



การแยกน้ำเลือดโดยช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ
Blood Plasma Isolation Using Microfluidic Channels
Fabricated by Low-cost Technique

ชีวารักษ์ รอดเนียม
Cheewarak Rodniam

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Biomedical Engineering
Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกน้ำเลือดโดยช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ
ผู้เขียน นายชีวารักษ์ รอดเนียม
สาขาวิชา วิศวกรรมชีวการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.สมยศ จิรสถิตสิน)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิน)

.....กรรมการ
(ดร.สมยศ จิรสถิตสิน)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ ชาติพันธุ์)

.....กรรมการ
(ดร.หาญศึก บุญเชิด)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ดร.สมยศ จิรสถิตสิน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นายชีวารักษ์ รอดเนียม)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นายชีวารักษ์ รอดเนียม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกน้ำเลือดโดยช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ
ผู้เขียน	นายชีวารักษ์ รอดเนียม
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวการแพทย์
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

น้ำเลือดมีความสำคัญต่อการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกเพราะมีความเข้มข้นของสารชีวเคมีสูงซึ่งใช้ป้องกันการเกิดโรคได้ การคัดแยกน้ำเลือดจากเลือดครบส่วนด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงเป็นวิธีมาตรฐานแต่ใช้เวลานานและปริมาณมาก ปัจจุบันมีอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ขนาดเล็กซึ่งอาศัยระบบไมโครฟลูอิดิกทำให้ทำงานได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น อย่างไรก็ตามการสร้างชิ้นงานต้นแบบมีต้นทุนสูงและซับซ้อน การศึกษาวิจัยนี้จึงเลือกประยุกต์ใช้งานเทคนิคการสร้างที่มีต้นทุนต่ำและทำได้ง่ายด้วยการใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์หรือเรียกกันว่าเทคนิคซูโรกราฟเพื่อสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับใช้คัดแยกน้ำเลือดแบบอกัมมันต์จากชั้นปราศจากเซลล์ รูปแบบช่องไมโครฟลูอิดิกที่ได้ออกแบบถูกตัดลงบนแผ่นพลาสติกใสก่อนจะถูกเคลือบด้วยเครื่องรีดร้อนเพื่อให้พร้อมใช้งาน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้สามารถสร้างช่องขนาดเล็กถึง 100 ไมโครเมตรได้ด้วยวิธีการตัดได้คัท แบบสุดท้ายของช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดเป็นช่องชนิดบิวทัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่เรียงต่ออนุกรมกัน 3 ลำดับเพื่อขยายชั้นปราศจากเซลล์ให้มีขนาดใหญ่เพียงพอต่อการคัดแยกน้ำเลือด ผลการคัดแยกน้ำเลือดด้วยชิปต้นแบบพบว่ามีอัตราการคัดแยกน้ำเลือดประมาณร้อยละ 1.7 ของตัวอย่างเลือดที่เข้าสู่ระบบ แต่มีประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์สูงถึงร้อยละ 99 ของจำนวนเซลล์ที่เข้าสู่ระบบ แม้ว่าชิปต้นแบบจะมีประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์สูงแต่ยังได้ปริมาณน้ำเลือดน้อย ดังนั้นการวิจัยต่อไปจึงควรพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกให้มีอัตราการคัดแยกสูงขึ้น เช่น การปรับปรุงขนาดของช่องบิวทัว-ขยายตัวให้มีขนาดเล็กลงเพื่อขยายชั้นปราศจากเซลล์ให้ใหญ่ขึ้นและสามารถคัดแยกได้มากขึ้น เป็นต้น โดยสรุปแล้วการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบสำหรับใช้คัดแยกน้ำเลือดแบบอกัมมันต์ซึ่งสร้างด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ

คำสำคัญ : ระบบไมโครฟลูอิดิก, ซูโรกราฟ, เครื่องตัดพล็อตเตอร์, ต้นทุนต่ำ, คัดแยกน้ำเลือด

Thesis Title	Blood Plasma Isolation Using Microfluidic Channels Fabricated by Low-cost Technique
Author	Mr. Cheewarak Rodniam
Major Program	Biomedical Engineering
Academic Year	2015

ABSTRACT

Blood plasma is important for clinical chemistry, because plasma includes high concentration of biochemical molecules that indicated the pathology of diseases. The standard blood plasma separation from whole blood by centrifugation is time-consuming and large-volume required. Nowadays, many analytical devices based on microfluidic system (MFs) have been performed quickly and simply. However, the fabrication processes of the MFs prototype are still expensive and complicated. This study applied a low-cost and rapid fabrication technique using a cutting plotter known as "Xurography" to address the prototyping of MFs for passive blood plasma separation from cell-free layers (CFL). Microfluidic channel patterns were carved into clear and transparent plastic films before bonded by a laminating machine. The results revealed that the microchannels were able to be carved down to 100 μm with the die-cut technique. The final design of the 3-step asymmetric contraction-expansion channels was employed to enhance the cell-free layer thicknesses that are appropriate sizes for the separation process. The plasma yield was about 1.7% with 99% cell separation efficiency. Although the separation efficiently was very high, the yield was still low. Therefore the new design of the MFs should be improved system yield for example the contraction-expansion channel should be reduced to make more CFL enhancement and higher plasma yield. To summary, the low-cost MFs was successfully developed for passive blood plasma separation.

Keywords: microfluidics, Xurography, cutting plotter, low-cost, plasma separation

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีอาจสำเร็จลุล่วงได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และความร่วมมือจากผู้ร่วมงานด้านต่างๆ โอกาสนี้จึงใคร่ขอแสดงความขอบคุณเป็นอย่างสูงไปยังผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ยินดีเสียสละเวลาและให้ความร่วมมือในการทำงานตลอดมา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.สมยศ จิรสถิตสิน ผู้จุดประกายแนวคิดการทำวิจัยและคอยให้คำปรึกษาพร้อมแนะนำข้อมูลต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลงกรณ์ พิมพ์พิน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ยินดีเสียสละเวลามาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ตลอดจนการชี้แนะและการให้คำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ชาติพันธุ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ตรวจทานวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ในการทำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเลือด การใช้เครื่องมือทดสอบต่างๆ ตลอดจนการชี้แนะและการให้คำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ดร.หาญศึก บุญเชิด กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ตรวจทานวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบทางเคมีคลินิก ตลอดจนการชี้แนะและการให้คำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณ คุณประภาภรณ์ จิตต์ภักดี และบุคลากรในหน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ความรู้ด้านกระบวนการต่างๆ ทางห้องปฏิบัติการ และความช่วยเหลือด้านตัวอย่างเลือด ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรากร ลิมบุตร อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ความรู้และความช่วยเหลือ

ด้านการพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกและอุปกรณ์ยึดจับชิ้นงานสำหรับการทำวิจัย ตลอดจนคำแนะนำ
ต่างๆ ในการทำงานวิจัยเกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิก

ขอขอบพระคุณ เพื่อนนักศึกษาทุกท่าน ทั้งรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเจ้าหน้าที่ประจำ
สถาบันวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ความร่วมมือและ
ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย การติดต่อประสานงาน ตลอดจนการให้คำแนะนำต่างๆ ในการ
ทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้การสนับสนุนด้านการ
เรียน ทั้งทางด้านทุนทรัพย์ การให้กำลังใจ การให้คำชี้แนะ จนประสบความสำเร็จในวันนี้

ชีวารักษ์ รอดเนียม

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
สารบัญ.....	(9)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 การทบทวนวรรณกรรม.....	4
1.4 ขอบเขตการวิจัย	12
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	13
1.6 สรุป	13
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	14
2.1 การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิคด้วยเครื่องตัดพลาสติกเตอร์	14
2.2 ทฤษฎีและปรากฏการณ์การไหลระดับจุลภาคที่ใช้สำหรับการคัดแยกน้ำเลือด	16
2.3 สรุป	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 การวางแผนการทดลอง	26
3.2 การสร้างชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิคต้นแบบ	31
3.3 การบันทึกภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวเพื่อใช้ในการตรวจสอบ	36
3.4 การตรวจวัดและการตรวจสอบข้อมูล.....	39
3.5 สรุป	45

เนื้อหา	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดสอบและการอภิปรายผล	46
4.1 ผลการทดสอบความสามารถและข้อจำกัดในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิก แบบต่างๆ ด้วยเครื่องตัดพลาสมา	46
4.2 ผลการศึกษาวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์	61
4.3 ความสามารถและคุณภาพของวิธีการคั่นแยกน้ำเลือดด้วยช่องไมโครฟลูอิดิก	69
4.4 สรุป	75
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	77
5.1 ผลสรุปการวิจัย	77
5.2 ข้อเสนอแนะ	81
บรรณานุกรม.....	84
ภาคผนวก.....	90
ภาคผนวก ก รายละเอียดข้อมูลความสามารถของเครื่องตัดพลาสมาจากผู้ผลิต.....	91
ภาคผนวก ข ข้อมูลการคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิก	96
ภาคผนวก ค ข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบปริมาตรน้ำเลือดต่อหน้าหน้า	100
ภาคผนวก ง รายละเอียดการปรับแก้ชุดคำสั่ง Analyze Stripes สำหรับซอฟต์แวร์ ImageJ ...	103
ภาคผนวก จ ข้อมูลการเผยแพร่วิทยานิพนธ์.....	108
ประวัติผู้เขียน.....	113

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1-1 ข้อเด่นข้อด้อยของระบบไมโครฟลูอิดิกส์สำหรับคัดแยกน้ำเลือดด้วยวิธีการต่างๆ	7
1-2 รายการตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของชิ้นปราคาจากเซลล์ [42]	9
3-1 จำนวนพิกเซลต่อระยะทางของภาพจากกล้อง Nikon D90	38
3-2 จำนวนค่าพิกเซลต่อระยะทางของภาพจากกล้อง Canon EOS 7D Mark II	38
4-1 ตารางแสดงขนาดและค่าความต้านทานของระบบไมโครฟลูอิดิกส์สำหรับคัดแยก น้ำเลือดที่มีค่าความต้านทานระหว่างช่องคัดแยกน้ำเลือดและช่องทางออกหลัก ต่างกัน 52 เท่า	70
4-2 ผลการเก็บน้ำเลือดจากระบบไมโครฟลูอิดิกทุกๆ 2 นาที	73
4-3 ผลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนในน้ำเลือด	74
ข-1 ข้อมูลขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายใน ช่องไมโครฟลูอิดิกของ Yang และคณะ	97
ข-2 ข้อมูลขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายใน ช่องไมโครฟลูอิดิกของ Rodríguez-Villarreal และคณะ	97
ข-3 ข้อมูลขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายใน ช่องไมโครฟลูอิดิกในงานวิจัยนี้	99
ง-1 ข้อมูลการชั่งน้ำหนักของตัวอย่างน้ำเลือดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง	101

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1-1 ลักษณะของช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวสำหรับขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์.....	8
2-1 แผนภาพตามภาคตัดขวางของแผ่นวัสดุตัดในการตัดด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์.....	15
2-2 รูปแบบการตัดชนิดต่างๆ ของเครื่องตัดพล็อตเตอร์.....	15
2-3 การเคลื่อนที่มุ่งเข้าสู่ศูนย์กลางท่อจุลภาคของเซลล์จนเกิดชั้นปราศจากเซลล์เนื่องจากผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist	18
2-4 แผนภาพแสดงแรงที่กระทำต่ออนุภาคตามขอบเขตการไหลของ Poiseuille.....	19
2-5 การไหลแบบมัลติออริฟิซซึ่งขับเคลื่อนด้วยแรงเฉื่อยและแรงเฉื่อยเหนี่ยวนำจากการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมด้วยช่องบีบตัว-ขยายตัว	21
2-6 ภาพแสดงกฎการไหลแยกไปสองทาง (Bifurcation law).....	22
2-7 การพิจารณาค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิก	24
3-1 ลำดับแผนงานในการดำเนินงานวิจัย	25
3-2 แบบร่างชิ้นงานสำหรับการตัดช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดแบบฮาล์ฟคัท	27
3-3 แบบร่างชิ้นงานสำหรับการตัดช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดแบบไดคัท.....	28
3-4 แบบร่างช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตร	29
3-5 แบบร่างช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร	30
3-6 แบบร่างช่องไมโครฟลูอิดิกเพื่อใช้คัดแยกน้ำเลือด.....	31
3-7 กรรมวิธีการสร้างชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิกโดยใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์	32
3-8 วัสดุตัดและพื้นที่การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิก	33
3-9 ลักษณะใบมีดตัดและผลการตัดของใบมีดที่มีมุมตัด 30 45 และ 60 องศา พร้อมมุมมองจากด้านข้างของใบมีดแต่ละชนิด (ก. - ค.) มุมมองจากด้านหน้าของใบมีดแต่ละชนิด (ง. - ฉ.) และผลการตัดของใบมีดแต่ละชนิด (ช. - ฎ.).....	34
3-10 เครื่องเคลือบบัตร FGK-320 สำหรับการประกอบชิ้นงานด้วยการรีดความร้อน	36
3-11 การใช้กล้องดิจิทัลต่อร่วมกับกล้องจุลทรรศน์ในการเก็บบันทึกภาพ	37

ภาพประกอบ

หน้า

3-12	ลักษณะภาพตัดขวางของช่องไมโครฟลูอิดิกและการเกิดเงา ของผนังช่องในภาพถ่าย.....	40
3-13	การตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ	41
3-14	การพิจารณาชั้นปราศจากเซลล์ที่ตำแหน่งต่างๆ	42
3-15	แผนภาพลำดับการตรวจสอบขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ.....	43
3-16	การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์.....	44
4-1	กราฟข้อมูลการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ด้วยการตัดฮาล์ฟคัทตามแนวแกนนอนของเครื่องตัดพลีเอสเตอร์ Silhouette Cameo®	48
4-2	ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทลงบนพลาสติก PVC ด้วยแรงกดระดับ 9 (ก. และ ข.) และช่องจากการตัดด้วยแรงกดระดับ 24 (ค. และ ง.).....	49
4-3	ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทด้วยเครื่องตัด Silhouette Cameo® ลงบนพลาสติก PET.....	50
4-4	ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทด้วยแรงกดระดับ 33 บนพลาสติก PET	51
4-5	การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดแบบฮาล์ฟคัทตามแนวแกนต่างๆของเครื่องตัดพลีเอสเตอร์ Graphtec CE6000-60.....	52
4-6	ภาพถ่ายช่องไมโครฟลูอิดิกบนพลาสติก PET ที่สร้างด้วยแรงกดระดับ 15 ตามแนวตั้ง (ก.) และแนวนอน (ข.) พร้อมแสดงพื้นผิวด้านล่าง (ค. และ ง.)	54
4-7	ช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทด้วยแรงกดระดับ 9 ลงบนพื้นผิวพลาสติก PVC ก่อนและหลังการประกอบชิ้นงาน (ก. และ ข.) และบนพื้นผิวพลาสติก PET ก่อนและหลังการประกอบชิ้นงาน (ค. และ ง.)	55
4-8	กราฟแสดงผลความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดไดคัทโดยใช้งานเครื่องตัดพลีเอสเตอร์ Silhouette Cameo®	57
4-9	กราฟแสดงผลความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดแบบไดคัทโดยใช้งานเครื่องตัดพลีเอสเตอร์ Graphtec CE6000-60	59
4-10	ภาพถ่ายช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดตามแนวแกนตั้ง (ก. และ ข.) และแนวแกนนอน (ค. และ ง.) โดยใช้การออกแบบช่องกว้าง 400 ไมโครเมตร	60

ภาพประกอบ

หน้า

4-11	ลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงและการเกิดขึ้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณต้นน้ำเปรียบเทียบกับบริเวณปลายน้ำ.....	62
4-12	ภาพถ่ายความเร็วชัดเตอร์ต่ำ (ก. และ ข.) และเร็วชัดเตอร์สูง (ค. และ ง.) ของเลือดภายในช่องไมโครฟลูอิดิกที่อัตราการไหล 200 ไมโครลิตรต่อนาที.....	62
4-13	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลที่มีผลต่อขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ในช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรที่มีอัตราส่วน 0.10.....	63
4-14	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลที่มีผลต่อขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ในช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรที่มีอัตราส่วน 0.15.....	64
4-15	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลที่มีผลต่อขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ในช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรที่มีอัตราส่วน 0.20.....	64
4-16	ลักษณะอนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร	65
4-17	ลักษณะการเกิดขึ้นปราศจากเซลล์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่ต่อเรียงกันแบบอนุกรม 5 ลำดับ ที่อัตราการไหล 300 ไมโครลิตรต่อนาที	66
4-18	ความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่ลำดับและอัตราการไหลต่างๆ	67
4-19	ความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ B1 ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่ลำดับและอัตราการไหลต่างๆ	68
4-20	ชิปไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดที่มีค่าความต้านทานไฮดรอลิกระหว่างช่องคัดแยกน้ำเลือดและช่องทางออกหลักต่างกัน 52 เท่า	70
4-21	การทดสอบคัดแยกน้ำเลือดโดยใช้แท่นยึดจับชิ้นงานช่วยเชื่อมต่อแผ่นชิประบบไมโครฟลูอิดิกต้นแบบกับท่อส่งตัวอย่างเลือด	72
4-22	น้ำเลือดที่ได้จากวิธีการปั่นเหวี่ยง (ก.) และระบบไมโครฟลูอิดิกที่เวลาต่างๆ (ข.).....	72
4-23	การปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดจากการแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกและภาพขยายของพื้นที่สำหรับการตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้ง 5 บริเวณ	74

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ผลตัวอย่างเลือดเป็นข้อมูลสำคัญที่นิยมใช้ประกอบการวินิจฉัยทางการแพทย์ เนื่องด้วยเลือดประกอบไปด้วยสารชีวเคมีและสารปนเปื้อนหลากหลายชนิดที่สามารถบ่งชี้ถึงลักษณะพยาธิวิทยาของโรค ส่วนประกอบของตัวอย่างเลือดแบ่งออกเป็น 3 ส่วนที่มีความสำคัญ คือ น้ำเลือด (Plasma) ส่วนผสมของเกล็ดเลือดกับเซลล์เม็ดเลือดขาว (Buffy coat) และเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red Blood Cells : RBCs) ส่วนประกอบทั้งสามมักถูกคัดแยกออกจากกันก่อนเข้ากระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ น้ำเลือดจัดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญต่อการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากเป็นแหล่งที่มีระดับความเข้มข้นสูงของสารชีวเคมีและสารปนเปื้อน ตัวอย่างสารชีวเคมีในน้ำเลือดที่นิยมใช้เป็นตัวชี้วัด ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของโปรตีนรวม (Total Protein) และโปรตีนอัลบูมิน (Albumin) ซึ่งใช้ประเมินภาวะทางโภชนาการและการทำงานของตับ ระดับความเข้มข้นของโปรตีนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ซึ่งใช้ประเมินภาวะแข็งตัวของเลือด ระดับความเข้มข้นของโปรตีนโกลบูลิน (Globulin) ซึ่งใช้ประเมินภาวะภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีกลุ่มไขมันชนิดต่างๆ เช่น คอเลสเตอรอล (Cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) และไลโปโปรตีน (Lipoprotein) ซึ่งเป็นกลุ่มไขมันที่นิยมใช้ประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติของน้ำเลือดดังกล่าวมาข้างต้นทำให้การวินิจฉัยทางการแพทย์กว่า 90% เลือกใช้ผลการตรวจวิเคราะห์น้ำเลือดเป็นข้อมูลประกอบการวินิจฉัย [1]

ระบบการตรวจวิเคราะห์สารปริมาณน้อยที่ให้ผลการทดสอบได้รวดเร็วมีความเที่ยงตรงและใช้งานได้ ณ จุดบริบาล (Point-of-care diagnostics) เริ่มมีความต้องการมากขึ้นตามจำนวนประชากรทั่วโลกที่เพิ่มขึ้น [2] จากข้อมูลสถิติอัตราประชากรของไทยมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรผู้สูงอายุ [3] ปัจจุบันกลุ่มประชากรวัยทำงานและประชากรผู้สูงอายุเริ่มใส่ใจเรื่องการดูแลสุขภาพด้วยวิธีการต่างๆ มากขึ้น เช่น การออกกำลังกาย การกินอาหาร การพักผ่อน และการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดข้อมูลต่างๆ ของร่างกาย เป็นต้น ความต้องการของผู้บริโภคมีแนวโน้มมาทางการดูแลสุขภาพเฉพาะด้านมากขึ้น ดังนั้นระบบการตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ที่สามารถใช้งานได้ ณ จุดบริบาลจึงเริ่มเป็นที่ต้องการมากขึ้นเช่นเดียวกัน ตัวอย่างระบบที่เริ่มมีขายอย่างแพร่หลายได้แก่ ระบบตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด ระบบตรวจวัดอัตราการเต้นของหัวใจ และ

ระบบตรวจวัดการเดิน เป็นต้น การให้บริการทางแพทย์ในอนาคตก็มีความต้องการเครื่องมือเหล่านี้เช่นเดียวกันเพราะว่าในอนาคตข้างหน้าโรงพยาบาลต้องให้บริการแก่ประชากรจำนวนมากจนอาจไม่สามารถให้บริการแก่ประชากรได้ทั่วถึงและทันทั่วทั้งที่ ระบบการตรวจวิเคราะห์สารปริมาณน้อยที่ให้ผลการทดสอบได้รวดเร็วจะเข้ามามีบทบาทช่วยให้แพทย์มีข้อมูลประกอบการวินิจฉัยและสามารถให้การรักษาได้ทันทั่วทั้งที่

