и нижняя капли (рис. 5, а) приобретают противоположные заряды. Чем ближе две капли подходят к Т-инжектору, тем сильнее они притягиваются друг к другу. Таким образом, происходит слияние.

В ряде работ описываются комбинации пассивных подходов и электрокоалесценции. Например, в [12] рассмотрено микрофлюидное устройство, оснащенное массивом упорядоченных столбиков и электродами, размещенными в реакционной камере (рис. 5, б). Столбики играют роль элементов, на которых происходило замедление и удержание капель. Затем к электродам прикладывалось напряжение, что способствовало скорейшему удалению тонкой масляной пленки между каплями и приводило к их слиянию. Такое сочетание пассивного и активного подходов позволяет сократить время, необходимое для слияния капель.

В работе [13] было предложено микрофлюидное устройство, позволяющее производить одновременное слияние нескольких капель. Рабочая зона устройства выполнена в виде канала с конусообразным уширением, в котором размещались электроды (рис. 5, в). 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, что приводило к дисбалансу кривизны вдоль границы раздела фаз. Данный дисбаланс в свою очередь приводил ко второй стадии. Из-за наличия большой капли имело место локальное падение давления между соседними каплями меньших размеров. Как результат реализовывалась коалесценция. Авторы выявили, что данное явление зависит от размера капель и их распределения.

Индукцируемая 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. Диэлектрфорез основан на различии в *диэлектрической проницаемости* дискретной и непрерывной фаз, в то время как электрокоалесценция основана на отличии в *проводимости* этих фаз. Подробно ознакомиться с манипуляциями каплями методом диэлектрфореза можно в работах [14–16].

Индукцируемая температурой коалесценция капель

В основе данного подхода лежит использование зависимости вязкости и поверхностного

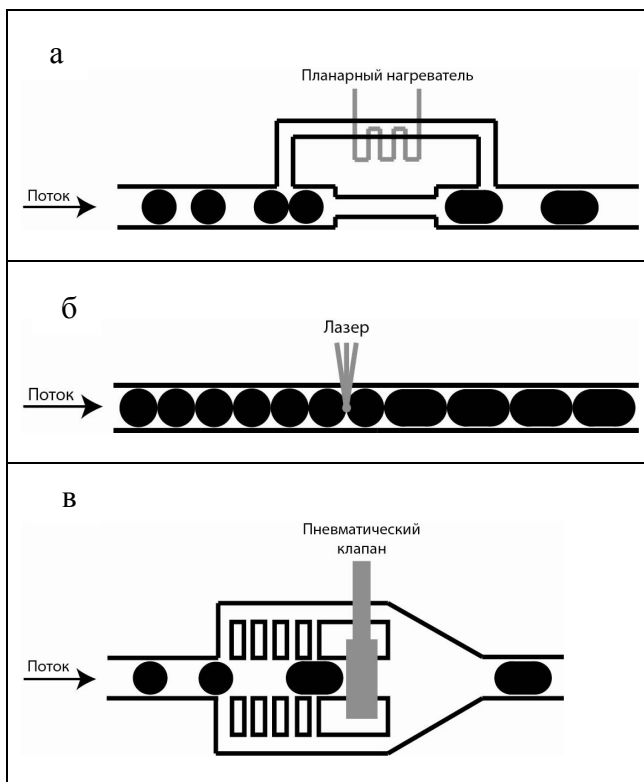


Рис. 6. Устройства для слияния капель. Активные методы.
 а — использование планарного нагревательного элемента; б — применение лазера для локального нагрева; в — использование пневматического клапана

натяжения от температуры. Увеличение температуры приводит к уменьшению вязкости непрерывной фазы. Как результат непрерывная фаза течет быстрее из-за нагрева. Кроме того, поверхностное натяжение капель уменьшается с увеличением температуры, поэтому добиться слияния капель становится проще.

Пример микрофлюидного устройства для реализации индуцируемой температурой коалесценции капель был представлен в работе [5]. В данном устройстве элемент с высоким гидравлическим сопротивлением — узкий канал — был соединен с основным каналом, имеющим сужение в поперечном сечении на определенном участке (рис. 6, а). Тонкий пленочный нагревательный элемент встроен в канал с высоким гидравлическим сопротивлением. При работе устройства часть потока непрерывной фазы проходит через узкий канал. В случае активации нагревательного элемента температура в узком канале возрастает и как следствие вязкость непрерывной фазы на выходе из канала снижается. Из-за отвода непрерывной фазы из основного канала увеличивается вероятность контакта капель друг с другом. Когда

слияние капель завершается, нагревательный элемент выключается для обеспечения транспорта образованных капель по основному каналу.

Вместо использования планарных нагревательных элементов может применяться сфокусированное лазерное излучение [17, 18] для нагрева локальной области потока жидкости с целью слияния капель (рис. 6, б). При нахождении капель в канале активируется мембранный клапан, который играет роль блокиратора, препятствующего движению капель. Капля замедляется и задерживается на некотором участке. Когда две капли входят в контакт друг с другом, образовавшаяся пара сдвигается вперед по каналу, т. к. на одну из капель действует поток, создаваемый непрерывной фазой, и попадают в зону облучения. Сфокусированное лазерное излучение воздействует на границу раздела между двумя каплями, что приводит к их слиянию. После этого мембранный клапан открывается для отвода полученной капли из зоны облучения.

Индукцируемая пневматическими клапанами коалесценция капель

Еще один подход, реализующий слияние капель при использовании пневматических клапанов, рассмотрен в [19]. В подобных устройствах мембранные клапаны, приводимые в действие пневматической системой, обычно размещаются над каналом (рис. 6, в). Когда капля попадает в реакционную камеру специальной формы, клапан активируется и выполняет роль элемента, препятствующего движению капли. Капля замедляется, вплоть до полной остановки, и дожидается следующей за ней капли, которая под действием непрерывной фазы оказывает давление на задержанную каплю. В результате контакта капель происходит их слияние. Затем клапан открывается и полученная в результате коалесценции капля отводится из реакционной камеры.

2. ОБРАБОТКА И МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ

Одно из важных условий устойчивой генерации капель — дисперсная фаза не должна смачивать поверхность канала, а непрерывная фаза должна смачивать (рис. 7). Если диаметр формируемых капель больше ширины канала, то следует обеспечить несмачиваемость поверхности дисперсной фазой, иначе формирование капель будет нестабильным. Даже частичная смачиваемость вещества дисперсной фазой приводит к нестабильности.

Методы модификации поверхности микрофлюидных чипов с целью придания требуемых свойств зависят от материала микрочипа, условий его использования и решаемых задач. Здесь будут рассмотрены методы и подходы, применяемые при

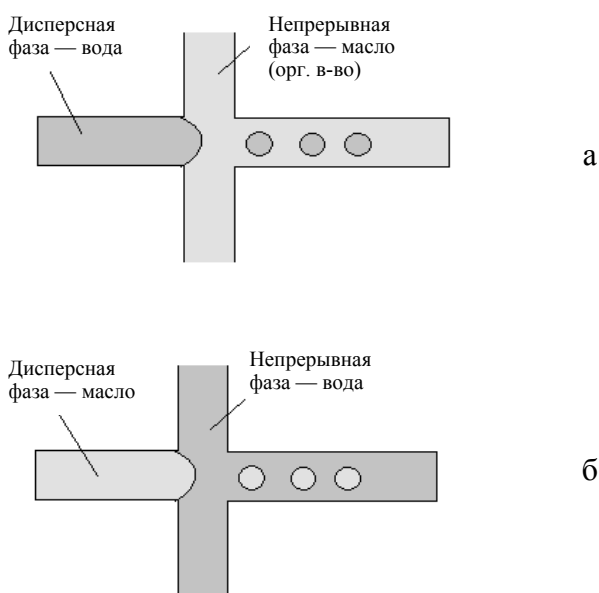


Рис. 7. Формирование капель в зависимости от смачиваемости поверхности.
а — гидрофобная поверхность, б — гидрофильная поверхность

модификации поверхности ПДМС (полидиметилсилоксана) как наиболее распространенного материала для прототипирования в микрофлюидике.