กระบวนการคัดแยกน้ำเลือดในห้องปฏิบัติการทั่วไปยังไม่เอื้ออำนวยต่อการตรวจวิเคราะห์ผลอย่างรวดเร็วเนื่องด้วยข้อจำกัดของเครื่องมือและลำดับขั้นตอนที่ซับซ้อน การตรวจวิเคราะห์ผลจึงเกิดความล่าช้าและข้อผิดพลาดได้ง่าย ด้วยเหตุนี้เองจึงมีผู้เสนอแนวคิดในการนำกระบวนการทดสอบต่างๆ ที่ต้องทำในห้องปฏิบัติการมารวมไว้บนแผ่นชิปขนาดเล็กเพียงชิ้นเดียว เรียกว่าระบบห้องปฏิบัติการบนแผ่นชิป (Lab-On-a-Chip) [4], [5] ด้วยแนวคิดนี้กระบวนการต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การสุ่มตัวอย่าง การนำส่งสาร การคัดแยกสาร การผสมสาร การทำปฏิกิริยา การตรวจวัด และการอ่านผล จะถูกนำมารวมไว้ให้พร้อมใช้งานบนแผ่นชิปขนาดเล็กเพียงชิ้นเดียว เทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาคหรือระบบไมโครฟลูอิดิก (Microfluidic system : MFs) จึงมีบทบาทและความสำคัญต่อการพัฒนาระบบห้องปฏิบัติการบนแผ่นชิป ช่องจุลภาคในแผ่นชิปไมโครฟลูอิดิกถูกนำมาใช้เพื่อการย่อยส่วนและรวบรวมกระบวนการต่างๆ ในห้องปฏิบัติการเข้าด้วยกัน [6] ระบบไมโครฟลูอิดิกมีความสามารถโดดเด่นในด้านการควบคุมและการตรวจวัดสารปริมาณน้อย ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อใช้งานในด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น การตรวจวิเคราะห์สารทางการแพทย์ [7]–[9] การตรวจวิเคราะห์สารเคมีในอุตสาหกรรมต่างๆ [10], [11] และการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม [12], [13] เป็นต้น เพื่อพัฒนาเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ที่ใช้สารปริมาณน้อยและให้ผลการทดสอบได้รวดเร็วจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาและพัฒนากระบวนการคัดแยกน้ำเลือดเพื่อทดแทนวิธีการคัดแยกเดิมที่ใช้ระยะเวลาช้านาน นอกจากนี้ระบบที่พัฒนาขึ้นจะต้องใช้งานง่าย คัดแยกได้รวดเร็ว ให้น้ำเลือดที่มีคุณภาพดี และมีปริมาณเพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์

หลายกลุ่มวิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษาและพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อการคัดแยกน้ำเลือดและการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด เทคนิคที่นิยมใช้ในการคัดแยกน้ำเลือดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้ กลุ่มแรกคือเทคนิคที่ใช้พลังงานจากภายนอกมากระตุ้นให้เกิดการคัดแยก (Active separation technique) เช่น การใช้แรงเหวี่ยง [14], [15] การใช้พลังงานไฟฟ้า [16], [17] การใช้พลังงานเสียง [18], [19] เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองเป็นเทคนิคการคัดแยกแบบไร้พลังงานกระตุ้น (Passive separation technique) โดยจะเกิดกระบวนการคัดแยกตามปรากฏการณ์ตามธรรมชาติ

เมื่อของไหลเคลื่อนที่ในช่องจุลภาค เช่น การตกตะกอนของอนุภาค [20] การใช้แรงคาปิลารี (Capillary force) [21] การใช้ตัวกรองขนาดเล็ก (Filter Membrane) [22]–[24] การใช้ผลกระทบของ Fåhræus [25] การใช้ปรากฏการณ์ของ Zweifach-Fung [26] และการแยกอนุภาคในการไหลแบบมัลติออริฟิซ (Multiorifice flow fractionation : MOFF) [27]–[29] เป็นต้น แม้ว่าการคัดแยกแบบไร้พลังงานกระตุ้นจะให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าการใช้พลังงานกระตุ้น แต่ตัวระบบจะมีความซับซ้อนน้อยกว่าช่วยให้ง่ายต่อการพัฒนาและการใช้งานจริง การคัดแยกน้ำเลือดด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกแบบไร้พลังงานกระตุ้นจึงเป็นแนวทางที่มีความน่าสนใจสามารถช่วยลดกระบวนการและความยุ่งยากในการใช้งานได้ อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีการสร้างลายวงจรด้วยแสง (Photolithography) ซึ่งเป็นวิธีการทั่วไปในการพัฒนาของไมโครฟลูอิดิกยังคงมีต้นทุนสูงและไม่สะดวกในการปรับปรุงแก้ไขการออกแบบ การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบด้วยเทคโนโลยีนี้จึงเป็นเรื่องยากและใช้ต้นทุนสูงเกินไป จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีนักวิจัยอีกหลายกลุ่มพยายามนำเสนอวิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำซึ่งใช้งานเทคโนโลยีและวัสดุอุปกรณ์ใกล้ตัวสามารถหาซื้อได้ง่าย เช่น เครื่องพิมพ์เลเซอร์ [30] เครื่องพิมพ์แว็กซ์ [23] เครื่องตัดพล็อตเตอร์ [31]–[34] และเครื่องตัดเลเซอร์พล็อตเตอร์ [35] เป็นต้น ถึงแม้ว่าเทคนิคต้นทุนต่ำที่หลายงานวิจัยได้นำเสนอจะมีความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิก แต่งานวิจัยเหล่านี้เป็นเพียงการนำเสนอเครื่องมือและวิธีการสร้างใหม่ๆ เท่านั้นยังขาดการนำเครื่องมือและวิธีการสร้างเหล่านั้นมาประยุกต์ใช้งานจริง

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการประยุกต์ใช้งานเทคโนโลยีต้นทุนต่ำในการพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อการใช้งานจริงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์ ผู้วิจัยเห็นความสำคัญของการเตรียมสิ่งส่งตรวจพื้นฐานอย่างน้ำเลือดดั่งที่กล่าวไว้ข้างต้น จึงเลือกที่จะนำเทคโนโลยีต้นทุนต่ำมาใช้พัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับใช้คัดแยกน้ำเลือด งานวิจัยนี้เริ่มจากการศึกษาความสามารถและข้อจำกัดของวิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ โดยเลือกใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์หรือเรียกว่า “เทคนิคซูโรกราฟ (Xurography)” เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความยืดหยุ่นในการออกแบบ รองรับการออกแบบด้วยซอฟต์แวร์เขียนแบบทั่วไป และสามารถสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกลงบนวัสดุที่ต้องการได้โดยตรง นอกจากนี้เทคนิคพล็อตเตอร์ตัดนั้นมีต้นทุนที่ไม่สูงมากเมื่อเทียบกับเทคนิคต้นทุนต่ำชนิดอื่นๆ จากข้อมูลความสามารถและข้อจำกัดที่ได้ศึกษาในครั้งนี้จะถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อออกแบบมิติของช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือด ข้อมูลจากงานวิจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่ามิติของช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ นั้นมีผลต่ออัตราการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ (Cell-free layer, CFL) [25], [36] การศึกษาวิธีขยายชั้นปราศจากเซลล์นั้นมีความสำคัญต่อการปรับปรุงผลการคัดแยกน้ำเลือดให้มีประสิทธิภาพและคุณภาพที่ดี คุณภาพของ

น้ำเลือดที่คัดแยกด้วยชิ้นงานต้นแบบจะถูกตรวจวัดและเปรียบเทียบกับคุณภาพของน้ำเลือดที่ได้จากกระบวนการคัดแยกด้วยวิธีปั่นแยกซึ่งใช้ในกระบวนการทางห้องปฏิบัติการทั่วไป การเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเลือดที่คัดแยกได้เลือกใช้การตรวจนับการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดเมื่อชิ้นงานต้นแบบสามารถใช้คัดแยกน้ำเลือดได้ดีก็จะส่งผลดีต่อการพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์สารอื่นๆ ที่ต้องใช้น้ำเลือดในการตรวจ เช่น การตรวจวัดระดับโปรตีนในเลือด การตรวจวัดปริมาณยาในเลือด หรือแม้แต่การตรวจวัดสารเสพติด เป็นต้น เทคนิคต้นทุนต่ำที่นำเสนอในครั้งนี้จะช่วยให้นักวิจัยมีอิสระในการออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสามารถและข้อจำกัดในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดฟลิวตเตอร์
2. ศึกษาวิธีการขยายชิ้นปราศจากเซลล์ด้วยการออกแบบช่องทางไหลจุลภาคในมิติและระยะขดเขยต่าง ๆ
3. ทดสอบประสิทธิภาพในการคัดแยกน้ำเลือดของชิ้นงานต้นแบบและยืนยันคุณภาพของน้ำเลือด

1.3 การทบทวนวรรณกรรม

1.3.1 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ต้องใช้ตัวอย่างเลือดเป็นสิ่งส่งตรวจนั้นมีหลายกลุ่มงาน เช่น การตรวจทางคลังเลือด (Blood bank) การตรวจทางโลหิตวิทยา (Hematology) การตรวจทางเคมีคลินิก (Clinical chemistry) และการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology) เป็นต้น ตัวอย่างเลือดครบส่วน (Whole blood) ซึ่งจัดเก็บจากผู้ป่วยเป็นสิ่งส่งตรวจที่ประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด สารชีวเคมี และสารปนเปื้อนอีกหลายชนิด ดังนั้นการใช้งานตัวอย่างเลือดครบส่วนโดยตรงในการตรวจวิเคราะห์อาจไม่เหมาะกับการตรวจวิเคราะห์บางประเภท การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปจึงเลือกใช้งานตัวอย่างเลือดและส่วนประกอบของตัวอย่างเลือดในรูปแบบที่แตกต่างกันไป เช่น การตรวจทางคลังเลือดนิยมใช้เลือดครบส่วนในการตรวจหมู่เลือดและการตรวจสอบความเข้ากันได้ของเลือด (Cross matching)

การตรวจทางโลหิตวิทยานิยมใช้เลือดครบส่วนในการตรวจเช่นกัน การตรวจทางเคมีคลินิกมีการใช้งานส่วนประกอบของเลือดทุกส่วนในการตรวจต่างๆ การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่งนิยมใช้เลือดแข็งตัวในการตรวจ การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดทางห้องปฏิบัติการจึงมีความหลากหลายในการเลือกใช้ส่วนประกอบของตัวอย่างเลือดเพื่อให้เหมาะสมกับวิธีการตรวจ

การตรวจทางเคมีคลินิกมีการใช้งานส่วนประกอบของเลือดในทุกๆ ส่วนขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการตรวจ ผลการตรวจทางเคมีคลินิกที่ถูกต้องและเชื่อถือได้นั้นมาจากคุณภาพของสิ่งส่งตรวจ ดังนั้นการจัดเก็บสิ่งส่งตรวจรวมทั้งการขนส่งเคลื่อนย้าย การเก็บรักษา และการเตรียมสิ่งส่งตรวจนับว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ หากสิ่งส่งตรวจมีการจัดเก็บหรือจัดเตรียมอย่างไม่ถูกต้องตั้งแต่เริ่มต้น ผลการตรวจวิเคราะห์ย่อมเกิดความผิดพลาดจนไม่สามารถใช้ประกอบการวินิจฉัยโรค กระบวนการเตรียมน้ำเลือดจึงเป็นขั้นตอนการเตรียมสิ่งส่งตรวจที่สำคัญสำหรับการตรวจวิเคราะห์เลือดทางห้องปฏิบัติการ การปั่นแยก (Centrifugation) ด้วยความเร่ง 1,500 g นาน 15 นาที [37] ยังคงเป็นวิธีการที่นิยมใช้งาน เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการคัดแยกสูงและสามารถแยกส่วนประกอบของตัวอย่างเลือดออกเป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง กลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเกล็ดเลือด และน้ำเลือด สำหรับการตรวจทางเคมีคลินิกโดยทั่วไปยอมให้มีระดับการปนเปื้อนของสารฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ในน้ำเลือดได้ประมาณ 0.2-1 กรัมต่อเดซิลิตร หรือมีค่าดัชนีการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemolysis Index : HI) น้อยกว่าร้อยละ 2 เนื่องจากน้ำเลือดที่มีการปนเปื้อนของสารฮีโมโกลบินอาจรบกวนผลการตรวจวัดจนทำให้มีความคลาดเคลื่อนได้ [38] การใช้น้ำเลือดในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกจึงมีการประเมินระดับการปนเปื้อนสารฮีโมโกลบินหรือดัชนีการแตกของเม็ดเลือดแดงก่อนการตรวจสอบเสมอ

รายการตรวจทางเคมีคลินิกสำหรับการตรวจสุขภาพประจำปีมีหลายรายการ เช่น การตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดหลังการอดอาหาร การตรวจวัดระดับไขมันในเลือด การตรวจโรคเกาต์ และการตรวจสมรรถภาพตับ [39] เป็นต้น ความต้องการใช้บริการตรวจทางเคมีคลินิกข้างต้นย่อมมีจำนวนมากขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร ในขณะที่กระบวนการตรวจวิเคราะห์ยังมีความซับซ้อนและความล่าช้าจากกระบวนการคัดแยกน้ำเลือด หากขาดการคิดค้นและพัฒนาเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วอาจส่งผลให้เกิดความล่าช้าในกระบวนการตรวจวิเคราะห์และการวินิจฉัยทางการแพทย์ในอนาคตข้างหน้าได้

1.3.2 ระบบห้องปฏิบัติการบนแผ่นชิป (Lab-On-a-Chip)

ระบบห้องปฏิบัติการบนแผ่นชิปเป็นแนวคิดที่ต้องการย่อยส่วนขั้นตอนการทำงานต่างๆ ที่จะต้องทำในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การสุ่มตัวอย่าง การนำส่งสาร การคัดแยกสาร การผสมสาร การทำปฏิกิริยา การตรวจวิเคราะห์ และการอ่านผล มารวมไว้ให้พร้อมใช้งานบนแผ่นชิปขนาดเล็ก [4], [5] แนวคิดนี้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและภาคสนามมากขึ้น เนื่องจากสามารถพัฒนาอุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารให้มีขนาดเล็ก อ่านผลได้รวดเร็ว และใช้สารปริมาณน้อย ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาจึงมีการศึกษาและพัฒนาเพื่อการใช้งานในด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น การตรวจวิเคราะห์สารทางการแพทย์ [7]–[9] การตรวจวิเคราะห์สารในอุตสาหกรรมอาหาร [10], [11] และสิ่งแวดล้อม [12], [13] เป็นต้น ระบบของไหลจุลภาคหรือระบบไมโครฟลูอิดิกเป็นเทคโนโลยีหลักในการพัฒนาห้องปฏิบัติการบนแผ่นชิป เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่มีความสามารถโดดเด่นด้านการย่อยส่วน การควบคุม การตรวจวัด และการเชื่อมต่อกับระบบอื่นๆ ดังนั้นการใช้งานห้องปฏิบัติการบนแผ่นชิปจึงง่าย สะดวก และรวดเร็ว การพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ที่สำคัญ และเปิดโอกาสให้ผู้ใช้งานสามารถทำการตรวจคัดกรองโรคบางอย่างได้ด้วยตัวเอง

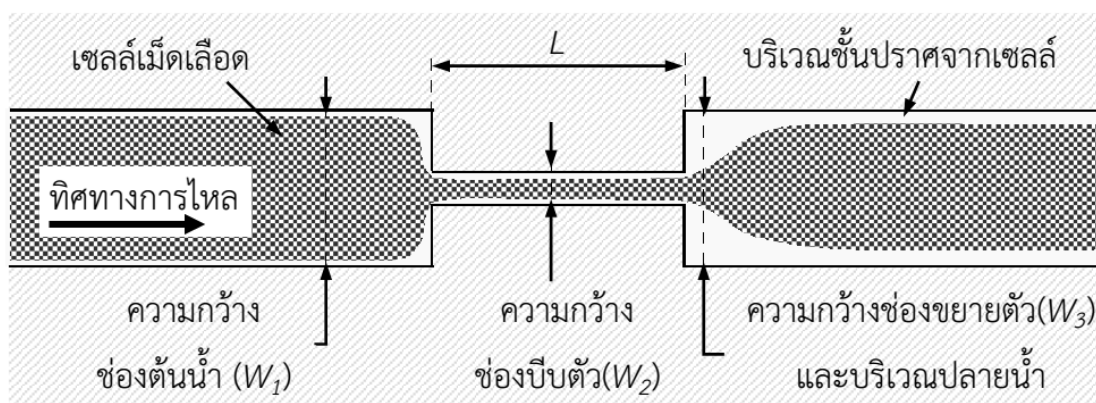
1.3.3 การคัดแยกน้ำเลือดด้วยระบบไมโครฟลูอิดิก

การคัดแยกน้ำเลือดด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกเป็นประเด็นที่นักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจ เนื่องจากการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์กว่าร้อยละ 90 เลือกลงข้อมูลจากน้ำเลือดในการตรวจสอบ [1] การศึกษาของ Bhagat และคณะได้รวบรวมเทคนิคการคัดแยกเซลล์ด้วยระบบของไหลจุลภาคไว้หลายวิธีการด้วยกัน [40] ซึ่งสามารถจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ เทคนิคการคัดแยกที่ต้องใช้พลังงานกระตุ้น (Active separation technique) และเทคนิคการคัดแยกแบบไร้พลังงานกระตุ้น (Passive separation technique) การคัดแยกทั้งสองกลุ่มมีข้อเด่นข้อด้อยที่แตกต่างกันซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1-1 หากพิจารณาเรื่องความซับซ้อนและความสะดวกในการสร้างและการใช้งานพบว่าการคัดแยกแบบไร้พลังงานกระตุ้นมีความซับซ้อนน้อยกว่าระบบที่ต้องใช้พลังงานกระตุ้น เนื่องจากการคัดแยกที่ต้องใช้พลังงานกระตุ้นจำเป็นต้องมีเครื่องมือและอุปกรณ์ต่อพ่วงเพื่อให้พลังงานแก่ระบบ การคัดแยกน้ำเลือดด้วยวิธีไร้พลังงานกระตุ้นจึงเหมาะสมต่อการศึกษาและพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามการคัดแยกน้ำเลือดด้วยวิธีไร้พลังงานกระตุ้นนั้นก็มีหลายวิธีการด้วยกัน

ตารางที่ 1-1 ข้อเด่นข้อด้อยของระบบไมโครฟลูอิดิกส์สำหรับคัดแยกน้ำเลือดด้วยวิธีการต่างๆ

คุณสมบัติ	การคัดแยกแบบ ใช้พลังงานกระตุ้น [14]–[19], [40], [41]	การคัดแยกแบบ ไร้พลังงานกระตุ้น [20]–[24], [26], [27], [40], [41]
ปริมาณการใช้สารตัวอย่างและ สารทดสอบ	ปริมาณน้อย	ปริมาณน้อย
เครื่องบ่งชี้การคัดแยก (Separation markers)	ขนาด คุณสมบัติทางไฟฟ้า คุณสมบัติแม่เหล็ก การหักเหของแสง	ขนาด รูปร่าง ความยืดหยุ่น สิ่งบ่งชี้ทางชีวภาพบนผิวเซลล์
ประสิทธิภาพในการแยก (Separation efficiencies)	> 90%	80 – 99%
ความเร็วในการคัดแยก (Throughput)	10,000 – 100,000 cells/s	4,000 – 2,000,000 cells/min
ความจำเพาะเจาะจง (Sensitivity)	สูง	ต่ำ
ความถูกต้องในการคัดแยก (Detection accuracy)	สูง	พอใช้
การติดฉลากตัวอย่าง (Labeled)	บางกรณีมีความ จำเป็นต้องติดฉลาก	ไม่ต้องทำการติดฉลาก
ความต้องการอุปกรณ์ข้างเคียง	ต้องใช้อุปกรณ์ข้างเคียง หลายชนิดโดยเฉพาะ อย่างยิ่งชุดอุปกรณ์ สำหรับการให้พลังงาน กระตุ้น	อาจต้องใช้อุปกรณ์ที่จำเป็น บางอย่าง เช่น เครื่องควบคุมการ ฉีด
ความซับซ้อนของระบบ	ระบบมีความซับซ้อนสูง ขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้	ระบบมีความซับซ้อนต่ำ
การตรวจ ณ จุดบริบาล (Point-of-care testing : POCT)	มีศักยภาพ	มีศักยภาพ
ราคา	แพง	ถูก

หลายงานวิจัยมีการออกแบบช่องทางไหลจุลภาคที่ไม่ซับซ้อนและสามารถให้ผลการคัดแยกที่ดี งานวิจัยของ Faivre และคณะได้นำเสนอระบบของไหลจุลภาคเพื่อกระตุ้นให้เกิดการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ที่ปลายน้ำโดยใช้การไหลผ่านช่องโฟกัสเซลล์ (Cell focusing) [42] ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับช่องบีบตัว-ขยายตัว (Contraction-expansion channel) ที่หลายงานวิจัยนำมาใช้งาน [27]–[29] วิธีการนี้อาศัยพลศาสตร์การไหลและผลกระทบของ Fåhræus เป็นกลไกสำคัญในการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ ลักษณะของช่องไมโครฟลูอิดิกถูกแบ่งออกเป็นสามส่วนคือ บริเวณช่องต้นน้ำ (Upstream channel) บริเวณช่องบีบตัว-ขยายตัว และบริเวณช่องปลายน้ำ (Downstream channel) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 1-1 จากภาพจะเห็นว่าบริเวณต้นน้ำและบริเวณปลายน้ำจะมีมิติความกว้างของช่องทางไหลที่โตกว่าบริเวณช่องบีบตัว งานของ Faivre และคณะได้ออกแบบให้ช่องทางไหลบริเวณต้นน้ำและปลายน้ำมีความกว้างเท่ากันที่ 100 ไมโครเมตร เมื่อเลือดไหลภายในท่อขนาดเล็กเหล่านี้จะได้รับอิทธิพลจากผลกระทบของ Fåhræus ร่วมกับแรงกระทำจากผนังท่อของช่องบีบตัว (Wall-effect lift force) เซลล์เม็ดเลือดที่เคลื่อนผ่านช่องบีบตัวจะมีการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมจากแรงเฉื่อย (Momentum-change-induced inertial force) ทำให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ศูนย์กลางของท่อมากขึ้น [27] ด้วยเหตุนี้จึงเกิดชั้นปราศจากเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นที่บริเวณช่องขยายตัว การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกในมิติความกว้างและความยาวขนาดต่างๆ เป็นตัวแปรสำคัญในการศึกษาวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ โดยความยาวของบริเวณช่องบีบตัว (L) ที่มากขึ้นช่วยเพิ่มการขยายตัวของชั้นปราศจากเซลล์ ในขณะที่มิติความกว้างของบริเวณช่องบีบตัว (W_2) ที่มากขึ้นส่งผลให้การขยายตัวของชั้นปราศจากเซลล์ลดลง นอกจากนี้ยังมีตัวแปรอื่นๆ ที่มีผลต่อการขยายตัวดังแสดงในตารางที่ 1-2 หากพิจารณาที่มีมิติความกว้างของช่องทางไหลจุลภาค



ภาพประกอบที่ 1-1 ลักษณะของช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวสำหรับขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์

จะพบว่ามีการใช้งานช่องทางไหลที่มีขนาดเล็กตั้งแต่ขนาด 10-300 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถประยุกต์ใช้งานได้ด้วยเทคนิคที่มีต้นทุนต่ำ นอกจากนี้อัตราการไหล (Flow rate) ของสารตัวอย่างในช่องไมโครฟลูอิดิกส์ถือเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญต่อผลการคัดแยกทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ หากระบบคัดแยกสามารถรองรับอัตราการไหลที่สูงขึ้นก็จะช่วยลดระยะเวลาของกระบวนการคัดแยกจากการศึกษาของ Faivre และคณะทำให้ผู้วิจัยเลือกศึกษาสองตัวแปรที่มีความสำคัญ คือ ความกว้างของช่องبيبตัว-ขยายตัวที่อัตราส่วนต่างๆ และอัตราการไหลของเลือด [25] ต่อมาทิมวิชัยนำงานของ Faivre และคณะมาประยุกต์ใช้ในการคัดแยกน้ำเลือด เช่น ทิมวิชัยของ Marchalot และคณะได้เสนอวิธีการคัดแยกแบบหลายลำดับขั้น (Multi-step separation) ซึ่งเป็นการนำหลักการที่ Faivre และคณะได้นำเสนอไว้มาประยุกต์ใช้งานร่วมกับผลกระทบของ Zweifach-Fung (Zweifach-Fung effect) ซึ่งทิมของ Yang และคณะเคยนำมาประยุกต์ใช้งาน [26] งานวิจัยของ Marchalot และคณะเลือกนำหน่วยคัดแยก (Separation unit) จำนวนสองหน่วยมาเรียงต่อกันแบบอนุกรม การนำหน่วยคัดแยกมาต่อเรียงกันจะต้องคำนวณค่าแรงดันตกคร่อม (Pressure drop, ΔP) อัตราการไหล และความต้านทานไฮดรอลิก (Hydraulic resistance) ที่บริเวณต่างๆ เพื่อควบคุมการไหลของระบบ โดยสามารถคำนวณค่าเหล่านี้ได้ในลักษณะเดียวกับกฎของโอม (Ohm's Law) [43] ความดันตกคร่อมและอัตราการไหลมีความสัมพันธ์กันโดยมีค่าความต้านทานไฮดรอลิกของท่อเข้ามาเกี่ยวข้อง เมื่อเปรียบเทียบตามกฎของโอมพบว่าความดันตกคร่อม อัตราการไหล และความต้านทาน

ตารางที่ 1-2 รายการตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ [42]

การเพิ่มขึ้นของตัวแปร	ขอบเขตของตัวแปร	การขยายตัวของชั้นปราศจากเซลล์
อัตราการไหล (Q)	10 – 100 $\mu\text{L/hr}$.	มีการเปลี่ยนแปลงน้อย
มิติความยาวของช่องبيبตัว (L)	50 – 300 μm	เพิ่ม
มิติความกว้างของช่องبيبตัว (W_2)	15 – 50 μm	ลด
ระดับความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit)	0.1 – 2.6%	เพิ่ม
ค่าความหนืดของเลือด	20 – 47 cP	เพิ่ม
ความยืดหยุ่นและปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดง	Solid beads Hardened RBCs Healthy RBCs Hypotonic RBCs	เพิ่ม

มีความสัมพันธ์แบบเดียวกับความต่างศักย์ทางไฟฟ้า กระแสไฟฟ้า และความต้านทานไฟฟ้าตามลำดับ นอกจากนี้การคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องที่มีลักษณะภาคตัดขวางเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีหลายกลุ่มวิจัยได้เสนอแนวคิดไว้อย่างแตกต่างกันไป [26], [44], [43] แต่การควบคุมอัตราส่วนระหว่างค่าความต้านทานไฮดรอลิกในท่อหลักและท่อคัดแยกน้ำเลือดมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการคัดแยกเหมือนกัน จากการคำนวณค่าความต้านทานภายในช่องไมโครฟลูอิดิกของงานวิจัยหลายกลุ่มด้วยสมการที่ Marchalot และคณะนำเสนอ [43] สามารถสรุปได้ว่าควรออกแบบระบบให้มีความต้านทานในท่อคัดแยกน้ำเลือดสูงกว่าท่อทางไหลออกของเลือดประมาณ 50 เท่า [26], [44] การออกแบบระบบคัดแยกน้ำเลือดที่นำมาต่ออนุกรมกัน 2 ลำดับของ Marchalot และคณะสามารถให้ผลการคัดแยกน้ำเลือดสูงประมาณร้อยละ 25 ที่อัตราการไหล 400 ไมโครลิตรต่อนาทีโดยใช้ตัวอย่างเลือดเจือจางที่ระดับ 1:20 โดยปริมาตร นอกจากนี้ผลการทดสอบข้อมูลโปรตีนในน้ำเลือดจากการคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกเปรียบเทียบกับน้ำเลือดจากการปั่นแยกแสดงให้เห็นว่าทั้งคู่มีข้อมูลโปรตีนเหมือนกัน สำหรับในงานวิจัยกลุ่มอื่นนั้นพบว่าสามารถคัดแยกได้น้อยกว่าเนื่องจากทำการคัดแยกเพียงลำดับเดียว เช่น งานวิจัยของ Sollier และคณะสามารถให้ผลการคัดแยกน้ำเลือดได้เพียงร้อยละ 17.8 โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่มีการเจือจางเท่ากัน [1] แต่งานวิจัยของ Rodriguez-Villarreal และคณะสามารถคัดแยกได้เพียงร้อยละ 3.47 เท่านั้น [44] จากข้อมูลการทบทวนวรรณกรรมได้แสดงให้เห็นว่าการคัดแยกน้ำเลือดด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกแบบไร้พลังงานกระตุ้นนั้นมีประสิทธิภาพในการคัดแยกที่น่าพอใจและน้ำเลือดที่ได้ยังมีคุณภาพเทียบเท่ากับวิธีการปั่นแยกทางห้องปฏิบัติการทั่วไป

1.3.4 การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ

การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิกโดยทั่วไปนิยมใช้พอลิเมอร์ซิลิโคนหรือเรียกอีกชื่อว่า พดีเอ็มเอส (Polydimethylsiloxane : PDMS) ในการคัดลอกรูปแบบช่องไมโครฟลูอิดิกจากแม่แบบซึ่งทำจากแผ่นซิลิโคน ด้วยข้อดีหลายอย่างของพดีเอ็มเอส เช่น ขึ้นรูปได้ง่าย คัดลอกรวดเร็วได้ดี มีความโปร่งแสง อ่อนตัวได้ และทนต่อสารเคมีต่างๆ เป็นต้น จึงเป็นที่นิยมใช้งานในการสร้างชิ้นงานต้นแบบ แต่พอลิเมอร์ชนิดนี้ยังมีราคาแพงและนำกลับมาใช้ใหม่ไม่ได้ การสร้างแม่แบบบนแผ่นซิลิโคนก็มีต้นทุนสูงเนื่องจากต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูง เช่น การพิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) เทคโนโลยีระบบห้องสะอาด (Cleanroom) เครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเลต และเครื่องปั่นเคลือบ (Spin coating) เป็นต้น การพัฒนาชิ้นงานต้นแบบของระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการดังกล่าวจึงเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนางานวิจัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีทรัพยากรจำกัด

เพื่อลดข้อจำกัดด้านการพัฒนาระบบของไหลจุลภาคบนแผ่นชิป จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มนำเสนอวิธีการสร้างชิปต้นแบบจากเครื่องมือและวัสดุที่หาซื้อได้ง่ายมีขายอยู่ตามท้องตลาดทั่วไป เช่น เครื่องพิมพ์เลเซอร์ [30] เครื่องตัดพล็อตเตอร์หรือเครื่องตัดสติ๊กเกอร์ [31]–[34] และเครื่องตัดเลเซอร์พล็อตเตอร์ [35] เป็นต้น การใช้เครื่องพิมพ์เลเซอร์เป็นวิธีการที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถใช้ชุดเครื่องพิมพ์ที่มีใช้งานในสำนักงานทั่วไป การศึกษาของ Nguyen และคณะได้นำเสนอการสร้างแม่แบบช่องไมโครฟลูอิดิกโดยใช้การพิมพ์ลงบนแผ่นพลาสติกหดตัวได้ (Shrink-film) [30] แผ่นพลาสติกหดตัวได้ชนิดนี้สามารถหดตัวได้มากกว่าร้อยละ 60 เมื่อโดนความร้อน การหดตัวของแผ่นพลาสติกส่งผลให้ลายวงจรของช่องทางไหลที่เคยมีขนาดใหญ่กลับหดตัวเล็กลงและสูงขึ้นจนสามารถใช้เป็นแม่แบบในการคัดลอกด้วยฟิสิกส์เอมัลซิโอมเมอร์ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น การควบคุมขนาดของช่องทำได้ยาก แผ่นพลาสติกเกิดการโค้งงอในระหว่างการหดตัวได้ง่าย รวมทั้งพื้นผิวของแผ่นพลาสติกมีความขรุขระเพิ่มขึ้นเมื่อมีการหดตัว นอกจากนี้ยังยากต่อการทำซ้ำ เป็นต้น

การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกโดยใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์หรือเทคนิคซูโรกราฟสามารถสร้างชิ้นงานได้โดยไม่ต้องสร้างแม่แบบ [31]–[34] วิธีการนี้ใช้การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์แล้วสั่งตัดรูปแบบช่องไมโครฟลูอิดิกลงบนแผ่นพลาสติกหรือวัสดุที่ต้องการได้โดยตรง การใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์จึงเป็นวิธีการที่ให้ความยืดหยุ่นในการออกแบบและการเลือกใช้วัสดุ นอกจากนี้เครื่องตัดพล็อตเตอร์ยังมีความสามารถในการตัดแบบต่างๆ ได้แก่ การตัดฮาล์ฟคัท (Half cut) การตัดไดคัท (Die cut) และการตัดขาดเป็นเส้นประ (Perforation cut) งานวิจัยของ Bartholomeusz และคณะได้ศึกษาวิธีการตัดที่เหมาะสมกับวัสดุชนิดต่างๆ เช่น แผ่นกระดาษ แผ่นพลาสติก แผ่นอลูมิเนียม ด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ [31] โดยพบว่าการตัดเฉือนพื้นผิววัสดุนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ มุมของมีดตัด แรงกด ความเร็วในการตัด และสมบัติเชิงกลของวัสดุ เป็นต้น การศึกษาของ Do และคณะแสดงให้เห็นความสามารถของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ โดยขนาดเล็กที่สุดที่สามารถทำได้อยู่ที่ขนาดความกว้างประมาณ 25 ไมโครเมตร [33] นอกจากนี้งานของ Do และคณะแสดงให้เห็นว่าการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการนี้สามารถใช้สร้างช่องทางไหลแบบสามมิติได้ โดยใช้การออกแบบช่องทางไหลเป็นลำดับชั้น (Layer) ต่างๆ แล้วนำมาประกอบเข้าด้วยกันเป็นชิ้นงาน [33]

หลังจากได้ออกแบบและเตรียมช่องไมโครฟลูอิดิกเป็นลำดับชั้นต่างๆ ไว้พร้อมแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การประกอบลำดับชั้นต่างๆ เข้าด้วยกัน การประกอบหรือยึดแผ่นชิ้นงานเข้าด้วยกันมีหลายวิธี เช่น การใช้กาว [45] การใช้ความร้อน [46] และการปรับปรุงพื้นผิว [35] เป็นต้น

วิธีการยึดด้วยแผ่นพลาสติกเคลือบบัตร (Lamination film) เป็นวิธีการที่ใช้ทั้งกาและความร้อนแต่สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว [47]–[49] เนื่องจากแผ่นพลาสติกเคลือบบัตรมีเนื้อกาเคลือบไว้ให้พร้อมใช้งาน นอกจากนี้งานของ Jeon และคณะได้แสดงให้เห็นว่าการยึดด้วยแผ่นรัดความร้อนสามารถทนความเค้นได้ถึง 200 kPa โดยไม่ต้องปรับพื้นผิววัสดุ [48] ปัจจุบันเครื่องตัดพล็อตเตอร์ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดมีราคาถูกลงทั้งเครื่องตัดพล็อตเตอร์คุณภาพสูงและเครื่องตัดพล็อตเตอร์สำหรับผู้ใช้งานทั่วไป ซึ่งราคาเริ่มต้นของเครื่องตัดพล็อตเตอร์สำหรับผู้ใช้งานทั่วไปอยู่ที่ประมาณสองหมื่นบาท การใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์จึงเป็นช่องทางที่มีความเหมาะสมต่อการวิจัยและพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิคแบบต้นทุนต่ำ

แม้ว่าวิธีการสร้างระบบของไหลจุลภาคแบบต้นทุนต่ำเหล่านี้จะมีข้อจำกัดหลายด้าน แต่ข้อได้เปรียบที่โดดเด่น คือ มีความสะดวกในการออกแบบ รองรับวัสดุได้หลากหลายชนิด และสามารถสร้างอุปกรณ์ต้นแบบได้รวดเร็ว กระบวนการสร้างชิ้นงานตั้งแต่ขั้นตอนการออกแบบจนจบกระบวนการสามารถเสร็จสิ้นได้ภายใน 24 ชั่วโมง [50] ดังนั้นหากไม่นับรวมระยะเวลาที่ใช้ในการออกแบบ กระบวนการพัฒนาชิ้นงานต้นแบบจะสามารถเสร็จสิ้นได้ในเวลา 2 นาที [34] การพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์จึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมต่อการทำวิจัยเพื่อการประยุกต์ใช้งานจริงในด้านต่างๆ สุดท้ายนี้ผลลัพธ์ของการศึกษาวิจัยและพัฒนาวีธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิคด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำจะสามารถนำไปสู่กระบวนการผลิตด้วยเทคโนโลยีขั้นสูงในระดับอุตสาหกรรมได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1. ช่องไมโครฟลูอิดิคขนาดต่างๆ สร้างด้วยการตัดฮาล์ฟคัทและการตัดได้คัทของเครื่องตัดพล็อตเตอร์
2. ความหนาของชั้นปราศจากเซลล์วิเคราะห์จากข้อมูลภาพถ่ายภายในช่องไมโครฟลูอิดิคชนิดบีบตัว-ขยายตัวที่มีมิติและระยะขดเชยต่างๆ
3. ตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ทดสอบเป็นตัวอย่างที่ไม่มีการติดเชื้อและต้องมีระดับฮีมาโตคริต (Hematocrit : Hct) กับค่าความหนืดของเลือดในระดับปกติ
4. การตรวจสอบคุณภาพของน้ำเลือดที่ได้จากระบบไมโครฟลูอิดิคใช้การตรวจนับจำนวนเซลล์เป็นข้อมูลหลัก

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลความสามารถและข้อจำกัดในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์
2. ระบบไมโครฟลูอิดิกต้นแบบที่สามารถใช้คัดแยกน้ำเลือดได้จริง
3. น้ำเลือดที่คัดแยกด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกมีคุณภาพที่ดีสามารถใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้

1.6 สรุป

การพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์สารปริมาณน้อยที่ให้ผลการทดสอบได้รวดเร็วเข้ามามีบทบาททางการแพทย์มากขึ้น การพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำช่วยเปิดโอกาสให้นักวิจัยพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้ง่ายและสะดวกขึ้น การพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบสำหรับใช้คัดแยกน้ำเลือดซึ่งสร้างด้วยเทคนิคที่นำเสนอจะเป็นแนวทางในการนำเทคนิคต้นทุนต่ำไปประยุกต์ใช้งานจริงกับงานวิจัยทางการแพทย์และงานวิจัยด้านอื่นๆ หากช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบนี้สามารถทำงานได้ดีจะสามารถนำมาเป็นต้นแบบสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

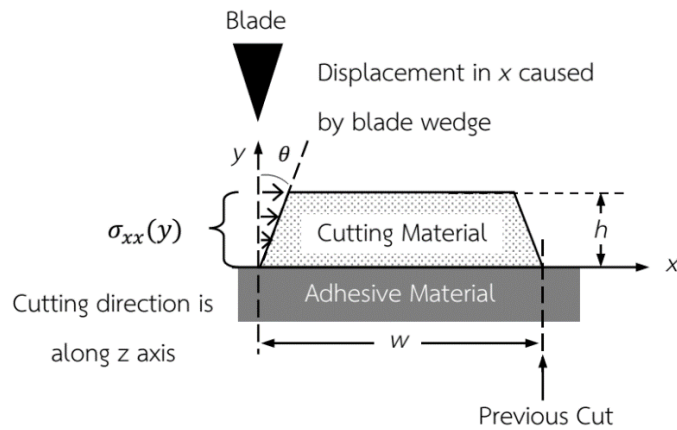
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ

2.1 การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์

การสร้างระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์หรือเรียกอีกชื่อว่าวิธีซูโรกราฟ (Xurography) ถูกนำเสนอไว้ในปี ค.ศ. 2005 โดย Bartholomeusz และคณะ [31] วิธีนี้สามารถใช้สร้างช่องจุลภาคที่มีขนาดความกว้างเล็กสุดประมาณ 20 ไมโครเมตรลงบนแผ่นพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ได้โดยตรงและไม่ต้องการสร้างแม่แบบ และโดยทั่วไปเครื่องตัดพล็อตเตอร์รองรับการตัดแผ่นพอลิเมอร์ที่มีความหนาประมาณ 25 ถึง 1000 ไมโครเมตร การสร้างรูปร่างขนาดจุลภาคลงบนแผ่นพอลิเมอร์โดยใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์นั้นย่อมมีข้อจำกัดในการสร้างจากหลายปัจจัย ได้แก่ ขนาดของแรงกดที่ใช้ตัด ความเร็วในการตัด สมบัติความยืดหยุ่นของวัสดุ (Elastic modulus : E) และอัตราส่วนปัวซองของวัสดุ (Poisson's ratio : ν) เป็นต้น แผ่นวัสดุจะถูกตัดขาดด้วยความเค้นตั้งฉาก (Normal Stress : σ_{xx}) ที่กระทำลงบนผิววัสดุซึ่งความเค้นตั้งฉากนี้จะถูกต้านทานโดยความเค้นเฉือน (Shear stress) ของวัสดุตามเส้นแนวการตัด กฎของฮุกใน 2 มิติ (2D Hooke's law) ได้ให้นิยามค่าความเค้นตั้งฉากของวัสดุที่มีสมบัติเท่ากันในทุกทิศทาง (Isotropic material) ไว้ด้วยความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (E) สมบัติความยืดหยุ่น (E) และอัตราส่วนปัวซอง (ν) โดยค่าความเค้นในระนาบ x นั้นมีการเปลี่ยนแปลงตามแนวแกน y ขึ้นอยู่กับมุมของใบมีดตัด (θ) และระยะห่างจากรอยตัดครั้งที่ผ่านมา (w) เมื่อตัดวัสดุในตำแหน่ง x ใดๆ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-1 จะเกิดความเค้นตั้งฉากในเนื้อวัสดุที่ตำแหน่ง y ใดๆ ($\sigma_{xx}(y)$) ตามความสัมพันธ์ในสมการที่ 2.1

$$\sigma_{xx}(y) = \frac{Ev}{(1+\nu)(1-2\nu)} \left(\frac{y \tan \theta}{w} \right) \quad \dots\dots\dots (2.1)$$

เมื่อผลรวมของแรงที่ใช้ในการตัดซึ่งพิจารณาได้จากผลรวมของความเค้นตั้งฉาก (σ_{xx}) ตามความหนาของแผ่นวัสดุ (h) และความยาวของใบมีด (L) ตามความสัมพันธ์ในสมการที่ 2.1 มีค่าสูงกว่าความเค้นจุดครากของวัสดุ (Yield strength) จะทำให้เกิดรอยตัดไปตามเส้นแนวตัด นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในขณะที่ทำการตัดจะเกิดความเค้นเฉือนระหว่างแผ่นวัสดุตัดกับวัสดุช่วยยึดจับชิ้นงานซึ่งวางรองอยู่ด้านล่าง การพิจารณาความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงนิยมพิจารณาภายใต้สมมติฐานที่ว่าแรงกระทำในวัสดุตัดและวัสดุช่วยยึดจับชิ้นงานมีขนาดเท่ากัน ดังนั้นเมื่อตัดรูปร่างที่มีขนาดความกว้าง (w) น้อยลงจะส่งผลให้เกิดความเค้นเฉือนในวัสดุช่วยยึดจับชิ้นงาน (τ_{yx}) สูงขึ้นจนถึงค่าสูงสุดที่วัสดุจะสามารถยึด

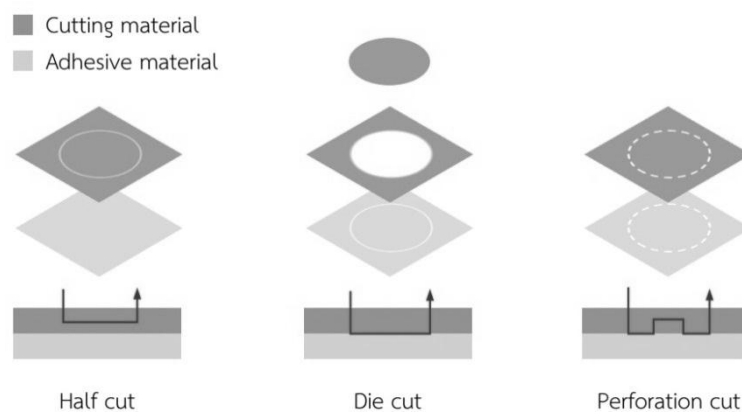


ภาพประกอบที่ 2-1 แผนภาพตามภาคตัดขวางของแผ่นวัสดุตัดในการตัดด้วยเครื่องตัดฟลีดเตอร์

จับขึ้นงานได้ ตัวแปรนี้จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อข้อจำกัดในการสร้างรูปร่างขนาดต่างๆ ด้วยเครื่องตัดฟลีดเตอร์ จากความสัมพันธ์ทั้งหมด Bartholomeusz และ คณะจึงได้เสนอสมการสำหรับใช้ประเมินขนาดความกว้างน้อยที่สุดที่เครื่องตัดฟลีดเตอร์สามารถสร้างได้ (w_c) [31] ดังสมการที่ 2.2

$$w_c = \sqrt{\frac{h^2 E \tan \theta \nu}{2(1+\nu)(1-2\nu)\tau_{yx-max}}} \dots\dots\dots (2.2)$$