Методы модификации можно разделить на два вида: основанные на процессе физической адсорбции (неионные поверхностно-активные вещества, осаждение пленок полиэлектролита) и методы, 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 частично 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 эмульсии, поверхности которых имеют различные свойства смачивания. Для формирования эмульсии В/М (вода-в-масле) 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). Наиболее часто применяемыми методами для получения гидрофобных свойств является модификация при помощи коммерчески

доступного водоотталкивающего агента Aquapel (PPG Industries, США), а также силанизация. Для получения эмульсии М/В, рабочие поверхности микроканалов подвергаются обработке для достижения гидрофильных свойств. Более трудоемкой является модификация устройств для двойных эмульсий, при этом сочетаются различные методы с последовательной (двухстадийной) обработкой. Наиболее применяемыми являются методы, основанные на осаждении слоев полиэлектролита и с использованием 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 функционализированных слоев. Функциональные полимеры 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 выдержкой чипа в течение 15 мин при температуре 120 °С. Этот метод позволяет создать гидрофильное покрытие на поверхности ПДМС, которое предотвращает сорбцию белков. Хотя этот метод предельно прост, но его недостатком является низкая плотность прививки за счет взаимодействий привитых слоев и участков с соседними полимерными цепями.

В статье [20] описана высокопроизводительная микрофлюидная система, использующая водно-масляную эмульсию для изучения взаимодействия мышинного норовируса и макрофагов. Устройство изготовлено из ПДМС и для усиления гидрофобных свойств обработано с помощью Aquapel (Rider, MA, США) путем заполнения системы каналов данным реагентом с последующей сушкой устройства струей воздуха и отжигом при 65 °С в течение 15 мин. Генератор капель, основанный на принципе фокусирования потока жидкости, используется для инкапсулирования отдельных клеток и вирусных частиц в стабильные водные капли объемом 65 нл в потоке фторированного масла. Благодаря упаковке отдельных клеток с одиночными вирусами удается достичь отсутствия конкуренции с другими вирусами, в результате чего количество инфекционных частиц практически эквивалентно количеству присутствующих вирусных геномов.

В статье [21] сообщается о применении монодисперсной двойной эмульсии, производимой на одном микрофлюидном устройстве с частично гидрофильными и гидрофобными каналами для количественного анализа в проточной цитометрии. Микрофлюидные устройства для форми-

рования двойной эмульсии (два последовательных генератора с фокусированием потока) изготовлены из ПДМС Sylgard 184 (Dow Corning, США) и герметизированы предметным стеклом после обработки в кислородной плазме. Для того чтобы получить частично гидрофильные и гидрофобные участки в устройстве, использовалась двухэтапная обработка, описанная в [22]. На первом этапе для получения гидрофильного покрытия канала производилось последовательное осаждение слоев полиэлектролита на поверхность микроканала непосредственно после герметизации устройства. Полиэлектролит вводился через внешний гидравлический порт и прокачивался через модифицируемый канал при постоянной скорости 50 мкл/ч. Чтобы избежать распространения полиэлектролита по другим каналам, через другой порт создавался поток деионизированной воды при скорости потока 100 мкл/ч. На втором этапе для получения гидрофобных свойств применялась локализованная обработка модифицируемой поверхности с помощью водоотталкивающего агента Aquapel (PPG Industries, США) путем прокачки его через канал со скоростью 20 мкл/ч. При этом гидрофильное покрытие в смежных каналах было защищено встречным потоком фторуглеродного масла FC-40 (3M, St. Paul, MN, США), циркулирующим со скоростью 100 мкл/ч. Интеграция двух генераторов капель на одном чипе позволяет синхронизировать два процесса для создания эмульсий в отличие от использования для этих целей двух отдельных чипов. Однако процесс модификации поверхности становится более сложным.

В работе [23] представлен протокол использования микрофлюидных устройств для анализа и сортировки отдельных клеток с высокой пропускной способностью. Компартиментализация (упаковка) одиночных клеток в капли позволяет проводить анализ белков, выделяемых из клеток. Авторы провели анализ для выявления антител, выделяемых из одиночных клеток мышинной гибридомы. Частота генерации капель составляла ~200 Гц. Для того чтобы просканировать ~1 млн клеток, требуется 2–6 ч. В работе используются два микрофлюидных устройства. Первое служит для упаковки клеток и шариков, покрытых мышинными антителами. Готовые капли собираются в пробирку, стеклянные капилляры или шприцы в зависимости от объема эмульсии. Для того чтобы предотвратить испарение воды из капель, эмульсия должна храниться в закрытой системе (например, шприц или капилляр) или в атмосфере, насыщенной водными парами. На втором устройстве осуществляется электрокинетическая сортировка капель на основе анализа уровня интенсивности флуоресценции. Микрофлюидные устройства были получены методом "мягкой" литографии

из ПДМС, соединенного со стеклянной подложкой после плазменной обработки. Авторами предлагаются два альтернативных варианта обработки каналов. Первый подход основан на использовании агента Aquapel, второй — с применением раствора силана. Все каналы устройства заполняются 1 %-м водным раствором перфтор-додecil-трихлор силаном (*perfluorododecyl-trichloro-silane*) и выдерживаются в течение 10–30 с, а затем высушиваются струей воздуха или азота. Далее каналы промывают фторуглеродным маслом для удаления непрореагировавшего силана, а затем продувают их сжатым воздухом или азотом.

Подход, описанный в работе [24] и применяемый для формирования двойных эмульсий в микрофлюидных системах, основан на использовании плазменной установки низкого давления для нанесения тонких полимерных пленок на поверхность ПДМС, не изменяющих объемные свойства материала. Предварительная обработка в среде аргона в течение 5 с активирует поверхность перед нанесением слоя полимера, т. к. кислород, присутствующий в камере в следовых количествах, возбуждается аргоновой плазмой и приводит к частичному окислению верхнего слоя материала, что улучшает адгезию с осаждаемыми слоями. Предварительная обработка в среде аргона также используется для того, чтобы уменьшить абляцию кремния во время осаждения и загрязнения осажденной пленки, а также для ограничения миграции цепей ПДМС и, следовательно, регенерации поверхности. На втором этапе используется обработка в среде аргона (в течение 30 с) в сочетании с акриловой кислотой для формирования покрытия на обработанной поверхности ПДМС. Заключительный этап состоит в обработке поверхности в среде гелия в течение 5 с для закрепления осажденной полимерной пленки и усиления прочности сцепления. В результате полученная пленка (толщиной 450 нм) хуже растворяется в воде и ограничивает восстановление гидрофобных свойств ПДМС со временем. Для оценки гидрофильности поверхности с покрытием выполняли статические измерения краевого угла, которые показали хорошую гидрофильность перед промывкой в воде (угол $<10^\circ$, в сравнении с $110\text{--}120^\circ$ для исходного ПДМС), а после промывки дистиллированной водой угол увеличивался до $50\text{--}60^\circ$. Данные сканирующей электронной микроскопии показали высокую однородность получаемых пленок. Придавая поверхности ПДМС гидрофильные свойства посредством полимеризации в плазме, можно создавать однократную эмульсию масло—вода в устройстве с Т-инжектором. В данном случае в качестве дисперсной фазы использовался тетрадекан, а в качестве непрерывной — вода с добавлением додецилсульфата натрия. Авторами была получена

двойная эмульсия: капли воды в тетрадекане с добавлением Span 80 формировали в первом гидрофобном инжекторе, далее происходило формирование двойной эмульсии во втором инжекторе, покрытом гидрофильной пленкой.