เครื่องตัดฟลีดเตอร์โดยทั่วไปมีวิธีการตัด 2 แบบ คือ การตัดฮาล์ฟคัท (Half cut) และการตัดไดคัท (Die cut) ซึ่งเพียงพอต่อการใช้งาน อย่างไรก็ตามเครื่องตัดฟลีดเตอร์บางรุ่นอาจมีความสามารถในการตัดเพิ่มขึ้น เช่น การตัดแบบเส้นประ (Perforation cut) ซึ่งเป็นการใช้วิธีการตัดฮาล์ฟคัทและการตัดไดคัทร่วมกันดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-2 วิธีการตัดแบบเส้นประจึงไม่



ภาพประกอบที่ 2-2 รูปแบบการตัดชนิดต่างๆ ของเครื่องตัดฟลีดเตอร์

เหมาะสมเนื่องจากเป็นการตัดอย่างไม่ต่อเนื่องทำให้ได้ช่องไมโครฟลูอิดิกที่ไม่ต่อเนื่อง ดังนั้นการตัดฮาล์ฟคัทและการตัดโดคัทซึ่งมีในเครื่องตัดพล็อตเตอร์ทั่วไปจึงเป็นรูปแบบการตัดที่เพียงพอและเหมาะสมสำหรับใช้สร้างช่องไมโครฟลูอิดิก

2.2 ทฤษฎีและปรากฏการณ์การไหลระดับจุลภาคที่ใช้สำหรับการคัดแยกน้ำเลือด

การคัดแยกน้ำเลือดด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกแบบไร้พลังงานกระตุ้นนั้นจะต้องอาศัยปรากฏการณ์ธรรมชาติอันเนื่องจากการเคลื่อนที่ของเลือดภายในท่อขนาดจุลภาค แม้ว่าเลือดเป็นของไหลที่มีพฤติกรรมการไหลไม่เหมือนการไหลของนิวตัน (Non-Newtonian fluid) อย่างไรก็ตามสามารถพิจารณาพฤติกรรมการไหลด้วยสมการของนิวตันได้ โดยสมมติให้เลือดคือของไหลซึ่งมีส่วนประกอบของเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นสารแขวนลอยในน้ำเลือดที่มีพฤติกรรมการไหลแบบนิวตัน (Newtonian fluid) [41] นอกจากนี้การไหลของน้ำเลือดภายในท่อขนาดจุลภาคที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไฮดรอลิก (Hydraulic diameters) ประมาณ 10 ถึง 500 ไมโครเมตรจะมีลักษณะการไหลแบบราบเรียบ (Laminar flow)

การพิจารณาปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับของไหลและอนุภาคต่างๆ ที่อยู่ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกนิยมใช้ค่าไร้หน่วย (Dimensionless numbers) ในการเปรียบเทียบ เลขเรย์โนลด์ (Reynolds number : Re) เป็นค่าไร้หน่วยที่มีความสำคัญและนิยมใช้ในการพิจารณาเป็นอันดับแรก เลขเรย์โนลด์เกิดจากการพิจารณาอิทธิพลระหว่างแรงเฉื่อยและแรงจากความหนืดที่มีผลต่อการไหล อนุภาคที่อยู่ภายในของไหลจะได้รับแรงกระทำจากแรงเฉื่อยและแรงจากความหนืดเนื่องจากอนุภาคจะมีปฏิกริยากับของไหล เลขเรย์โนลด์นั้นมีความสัมพันธ์ตามสมการที่ 2.3

$$Re_p = Re_c \frac{a^2}{D_h^2} = \frac{U_m a^2}{\mu D_h} \quad \dots\dots\dots (2.3)$$

โดยตัวแปร Re_c คือเลขเรย์โนลด์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิก ตัวแปร a คือเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค ตัวแปร D_h คือเส้นผ่านศูนย์กลางไฮดรอลิกของช่องไมโครฟลูอิดิก ตัวแปร U_m คือความเร็วสูงสุดของการไหล และตัวแปร μ คือค่าความหนืดจลนศาสตร์ของของไหล (Kinematic viscosity) ภายใต้การไหลแบบราบเรียบในเครือข่ายท่อจุลภาคนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเลขเรย์โนลด์ค่อนข้างมาก ตั้งแต่ 0.01 ถึง 100 ซึ่งส่งผลสำคัญต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดง [41] ด้วยเหตุนี้เราจึงสามารถประมาณการหรือแยกแยะลักษณะของปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นกับอนุภาคได้โดยใช้เลขเรย์โนลด์ของอนุภาค (Re_p) ตามสมการที่ 2.3

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงมวลสารในตัวอย่างสารละลายต่างๆ นิยมใช้เลข เพคเลท (Peclet number : Pe) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงมวลเนื่องจากการไหล และการเปลี่ยนแปลงมวลเนื่องจากการแพร่ ซึ่งสามารถสรุปเป็นความสัมพันธ์ได้ตามสมการที่ 2.4

$$Pe = \frac{UDh}{D} \quad \dots\dots\dots (2.4)$$

โดยตัวแปร U คือค่าความเร็วเฉลี่ยของการไหล และตัวแปร D คือค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของอนุภาค ภายใต้การไหลที่มีค่าเพคเลทมากกว่า 1 ($Pe \gg 1$) การเคลื่อนที่ของอนุภาคจะได้รับอิทธิพลจากแรงเฉื่อยเนื่องจากการไหลเป็นหลักเมื่อเปรียบเทียบกับอิทธิพลจากการแพร่

โดยทั่วไปช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีการใช้งานอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงมิติความกว้าง ความลึก และความยาวของช่องอย่างไม่เป็นเชิงเส้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงมิติเหล่านี้ส่งผลต่อพฤติกรรมของอนุภาค เลขสโตกซ์ (Stokes number) เป็นค่าไร้หน่วยอีกค่าหนึ่งที่นิยมใช้ประกอบการอธิบายพฤติกรรมของอนุภาค นิยามของเลขสโตกซ์เป็นอัตราส่วนระหว่างค่าเวลาของการคลายของอนุภาค (Relaxation time of partical : τ_p) กับค่าเวลาการก่อลักษณะการไหล (Characteristic time of the flow : τ_f) ตามสมการที่ 2.5

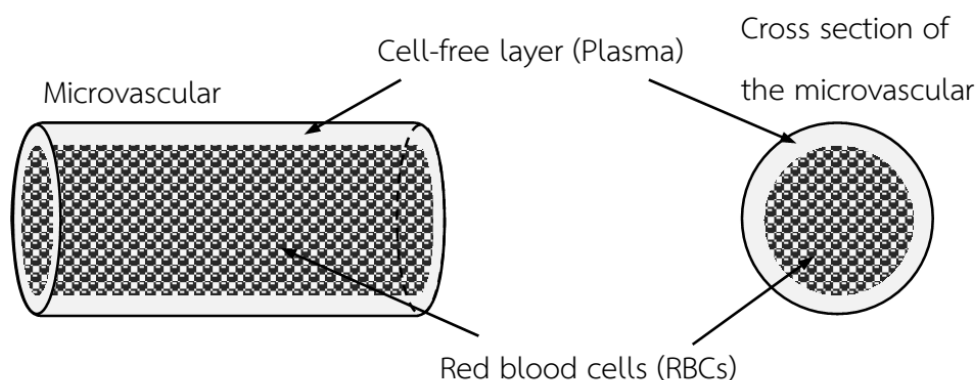
$$St = \frac{\tau_p}{\tau_f} = \frac{\rho_p d^2 / 18\mu}{D_h / U_m} = \frac{\beta d^2 U_m}{18\nu D_h} = \frac{\beta}{18} Re_p \quad \dots\dots\dots (2.5)$$

โดยที่ตัวแปร β คือค่าความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity) ของอนุภาคซึ่งมาจากอัตราส่วนระหว่างค่าความหนาแน่นของอนุภาค (ρ_p) กับค่าความหนาแน่นในตัวกลางของไหล (ρ_f) กรณีที่เลขสโตกซ์มากกว่า 1 ($St \gg 1$) อนุภาคจะมีพฤติกรรมเคลื่อนที่ไปตามการไหลโดยรักษาตำแหน่งเดิม

ค่าไร้หน่วยอย่างน้อย 2 ตัวจะเป็นพื้นฐานสำคัญสู่การศึกษาปรากฏการณ์ที่ซับซ้อนยิ่งขึ้น เช่น ปรากฏการณ์ที่ใช้ในการคัดแยกน้ำเลือดส่วนใหญ่มีเลขเพคเลทมากกว่า 1 ดังนั้นค่าไร้หน่วยที่มักใช้พิจารณาก็คือเลขเรย์โนลด์และเลขสโตกซ์ ปรากฏการณ์ที่มีผลสำคัญต่อการคัดแยกน้ำเลือดและนำมาใช้ออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกในงานวิจัยนี้ ได้แก่ การเคลื่อนที่เข้าสู่ศูนย์กลางท่อของเซลล์เม็ดเลือดแดงภายในท่อขนาดจุลภาคอันเนื่องจากผลกระทบของ Fåhræus การแยกอนุภาคในการไหลแบบมัลติออริฟิช (Multiorifice flow fractionation : MOFF) และการเคลื่อนที่ของอนุภาคภายในท่อที่มีทางแยกไปสองทางซึ่งได้รับอิทธิพลจากผลกระทบของ Zweifach-Fung เป็นต้น ปรากฏการณ์ที่กล่าวมาทั้งหมดล้วนมีหน้าที่ในกระบวนการคัดแยกแตกต่างกันไปดังนี้

2.2.1 ทฤษฎีผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist (Fåhræus-Lindqvist effect)

จากการศึกษาเสถียรภาพการเป็นสารแขวนลอยของเลือด (Suspension stability) ในหลายๆ งานวิจัยเริ่มเผยให้เห็นว่าคุณสมบัติการเป็นสารแขวนลอยของเลือดเริ่มเปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัดที่การไหลที่มีความดันตกคร่อมต่ำและการไหลในท่อขนาดจุลภาค Fåhræus จึงได้ศึกษาการไหลของเลือดที่มีความดันตกคร่อมต่ำภายในท่อจุลภาค จนพบว่าเมื่อเลือดไหลภายในท่อจุลภาคที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 300 ไมโครเมตรด้วยค่าอัตราการไหลสูงจะส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเคลื่อนที่มุ่งเข้าสู่ศูนย์กลางของท่อจุลภาคจนเกิดชั้นปราศจากเซลล์ (Cell-free layer) ขนาดเล็กขึ้นดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-3 จึงเรียกปรากฏการณ์นี้ว่าผลกระทบของ Fåhræus หากพิจารณาค่าความเร็วเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดงภายใต้การไหลแบบโค้งพาราโบลา (Parabolic flow) ในท่อจุลภาคจะมีค่ามากกว่าความเร็วเฉลี่ยในของไหลหรือน้ำเลือด ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้ระดับฮีมาโตคริตภายในท่อจุลภาค (Tube hematocrit, Hct_{tube}) มีค่าน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับฮีมาโตคริตในตัวอย่างเลือด (Feed hematocrit, Hct_{feed}) ที่ป้อนเข้าสู่ท่อ ผลกระทบของ Fåhræus สามารถอธิบายได้ว่าความสัมพันธ์ของระดับฮีมาโตคริตในท่อจุลภาคและระดับฮีมาโตคริตในตัวอย่างเลือด (Hct_{tube} / Hct_{feed}) มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อเพิ่มขึ้น



ภาพประกอบที่ 2-3 การเคลื่อนที่มุ่งเข้าสู่ศูนย์กลางท่อจุลภาคของเซลล์จนเกิดชั้นปราศจากเซลล์ เนื่องจากผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist

ต่อมา Fåhræus และ Lindqvist ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ตามภาคตัดขวาง (Lateral migration) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไหลภายในท่อจุลภาค ทีมวิจัยได้พบว่าค่าความหนืดของเลือดมีการเปลี่ยนแปลงตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดหรือท่อจุลภาค และได้สรุปว่าในท่อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 300 ไมโครเมตร ค่าความหนืดของเลือดจะมี

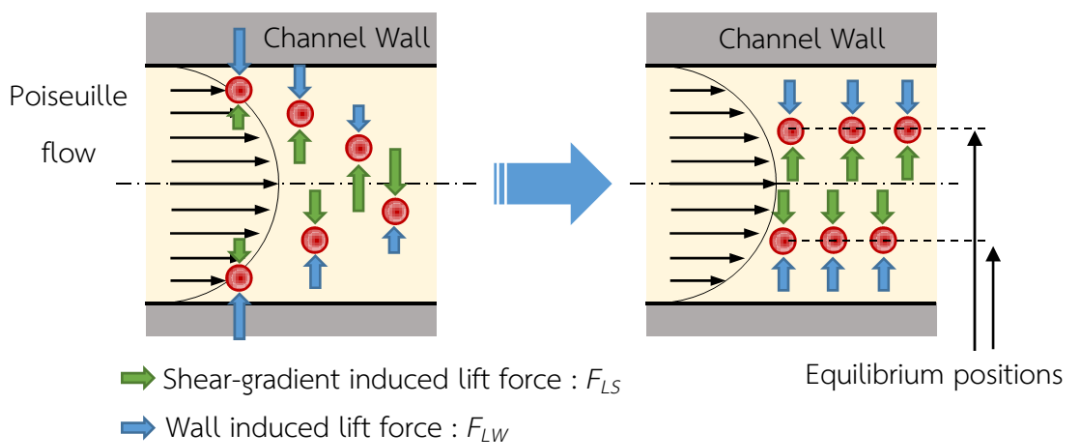
ค่าลดลงเมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อลดลง ปรากฏการณ์นี้จึงถูกเรียกว่าผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist (Fåhræus-Lindqvist effect) ซึ่งต่อมาได้นำมาใช้อธิบายลักษณะการเกิดขึ้นปราศจากเซลล์ (Cell-free layer) ภายในท่อจุลภาค การศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ในภาคตัดขวางของอนุภาคแข็ง (Solid spheres) ซึ่งเป็นสารแขวนลอยในของเหลวได้ข้อสรุปที่ยอมรับกันทั่วไปว่าการไหลภายในท่อจุลภาครูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าตามขอบเขตการไหลของ Poiseuille ที่มีเลขเรย์โนลด์มากกว่า 1 ($Re > 1$) และมีเลขเรย์โนลด์ของอนุภาคน้อยกว่า 1 มากๆ ($Re_p \ll 1$) จะมีแรงยกเฉื่อยที่กระทำต่ออนุภาคแข็ง (Inertial lift force : F_L) ซึ่งสามารถมีความสัมพันธ์ตามสมการที่ 2.6

$$F_L \propto \frac{\rho U^2 a^4}{w^2} \dots\dots\dots (2.6)$$

โดยแรงเฉื่อยที่กระทำต่ออนุภาคสามารถแยกย่อยเป็นแรงกระทำ 2 ชนิดดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-4 ได้แก่ แรงยกเหนี่ยวนำจากผนังท่อ (Wall induced lift force : F_{LW}) และแรงยกเหนี่ยวนำจากเกรเดียนต์ความเครียด (Shear-gradient induced lift force : F_{LS}) สำหรับกรณีที่เลขเรย์โนลด์ของอนุภาคมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ($Re_p \geq 1$) จะมีแรงยกเหนี่ยวนำจากผนังท่อ (F_{LW}) กระทำในทิศทางพุ่งเข้าหาศูนย์กลางท่อซึ่งสามารถประมาณค่าได้ตามความสัมพันธ์ในสมการที่ 2.7

$$F_{LW} \propto f_l \frac{\rho U^2 a^6}{w^4} \dots\dots\dots (2.7)$$

โดยที่ f_l คือค่าไร้มิติของแรงยก (Lift coefficient) ซึ่งมาจากความสัมพันธ์ระหว่างเลขเรย์โนลด์กับค่าตำแหน่งภาคตัดขวางอ้างอิง (w/h) สำหรับท่อจุลภาคที่มีภาคตัดขวางเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าซึ่งมี



ภาพประกอบที่ 2-4 แผนภาพแสดงแรงที่กระทำต่ออนุภาคตามขอบเขตการไหลของ Poiseuille

อัตราส่วนระหว่างความกว้าง (w) และความสูง (h) ในช่วง 2 ถึง 0.5 จะมีค่า f_l ประมาณ 0.02-0.05 ในขณะที่เดียวกันอนุภาคจะได้รับแรงยกเหนียวมาจากเกรเดียนความเครียด (F_{LS}) ในทิศทางพุ่งเข้าสู่ผนังท่อซึ่งสามารถประมาณค่าได้ตามความสัมพันธ์ในสมการที่ 2.8

$$F_{LS} \propto f_l \frac{\rho U^2 a^3}{w} \quad \dots\dots\dots (2.8)$$

แรงกระทำทั้งสองจะหักล้างกันตามความยาวของท่อจนถึงจุดหนึ่งที่แรงกระทำต่ออนุภาคทั้งสองเท่ากันทำให้เข้าสู่ตำแหน่งสมดุล (Equilibrium positions) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-4 จุดสมดุลเป็นตำแหน่งที่อนุภาคไม่มีการเคลื่อนที่ในภาคตัดขวาง แต่มีเพียงการเคลื่อนที่ไปตามการไหลภายในท่อ ระยะทางสู่จุดสมดุล (L_f) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.9 และอัตราการไหลสู่จุดสมดุล (Q_f) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.10

$$L_f = \frac{\pi \mu w^2}{\rho U_m a^2 f_l} \quad \dots\dots\dots (2.9)$$

$$Q_f = \frac{2\pi \mu h w^3}{3\rho L a^2 f_l} \quad \dots\dots\dots (2.10)$$

การศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ในภาคตัดขวางของอนุภาคในลำดับต่อมาเริ่มใช้อนุภาคที่มีความยืดหยุ่นซึ่งมีความใกล้เคียงกับลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงมากขึ้น การศึกษาอนุภาคที่มีความยืดหยุ่นนับเป็นสิ่งที่ท้าทายเป็นอย่างมากเพราะการแก๊สมการของการไหลจำเป็นจะต้องแก๊สมการภายใต้ขอบเขตที่มีความยืดหยุ่นและอิทธิพลร่วมกันระหว่างการเปลี่ยนรูปร่างกับอัตราการไหล นอกจากนี้ประเด็นที่สำคัญคือรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นไม่ได้เป็นทรงกลมแต่มีลักษณะรูปทรงวงรี มีความหนาแน่นสูงกว่าน้ำเลือด ($\rho_{red\ cell} = 1.09 > \rho_{plasma} = 1.02\text{g/cm}^3$) และมีความยืดหยุ่น ภายใต้ตัวแปรมากมายที่มีผลต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์ Abkarian และ Viallat ได้นำเสนอแนวคิดสำหรับอธิบายแรงกระทำต่อเซลล์ (F_L) ในขอบเขตการไหลของ Poiseuille ที่เลขเรย์โนลด์ค่าน้อยดังสมการที่ 2.11

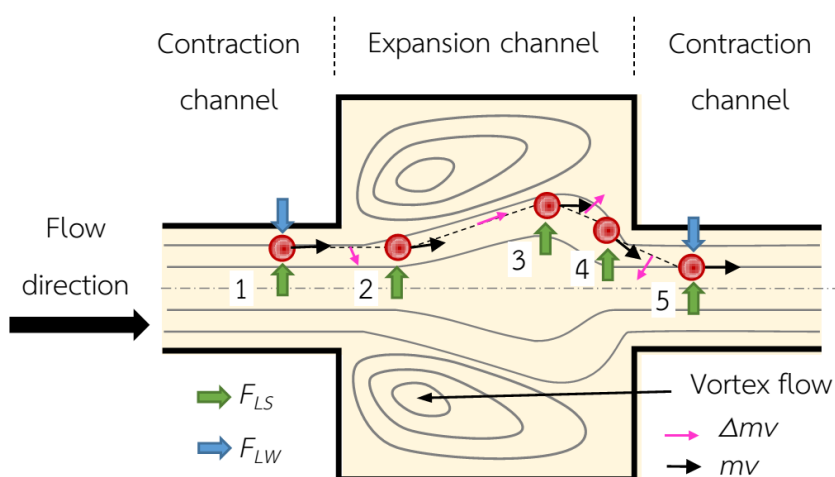
$$F_L = \eta \dot{\gamma} \frac{R^3}{h} f(v) \quad \dots\dots\dots (2.11)$$

โดยตัวแปร η คือค่าความหนืด ตัวแปร $\dot{\gamma}$ คืออัตราเฉือน (Shear rate) ตัวแปร R คือรัศมีของเซลล์ ตัวแปร h คือระยะห่างระหว่างผนังท่อกับเซลล์ และตัวแปร $f(v)$ คือฟังก์ชันของปริมาตรของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงลดลง

2.2.2 การคัดแยกอนุภาคด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกแบบมัลติออริฟิซ (Multiorifice flow fractionation : MOFF)

การคัดแยกอนุภาคด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกแบบมัลติออริฟิซหรือ MOFF นั้นเป็นการแยกโดยใช้ขนาดของอนุภาคเป็นเครื่องบ่งชี้ วิธีการนี้ขับเคลื่อนด้วยแรงเชิงกล 2 ชนิดร่วมกัน คือ แรงยกเฉื่อย (Inertial lift force) และแรงเฉื่อยเหนี่ยวนำจากการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัม (Momentum-change-induced inertial force : mv) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-5 แรงยกเฉื่อยนั้นเกิดขึ้นจากสนามแรงดันในภาคตัดขวางของช่องไมโครฟลูอิดิกที่กระทำต่ออนุภาคซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาภายใต้ขอบเขตการไหลแบบ Poiseuille แรงเฉื่อยที่เกิดขึ้นนั้นแบ่งย่อยออกเป็นแรงกระทำ 2 ชนิด คือ แรงยกเหนี่ยวนำจากผนังท่อและแรงยกเหนี่ยวนำจากเกรเดียนต์ความเร็ว ต่อมามีการศึกษาพบว่าแรงเฉื่อยทั้งคู่ก่อให้เกิดตำแหน่งสมดุลของการเคลื่อนที่ตามภาคตัดขวางของอนุภาค โดยมีตำแหน่งสมดุลอยู่ในระยะ 0.6 เท่าของรัศมีจากแนวแกนของท่อโดยประมาณ [51] ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ถูกเรียกว่าการกระจุกตัวภายในท่อ (Tubular pinch effect) โดยลักษณะการกระจุกตัวของอนุภาคที่เกิดขึ้นที่บริเวณขอบด้านข้างทั้งสองของท่อ

แรงเฉื่อยเหนี่ยวนำจากการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัม (Momentum-change-induced inertial force) นั้นมีพื้นฐานมาจากทิศทางการเคลื่อนที่ของการไหลไม่ตรงกับทิศทางการเคลื่อนที่ของอนุภาคซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากลักษณะของช่องไมโครฟลูอิดิกบีบตัว-ขยายตัว เมื่ออนุภาคเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมภายใต้การไหลที่มีเลขเรย์โนลด์และเลขสโตกส์ค่าสูงจะทำให้ทิศทางการ



ภาพประกอบที่ 2-5 การไหลแบบมัลติออริฟิซซึ่งขับเคลื่อนด้วยแรงเฉื่อยและแรงเฉื่อยเหนี่ยวนำจากการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมด้วยช่องบีบตัว-ขยายตัว

เคลื่อนที่ของอนุภาคไม่ตรงกับทิศทางการไหล การเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมจัดเป็นตัวแปรสำคัญสำหรับการใช้ตัดแยกอนุภาคด้วยขนาด หากพิจารณาตามกฎข้อที่ 2 ของนิวตันแล้วการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมในช่วงเวลาหนึ่งมีค่าเท่ากับแรงขับเคลื่อนจากแรงเฉื่อย จนสามารถเขียนอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างแรงเฉื่อย (F_i) และการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัม (Δmv) ได้ตามสมการที่ 2.12

$$F_i = ma = m \frac{dv}{dt} \sim m \frac{\Delta v}{\Delta t} = \frac{\Delta mv}{\Delta t} \quad \text{..... (2.12)}$$

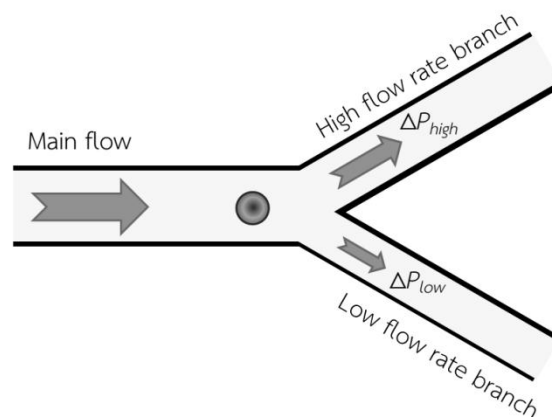
ภายใต้สมมติฐานที่ว่าอนุภาคมีการไหลด้วยความเร็วเดียวกับความเร็วเฉลี่ยของการไหล (U) ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง (D_h) ขนาดต่างๆ และผลต่างของเวลา (Δt) สามารถทดแทนได้ด้วยอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางและความเร็วเฉลี่ยของการไหล (D_h/U) ความสัมพันธ์ระหว่างแรงเฉื่อยจึงสามารถเขียนอธิบายใหม่ได้ตามสมการที่ 2.13 และเขียนอธิบายใหม่ในกรณีที่อนุภาคมีรูปร่างรีได้ตามสมการที่ 2.14

$$F_i \sim m \frac{U^2}{D_h} \quad \text{..... (2.13)}$$

$$F_i \sim \frac{\rho_p \pi d^3 U^2}{6D_h} \quad \text{..... (2.14)}$$

2.2.3 ทฤษฎีผลกระทบของ Zweifach-Fung (Zweifach-Fung effect)

การคัดแยกน้ำเลือดด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับกฎการไหลแยกไปสองทาง (Bifurcation law) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-6 ซึ่งนิยมเรียกกันทั่วไปว่าผลกระทบของ Zweifach-Fung กฎการไหลนี้ถูกนำมาใช้อธิบายพฤติกรรมเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อ



ภาพประกอบที่ 2-6 ภาพแสดงกฎการไหลแยกไปสองทาง (Bifurcation law)

ไหลผ่านหลอดเลือดฝอยที่มีทางแยกไปสองทาง ซึ่งเซลล์ขนาดใหญ่จะมีพฤติกรรมการเคลื่อนที่เอนเอียงไปทางหลอดเลือดที่มีอัตราการไหลสูงกว่าเพราะเซลล์ขนาดใหญ่จะถูกบริเวณที่มีสนามแรงดันสูงควบคุมได้ง่าย ส่วนเซลล์ที่มีขนาดเล็กจะไหลสู่หลอดเลือดที่มีอัตราการไหลต่ำกว่า การเคลื่อนที่ของเซลล์ในลักษณะนี้จะเกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างอัตราการไหลในท่อทั้งสองมีความแตกต่างกันประมาณ 2.5 ต่อ 1 โดยมีอัตราส่วนระหว่างขนาดของเซลล์กับท่อต่างกันประมาณ 1 เท่า [26]

2.2.4 การคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิก

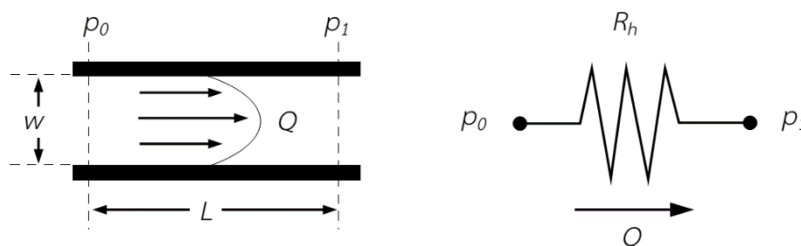
สืบเนื่องจากกฎการไหลแยกไปสองทางที่นำมาใช้เป็นหลักการสำคัญสำหรับการคัดแยกน้ำเลือด แต่ในการออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกที่ซับซ้อนยิ่งขึ้นจำเป็นต้องมีเครื่องมือสำหรับการประเมินขนาดความกว้างในมิติต่างๆ ของช่องเพื่อให้ได้ผลการคัดแยกตามที่ต้องการ เครื่องมือสำหรับการประเมินเบื้องต้นโดยอยู่ภายใต้เงื่อนไขของช่องไมโครฟลูอิดิกที่ไม่มีการกักเก็บและเป็นของไหลในอุดมคติของนิวตัน (Newtonian viscous fluid) เราสามารถอธิบายความสัมพันธ์อย่างง่ายระหว่างความดันตกคร่อมช่องไมโครฟลูอิดิก (ΔP) ความต้านทานไฮดรอลิก (R) และอัตราการไหล (Q) ตามสมการที่ 2.15

$$\Delta P = QR \quad \text{..... (2.15)}$$

โดยสมการความสัมพันธ์มีลักษณะเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้า (V) ความต้านทานไฟฟ้า (R) และกระแสไฟฟ้า (I) ในระบบวงจรไฟฟ้าพื้นฐาน (Electrical circuit : $V=IR$) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-7 สำหรับค่าความต้านทานไฮดรอลิกในช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีลักษณะภาคตัดขวางเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าจะสามารถคำนวณได้โดยใช้ความสัมพันธ์ที่ Marchalot และคณะนำเสนอ [43] ดังแสดงในสมการที่ 2.16

$$R = \frac{8\mu(w+h)^2L}{h^3w^3} \quad \text{..... (2.16)}$$

โดยตัวแปรความยาว (L) ความกว้าง (w) และความสูง (h) เป็นขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกในบริเวณที่พิจารณาดังแสดงในภาพประกอบที่ 2-7 และตัวแปร μ คือ ค่าความหนืดของสารตัวอย่าง กรณีที่ใช้สารตัวอย่างเป็นเลือดที่มีการเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ถึง 1:2 โดยปริมาตรสามารถใช้ค่าความหนืดประมาณ 1.5 เซนติพอยด์ (Centipoise : cP) ในการคำนวณด้วยสมการที่ 2.16 ได้ [43]



ภาพประกอบที่ 2-7 การพิจารณาค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิก

2.3 สรุป

ข้อมูลทฤษฎีและหลักการต่างๆ ดังได้กล่าวไว้ในบทนี้ล้วนเป็นพื้นฐานที่จำเป็นต่อการพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือด เริ่มจากหลักการตัดของเครื่องตัดพล็อตเตอร์และการประเมินความสามารถของเครื่องมือทำให้สามารถสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ตามความต้องการได้ การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดได้ออกแบบตามข้อมูลทฤษฎีและหลักการไหลระดับจุลภาคในหมวดต่างๆ ดังนี้ การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกเพื่อการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ตามทฤษฎีผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist และทฤษฎีการแยกอนุภาคในการไหลแบบมัลติออร์บิต จากนั้นนำรูปแบบที่สามารถขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ได้ดีมาใช้พัฒนาต่อยอดเพื่อการคัดแยกน้ำเลือด ในขั้นตอนนี้จะต้องออกแบบช่องสำหรับการคัดแยกน้ำเลือดเพิ่มเข้ามาในระบบโดยอ้างอิงทฤษฎีผลกระทบของ Zweifach-Fung โดยมีการคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกบริเวณต่างๆ ให้ได้อัตราส่วนค่าความต้านทานที่เหมาะสมกับการคัดแยก สุดท้ายชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิกต้นแบบที่ออกแบบและพัฒนาขึ้นจะเข้าสู่การทดสอบต่างๆ ตามรายละเอียดในบทที่ 3 เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการคัดแยกของระบบและคุณภาพของน้ำเลือด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดในครั้งนี้นำเลือกใช้เครื่องตัดพลาสมาเตอร์เป็นเครื่องมือหลักในการสร้างชิ้นงาน เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีความยืดหยุ่นในการออกแบบ รองรับวัสดุตัดได้หลากหลายชนิด สร้างชิ้นงานได้รวดเร็ว และต้นทุนด้านเครื่องมือและวัสดุไม่สูงจนเกินไป การดำเนินงานวิจัยได้จัดแบ่งแผนงานหลักเป็น 3 ส่วนดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-1 แผนงานแรกเป็นการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างชิ้นงานต้นแบบ งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นการศึกษาเพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกโดยใช้เครื่องตัดพลาสมาเตอร์ ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดฮาล์ฟคัทและการศึกษาความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดไดคัท กลุ่มงานที่สองเป็นการออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกเพื่อขยายขนาดของชิ้นปราศจากเซลล์โดยศึกษาช่องไมโครฟลูอิดิกแบบต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการขยายขนาดของชิ้นปราศจากเซลล์ ช่องไมโครฟลูอิดิกชุดที่สามารถขยายชิ้นปราศจากเซลล์จนมีขนาดใหญ่จนเพียงพอต่อการนำมาประยุกต์ใช้คัดแยกน้ำเลือดจะถูกนำมาใช้ทดลองในกลุ่มงานถัดไป กลุ่มงานสุดท้ายจะสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกชุดนั้นเป็นชิ้นงานต้นแบบเพื่อใช้คัดแยกน้ำเลือด จากนั้นจึงประเมินอัตราการคัดแยกน้ำเลือด ประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์ และทดสอบคุณภาพของน้ำเลือดด้วยวิธีการตรวจวัดแบบต่างๆ

1. การศึกษาปัจจัยในการสร้างชิ้นงานต้นแบบด้วยเครื่องตัดพลาสมาเตอร์	2. การออกแบบและพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกเพื่อขยายชิ้นปราศจากเซลล์	3. การประเมินผลความสามารถด้านต่างๆ ของช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบ
<ul style="list-style-type: none"> - การตัดฮาล์ฟคัท <ul style="list-style-type: none"> - แรงกด - แนวแกนตัด - การตัดไดคัท <ul style="list-style-type: none"> - การออกแบบ - แนวแกนตัด 	<ul style="list-style-type: none"> - การออกแบบและพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ - ตรวจวัดขนาดของชิ้นปราศจากเซลล์ที่อัตราการไหลระดับต่างๆ 	<ul style="list-style-type: none"> - ประเมินอัตราการคัดแยก - ประเมินประสิทธิภาพในการคัดแยก - ตรวจระดับการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือด

ภาพประกอบที่ 3-1 ลำดับแผนงานในการดำเนินงานวิจัย

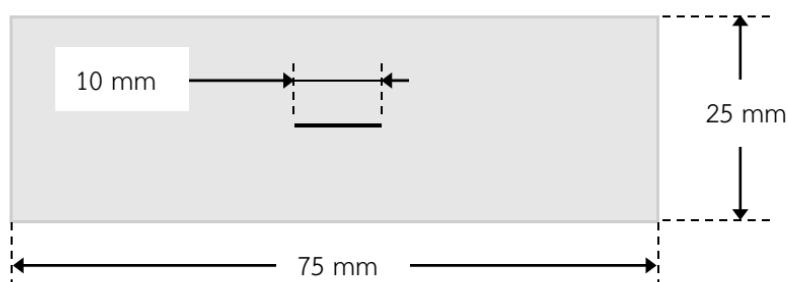
3.1 การวางแผนการทดลอง

3.1.1 การทดลองเพื่อการศึกษาปัจจัยในการสร้างชิ้นงานต้นแบบด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์

การทดลองในกลุ่มนี้จัดแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การทดลองสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดฮาล์ฟคัท และการทดลองสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกตามการออกแบบด้วยวิธีการตัดโดคัท งานวิจัยนี้เลือกใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ 2 รุ่น คือ เครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo® ซึ่งมีราคาประมาณ 20,000 บาท และเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 ซึ่งมีราคาประมาณ 50,000 บาท เครื่องตัดทั้งสองรุ่นมีความสามารถตามรายละเอียดในภาคผนวก ก. ซึ่งแสดงข้อมูลความสามารถต่างๆ ของเครื่องมือตามข้อมูลจากผู้ผลิตได้ระบุไว้ อย่างไรก็ตามเครื่องมือทั้งสองรุ่นล้วนรองรับการตัดฮาล์ฟคัทและการตัดโดคัทเหมือนกัน งานวิจัยนี้เลือกวิธีการตัดทั้ง 2 แบบมาศึกษาเพิ่มเติมใน 2 ปัจจัยร่วมที่อาจมีผลสำคัญต่อการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิก คือ ปัจจัยจากวัสดุตัด (Cutting material) และปัจจัยจากแนวแกนตัด (Cutting axis) ดังนั้นการทดลองทั้งสองกลุ่มจะมีการทดสอบปัจจัยจากวัสดุตัดและปัจจัยจากแนวแกนตัดควบคู่ไปกับการทดสอบปัจจัยหลักโดยมีรายละเอียดแผนการทดลองดังนี้

แผนการทดลองที่ 1 การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดฮาล์ฟคัท วิธีการนี้ใช้ความสามารถในการควบคุมขนาดแรงกด (Cutting force) ของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ลงบนพื้นผิวของวัสดุตัด การทดลองนี้ศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อขนาดความกว้างของช่องจาก 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยจากแรงกด ปัจจัยจากวัสดุตัด และปัจจัยจากแนวแกนตัด ปัจจัยจากแรงกดที่มีผลต่อขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกถือเป็นปัจจัยหลักในการทดลอง ส่วนปัจจัยจากวัสดุตัดและปัจจัยจากแนวแกนตัดเป็นปัจจัยร่วมที่นำเข้ามาพิจารณาพร้อมกับปัจจัยหลัก ปัจจัยจากแรงกดมีการทดลองด้วยการใช้แรงกดตั้งแต่ระดับน้อยสุดไปถึงระดับสูงสุดที่เครื่องตัดรุ่นนั้นๆ สามารถทำได้ เช่น การทดลองด้วยเครื่องตัด Silhouette Cameo® ซึ่งสามารถใช้แรงกดได้ตั้งแต่ 7 ถึง 230 กรัมฟอร์ซ (Gram-force : gf) และแบ่งแรงกดได้ 33 ระดับ การทดลองได้เลือกใช้แรงกดทั้งหมด 12 ระดับ (1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33) การทดลองด้วยเครื่องตัด Graphtec CE6000-60 ซึ่งสามารถจ่ายแรงกดได้ตั้งแต่ 20 ถึง 300 กรัมฟอร์ซ และสามารถควบคุมระดับแรงกดได้ 31 ระดับ การทดลองเลือกใช้แรงกดทั้งหมด 8 ระดับ (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) การทดสอบเครื่องตัด Graphtec CE6000-60 ด้วยการใส่แรงกดเพียงระดับ 15 นั้นเนื่องมาจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าที่แรงกดระดับ 15 สามารถตัดแผ่นพลาสติกใสได้ขาดสมบูรณ์ ต่อมาเป็นปัจจัยจากวัสดุตัดซึ่งมี 2 ชุดเนื่องจากเลือกใช้แผ่นใสที่ผลิตจากพอลิเมอร์ต่างชนิดกัน คือ พอลิไวนิลคลอไรด์

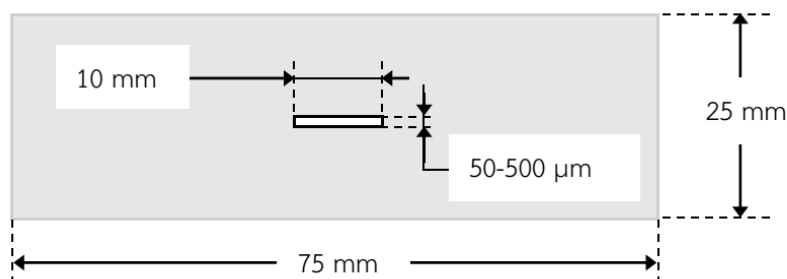
(Polyvinylchloride : PVC) และพอลิเอสเตอร์ (Polyester : PET) และปัจจัยสุดท้ายคือทิศทางหรือแนวแกนที่ใช้ตัดมี 2 ชุดเช่นกัน เนื่องจากโดยทั่วไปเครื่องตัดพล็อตเตอร์ทำงานภายใต้ 2 แนวแกน คือ แกนนอน (*x-axis*) และแกนตั้ง (*y-axis*) จากการออกแบบการทดลองจะได้กลุ่มการทดลองทั้งหมด 48 กลุ่มสำหรับเครื่องตัด Silhouette Cameo[®] และกลุ่มการทดลองจำนวน 32 กลุ่มสำหรับเครื่องตัด Graphtec CE6000-60 แต่ละกลุ่มการทดลองจะนำมาใช้สร้างช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีความยาว 10 มิลลิเมตรตามแบบร่างชิ้นงานในภาพประกอบที่ 3-2 อย่างละ 3 ชิ้น จากนั้นจึงนำชิ้นงานทั้งก่อนและหลังการประกอบชิ้นงานมาเก็บบันทึกภาพที่ระยะกึ่งกลางของช่องไมโครฟลูอิดิกตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.3 สุดท้ายจึงนำภาพที่ได้มาตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.4.1 และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระแก่กัน (Unpaired 2-Sample t-test) เพื่อการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างขนาดความกว้างของช่องที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยแรงกดระดับต่างๆ บนเนื้อพลาสติก PVC และพลาสติก PET



ภาพประกอบที่ 3-2 แบบร่างชิ้นงานสำหรับการตัดช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดแบบฮาล์ฟคัท

แผนการทดลองที่ 2 การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ตามการออกแบบด้วยวิธีการตัดแบบโคคัทเป็นการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดเนื้อวัสดุที่ไม่ต้องการออกไปเพื่อสร้างพื้นที่ว่างสำหรับใช้เป็นช่องไมโครฟลูอิดิก การสร้างช่องด้วยวิธีการนี้จะต้องใช้ระดับแรงกดที่สามารถตัดแผ่นพลาสติกใสได้ขาดสมบูรณ์ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากผลการทดลองที่ 1 การทดลองนี้ศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อขนาดของช่องจาก 2 ปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยจากการออกแบบ และปัจจัยจากแนวแกนที่ใช้ตัด ปัจจัยจากการออกแบบในที่นี้ใช้การออกแบบช่องทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาดความกว้างตั้งแต่ 50 ถึง 500 ไมโครเมตรแล้วตัดลงไปบนเนื้อวัสดุ โดยแต่ละช่องมีความยาว 10 มิลลิเมตรตามแบบร่างในภาพประกอบที่ 3-3 โดยงานวิจัยนี้แบ่งขนาดความกว้างเป็น 6 ชุด ได้แก่ 50 100 200 300 400 และ 500 ไมโครเมตร สำหรับปัจจัยจากแนวแกนตัดจะประกอบไปด้วย 2 แนวแกนตัด

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยใช้การตัดชิ้นงานตามแนวแกนนอนและแนวแกนตั้งของเครื่องตัด จากการออกแบบการทดลองจะได้กลุ่มการทดลองทั้งหมด 12 กลุ่ม แต่ละกลุ่มการทดลองจะนำมาสร้างชิ้นงานเพื่อใช้ในการตรวจสอบอย่างละ 3 ชิ้น จากนั้นจึงนำชิ้นงานทั้งก่อนและหลังการประกอบชิ้นงานมาเก็บบันทึกภาพที่บริเวณกึ่งกลางช่องไมโครฟลูอิดิกตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.3 สุดท้ายจึงนำข้อมูลภาพมาตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.4.1 แล้วทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Unpaired 2-Sample t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกที่เกิดขึ้นจากการตัดตามแนวแกนนอนและแนวแกนตั้ง



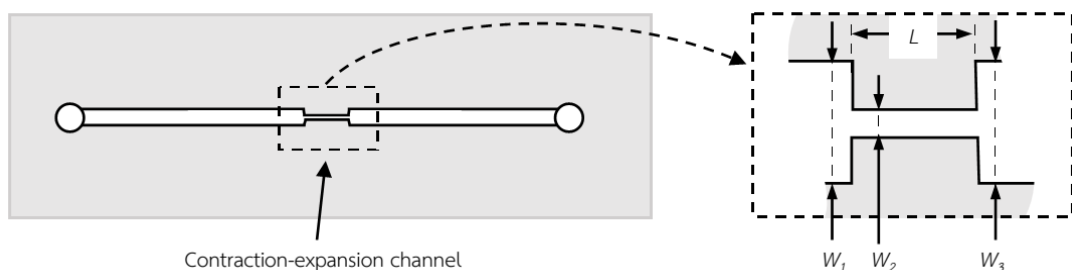
ภาพประกอบที่ 3-3 แบบร่างชิ้นงานสำหรับการตัดช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยวิธีการตัดแบบได้คัท

3.1.2 การทดลองเพื่อศึกษาวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์

การทดลองในกลุ่มนี้ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การทดลองเพื่อศึกษาวิธีการขยายชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตร และการทดลองเพื่อศึกษาวิธีการขยายชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร โดยการทดลองทั้งหมดใช้งานตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคซึ่งจัดเก็บโดยหน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิตของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้งานจะมีอายุการเก็บมาแล้วอย่างน้อย 1 วันเนื่องจากเป็นเลือดเก็บไว้สำรองเพื่อการสอบทวนของห้องปฏิบัติการ ข้อมูลจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าตัวอย่างเลือดในช่วง 3 วันโดยเริ่มนับจากวันที่จัดเก็บจะมีระดับความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินลดลงไม่เกินร้อยละ 2 และมีความหนืดอยู่ในระดับปกติ [52] งานวิจัยนี้จึงถือว่าตัวอย่างเลือดในช่วง 3 วันหลังจากการจัดเก็บเป็นตัวอย่างเลือดที่มีคุณสมบัติเทียบเท่ากับตัวอย่างเลือดในวันที่ทำการจัดเก็บ การทดลองทั้งหมดจึงจำเป็นต้องดำเนินการภายใน 2 วันหลังจากได้รับเลือดจากหน่วยคลังเลือด

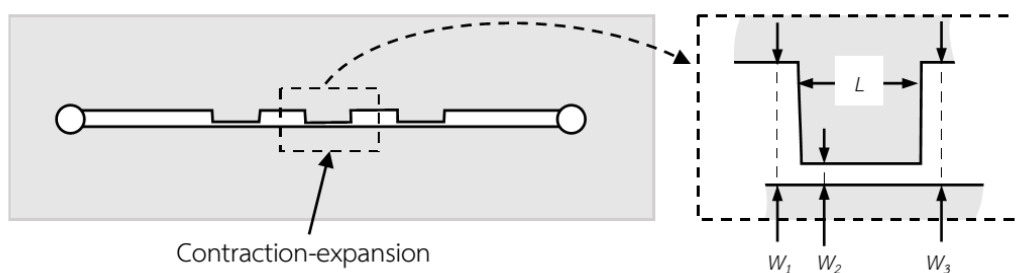
แผนการทดลองที่ 3 การศึกษาวิธีขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตร การทดลองนี้ได้ออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกให้มีการบีบตัวและขยายตัวในลักษณะเดียวกับการศึกษาของ Faivre และคณะ [42] การทดลองจะพิจารณาอิทธิพลที่มีผลต่อการขยายตัวของชั้นปราศจากเซลล์โดยเปรียบเทียบจาก 2 ปัจจัยหลัก คือ อัตราส่วนระหว่างความกว้างของช่องบีบตัวต่อช่องขยายตัว (W_2/W_3) และอัตราการไหล (Flow rate) ของตัวอย่างเลือด อิทธิพลจากอัตราส่วนระหว่างความกว้างของช่องบีบตัวต่อช่องขยายตัวควบคุมด้วยการออกแบบช่องให้มีอัตราส่วนแตกต่างกัน 3 ชุด คือ 0.10 0.15 และ 0.20 โดยใช้ช่องขยายตัว (W_3) ที่มีความกว้าง 1000 650 และ 500 ไมโครเมตรตามลำดับ สำหรับช่องบีบตัวนั้นจะมีขนาดความกว้าง (W_2) เท่ากับ 100 ไมโครเมตรและมีความยาว (L) 1000 ไมโครเมตรดั่งแบบร่างชิ้นงานในภาพประกอบที่ 3-4 จากนั้นจึงเตรียมชิ้นงานจากรูปแบบช่องไมโครฟลูอิดิกทั้ง 4 แบบ แบบละ 3 ชิ้นงาน ดังนั้นการทดลองนี้ต้องใช้ชิ้นงานทั้งหมด 12 ชิ้นงาน จากนั้นนำชิ้นงานทั้งหมดมาทดสอบการไหลด้วยตัวอย่างเลือดที่อัตราการไหลตั้งแต่ 50 100 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตรต่อนาทีจากการออกแบบการทดลองจะได้กลุ่มการทดลองทั้งหมด 24 กลุ่ม และทุกกลุ่มการทดลองถูกนำมาทดสอบการไหลโดยใช้ตัวอย่างเลือดที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำเกลือ (Normal saline solution : NSS 0.9% Sodium chloride) ที่อัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร ลักษณะการไหลและการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงในช่องไมโครฟลูอิดิกโดยเฉพาะที่บริเวณช่องบีบตัว-ขยายตัวจะถูกเก็บบันทึกเป็นภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวเพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.4.2 สุดท้ายจึงนำผลการตรวจสอบมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากอัตราส่วนระหว่างความกว้างของช่องบีบตัวต่อช่องขยายตัวและอัตราการไหลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

แผนการทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร การทดลองนี้ต้องการศึกษาวิธีการขยาย



ภาพประกอบที่ 3-4 แบบร่างช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตร

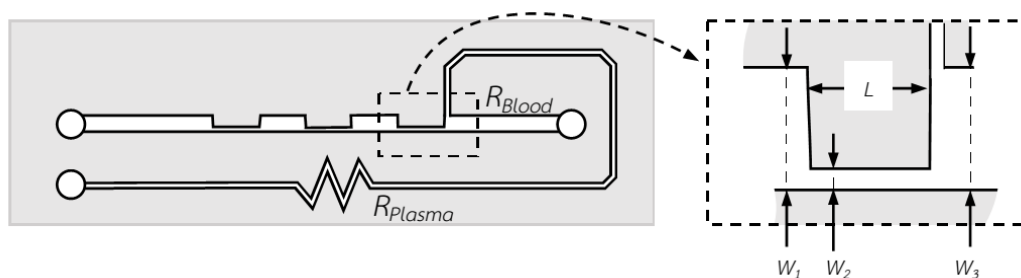
ชั้นปราศจากเซลล์ที่ด้านใดด้านหนึ่งของช่องเพื่อรองรับกรณีปัญหาการเกิดชั้นปราศจากเซลล์ที่ไม่สมมาตรซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในการทดลองที่ 3 โดยใช้การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกให้มีการบีบตัวและขยายตัวเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา แต่ปรับปรุงการจัดวางตำแหน่งของช่องบีบตัวและช่องขยายตัวให้เกิดความไม่สมมาตรดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-5 การเลือกใช้ขนาดความกว้างของช่องขยายตัว (W_3) จะเลือกจากรูปแบบที่สามารถขยายชั้นปราศจากเซลล์ได้ดีโดยอ้างอิงจากการทดลองที่ 3 สำหรับช่องบีบตัวจะมีขนาดความกว้าง (W_2) และความยาว (L) ของช่องเท่าเดิมที่ 100 และ 1000 ไมโครเมตรตามลำดับ การทดลองพิจารณาอิทธิพลที่มีผลต่อขนาดของชั้นปราศจากเซลล์โดยเปรียบเทียบจาก 2 ปัจจัย คือ ลำดับอนุกรม (Step) ของช่องบีบตัว-ขยายตัว และอัตราการไหล การทดลองนี้ได้ออกแบบให้ช่องบีบตัว-ขยายตัวต่ออนุกรมกันเป็นจำนวน 5 ลำดับในชิ้นงานเดียวกันเพื่อศึกษาอัตราการขยายตัวของชั้นปราศจากเซลล์ที่อนุกรมลำดับต่างๆ จากนั้นจึงเตรียมชิ้นงานขึ้นมา 3 ชิ้น เพื่อนำมาทดสอบการไหลที่อัตราการไหลระดับต่างๆ โดยแบ่งอัตราการไหลเป็น 6 ระดับเช่นกัน ได้แก่ 50 100 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตรต่อนาที จากการออกแบบการทดลองจะได้กลุ่มการทดลองทั้งหมด 30 กลุ่ม ทุกกลุ่มการทดลองถูกนำมาทดสอบการไหลโดยใช้ตัวอย่างเลือดที่มีการเจือจางด้วยน้ำเกลือ (Normal saline solution : NSS 0.9% Sodium chloride) ที่อัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร ลักษณะการไหลและการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่บริเวณต่างๆ ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกจะถูกเก็บบันทึกเป็นภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวเพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.4.2 สุดท้ายจึงนำผลการตรวจสอบมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากลำดับอนุกรมของช่องบีบตัว-ขยายตัวและอัตราการไหลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)



ภาพประกอบที่ 3-5 แบบร่างช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร

3.1.3 การทดลองเพื่อคัดแยกน้ำเลือดด้วยช่องไมโครฟลูอิดิก

การทดลองนี้เป็นการต่อยอดจากการทดลองที่ผ่านมาเพื่อปรับปรุงและออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับใช้คัดแยกน้ำเลือด ในงานนี้จะต้องมีการออกแบบช่องทางไหลของน้ำเลือด (Plasma Channel) เพิ่มเติมเข้ามาในระบบดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-6 การออกแบบช่องทางไหลของน้ำเลือดจำเป็นต้องพิจารณาสัดส่วนความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกแต่ละบริเวณร่วมกัน จากการคำนวณค่าความต้านทานภายในช่องไมโครฟลูอิดิกของงานวิจัยต่างๆ ด้วยสมการที่ 2.21 พบว่าค่าความต้านทานในช่องคัดแยกน้ำเลือด (R_{Plasma}) มีค่ามากกว่าความต้านทานภายในช่องทางออกหลักของเลือด (R_{Blood}) ประมาณ 50 เท่า [26], [44] ข้อมูลในภาคผนวก ข. ได้แสดงรายละเอียดผลการคำนวณค่าความต้านทานภายในช่องต่างๆ ของการออกแบบในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและการออกแบบในงานวิจัยนี้ จากนั้นจึงเตรียมชิ้นงานตามรายละเอียดการออกแบบจำนวน 3 ชุดเพื่อใช้ในการทดสอบคัดแยกน้ำเลือด โดยเลือดใช้อัตราการไหลที่ให้ผลการขยายชั้นปราศจากเซลล์ได้ดีอ้างอิงจากผลการทดลองที่ผ่านมา ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลองมีการเจือจางด้วยน้ำเกลือ (Normal saline solution : NSS 0.9% Sodium chloride) เป็นอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตรเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา การเก็บตัวอย่างน้ำเลือดที่คัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกจะจัดเก็บครั้งละ 2 นาที่ เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปคำนวณปริมาณและตรวจนับจำนวนเซลล์ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.4.3 และ 3.4.4 ตามลำดับ

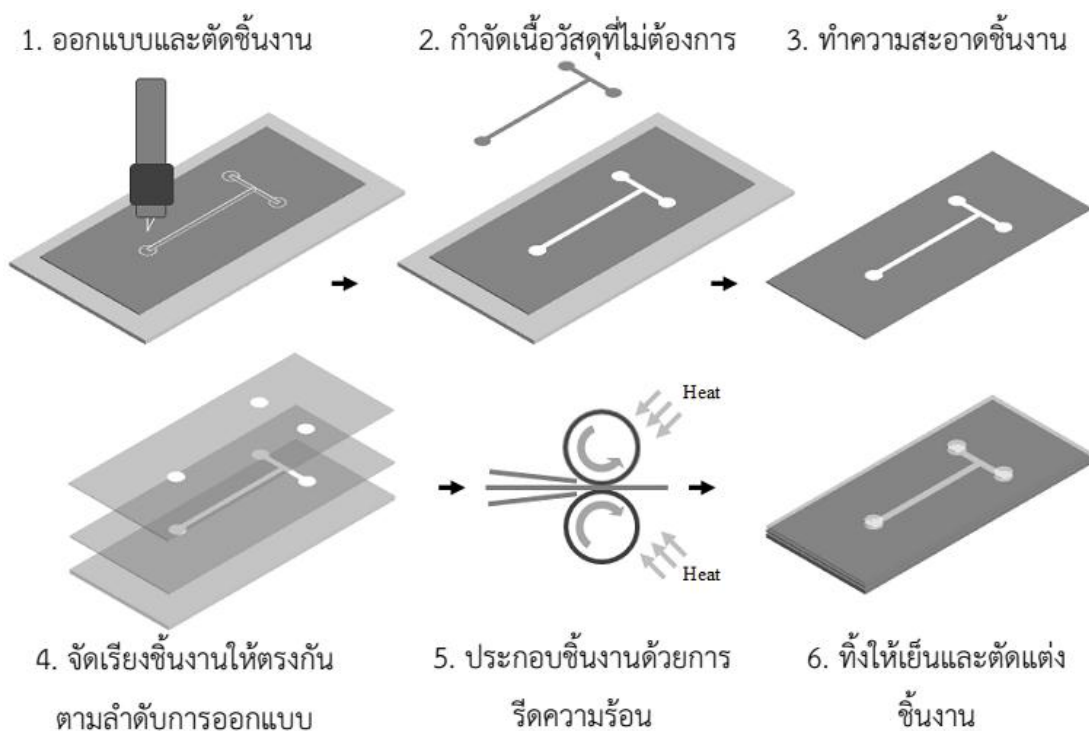


ภาพประกอบที่ 3-6 แบบร่างช่องไมโครฟลูอิดิกเพื่อใช้คัดแยกน้ำเลือด

3.2 การสร้างชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิกต้นแบบ

การสร้างชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิกนั้นมีหลายวิธีการดังได้กล่าวไว้ในบททบทวนวรรณกรรม การใช้เครื่องตัดพลาสมาสร้างชิ้นงานต้นแบบเป็นวิธีการที่มีต้นทุนต่ำและมีความคล่องตัวในการออกแบบ โดยมีปัจจัยพื้นฐานที่ต้องพิจารณา ได้แก่ วัสดุตัด (Cutting Material) ใบมีดตัด (Blade) การเลือกใช้แผ่นรองตัดกับวัสดุยึดจับชิ้นงาน (Cutting Mat) และการประกอบชิ้นงาน

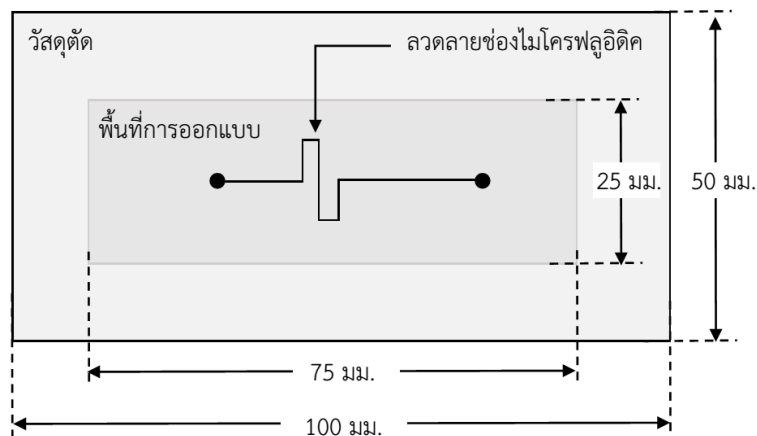
สำหรับกรรมวิธีการสร้างชิ้นงานต้นแบบโดยใช้เครื่องตัดพลาสมาประกอบไปด้วย 6 ขั้นตอนสำคัญดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-7 เริ่มจากการออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์แล้วส่งตัดลงบนวัสดุด้วยเครื่องตัดพลาสมา การตัดแต่ละชิ้นงานจะใช้เวลาประมาณ 1 นาทีหากรูปแบบช่องไม่ซับซ้อนจนเกินไป จากนั้นให้กำจัดหรือลอกส่วนเนื้อวัสดุที่ไม่ต้องการออกด้วยเทปกาวจะได้ชิ้นงานที่มีรูปแบบช่องไมโครฟลูอิดิกตามการออกแบบ ต่อมาจึงนำชิ้นงานแต่ละชิ้นไปตรวจสอบขนาดตามรายละเอียดการตรวจสอบในหัวข้อที่ 3.4.1 กระบวนการนี้ใช้เวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงนำชิ้นงานมาซ้อนเรียงให้ตรงกันตามลำดับการออกแบบแล้วนำเข้าสู่กระบวนการประกอบชิ้นงานให้ยึดติดกันด้วยวิธีการรีดความร้อน สุดท้ายจึงชิ้นงานไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและตัดแต่งชิ้นงานก็จะได้ชิ้นงานที่มีช่องไมโครฟลูอิดิกที่สมบูรณ์สามารถใช้งานได้จริง กระบวนการนี้ใช้เวลาอีกประมาณ 2 ถึง 3 นาที จากกระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมาทำให้สามารถสร้างชิ้นงานต้นแบบของระบบไมโครฟลูอิดิกได้เสร็จสมบูรณ์ภายใน 10 นาที โดยไม่นับรวมระยะเวลาในการออกแบบ การสร้างชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิกต้นแบบด้วยเครื่องตัดพลาสมาจึงสะดวกรวดเร็ว มีอิสระในการออกแบบชิ้นงาน และมีต้นทุนด้านเครื่องมือและวัสดุไม่สูงจนเกินไป



ภาพประกอบที่ 3-7 กรรมวิธีการสร้างชิ้นงานระบบไมโครฟลูอิดิกโดยใช้เครื่องตัดพลาสมา

3.2.1 การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

งานวิจัยนี้เลือกใช้งานเครื่องตัด 2 รุ่นด้วยกันคือ เครื่องตัด Silhouette Cameo® ซึ่งเป็นเครื่องตัดขนาดเล็กแบบตั้งโต๊ะ และเครื่องตัด Graphtec CE6000-60 ซึ่งเป็นเครื่องตัดขนาดกลาง เครื่องตัดทั้งสองรุ่นมีซอฟต์แวร์ควบคุมเครื่องตัดโดยเฉพาะคือ Silhouette Studio® และ Graphtec Studio® ตามลำดับ การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สามารถเลือกใช้ซอฟต์แวร์สำหรับช่วยเขียนแบบที่รองรับการบันทึกเอกสารในรูปแบบที่ซอฟต์แวร์ควบคุมเครื่องตัดรองรับ เช่น เอกสาร AutoCAD Interchange ซึ่งจะมีนามสกุลเอกสารเป็น .dxf เป็นต้น สำหรับซอฟต์แวร์ควบคุมเครื่องตัดทั้งสองรุ่นล้วนรองรับการใช้งานเอกสาร AutoCAD Interchange และมีลักษณะการใช้งานที่คล้ายกัน การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกในงานวิจัยนี้เลือกใช้งานซอฟต์แวร์ Solid Edge 2D ช่วยในการเขียนแบบเนื่องจากผู้พัฒนาอนุญาตให้ใช้งานได้ฟรีและมีเครื่องมือช่วยในการเขียนแบบเทียบเท่ากับซอฟต์แวร์ช่วยเขียนแบบอื่นๆ รูปแบบช่องไมโครฟลูอิดิกจะถูกออกแบบภายในพื้นที่ขนาด 75×25 ตารางมิลลิเมตรดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-8 ซึ่งเป็นขนาดเดียวกันกับแผ่นกระจกสไลด์เพื่อให้ง่ายต่อการใช้งานร่วมกับกล้องจุลทรรศน์



ภาพประกอบที่ 3-8 วัสดุตัดและพื้นที่การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิก

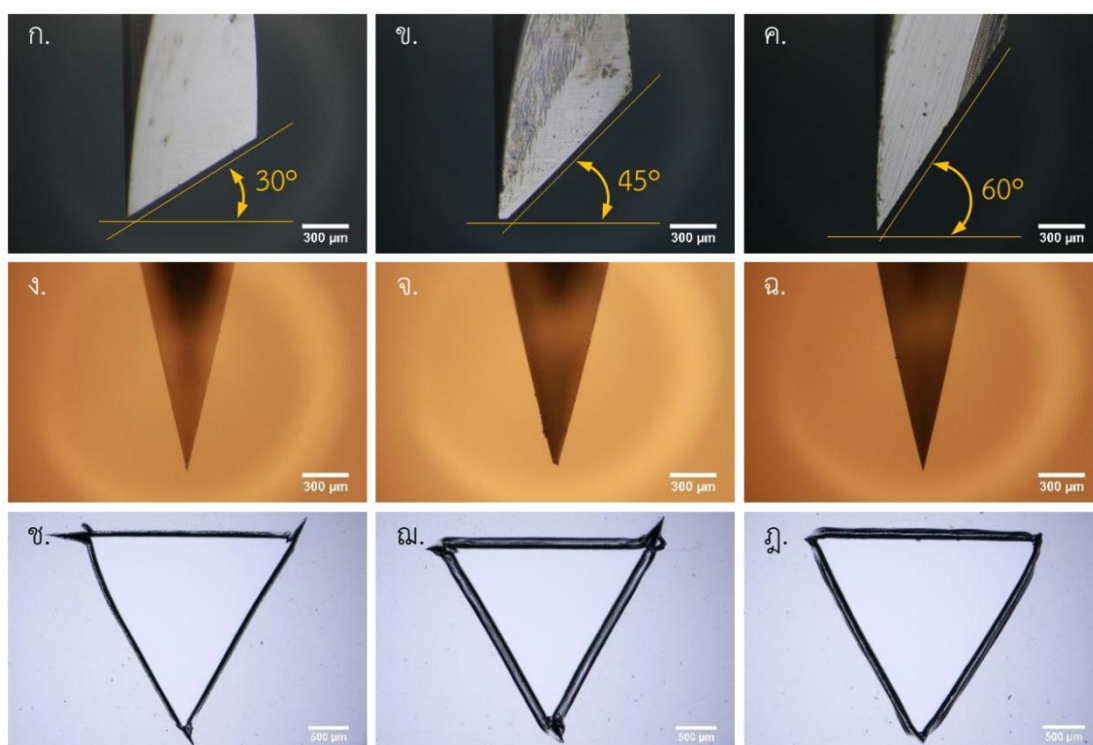
3.2.2 การเตรียมวัสดุตัด (Cutting Material)

วัสดุตัดหรือวัสดุที่ใช้ในการสร้างชิ้นงานในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เลือกใช้แผ่นพลาสติกใสที่มีความหนาประมาณ 100 ไมโครเมตรซึ่งสามารถหาซื้อได้ง่ายสองชนิด คือ แผ่นใสสำหรับการเขียนที่ผลิตจากพลาสติก PVC และแผ่นใสสำหรับถ่ายเอกสารที่ผลิตจากพลาสติก PET แผ่นวัสดุตัด

ต้องจัดเตรียมให้มีขนาดใหญ่กว่าพื้นที่การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิก โดยตัดแบ่งแผ่นใสเป็นแผ่นขนาดเล็กประมาณ 100×50 มิลลิเมตรดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-8 แผ่นใสขนาด A4 จำนวน 1 แผ่นราคาประมาณ 3-4 บาทจะสามารถตัดแบ่งเป็นวัสดุตัดได้ 12 ชิ้น ดังนั้นต้นทุนด้านวัสดุตัดจึงลดลงเหลือประมาณ 0.3 บาทต่อชิ้น การสร้างชิ้นงานต้นแบบที่ต้องใช้แผ่นพลาสติก PVC หรือ PET จำนวน 1 ชิ้น ประกอบกับพลาสติกเคลือบบัตรอีก 1 ชุดจะมีต้นทุนของวัสดุทั้งหมดประมาณ 0.6 บาทเท่านั้น

3.2.3 การเลือกใช้ใบมีด (Blade)

ใบมีดเป็นอุปกรณ์หลักในการตัดชิ้นงานของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ โดยทั่วไปเครื่องตัดพล็อตเตอร์จะรองรับการใช้งานใบมีดหลายรูปแบบรวมถึงการเปลี่ยนไปใช้งานปากกาแทนใบมีดสำหรับงานวาดภาพ ใบมีดตัดที่มีใช้งานทั่วไปมีมุมปลายมีดที่แตกต่างกันทำให้เกิดองศาการตัดวัสดุที่ต่างกัน ใบมีดตัดโดยส่วนใหญ่มีมุมตัดอยู่ 3 ลักษณะคือ 30 องศา 45 องศา และ 60 องศา ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-9



ภาพประกอบที่ 3-9 ลักษณะใบมีดตัดและผลการตัดของใบมีดที่มีมุมตัด 30 องศา 45 องศา และ 60 องศา พร้อมมุมมองจากด้านข้างของใบมีดแต่ละชนิด (ก. - ค.) มุมมองจากด้านหน้าของใบมีดแต่ละชนิด (ง. - ฉ.) และผลการตัดของใบมีดแต่ละชนิด (ช. - ฎ.)