В работе [25] продемонстрирована возможность создания биоразлагаемых микрокапсул с использованием микрофлюидных устройств из ПДМС для двойной эмульсии. 3D-микроканалы с локально модифицированной поверхностью используются для генерации монодисперсной эмульсии вода—органический растворитель—вода. Биоразлагаемый материал (poly(L-lactic acid), трилаурин, фосфохолин) растворяют в органической среде (в этой работе используется этилацетат) и отверждают, чтобы получить микрокапсулы, из которых в последствии можно извлечь растворитель. Таким образом, микрофлюидные устройства из ПДМС могут выступать в качестве универсального аппарата для изготовления биоразлагаемых микрокапсул для различных целей в биологической и фармацевтической промышленности. Для формирования двойной эмульсии используется двухстадийный процесс обработки поверхности с целью придания гидрофильных и гидрофобных свойств поверхности или применяются стеклянные капилляры [26], что усложняет процесс изготовления микрофлюидных устройств и приводит к увеличению стоимости производства. Авторы описывают новый тип микрофлюидного устройства из ПДМС, которое сочетает двухшаговую эмульсификацию по схеме фокусирования потока. 3D-каналы с частично обработанной поверхностью путем структурирования под действием УФ-излучения используются для формирования двойной эмульсии. Устройства изготавливались из двух пленок ПДМС для формирования 3D-структуры, обрабатывались коронным разрядом в течение 30–60 с, приводились в контакт друг с другом и выдерживались 2 ч при 80 °С для создания неразъемного соединения. Для частичной обработки каналов в первый инжектор вводился этилацетат в качестве защитной жидкости; второй инжектор заполнялся водным раствором, содержащим бензофенон (фотоинициатор), Pluronic F-68 (для улучшения растворимости бензофенона в воде), акриловую кислоту и трет-бутиловый спирт. Затем устройство подвергали воздействию УФ-излучения ($\lambda = 253.7$ нм) в течение 10 мин для активации процесса структурирования. После обработки каналы устройства промывали этиловым спиртом и дистиллированной водой для удаления этилацетата и остатков раствора. В результате такой обработки поверхность приобретала гидрофильные свойства. Качество модификации поверхности было охарактеризовано при измерении краевого угла: краевой угол воды с добавлением

5 % Tween 20 на обработанной поверхности ПДМС составил 63.2°, что на 40° ниже, чем значение угла смачивания чистой воды на необработанной поверхности ПДМС. Описание подобной методики обработки также можно встретить в статье [27].

Авторами [28] предложен новый метод структурирования поверхности микрофлюидных устройств 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. Как уже отмечалось ранее, для формирования двойной эмульсии требуются различные свойства смачивания на одном устройстве, но подобная обработка поверхности ПДМС остается достаточно сложной, несмотря на многочисленные доступные способы модификации поверхности. В некоторых случаях локальные участки генератора двойной эмульсии обрабатываются с помощью метода фотополимеризации при прохождении света через фото-маску или сфокусированным пучком света. Но такие способы требуют точного позиционирования маски над изготавливаемыми устройствами, что является главным препятствием для воспроизводимого изготовления устройств с одинаковыми характеристиками. Кроме того, за счет усадки ПДМС при его отверждении фото-маска должна быть адаптирована для каждой конкретной конструкции устройства и изготовлена с высокой точностью. Все это приводит к необходимости усовершенствования метода функционального структурирования. Авторами были изготовлены тестовые структуры из ПДМС методом "мягкой" литографии, герметизированные стеклянной пластиной после плазменной обработки и содержащие один канал шириной 30 мкм, два резервуара — справа и слева от канала, набор масок (хемо-маски) с различными вариантами размеров (200, 400 и 800 мкм). Толщина переемычки (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 группы фотоинициатора, которые обеспечат поверхностно-связанные радикалы, инициирующие процесс полимеризации. На втором этапе канал заполняли раствором мономеров акриловой кислоты и подвергали все устройство воздействию УФ-излучения интенсивностью 140 мВт/см^2 в течение 10 мин в воздушной среде. 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 при предварительном заполнении резервуара 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 микрофлюидных устройств с двумя генераторами с фокусировкой потока для получения двойных эмульсий. В устройстве для формирования эмульсии вода-в-масле-в-воде (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 масло-в-воде-в-масле (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. Также авторами была показана возможность обработки каналов без использования фотоинициатора. Соответствующий раствор для обработки представлял собой водный раствор акриламида, персульфат аммония и тетраметилэтилендиамина, которые инициировали полимеризацию полиакриламида на стенках канала. Подобный подход использовался для изготовления микрофлюидного устройства для двойной эмульсии В/М/В. Устройство заполняли раствором и инкубировали в течение ночи. В процессе полимеризации полиакриламида поверхность каналов приобретала гидрофильные свойства, за исключением участков, расположенных рядом с "хемо-маской".

В работе [29] описывается процедура ковалентного связывания, которая была адаптирована для двух микрофлюидных устройств: микробиореактора для скрининга дрожжевых клеток и генератора эмульсии М/В. Были предложены два метода обработки ПДМС для создания гидрофильной поверхности. Кроме того, исследовалась стабильность модифицированного ПДМС во времени при

хранении в различных средах — воздух, этиловый спирт, деионизованная вода, хлорид натрия. Первая методика обработки основана на использовании ПЭГ-силана. Вначале поверхность ПДМС подвергалась плазменной обработке в воздушной среде, а после этого активированные образцы погружались в раствор ПЭГ-силана (2-[метокси(полиэтиленокси)пропил]-триметоксисилан) в толуоле или этиловом спирте и выдерживались в течение 20 мин при непрерывном перемешивании. Оптимальная концентрация ПЭГ определена на уровне 0.1 М. Далее образцы промывались и высушивались.

Другой подход заключался в использовании коммерческого набора реактивов (Aldrich Prod. No. 701912) для создания гидрофильной поверхности. Подробно методика описана в работе [30] и основана на использовании полиглицидилметакрилата с предварительной обработкой низкочастотной плазмой в воздушной среде и сополимере акриламида и акриловой кислоты. Вторая методика более трудоемка и занимает в 3 раза больше времени — 21 против 7 ч в первом случае. Показано, что процесс ПЭГ-силанизации с предварительной плазменной обработкой позволяет получить краевой угол $\sim 50^\circ$. Поверхность сохраняет стабильные свойства в течение пяти месяцев при условии хранения в различных средах (воздух, этиловый спирт, деионизованная вода, раствор хлорида натрия), имитирующих жидкости, которые обычно используются в исследованиях. При применении коммерческого набора для модификации удалось достичь значений краевого угла $\sim 25\text{--}35^\circ$. Однако первая методика, которая к тому же требует гораздо меньше времени, позволяет получить более однородную и оптически прозрачную поверхность, что делает данный подход привлекательным.

В работе [31] авторы применяли комбинацию ковалентной пришивки силана и фотополимеризации акриловых кислот под действием УФ-излучения, чтобы выборочно изменять свойства поверхности на определенных участках готового устройства. Метод использовался для МФЧ, предназначенного для получения двойной монодисперсной эмульсии (В/М/В и М/В/М) и многократной эмульсии, содержащей различные количества капель внутри. Получение многократной эмульсии описано в работе [32].

Авторами [33] была показана возможность формирования гидрофильного слоя в канале МФЧ, но такое покрытие не позволяет достигнуть высокого пространственного разрешения и контрастности регистрируемого изображения. Микрофлюидное устройство состояло из двух пластин ПДМС (одна содержала микроструктуры, вторая являлась защитной), которые соединялись при помощи

плазменной обработки в среде кислорода. Далее устройство заполнялось раствором, содержащим 3-(триметоксисиллил) пропилметакрилат, уксусную кислоту и этиловый спирт, выдерживалось в течение 15 мин и 5 мин при 120 °С. После обработки устройство сушили струей воздуха, промывали в изопропиловом и этиловом спирте и сушили при 65 °С в течение 30 мин. Далее устройство заполняли раствором мономера (акриловая кислота, 2-гидрокси-2-метилпропиофенон) и выборочно подвергали воздействию УФ-излучения для образования ковалентной связи между акрилатными группами акриловой кислоты и метакрилатными группами силана. В результате выбранный участок микроканала приобретал гидрофильные свойства. Значение краевого угла для необработанной поверхности составило $102.8 \pm 1.3^\circ$, после обработки силаном — $72.9 \pm 0.7^\circ$, а после образования слоя полиакриловой кислоты значение составило $57.8 \pm 0.9^\circ$.

В статье [34] представлен универсальный метод для структурирования поверхности. При этом используется инертная жидкость, защищающая отдельные участки устройства, которые не должны подвергаться обработке. Авторами применялись фото- и тепловые инициаторы в процессе обработки поверхности МФУ, предназначенного для формирования двойных эмульсий (В/М/В и М/В/М). Устройство изготавливали традиционным методом мягкой литографии в ПДМС. Для управления свойствами смачивания применяли подход на основе золь-гель покрытия, которое придает гидрофобные свойства и может быть преобразовано в гидрофильную пленку после химической обработки. Для этого в раствор золь-геля вводили фтор- и метакрилат-силаны. Перед обработкой в раствор золь-геля добавлялся кислотный катализатор. Для этого комбинировались следующие компоненты: раствор золь-геля, метанол, трифторэтанол и водный раствор соляной кислоты, рН 2. Для модификации каналов их заполняли смесью золь-геля сразу после плазменной обработки. Из-за содержания в смеси фтор-силанов поверхность каналов приобретала гидрофобные свойства. Для изменения смачивания (придание гидрофильных свойств) использовали метакрилат-силаны в составе золь-геля. Подобные силаны содержат двойные связи, которые используются для пришивки гидрофильных полимеров (в данном случае раствор мономера акриловой кислоты) на поверхности. Для обеспечения условий (протекания процесса) полимеризации под воздействием УФ-излучения к раствору мономера акриловой кислоты в этиловом спирте добавлялся фотоинициатор. Устройство подвергалось УФ-обработке, но пришивка слоя полимера происходила на определенных участках, свободных от инертной среды.

Для тепловой инициации реакции использовали раствор мономера акриловой кислоты в воде с добавлением APS и тетраметилэтилендиамина. Температура, необходимая для осуществления реакции полимеризации, составила 80 °С (устройство помещалось на разогретую до 80 °С подложку). Подобный подход был описан авторами в работе [35].

3. СОЗДАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ ЭМУЛЬСИЙ В МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВАХ

Две несмешивающиеся жидкости не могут образовывать устойчивую эмульсию, поэтому для ее стабилизации используются различные способы. Стабилизация капель может быть реализована: (I) с помощью сил отталкивания между молекулами на границе раздела сред вследствие электростатического и / или стерических эффектов; (II) замедлением гидродинамического потока вдоль границы с помощью эффекта Марангони или при изменении вязкости [36, 37]. И в том и другом случае определяющую роль играют 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 (ПАВ), 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. 8, а), а не в объеме одной из них, т. е. содержать группы, обладающие сродством к обоим 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.

Природа ПАВ может определять тип эмульсии. ПАВ, которые лучше растворимы в воде, чем в масле, как правило, формируют эмульсии масло-в-воде (М/В), а ПАВ, которые лучше растворимы в масле, как правило, формируют эмульсии вода-в-масле (В/М) [38].

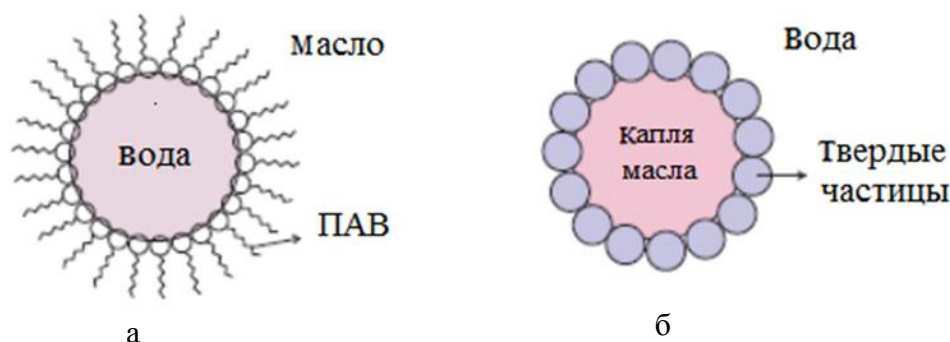


Рис. 8. Эмульсии, стабилизированные ПАВ (а) и твердофазными микрочастицами (б)

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 также позволяет получать размеры капель до ~ 100 нм, такие эмульсии называются "миниэмульсиями" [39]. 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 до ~ 10 нм, такие эмульсии являются прозрачными из-за их малого размера и называются микроэмульсиями [40]. Свойства микроэмульсий в значительной степени определяются свойствами монослоя ПАВ.

Эмульсии, которые стабилизируют с помощью небольших твердых частиц, адсорбирующихся на границе раздела между фазами, называют эмульсии Пикеринга (Pickering) (см. рис. 8, б). Чтобы такая эмульсия была стабильной, требуется, чтобы краевые углы смачивания твердофазной частицы для обеих фаз 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 гидрофобность, 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.

Для каждого конкретного случая эмульгатор подбирается опытным путем, но при выборе часто используют эмпирические зависимости и характеристики, например гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), оценивающий баланс между действием полярной и неполярной частей молекул и позволяющий предсказать тип получаемой

эмульсии. В 1949 г. Гриффин [41] ввел понятие ГЛБ (HLB) 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:

$$HLB = 7 + X_h (\text{hydrophilic group numbers}) - X_l (\text{lipophilic group numbers}).$$

Эта оценка не характеризует устойчивости эмульсий. Для адекватной оценки эмульгирующей способности разных 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 выполнить операции с каплями, такие как воспроизводимая генерация капель, инкубация их при разной температуре, транспортировка и слияние, важно использовать надежные ПАВ [42]. В качестве ПАВ, как правило, выбирают амфифильные молекулы с гидрофобными и гидрофильными группами [43]. 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 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 [44]. 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 периода времени, необходимого для экспериментов; быть инертными по отношению к компонентам в капле; регулировать молекулярный обмен между каплями и предотвращать миграцию биомолекул к границе раздела [42]. Изучение капель в микрофлюидных устройствах 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 сурфактанты — 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 фтористоеуглеродные масла. Капли в углеводородном масле, таком как гексадекан или так называемом минеральном масле, обычно стабилизируются коммерчески доступными ПАВ, например Span 80. Этот ПАВ в 3 %-м соотношении добавляется к гексадекану для стабилизации капель, что снижает поверхностное натяжение между дистиллированной водой и раствором гексадекана до $\gamma = 5$ мН/м [45, 46]. Другой ПАВ — ABIL EM 90 добавляют в соотношении 1 и 2 % для формирования капель диаметром 10–30 мкм. 2 %-я добавка ПАВ ABIL EM 90 в минеральное масло позволяла сохранять капли до 4 ч [47–50].