กรณีที่ต้องการตัดชิ้นงานที่มีขนาดเล็กนิยมเลือกใช้ใช้งานใบมีดที่ทำมุม 60 องศากับวัสดุเพื่อช่วยลดรอยตัดส่วนเกินอันเกิดจากคมมีดดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-9 ข. ฉ. และ ก. ตามลำดับ การสร้างชิ้นงานในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีการใช้งานใบมีดที่ทำมุม 45 องศาในกรณีที่ใช้เครื่องตัด Silhouette Cameo® เนื่องจากเป็นชุดใบมีดเพียงชนิดเดียวที่มีจำหน่ายในท้องตลาด แต่สำหรับเครื่องตัด Graphtec CE6000-60 นั้นเลือกใช้ใช้งานใบมีดที่ทำมุม 60 องศา

3.2.4 การเลือกใช้แผ่นรองตัดและวัสดุยึดจับชิ้นงาน (Cutting Mat)

แผ่นรองตัดและวัสดุยึดจับชิ้นงานมีหน้าที่ช่วยตรึงวัสดุตัดให้อยู่ในตำแหน่งตัดและป้องกันการเสีรूपของวัสดุในระหว่างขั้นตอนการตัด แผ่นรองตัดควรเป็นวัสดุที่บดแสงและมีความแข็งแรงมากกว่าวัสดุตัด การเป็นวัสดุที่บดแสงจะช่วยให้ระบบตรวจวัดของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ที่อาศัยแสงเลเซอร์สามารถตรวจสอบพื้นที่ตัดได้ นอกจากนี้ความแข็งของแผ่นรองตัดจะช่วยรองรับวัสดุตัดไม่ให้เกิดการโก่งงอและช่วยรองรับใบมีดไม่ให้กระแทกกับแท่นรองของเครื่องตัดโดยตรง วัสดุยึดจับชิ้นงานเป็นอีกหนึ่งส่วนที่มีความสำคัญในการช่วยตรึงวัสดุตัดให้อยู่บนแผ่นรองตัดโดยไม่โก่งงอ งานวิจัยนี้เลือกใช้เทปกาวสองหน้าร่วมกับเทปกระดาษเป็นวัสดุยึดจับชิ้นงานร่วมกัน โดยเทปกาวสองหน้าใช้ในการตรึงเทปกระดาษกับแผ่นรองตัดให้ยึดติดกัน ดังนั้นเทปกาวสองหน้าจึงควรมีความสามารถในการยึดเกาะสูงเพื่อป้องกันการโก่งงอและการเลื่อนตำแหน่งของชิ้นงาน งานวิจัยนี้เลือกใช้งานเทปกาวสองหน้า 3M รหัส 300 LSE ซึ่งสามารถยึดเกาะผิวแก้วด้วยแรง 102–113 นิวตันต่อหนึ่งร้อยมิลลิเมตร (N/100 mm) เทปกระดาษ 3M รหัส #888 ทำหน้าที่ตรึงวัสดุตัดกับเทปกาวสองหน้าบนแผ่นรองตัด การใช้เทปกระดาษช่วยตรึงวัสดุตัดมีความเหมาะสมกว่าการใช้เทปกาวสองหน้าเนื่องจากเทปกระดาษมีความสามารถในการลอกออกได้โดยไม่ทิ้งคราบและไม่มียึดติดชิ้นงานแข็งแรงจนเกินไปทำให้สะดวกในการลอกชิ้นงานและสามารถกำจัดเนื้อวัสดุที่ไม่ต้องการได้ง่าย

3.2.5 การยึดประกอบชิ้นงาน (Chip Bonding)

การยึดประกอบชิ้นงานเป็นการนำแผ่นชิ้นงานในลำดับชั้นต่างๆ มาประกอบยึดติดกันจนก่อให้เกิดช่องไมโครฟลูอิดิกที่สมบูรณ์สามารถนำไปใช้งานได้ งานวิจัยนี้เลือกใช้งานแผ่นเคลือบความร้อน (Laminating Films) เป็นวัสดุยึดประกอบชิ้นงาน โดยใช้เป็นแผ่นปิดชั้นนอกสุดทั้งสองด้านของแผ่นชิ้นงาน ก่อนทำการยึดประกอบชิ้นงานจะต้องจัดวางแนวชิ้นงานในแต่ละชั้นให้มีความตรงกัน จากนั้นจึงนำชิ้นงานที่จัดเรียงเรียบร้อยแล้วมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C

ด้วยเครื่องรีดความร้อน (FGK-320 Laminator) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-10 หากชิ้นงานที่ ออกแบบมีจำนวนชิ้นงานประกอปกันมากกว่า 3 ชิ้นขึ้นไปจำเป็นต้องจัดแบ่งลำดับการรีดความร้อน เนื่องจากการรีดความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C นั้นเหมาะสำหรับการรีดความร้อนแผ่นพลาสติกที่ซ้อน กันไม่เกิน 3 ชั้นโดยนับรวมแผ่นเคลือบความร้อนด้วย ดังนั้นหากมีจำนวนชิ้นงานมากกว่า 3 ชิ้น จะต้องรีดความร้อนไปที่ละคู่จนครบจำนวนชั้นที่ออกแบบ การใช้แผ่นกระดาษห่อหุ้มชิ้นงานก่อนการ รีดความร้อนช่วยให้ชิ้นงานมีความโปร่งใสที่ดีเพราะกระดาษช่วยป้องกันไม่ให้อุณหภูมิความร้อน โดยตรง ด้วยขั้นตอนการประกอบชิ้นงานทั้งหมดทำให้การประกอบชิ้นงานชิปไมโครฟลูอิดิกทำได้ ง่ายและรวดเร็ว



ภาพประกอบที่ 3-10 เครื่องเคลือบบัตร FGK-320 สำหรับการประกอบชิ้นงานด้วยการรีดความร้อน

3.3 การบันทึกภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวเพื่อใช้ในการตรวจสอบ

การทดลองครั้งนี้เลือกใช้งานกล้องดิจิทัลชนิดถอดเปลี่ยนเลนส์ได้ (Digital single-lens reflex camera : DSLR) จำนวน 2 รุ่น เพื่อใช้ในการเก็บบันทึกภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวผ่าน กล้องจุลทรรศน์ (CKX-41 Olympus) ได้แก่ กล้อง Nikon D90 และกล้อง Canon EOS 7D Mark II ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-11 การใช้กล้องดิจิทัลร่วมกับกล้องจุลทรรศน์ในการเก็บบันทึกภาพ นั้นไม่ได้เก็บบันทึกภาพผ่านเลนส์ของผู้ผลิตโดยตรงทำให้ไม่สามารถปรับค่ารับแสงได้ แต่ในกรณีนี้ สามารถควบคุมแหล่งกำเนิดแสงของกล้องจุลทรรศน์ให้เปล่งแสงที่สว่างมากหรือน้อยได้ตามต้องการ นอกจากนี้การใช้งานกล้อง DSLR จะสามารถปรับค่าความเร็วชัตเตอร์ (Shutterspeed) และค่า ความไวต่อแสง (ISO) ในการถ่ายภาพได้เช่นเดียวกับการใช้งานกล้อง DSLR โดยทั่วไป ดังนั้นผู้ใช้งาน สามารถปรับค่าความเร็วชัตเตอร์และค่าความไวต่อแสงเพื่อการเก็บบันทึกภาพได้ตามต้องการ แต่

กล้องทั้งสองมีความสามารถที่ต่างกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งความแตกต่างด้านความละเอียดของภาพ ซึ่งกล้อง Nikon D90 จะมีความละเอียดของภาพอยู่ที่ 12.9 ล้านพิกเซล และกล้อง Canon EOS 7D Mark II มีความละเอียดของภาพอยู่ที่ 20.2 ล้านพิกเซล งานวิจัยนี้จึงใช้งานกล้องดิจิทัลทั้งสองเพื่อเก็บบันทึกภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์เท่านั้นไม่ต้องการเปรียบเทียบความสามารถของกล้อง รายละเอียดการเก็บบันทึกภาพเพื่อใช้ในการวิจัยจึงสามารถสรุปได้ดังนี้



ก. กล้อง Nikon D90



ข. กล้อง Canon EOS 7D Mark II



ค. การนำกล้อง DSLR มาใช้ร่วมกับ กล้องจุลทรรศน์

ภาพประกอบที่ 3-11 การใช้กล้องดิจิทัลร่วมกับกล้องจุลทรรศน์ในการเก็บบันทึกภาพ

3.3.1 การเก็บบันทึกภาพด้วยกล้อง Nikon D90

การนำกล้อง Nikon D90 มาใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์จะต้องใช้งานกล้องในโหมดควบคุมด้วยมือ (Manual Mode : M) เท่านั้น และเพื่อการบันทึกภาพที่มีคุณภาพสูงให้ปรับค่าการบันทึกภาพเป็นไฟล์ JPEG ที่มีขนาดใหญ่ (สัญลักษณ์ L) จะได้ภาพที่มีขนาด 4,288 × 2,848 พิกเซล หรือ 12.9 ล้านพิกเซล งานวิจัยนี้ได้ใช้กล้อง Nikon D90 ในการเก็บบันทึกภาพหนึ่งของการทดลองบางส่วนโดยใช้รูปแบบไฟล์ภาพมาตรฐาน (Standard Picture Style) ในการเก็บภาพ ภาพถ่ายที่ได้จะนำมาใช้ในการตรวจวัดขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิคโดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนระหว่างจำนวนพิกเซลต่อระยะทางดังแสดงในตารางที่ 3-1 การตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องจากภาพถ่ายด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ จะอธิบายรายละเอียดวิธีการตรวจสอบไว้ในหัวข้อที่ 3.4.1

ตารางที่ 3-1 จำนวนพิกเซลต่อระยะทางของภาพจากกล้อง Nikon D90

กำลังขยายของเลนส์วัตถุ	จำนวนพิกเซลต่อระยะทาง (pixel/um)
4x	0.867
10x	2.060
20x	4.160
40x	8.240

3.3.2 การเก็บบันทึกภาพด้วยกล้อง Canon EOS 7D Mark II

การนำกล้อง Canon EOS 7D Mark II มาใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์จะต้องใช้งานกล้องในโหมดควบคุมด้วยมือ (Manual Mode : M) เช่นเดียวกัน และเพื่อการบันทึกภาพที่มีคุณภาพสูงให้ปรับค่าการบันทึกภาพเป็นไฟล์ JPEG ที่มีขนาดใหญ่ (สัญลักษณ์ L) ซึ่งจะได้ภาพถ่ายที่มีขนาดภาพเป็น 5,472 x 3,648 พิกเซลหรือ 20.2 ล้านพิกเซล งานวิจัยได้ใช้กล้อง Canon EOS 7D Mark II ในการเก็บบันทึกภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวโดยใช้รูปแบบไฟล์ภาพที่ได้ทำการปรับปรุงโดยเฉพาะ (Custom Picture Style) ในการเก็บภาพ การเก็บบันทึกภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวเพื่อการวิจัยแบ่งเป็นสองรูปแบบ คือ การบันทึกภาพที่ความเร็วชัตเตอร์ต่ำซึ่งใช้ค่าความเร็วชัตเตอร์ 1/20 ถึง 1/60 วินาที และการบันทึกภาพที่ความเร็วชัตเตอร์สูงซึ่งใช้ค่าความเร็วชัตเตอร์ 1/2,000 ถึง 1/8,000 วินาที ภาพที่ได้จะนำมาใช้ในการตรวจวัดขนาดของช่องไมโครพลูอิดิกและขนาดของชั้นปราศจากเซลล์โดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนระหว่างจำนวนพิกเซลต่อระยะทางดังตารางที่ 3-2 การตรวจสอบขนาดความกว้างจะใช้งานซอฟต์แวร์ ImageJ ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.4.2

ตารางที่ 3-2 จำนวนค่าพิกเซลต่อระยะทางของภาพจากกล้อง Canon EOS 7D Mark II

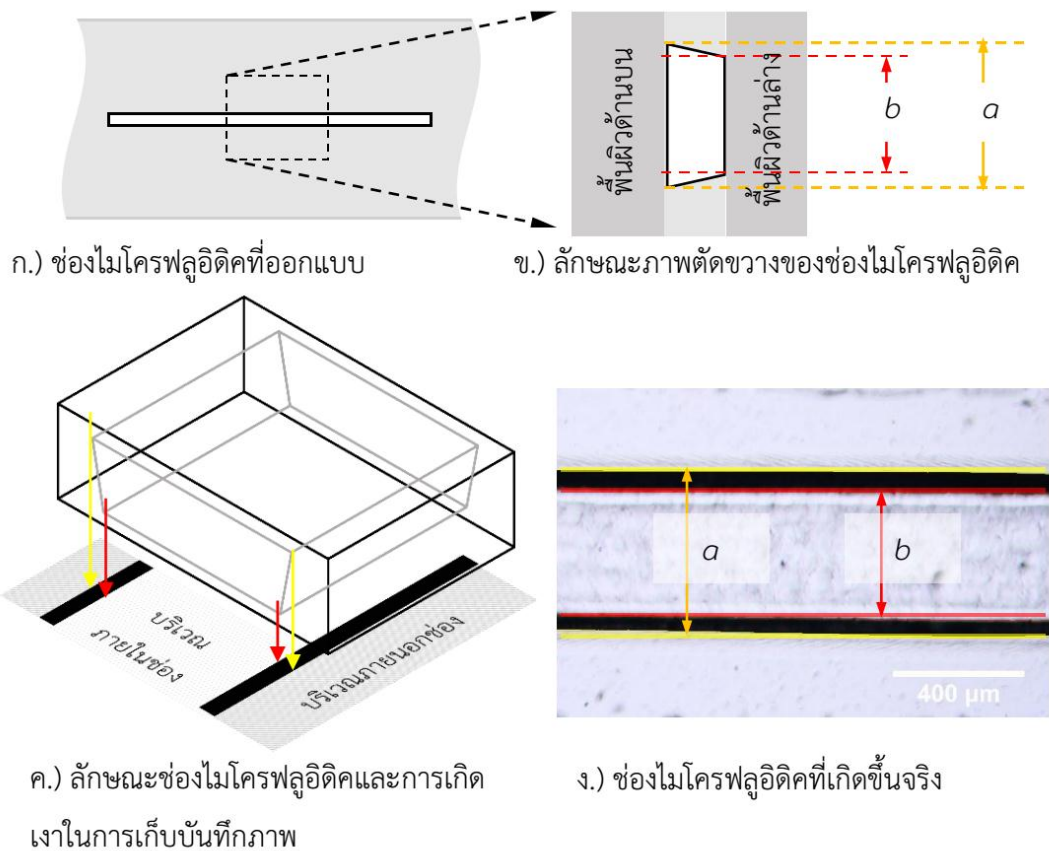
กำลังขยายของเลนส์วัตถุ	จำนวนพิกเซลต่อระยะทาง (pixel/um)
4x	1.160
10x	2.707
20x	5.600
40x	10.800

3.4 การตรวจวัดและการตรวจสอบข้อมูล

การตรวจวัดและการตรวจสอบข้อมูลต่างๆ จากการทดลองประกอบด้วย 4 รูปแบบ ได้แก่ การตรวจสอบขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยข้อมูลภาพ การตรวจสอบขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยข้อมูลภาพ การตรวจสอบปริมาณน้ำเลือดที่ได้จากการคัดแยกด้วยวิธีการชั่งน้ำหนัก และตรวจวัดระดับการปนเปื้อนของเซลล์ด้วยการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือด รายละเอียดของแต่ละวิธีการตรวจสอบสามารถสรุปได้ดังนี้

3.4.1 การตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ

การตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ นั้นเป็นการประมวลผลข้อมูลจากภาพถ่ายซึ่งได้จากวิธีการเก็บบันทึกภาพตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.3 เนื่องจากช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเครื่องตัดพลาสมาเตอร์นั้นมีรูปทรงคล้ายสี่เหลี่ยมคางหมูอันเนื่องมาจากลักษณะของใบมีดตัด จึงทำให้ภาพที่เก็บบันทึกได้มีเงาของผนังช่องปรากฏอยู่ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-12 การตรวจวัดขนาดจึงวัดความกว้างของช่องที่บริเวณผนังด้านนอกหรือพื้นผิวด้านบน (a) และหนึ่งด้านในหรือบริเวณพื้นผิวด้านล่าง (b) โดยอ้างอิงจากเงาภาพ การตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ สามารถสรุปได้ 7 ขั้นตอนดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-13 เริ่มจากเปิดภาพถ่ายด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ แล้วให้ทำการเลือกบริเวณช่องไมโครฟลูอิดิกที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นให้คัดลอกเป็นภาพใหม่โดยไม่ต้องบีบอัดภาพเพื่อคงจำนวนพิกเซลให้เท่ากับภาพต้นฉบับ ต่อมาจึงแปลงภาพที่คัดลอกไว้ให้เป็นภาพระดับสีเทาชนิด 8 บิต เพื่อใช้ในการประมวลผลภาพในขั้นตอนต่อไป ภาพ 8 บิตที่จะถูกนำมาพิจารณาบริเวณที่เป็นผนังช่องหรือเงาภาพโดยใช้หลักการขีดแบ่งค่าสีของภาพ (Threshold) โดยการขีดแบ่งค่าสีของภาพตามรูปแบบ Minimum (Minimum Threshold) สามารถใช้คัดแยกบริเวณที่เป็นผนังช่องออกจากบริเวณที่เป็นพื้นผิวพลาสติกได้ดี เมื่อผ่านการขีดแบ่งค่าสีจะได้ชุดข้อมูลใหม่เป็นภาพลักษณะฐานสอง (Binary Image) ที่มีความเข้มสีสองระดับ คือ ขาว และดำ ภาพลักษณะฐานสองที่ได้เป็นชุดข้อมูลหลักสำหรับการประมวลผลภาพ โดยให้คัดลอกเป็น 2 ชุดเพื่อใช้ในการหาตำแหน่งของผนังด้านบนหนึ่งชุดและผนังด้านล่างอีกหนึ่งชุด การหาตำแหน่งเงาของผนังด้านบนและด้านล่างจะใช้ส่วนเสริมชื่อ Analyze Stripes ของซอฟต์แวร์ ImageJ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการปรับแก้ชุดคำสั่งเล็กน้อยดังแสดงไว้ในภาคผนวก ง. ทั้งนี้เพื่อให้สามารถเก็บผลการตรวจวัดเป็นเอกสารประเภทสเปรดชีต (Spreadsheet) ที่มีนามสกุล .csv หรือ .xls ได้



ภาพประกอบที่ 3-12 ลักษณะภาพตัดขวางของช่องไมโครฟลูอิดิกและการเกิดเงาของผนังช่องในภาพถ่าย

3.4.2 การตรวจสอบขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ

การตรวจสอบขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ นั้นเป็นการประมวลผลข้อมูลจากภาพถ่ายซึ่งได้จากวิธีการเก็บบันทึกภาพตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.3 การตรวจวัดขนาดของชั้นปราศจากเซลล์มีพิจารณาอยู่ 4 บริเวณด้วยกัน ดังนี้ บริเวณใกล้ผนังด้านบนของช่องปลายน้ำ (A_1) บริเวณใกล้ผนังด้านล่างของช่องปลายน้ำ (A_2) บริเวณใกล้ผนังด้านบนของช่องขยายตัว (B_1) และบริเวณใกล้ผนังด้านล่างของช่องขยายตัว (B_2) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-14 จากการตรวจวัดขนาดของชั้นปราศจากเซลล์นั้นจะพิจารณาระยะจากผนังช่องไปถึงบริเวณที่มีเซลล์ปรากฏซึ่งจะมีสีแดงเข้มของเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเครื่องตัดพลาสมาเตอร์นั้นมีรูปทรงคล้ายสี่เหลี่ยมคางหมูทำให้ภาพที่เก็บบันทึกได้มีเงาของพื้นผิวด้านบนและเงาของพื้นผิวด้านล่างปรากฏอยู่ การพิจารณาดำเนินการของผนังช่องจะอ้างอิงจากค่าเฉลี่ยของตำแหน่ง