Изучение изменения размера капель в течение долгого времени с использованием 2 % ABIL EM 90 вместе с 0.5 % Triton X 100 [44] показало, что стабилизировать капли можно в течение минимум шести часов, но ~25 % капель объединились после этого времени. В отличие от этого состав с 3% ABIL EM 90 менее был подвержен слиянию (только 10 %). Увеличение концентрации ПАВ вызвало агрегацию капель.

ABIL EM 90 является биосовместимым и используется в косметических продуктах [51]. В микрофлюидных системах минеральное масло с ABIL EM 90 применяется для цифровой ПЦР в каплях [46]. Такое сочетание обеспечивает хорошую температурную стабильность капель. Однако высокая вязкость раствора обуславливает обратное давление при длительной инкубации капель в канале и приводит к нестабильности капель. Поэтому ABIL EM 90 в ряде случаев непригоден для микрофлюидных приложений, требующих длительного инкубационного времени и сложных операций с каплями. Другой ПАВ — ABIL EM 180 [52] являющийся универсальным высокомолекулярным эмульгатором для В/М эмульсий также успешно используется в "капельной" микрофлюидике. Он обладает хорошей тер-

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

Перфторированные масла и ПАВы 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 являлись нестабильными и объединялись друг с другом под давлением [53].

Фторуглеродные масла имеют преимущества по сравнению с углеводородными маслами из-за хороших свойств кислородопроницаемости и не смешивания с органическими и водными растворителями. Микроэмульсии в фторуглеродных маслах могут быть получены с использованием Fluorinert FC-40, FC-77 или аналогичных масел в качестве непрерывной масляной фазы и стабилизированы перфторполиэфиром (ПФПЭ) на основе ПАВ, таких как Krytox (DuPont) и др. [42, 44].

Перфторированные углеводороды (перфтордекалин, перфтортрибутиламин FC-43, FC-70 и др.) иногда предпочтительнее, чем минеральные масла, из-за их расслаивания в органических и водных растворителях, хорошей физической и химической стабильности. Фторуглеродные масла, как правило, плотнее, чем водоподобные вещества дисперсной фазы [54]. Полезная информация о типах эмульсий, составе непрерывной фазы и применяемых ПАВ со ссылками на соответствующие работы приведена в обзоре [55]. Отметим, что перфтордекалин в сочетании с 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-octanol использовали для изучения кристаллизации белка в группе Исмагилова [56].

Некоторые компании специализируются в области синтеза фторированных материалов, поэтому у зарубежных исследователей существует возможность заказать необходимые вещества у них. Например, компания RAN Biotechnologies [57], основанная в 2012 г., разрабатывает и синтезирует флуоросурфактанты для "капельной" микрофлюидики (инкапсуляция ДНК, РНК, белков и клеток) и эмульсионной ПЦР.

Такая ситуация с ПАВ приводит к тому, что некоторые исследовательские группы синтезируют сурфактанты с необходимыми свойствами: например, в работе [58] было синтезировано ПАВ и выявлены его характеристики для генерации капель, их стабильность, липофильность и цитотоксичность с целью использования для высокопроизводительных скрининговых платформ.

Из-за большого соотношения площади поверхности к объему микрокапель поверхностные взаимодействия на границе раздела вода—масло имеют существенное значение в выборе системы масло—ПАВ для изоляции клеток и биологически

активных 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 могут в некоторых случаях быть рассмотрены как замкнутые пространства (реакторы), это не всегда отражает реальные процессы. В работах [59, 60] был обнаружен перенос малых молекул из водного раствора в масляную фазу. Этот эффект зависит от концентрации ПАВ и может быть уменьшен при добавлении биополимеров, приводящих к образованию пленки на границе раздела сред, например, добавлением БСА.

При выборе компонентов для создания эмульсий должно быть изучено влияние масла и ПАВ на вещества дисперсной фазы (находящиеся в капле). Так, взаимодействие биологических молекул, таких как белков и ДНК (РНК), с границей раздела вода—масло часто приводит к дезактивации, денатурации и локализации биологических молекул на поверхности [61]. Чтобы уменьшить взаимодействие с биологическими молекулами следует использовать неионные ПАВ [62]. Диффузия биологических молекул в масляную фазу может привести к потере чувствительности при обнаружении, неправильности экспериментальных результатов и перекрестной контаминации капель. Поэтому выбору непрерывной фазы следует уделить особое внимание, чтобы предотвратить перенос биомолекул между каплями [63]. Токсичность масла и ПАВ для клеток также должна быть тщательно изучена; например, в работе [64] 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.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 15-19-10041)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Riegler H., Lazar P. Delayed coalescence behavior of droplets with completely miscible liquids // *Langmuir*. 2008. Vol. 24, no. 13. P. 6395–6398. doi: 10.1021/la800630w.
2. 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. Vol. 4, no. 4. P. 292–298. doi: 10.1039/b403280m.
3. Eggers J., Lister J.R., Stone H.A. Coalescence of liquid drops // *Journal of Fluid Mechanics*. 1999. Vol. 401. P. 293–310. doi: 10.1017/S002211209900662X.
4. Wilhelm T.S. et al. Surface-induced droplet fusion in microfluidic devices // *Lab on a Chip*. 2007. Vol. 7, no. 8. P. 984–986. doi: 10.1039/b708091c.
5. Köhler J.M. et al. Digital reaction technology by micro segmented flow — components, concepts and applications // *Chemical Engineering Journal*. 2004. Vol. 101, no. 1. P. 201–216. doi: 10.1016/j.cej.2003.11.025.
6. Chokkalingam V. et al. Optimized droplet-based microfluidics scheme for sol-gel reactions // *Lab on a Chip*. 2010. Vol. 10, no. 13. P. 1700–1705. doi: 10.1039/b926976b.
7. Bremond N., Thiam A.R., Bibette J. Decompressing emulsion droplets favors coalescence // *Physical review letters*. 2008. Vol. 100, no. 2. P. 024501. doi: 10.1103/PhysRevLett.100.024501.
8. 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. Vol. 6, no. 2. P. 174–178. doi: 10.1039/b513908b.
9. Niu X. et al. Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits // *Lab on a Chip*. 2008. Vol. 8, no. 11. P. 1837–1841. doi: 10.1039/b813325e.
10. Chabert M., Dorfman K.D., Viovy J.L. Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels // *Electrophoresis*. 2005. Vol. 26, no. 19. P. 3706–3715. doi: 10.1002/elps.200500109.
11. Link D.R. et al. Electric control of droplets in microfluidic devices // *Angewandte Chemie International Edition*. 2006. Vol. 45, no. 16. P. 2556–2560. doi: 10.1002/anie.200503540.
12. Niu X. et al. Electro-coalescence of digitally controlled droplets // *Analytical chemistry*. 2009. Vol. 81, no. 17. P. 7321–7325. doi: 10.1021/ac901188n.
13. Zagnoni M., Baroud C.N., Cooper J.M. Electrically initiated upstream coalescence cascade of droplets in a microfluidic flow // *Physical Review E*. 2009. Vol. 80, no. 4. P. 046303. doi: 10.1103/PhysRevE.80.046303.
14. Schwartz J.A., Vykoukal J.V., Gascoyne P.R.C. Droplet-based chemistry on a programmable micro-chip // *Lab on a Chip*. 2004. Vol. 4, no. 1. P. 11–17. doi: 10.1039/b310285h.
15. Singh P., Aubry N. Transport and deformation of droplets in a microdevice using dielectrophoresis // *Electrophoresis*. 2007. Vol. 28, no. 4. P. 644–657. doi: 10.1002/elps.200600549.
16. 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. Vol. 9, no. 11. P. 1504–1506. doi: 10.1039/b903468d.
17. 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. Vol. 7, no. 8. P. 1029–1033. doi: 10.1039/b702472j.
18. Lorenz R.M. et al. Vortex-trap-induced fusion of femtoliter-volume aqueous droplets // *Analytical chemistry*. 2007. Vol. 79, no. 1. P. 224–228. doi: 10.1021/ac061586w.
19. 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. Vol. 18, no. 11. P. 115005. doi: 10.1088/0960-1317/18/11/115005.

20. Fischer A.E. et al. A high-throughput drop microfluidic system for virus culture and analysis // *Journal of virological methods*. 2015. Vol. 213. P. 111–117. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.12.003.
21. 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. Vol. 4. P. 402–413. doi: 10.3390/mi4040402.
22. Bauer W.A.C. et al. Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions // *Lab on a Chip*. 2010. Vol. 10, no. 14. P. 1814–1819. doi: 10.1039/c004046k.
23. Mazutis L. et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics // *Nature protocols*. 2013. Vol. 8, no. 5. P. 870–891. doi: 10.1038/nprot.2013.046.
24. Barbier V. et al. Stable modification of PDMS surface properties by plasma polymerization: application to the formation of double emulsions in microfluidic systems // *Langmuir*. 2006. Vol. 22, no. 12. P. 5230–5232. doi: 10.1021/la053289c.
25. Liao C.Y., Su Y.C. Formation of biodegradable microcapsules utilizing 3D, selectively surface-modified PDMS microfluidic devices // *Biomedical microdevices*. 2010. Vol. 12, no. 1. P. 125–133. doi: 10.1007/s10544-009-9367-8.
26. Shah R.K. et al. Designer emulsions using microfluidics // *Materials Today*. 2008. Vol. 11, no. 4. P. 18–27. doi: 10.1016/S1369-7021(08)70053-1.
27. Seo M. et al. Microfluidic consecutive flow-focusing droplet generators // *Soft Matter*. 2007. Vol. 3, no. 8. P. 986–992. doi: 10.1039/b700687j.
28. Romanowsky M.B. et al. Functional patterning of PDMS microfluidic devices using integrated chemo-masks // *Lab on a Chip*. 2010. Vol. 10, no. 12. P. 1521–1524. doi: 10.1039/c004050a.
29. Demming S. et al. Characterization of long-term stability of hydrophilized PEG-grafted PDMS within different media for biotechnological and pharmaceutical applications // *Physica status solidi (a)*. 2011. Vol. 208, no. 6. P. 1301–1307. doi: 10.1002/pssa.201000967.
30. Zdyrko B., Klep V., Luzinov I. Universal platform for modification employing grafted polymer layers // *Material Matters*. 2008. Vol. 3, no. 2. P. 44–46.
31. 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. Vol. 20, no. 4. P. 422–428. doi: 10.1007/s13233-012-0048-8.
32. Abate A.R., Weitz D.A. High-order multiple emulsions formed in poly (dimethylsiloxane) microfluidics // *Small*. 2009. Vol. 5, no. 18. P. 2030–2032. doi: 10.1002/smll.200900569.
33. Kim B.Y. et al. Solvent-resistant PDMS microfluidic devices with hybrid inorganic/organic polymer coatings // *Advanced Functional Materials*. 2009. Vol. 19, no. 23. P. 3796–3803. doi: 10.1002/adfm.200901024.
34. Abate A.R. et al. Patterning microfluidic device wettability using flow confinement // *Lab on a Chip*. 2010. Vol. 10, no. 14. P. 1774–1776. doi: 10.1039/c004124f.
35. Abate A.R. et al. Photoreactive coating for high-contrast spatial patterning of microfluidic device wettability // *Lab on a Chip*. 2008. Vol. 8, no. 12. P. 2157–2160. doi: 10.1039/b813405g.
36. Bibette J. et al. Stability criteria for emulsions // *Physical Review Letters*. 1992. Vol. 69, no. 16. P. 2439–2442. doi: 10.1103/PhysRevLett.69.2439.
37. Amarouchene Y., Cristobal G., Kellay H. Noncoalescing drops // *Physical Review Letters*. 2001. Vol. 87, no. 20. P. 206104. doi: 10.1103/PhysRevLett.87.206104.
38. Schramm L.L. *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005. 463 p. doi: 10.1002/3527606750.
39. Landfester K. Recent developments in miniemulsions — formation and stability mechanisms // *Macromolecular Symposia*. 2000. Vol. 150, no. 1. P. 171–178. doi: 10.1002/1521-3900(200002)150:1<171::AID-MASY171>3.0.CO;2-D.
40. Goodwin G.W. *Colloids and interfaces with surfactants and polymers. An Introduction*. John Wiley & Sons Ltd., 2004. 289 p. doi: 10.1002/0470093919.
41. Griffin W.C. Hydrophilic-lipophilic balance // *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1949. Vol. 1. P. 311–326.
42. Baret J.C. Surfactants in droplet-based microfluidics // *Lab on a Chip*. 2012. Vol. 12, no. 3. P. 422–433. doi: 10.1039/C1LC20582J.
43. Zhang R., Somasundaran P. Advances in adsorption of surfactants and their mixtures at solid/solution interfaces // *Advances in colloid and interface science*. 2006. Vol. 123. P. 213–229. doi: 10.1016/j.cis.2006.07.004.
44. Joensson H.N., Andersson Svahn H. Droplet microfluidics — a tool for single-cell analysis // *Angewandte Chemie International Edition*. 2012. Vol. 51, no. 49. P. 12176–12192. doi: 10.1002/anie.201200460.
45. Link D.R. et al. Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices // *Physical Review Letters*. 2004. Vol. 92, no. 5. P. 054503. doi: 10.1103/PhysRevLett.92.054503.
46. Schaerli Y. et al. Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets // *Analytical chemistry*. 2008. Vol. 81, no. 1. P. 302–306. doi: 10.1021/ac802038c.
47. Courtois F. et al. An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in picolitre droplets // *ChemBioChem*. 2008. Vol. 9, no. 3. P. 439–446. doi: 10.1002/cbic.200700536.
48. Hatch A.C. et al. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR // *Lab on a Chip*. 2011. Vol. 11, no. 22. P. 3838–3845. doi: 10.1039/c1lc20561g.
49. Huebner A.M. et al. Monitoring a reaction at submillisecond resolution in picoliter volumes // *Analytical chemistry*. 2011. Vol. 83, no. 4. P. 1462–1468. doi: 10.1021/ac103234a.
50. Bremond N., Doméjean H., Bibette J. Propagation of drop coalescence in a two-dimensional emulsion: A route towards phase inversion // *Physical review letters*. 2011. Vol. 106, no. 21. P. 214502.

- doi: 10.1103/PhysRevLett.106.214502.
51. *Saint-Jaimes A., Zemb T., Langevin D.* Trends in Colloid and Interface Science XV. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. 299 p.
 52. URL: (<http://www.surfachem.com/abil-em180>).
 53. *Song H., Tice J.D., Ismagilov R.F.* A microfluidic system for controlling reaction networks in time // *Angewandte Chemie*. 2003. Vol. 115, no. 7. P. 792–796. doi: 10.1002/ange.200390172.
 54. *Niu X., de Mello A.J.* Building droplet-based microfluidic systems for biological analysis // *Biochemical Society Transactions*. 2012. Vol. 40, no. 4. P. 615–623. doi: 10.1042/BST20120005.
 55. *Basova E.Y., Foret F.* Droplet microfluidics in (bio) chemical analysis // *Analyst*. 2014. Vol. 140, no. 1. P. 22–38. doi: 10.1039/C4AN01209G.
 56. *Zheng B., Roach L.S., Ismagilov R.F.* Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets // *Journal of the American Chemical Society*. 2003. Vol. 125, no. 37. P. 11170–11171. doi: 10.1021/ja037166v.
 57. URL: (<http://www.ranbiotechnologies.com/>).
 58. *Chen C.H. et al.* Enhancing protease activity assay in droplet-based microfluidics using a biomolecule concentrator // *Journal of the American Chemical Society*. 2011. Vol. 133, no. 27. P. 10368–10371. doi: 10.1021/ja2036628.
 59. *Courtois F. et al.* Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays // *Analytical chemistry*. 2009. Vol. 81, no. 8. P. 3008–3016. doi: 10.1021/ac802658n.
 60. *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. Vol. 83, no. 8. P. 2852–2857. doi: 10.1021/ac200373n.
 61. *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. Vol. 77, no. 3. P. 785–796. doi: 10.1021/ac049061w.
 62. *Holtze C. et al.* Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions // *Lab on a Chip*. 2008. Vol. 8, no. 10. P. 1632–1639. doi: 10.1039/b806706f.
 63. *Derkach S.R.* Rheology of emulsions // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009. Vol. 151, no. 1. P. 1–23. doi: 10.1016/j.cis.2009.07.001.
 64. *Brouzes E. et al.* Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, no. 34. P. 14195–14200. doi: 10.1073/pnas.0903542106.
- Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург** (Кухтевич И.В., Посмитная Я.С., Букатин А.С., Евстапов А.А.)
- Университет ИТМО, Санкт-Петербург** (Кухтевич И.В., Посмитная Я.С., Белоусов К.И., Евстапов А.А.)
- Академический университет — НОЦ нанотехнологий РАН, Санкт-Петербург** (Букатин А.С., Евстапов А.А.)
- Сибирский федеральный университет, г. Красноярск** (Кухтевич И.В., Белоусов К.И., Букатин А.С.)
- Контакты: *Евстапов Анатолий Александрович*, an_evst@mail.ru
- Материал поступил в редакцию: 15.06.2015

PRINCIPLES, TECHNOLOGIES AND DROPLET-BASED MICROFLUIDIC DEVICES. PART 2 (REVIEW)

I. V. Kukhtevich^{1,2,4}, Y. S. Posmitnaya^{1,2}, K. I. Belousov^{2,4}, A. S. Bukatin^{1,3,4}, A. A. Evstrapov^{1,2,3}

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia*

²*ITMO University, Saint-Petersburg, Russia*

³*St. Petersburg Academic University — Nanotechnology Research and Education Center RAS, Russia*

⁴*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia*

The active and passive methods and the devices for coalescence of the droplets are considered in the second part of the review. Particular attention is paid to the methods of processing and surface modification of polydimethylsiloxane (the most frequently used material in microfluidics) in order to create the conditions for the stable droplet generation. Depending on the type of the emulsion (water drops in oil transport flow or vice versa) the surface should be hydrophilic or hydrophobic. The surface with the different wetting properties on the various local sections is required at generation of double emulsions. A single part describes the methods of stabilizing the emulsions. Usually the surfactants used for the droplets stabilizing. The surfactant reduces the surface tension between the two fluids through the formation of the oriented film at their interface. However, the choice of an appropriate surfactant should be carefully carried out, since these substances can affect on the components of sample and biomolecules.

Keywords: microfluidic chip, droplet microfluidics, dimensionless numbers of fluid mechanics, droplet generator, droplet coalescence

REFERENCES

1. Riegler H., Lazar P. Delayed coalescence behavior of droplets with completely miscible liquids. *Langmuir*, 2008, vol. 24, no. 13, pp. 6395–6398. doi: 10.1021/la800630w.
2. 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, vol. 4, no. 4, pp. 292–298. doi: 10.1039/b403280m.
3. Eggers J., Lister J.R., Stone H.A. Coalescence of liquid drops. *Journal of Fluid Mechanics*, 1999, vol. 401, pp. 293–310. doi: 10.1017/S002211209900662X.
4. Wilhelm T.S. et al. Surface-induced droplet fusion in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2007, vol. 7, no. 8, pp. 984–986. doi: 10.1039/b708091c.
5. Köhler J.M. et al. Digital reaction technology by micro segmented flow — components, concepts and applications. *Chemical Engineering Journal*, 2004, vol. 101, no. 1, pp. 201–216. doi: 10.1016/j.cej.2003.11.025.
6. Chokkalingam V. et al. Optimized droplet-based microfluidics scheme for sol-gel reactions. *Lab on a Chip*, 2010, vol. 10, no. 13, pp. 1700–1705. doi: 10.1039/b926976b.
7. Bremond N., Thiam A.R., Bibette J. Decompressing emulsion droplets favors coalescence. *Physical review letters*, 2008, vol. 100, no. 2, pp. 024501. doi: 10.1103/PhysRevLett.100.024501.
8. 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, vol. 6, no. 2, pp. 174–178. doi: 10.1039/b513908b.
9. Niu X. et al. Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits. *Lab on a chip*, 2008, vol. 8, no. 11, pp. 1837–1841. doi: 10.1039/b813325e.
10. Chabert M., Dorfman K.D., Viovy J.L. Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels. *Electrophoresis*, 2005, vol. 26, no. 19, pp. 3706–3715. doi: 10.1002/elps.200500109.
11. Link D.R. et al. Electric control of droplets in microfluidic devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, vol. 45, no. 16, pp. 2556–2560. doi: 10.1002/anie.200503540.
12. Niu X. et al. Electro-coalescence of digitally controlled droplets. *Analytical chemistry*, 2009, vol. 81, no. 17, pp. 7321–7325. doi: 10.1021/ac901188n.
13. Zagnoni M., Baroud C.N., Cooper J.M. Electrically initiated upstream coalescence cascade of droplets in a microfluidic flow. *Physical Review E*, 2009, vol. 80, no. 4, pp. 046303. doi: 10.1103/PhysRevE.80.046303.
14. Schwartz J.A., Vykoukal J.V., Gascoyne P.R.C. Droplet-based chemistry on a programmable micro-chip. *Lab on a Chip*, 2004, vol. 4, no. 1, pp. 11–17. doi: 10.1039/b310285h.
15. Singh P., Aubry N. Transport and deformation of droplets in a microdevice using dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 2007, vol. 28, no. 4, pp. 644–657. doi: 10.1002/elps.200600549.
16. 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, vol. 9, no. 11, pp. 1504–1506. doi: 10.1039/b903468d.

17. 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, vol. 7, no. 8, pp. 1029–1033. doi: 10.1039/b702472j.
18. Lorenz R.M. et al. Vortex-trap-induced fusion of femtoliter-volume aqueous droplets. *Analytical chemistry*, 2007, vol. 79, no. 1, pp. 224–228. doi: 10.1021/ac061586w.
19. 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, vol. 18, no. 11, pp. 115005. doi: 10.1088/0960-1317/18/11/115005.
20. Fischer A.E. et al. A high-throughput drop microfluidic system for virus culture and analysis. *Journal of virological methods*, 2015, vol. 213, pp. 111–117. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.12.003.
21. 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, vol. 4, pp. 402–413. doi: 10.3390/mi4040402.
22. Bauer W.A.C. et al. Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions. *Lab on a Chip*, 2010, vol. 10, no. 14, pp. 1814–1819. doi: 10.1039/c004046k.
23. Mazutis L. et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature protocols*, 2013, vol. 8, no. 5, pp. 870–891. doi: 10.1038/nprot.2013.046.
24. Barbier V. et al. Stable modification of PDMS surface properties by plasma polymerization: application to the formation of double emulsions in microfluidic systems. *Langmuir*, 2006, vol. 22, no. 12, pp. 5230–5232. doi: 10.1021/la053289c.
25. Liao C.Y., Su Y.C. Formation of biodegradable microcapsules utilizing 3D, selectively surface-modified PDMS microfluidic devices. *Biomedical microdevices*, 2010, vol. 12, no. 1, pp. 125–133. doi: 10.1007/s10544-009-9367-8.
26. Shah R.K. et al. Designer emulsions using microfluidics. *Materials Today*, 2008, vol. 11, no. 4, pp. 18–27. doi: 10.1016/S1369-7021(08)70053-1.
27. Seo M. et al. Microfluidic consecutive flow-focusing droplet generators. *Soft Matter*, 2007, vol. 3, no. 8, pp. 986–992. doi: 10.1039/b700687j.
28. Romanowsky M.B. et al. Functional patterning of PDMS microfluidic devices using integrated chemo-masks. *Lab on a Chip*, 2010, vol. 10, no. 12, pp. 1521–1524. doi: 10.1039/c004050a.
29. Demming S. et al. Characterization of long-term stability of hydrophilized PEG-grafted PDMS within different media for biotechnological and pharmaceutical applications. *Physica status solidi (a)*, 2011, vol. 208, no. 6, pp. 1301–1307. doi: 10.1002/pssa.201000967.
30. Zdyrko B., Klep V., Luzinov I. Universal platform for modification employing grafted polymer layers. *Material Matters*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 44–46.
31. 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, vol. 20, no. 4, pp. 422–428. doi: 10.1007/s13233-012-0048-8.
32. Abate A.R., Weitz D.A. High-order multiple emulsions formed in poly (dimethylsiloxane) microfluidics // *Small*. 2009. Vol. 5, no. 18. P. 2030–2032. doi: 10.1002/sml.200900569.
33. Kim B.Y. et al. Solvent-resistant PDMS microfluidic devices with hybrid inorganic/organic polymer coatings. *Advanced Functional Materials*, 2009, vol. 19, no. 23, pp. 3796–3803. doi: 10.1002/adfm.200901024.
34. Abate A.R. et al. Patterning microfluidic device wettability using flow confinement. *Lab on a Chip*, 2010, vol. 10, no. 14, pp. 1774–1776. doi: 10.1039/c004124f.
35. Abate A.R. et al. Photoreactive coating for high-contrast spatial patterning of microfluidic device wettability. *Lab on a Chip*, 2008, vol. 8, no. 12, pp. 2157–2160. doi: 10.1039/b813405g.
36. Bibette J. et al. Stability criteria for emulsions. *Physical Review Letters*, 1992, vol. 69, no. 16, pp. 2439–2442. doi: 10.1103/PhysRevLett.69.2439.
37. Amarouchene Y., Cristobal G., Kellay H. Noncoalescing drops. *Physical Review Letters*, 2001, vol. 87, no. 20, pp. 206104. doi: 10.1103/PhysRevLett.87.206104.
38. Schramm L.L. *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005. 463 p. doi: 10.1002/3527606750.
39. Landfester K. Recent developments in miniemulsions — formation and stability mechanisms. *Macromolecular Symposia*, 2000, vol. 150, no. 1, pp. 171–178. doi: 10.1002/1521-3900(200002)150:1<171::AID-MASY171>3.0.CO;2-D.
40. Goodwin G.W. *Colloids and interfaces with surfactants and polymers. An Introduction*. John Wiley & Sons Ltd., 2004. 289 p. doi: 10.1002/0470093919.
41. Griffin W.C. Hydrophilic-lipophilic balance. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1949, vol. 1, pp. 311–326.
42. Baret J.C. Surfactants in droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 422–433. doi: 10.1039/C1LC20582J.
43. Zhang R., Somasundaran P. Advances in adsorption of surfactants and their mixtures at solid/solution interfaces. *Advances in colloid and interface science*, 2006, vol. 123, pp. 213–229. doi: 10.1016/j.cis.2006.07.004.
44. Joensson H.N., Andersson Svahn H. Droplet microfluidics — a tool for single-cell analysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, vol. 51, no. 49, pp. 12176–12192. doi: 10.1002/anie.201200460.
45. Link D.R. et al. Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Physical Review Letters*, 2004, vol. 92, no. 5, pp. 054503. doi: 10.1103/PhysRevLett.92.054503.
46. Schaerli Y. et al. Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets. *Analytical chemistry*, 2008, vol. 81, no. 1, pp. 302–306. doi: 10.1021/ac802038c.
47. Courtois F. et al. An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in

- picolitre droplets. *ChemBioChem.*, 2008, vol. 9, no. 3, pp. 439–446. doi: 10.1002/cbic.200700536.
48. Hatch A.C. et al. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab on a Chip*, 2011, vol. 11, no. 22, pp. 3838–3845. doi: 10.1039/c1lc20561g.
 49. Huebner A.M. et al. Monitoring a reaction at submillisecond resolution in picoliter volumes. *Analytical chemistry*, 2011, vol. 83, no. 4, pp. 1462–1468. doi: 10.1021/ac103234a.
 50. Bremond N., Doméjean H., Bibette J. Propagation of drop coalescence in a two-dimensional emulsion: A route towards phase inversion. *Physical review letters*, 2011, vol. 106, no. 21, pp. 214502. doi: 10.1103/PhysRevLett.106.214502.
 51. Saint-Jaimes A., Zemb T., Langevin D. *Trends in Colloid and Interface Science XV*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. 299 p.
 52. URL: (<http://www.surfachem.com/abil-em180>).
 53. Song H., Tice J.D., Ismagilov R.F. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie*, 2003, vol. 115, no. 7, pp. 792–796. doi: 10.1002/ange.200390172.
 54. Niu X., de Mello A.J. Building droplet-based microfluidic systems for biological analysis. *Biochemical Society Transactions*, 2012, vol. 40, no. 4, pp. 615–623. doi: 10.1042/BST20120005.
 55. Basova E.Y., Foret F. Droplet microfluidics in (bio) chemical analysis. *Analyst*, 2014, vol. 140, no. 1, pp. 22–38. doi: 10.1039/C4AN01209G.
 56. Zheng B., Roach L.S., Ismagilov R.F. Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, vol. 125, no. 3, pp. 11170–11171. doi: 10.1021/ja037166v.
 57. URL: (<http://www.ranbiotechnologies.com/>).
 58. Chen C.H. et al. Enhancing protease activity assay in droplet-based microfluidics using a biomolecule concentrator. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol. 133, no. 27, P. 10368–10371. doi: 10.1021/ja2036628.
 59. Courtois F. et al. Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays. *Analytical chemistry*, 2009, vol. 81, no. 8, pp. 3008–3016. doi: 10.1021/ac802658n.
 60. 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, vol. 83, no. 8, pp. 2852–2857. doi: 10.1021/ac200373n.
 61. Roach L.S., Song H., Ismagilov R.F. Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorophilic surfactants. *Analytical chemistry*, 2005, vol. 77, no. 3, pp. 785–796. doi: 10.1021/ac049061w.
 62. Holtze C. et al. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*, 2008, vol. 8, no. 10, pp. 1632–1639. doi: 10.1039/b806706f.
 63. Derkach S.R. Rheology of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009, vol. 151, no. 1, pp. 1–23. doi: 10.1016/j.cis.2009.07.001.
 64. Brouzes E. et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol. 106, no. 34, pp. 14195–14200. doi: 10.1073/pnas.0903542106.

Contacts: *Evstrapov Anatoliy Aleksandrovich*,
 an_evs@mail.ru

Article received in edition: 15.06.2015