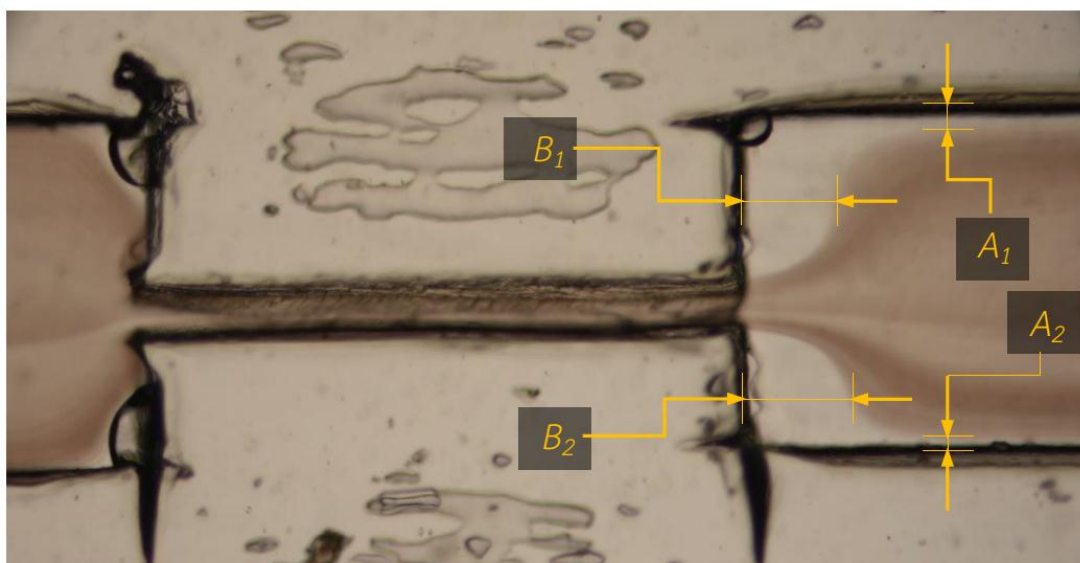
1. เลือกบริเวณที่ต้องการตรวจสอบ
2. คัดลอกเป็นภาพใหม่
3. แปลงเป็นภาพระดับสีเทา 8 บิต (8 bit grayscale image)
4. เทรสโฮลด์ภาพ (Threshold) ด้วยวิธีการ Minimum หรือ Moment แล้วคัดลอกเป็นภาพใหม่จำนวน 2 ภาพ
5. ตรวจสอบความกว้างของเงาด้านนอกโดยใช้ส่วนเสริม Analyze Stripes กับภาพที่ 1
6. ตรวจสอบความกว้างของเงาด้านในโดยใช้ส่วนเสริม Analyze Stripes กับภาพที่ 2
7. เก็บบันทึกค่าการตรวจสอบลงในเอกสาร Excel

	Area	Mean	StdDev	Min	Max	X	Y	Major	Minor	Angle
1	3145	577.468	11.209	561.508	628.894	1550.004	575.598	567.416	7.057	0.154
2	3112	1419.380	8.177	1386.638	1431.655	1556	1417.501	662.386	5.982	0.020

ภาพประกอบที่ 3-13 การตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิคด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ

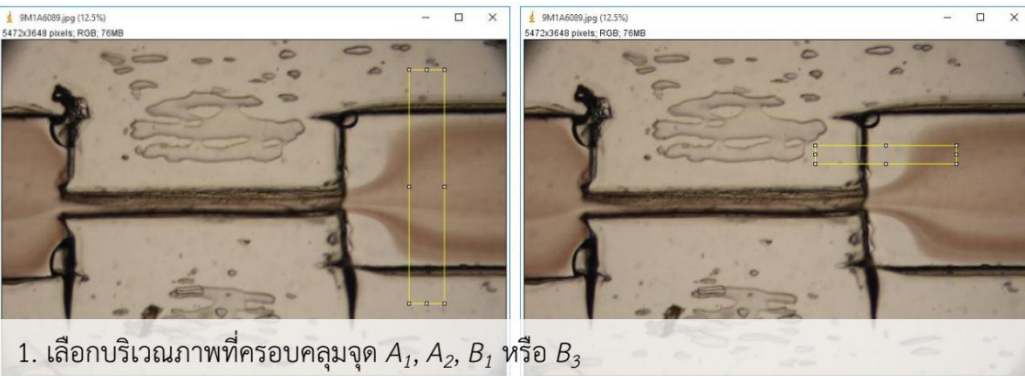
พื้นผิวด้านบนและพื้นผิวด้านล่าง การพิจารณาค่าแห่งของบริเวณที่มีเซลล์จะพิจารณาจากกลุ่มพิกเซลที่มีค่าสีที่ต่ำกว่าค่าสีของชั้นปราศจากเซลล์ ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้ค่าสีโดยเฉลี่ยของพื้นผิวด้านนอกช่องไมโครฟลูอิดิกเป็นค่าสีอ้างอิงสำหรับชั้นปราศจากเซลล์ เนื่องจากภาพชั้นปราศจากเซลล์ที่เก็บบันทึกได้มีค่าสีใกล้เคียงกับบริเวณพื้นผิวด้านนอก

การตรวจสอบขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ สามารถสรุปได้ 6 ขั้นตอนดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-15 เริ่มจากเปิดภาพถ่ายด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ แล้วเลือกบริเวณช่องไมโครฟลูอิดิกที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นคัดลอกเป็นภาพใหม่โดยไม่ต้องบีบอัดภาพเพื่อรักษาอัตราส่วนของจำนวนพิกเซลต่อระยะทางให้เท่าเดิมเหมือนกับภาพต้นฉบับ ต่อมาจึงทำการแปลงภาพที่คัดลอกไว้เป็นภาพระดับสีเทาชนิด 8 บิต เพื่อใช้ในการประมวลผลภาพในขั้นตอนต่อไป ภาพระดับสีเทาที่ได้จะถูกนำมาพิจารณาบริเวณที่เป็นผนังช่องโดยใช้หลักการขีดแบ่งค่าสีของภาพ (Threshold) ตามรูปแบบ Minimum (Minimum Threshold) ในการตัดแยกบริเวณที่เป็นผนังช่องออกจากบริเวณที่เป็นพื้นผิวพลาสติก เมื่อผ่านการขีดแบ่งค่าสีจะได้ชุดข้อมูลใหม่เป็นภาพลักษณะฐานสองที่มีความเข้มสีสองระดับ ข้อมูลภาพฐานสองนี้เป็นชุดข้อมูลหลักสำหรับการประมวลผลภาพ โดยให้คัดลอกเป็น 2 ชุดเพื่อใช้ในการหาตำแหน่งของผนังด้านบนหนึ่งชุดและตำแหน่งของบริเวณชั้นเซลล์อีกหนึ่งชุด การหาตำแหน่งของทั้งสองส่วนจะใช้ส่วนเสริมชื่อ Analyze Stripes ของซอฟต์แวร์ ImageJ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ปรับแก้ชุดคำสั่งเล็กน้อยดังแสดงไว้ในภาคผนวก ง. ทั้งนี้เพื่อให้สามารถเก็บผลการตรวจวัดเป็นเอกสารประเภทสเปรดชีทที่มีนามสกุล .csv หรือ .xls ได้



ภาพประกอบที่ 3-14 การพิจารณาชั้นปราศจากเซลล์ที่ตำแหน่งต่างๆ

1. เลือกบริเวณภาพที่ครอบคลุมจุด A_1, A_2, B_1 หรือ B_3 เพื่อใช้ในการตรวจสอบ
2. คัดลอกเป็นภาพใหม่
3. แปลงภาพเป็นภาพระดับสีเทา 8 บิต (8 bit grayscale image) แล้วคัดลอกเป็นภาพใหม่ จำนวน 2 ภาพ
4. ทำการเทรซโฮลด์ภาพที่ 1 ด้วยวิธีการ Mini-mum เพื่อตรวจสอบขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิก
5. ทำการเทรซโฮลด์ภาพที่ 2 ด้วยค่าเฉลี่ยสีของพื้นผิวด้านนอกช่องไมโครฟลูอิดิกเพื่อตรวจสอบความกว้างของบริเวณชั้นปราศจากเซลล์
6. เก็บบันทึกค่าการตรวจสอบลงในเอกสาร Excel



2. คัดลอก

3. ภาพระดับสีเทา

4. ตรวจสอบ

5. ตรวจสอบ

พื้นผิวด้านนอกช่องไมโครฟลูอิดิก

6. เก็บบันทึกค่าการตรวจสอบ

Area	Mean	StDev	Min	Max	X	Y	Major	Minor	Angle	
1	480	428.939	1.426	425.798	433.098	193.838	426.658	195.606	2.684	0.800
2	384	476.716	1.193	476.312	481.873	192	476.526	210.919	2.323	0.877

Area	Mean	StDev	Min	Max	X	Y	Major	Minor	Angle	
1	650	579.373	13.027	657.253	616.325	163.405	567.489	135.003	6.103	12.840
2	396	2087.942	23.557	2040.251	2122.680	167.169	2082.560	116.021	4.207	169.791

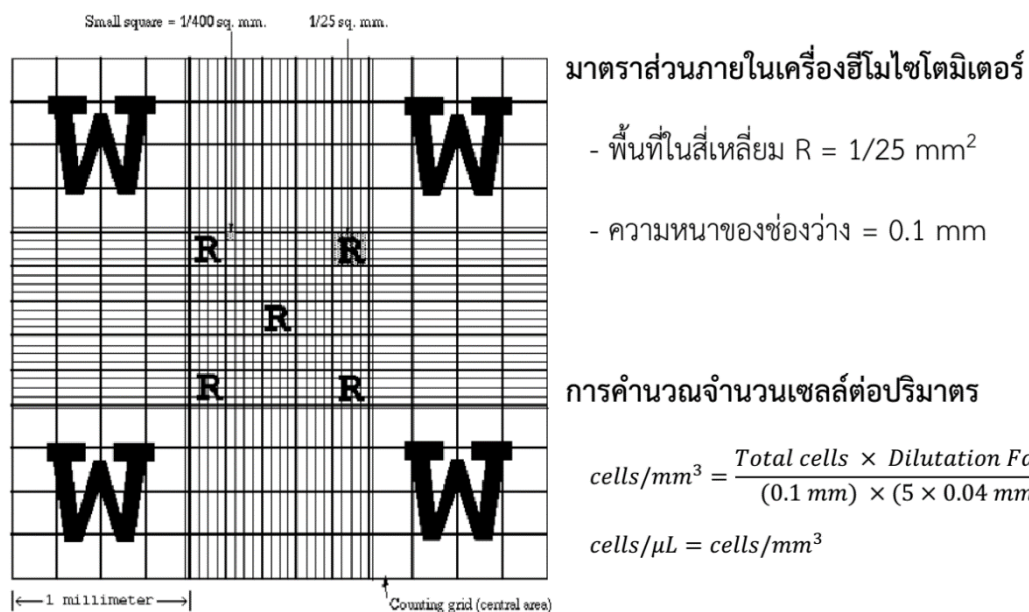
ภาพประกอบที่ 3-15 แผนภาพลำดับการตรวจสอบขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ

3.4.3 การตรวจสอบปริมาณน้ำเลือดที่ได้จากการคัดแยก

การตรวจสอบปริมาณน้ำเลือดที่ได้จากการคัดแยกใช้วิธีการเปรียบเทียบปริมาณต่อหน้าหนัก ก่อนการตรวจสอบจะต้องเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบ งานวิจัยนี้ใช้ข้อมูลการชั่งน้ำหนักของน้ำเลือดซึ่งได้จากวิธีการปั่นเหวี่ยงเป็นข้อมูลอ้างอิง น้ำเลือดที่ปริมาตรต่างๆ ตั้งแต่ 2 ถึง 30 ไมโครลิตร ได้จัดเตรียมปริมาตรละ 3 ตัวอย่าง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยตาชั่งสารที่อ่านค่าทศนิยม 3 ตำแหน่งได้ ข้อมูลที่ได้นำมาเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในการตรวจสอบปริมาณน้ำเลือดที่แสดงไว้ในภาคผนวก ค. ข้อมูลปริมาณน้ำเลือดที่ได้จากการคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิก จะนำมาใช้ประเมินผลอัตราการคัดแยกและประสิทธิภาพในการคัดแยกในลำดับต่อไป

3.4.4 การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือด

การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดใช้เพื่อการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเลือดที่ได้จากกระบวนการคัดแยก สำหรับการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดแดงจะนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในพื้นที่สี่เหลี่ยมจัตุรัส (รูปตัว R) ทั้ง 5 จุดของเครื่องฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-16 จากนั้นใช้จำนวนเซลล์ที่นับได้ในการรายงานผลระดับการปนเปื้อนเซลล์และการคำนวณประสิทธิภาพในการคัดแยกของระบบ (Separation efficiency : η) ตามสมการที่ 3.1



ภาพประกอบที่ 3-16 การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์

$$\text{Separation efficiency}(\eta) = 1 - \frac{\text{Cells in separated plasma}}{\text{Cells in source blood}} \quad \dots\dots\dots (3.1)$$

สุดท้ายข้อมูลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดที่ได้จากกระบวนการคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกกับวิธีการปั่นเหวี่ยงจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อยืนยันคุณภาพของน้ำเลือด การปั่นเหวี่ยงของเซลล์ในน้ำเลือดสามารถใช้คำนวณหาสัดส่วนความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินเบื้องต้นได้ เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงและระดับฮีมาโตคริตตามสมการที่ 3.2 และ 3.3

$$\text{Hb (g/dL)} = \text{RBC Count} (\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{L}) \times 3 \quad \dots\dots\dots (3.2)$$

$$\text{Hb (g/dL)} \times 3 = \text{Hct}(\%) \pm 3 \quad \dots\dots\dots (3.3)$$

โดยทั่วไปแล้วการประเมินความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินเบื้องต้นนิยมใช้กฎการคำนวณตามสมการที่ 3.3 เพราะเป็นการประเมินด้วยค่าฮีมาโตคริต ซึ่งต้องทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามวิธีการประเมินความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินจากการคำนวณไม่สามารถใช้แทนค่าการตรวจวัดจริงได้ วิธีการนี้จึงใช้สำหรับการประเมินความเป็นไปได้ของค่าการตรวจวัดเท่านั้น

3.5 สรุป

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ได้จัดแบ่งแผนการทดลองออกเป็น 3 แผนงาน ดังนี้ แผนการทดลองแรกสำหรับศึกษาความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ แผนการทดลองที่สองศึกษาวิธีขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ และแผนการทดลองที่สามเพื่อศึกษาความสามารถของวิธีการคัดแยกและตรวจสอบคุณภาพของน้ำเลือด ในแต่ละแผนการทดลองจะมีวิธีการตรวจสอบด้วยวิธีการต่างๆ ตามรายละเอียดที่ได้กล่าวไว้เพื่อการรายงานผลข้อมูลดังนี้ การรายงานผลความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ การรายงานผลความสามารถในการขยายชั้นปราศจากเซลล์ การรายงานผลประสิทธิภาพในการคัดแยกน้ำเลือด และการรายงานผลคุณภาพของน้ำเลือด สำหรับการรายงานผลการทดลองทั้งหมดจะนำเสนอไว้ในบทต่อไป

บทที่ 4

ผลการทดสอบและการอภิปรายผล

เนื้อหาในบทนี้ได้รวบรวมข้อมูลผลการทดสอบต่างๆ ตามแผนการทดลองในบทที่ 3 แล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อใช้ประกอบการอภิปรายผล งานในส่วนแรกเป็นการศึกษาปัจจัยในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ เนื่องจากก่อนการใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์เพื่อสร้างชิ้นงานจำเป็นต้องทราบถึงความสามารถและข้อจำกัดของเครื่องมือ ข้อมูลการทดสอบการตัดด้วยแรงกดระดับต่างๆ และการตัดตามการออกแบบช่องขนาดต่างๆ จะช่วยอธิบายถึงความสามารถและข้อจำกัดในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกได้ ดังนั้นผลการทดลองชุดนี้สามารถใช้อธิบายความสามารถในการตัดและข้อจำกัดของเครื่องมือตามจุดประสงค์ข้อแรกของงานวิจัยได้ การทดลองในลำดับต่อมาคือการศึกษาวิธีขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับจุดประสงค์ที่สองของงานวิจัย ผลการทดสอบอิทธิพลจากการใช้งานช่องบิวด์-ช่องขยายตัวแบบต่างๆ ถูกนำมาเปรียบเทียบกับอิทธิพลจากอัตราการไหล ผลจากทั้งสองปัจจัยจะสามารถสรุปเป็นชุดข้อมูลสำหรับใช้ประกอบการตัดสินใจเลือกวิธีขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ที่เหมาะสม สุดท้ายจึงนำชุดข้อมูลที่ได้ออกแบบและพัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับการคัดแยกน้ำเลือด ผลการทดสอบคัดแยกน้ำเลือดจะสามารถแสดงให้เห็นผลลัพธ์ด้านประสิทธิภาพในการคัดแยกและคุณภาพของน้ำเลือดได้ตามจุดประสงค์ที่สาม สุดท้ายการเปรียบเทียบข้อมูลกับวิธีการคัดแยกในห้องปฏิบัติการจะเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยยืนยันความสามารถและคุณภาพของวิธีการคัดแยกน้ำเลือดที่น่าเสนอได้อย่างน่าเชื่อถือ

4.1 ผลการทดสอบความสามารถและข้อจำกัดในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกแบบต่างๆ ด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์

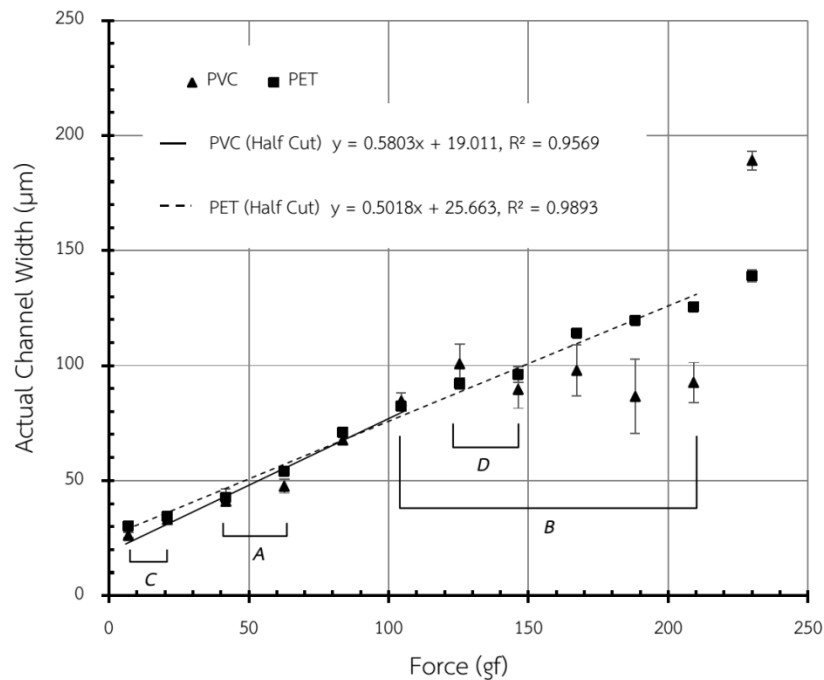
งานวิจัยนี้เลือกใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ 2 รุ่นซึ่งมีความสามารถแตกต่างกันตามข้อมูลในภาคผนวก ก. เครื่องมือชุดแรกคือเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo[®] เป็นเครื่องตัดแบบตั้งโต๊ะขนาดเล็กสำหรับใช้งานทั่วไป เครื่องมือชุดที่สองเลือกใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 ซึ่งเป็นเครื่องตัดขนาดกลางสำหรับงานตัดที่ต้องการความละเอียดสูง การใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์สร้างช่องขนาดต่างๆ มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัยตามที่ได้กล่าวไว้ในบททบทวนวรรณกรรมและหลักการตัดในบทที่ 2 ปัจจัยหลักที่มีความสำคัญซึ่งนำมาศึกษาทดลอง คือ

ปัจจัยจากแรงกด และปัจจัยจากการออกแบบ นอกจากนี้ยังมีอีก 2 ปัจจัยร่วมที่อาจมีผลสำคัญต่อการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิก คือ ปัจจัยจากวัสดุตัด และปัจจัยจากแนวแกนที่ใช้ตัด งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาควบคู่กันไปกับ 2 ปัจจัยหลัก การศึกษาความสามารถของเครื่องมือทั้งสองชุดจึงมีความสำคัญสำหรับงานออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อการประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ ต่อไป

4.1.1 ผลการศึกษาวิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดฮาล์ฟคัท (Half cut)

การตัดฮาล์ฟคัทคือการตัดวัสดุโดยที่เนื้อวัสดุยังไม่ขาดจากกันอย่างสมบูรณ์ดังที่เคยกล่าวไว้ในบทที่ 2 การตัดฮาล์ฟคัทสามารถควบคุมได้ด้วยการควบคุมแรงกดที่ระดับต่างๆ ตามความสามารถของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ ในหัวข้อนี้จึงศึกษาปัจจัยจากแรงกดที่มีผลต่อขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกและปัจจัยจากวัสดุตัดควบคู่กันไป การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้แผ่นพลาสติกใส (Transparent film) จากพลาสติก 2 ชนิดเป็นวัสดุตัด ได้แก่ พลาสติก PVC และพลาสติก PET การทดลองต่างๆ ได้ดำเนินการตามแผนการทดลองที่ 1 ซึ่งได้กล่าวรายละเอียดต่างๆ ไว้ในหัวข้อที่ 3.1.1 โดยใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ทั้งสองชุด ผลการทดลองจะสรุปเป็นข้อมูลความสามารถและข้อจำกัดในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ด้วยการตัดฮาล์ฟคัทดังนี้

การทดลองสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัด Silhouette Cameo[®] ได้ทดลองด้วยระดับแรงกดตั้งแต่ระดับน้อยสุดไปจนถึงระดับสูงสุดที่ตัวเครื่องสามารถทำได้ คือ ระดับ 1 ถึงระดับ 33 ซึ่งเป็นการใช้แรงกดตั้งแต่ 7 gf ถึง 230 gf ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับแรงกดกับความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกมีความเป็นเชิงเส้นสูงจึงสามารถประเมินขนาดแรงกดที่ระดับต่างๆ เพื่อสรุปเป็นกราฟข้อมูลได้ดังภาพประกอบที่ 4-1 จากกราฟแสดงให้เห็นว่าเครื่องตัดชุดนี้สามารถสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีขนาดเล็กสุดประมาณ 30 ไมโครเมตรบนพลาสติกทั้งสองชนิด เมื่อวิเคราะห์ผลข้อมูลความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกบนพลาสติก PVC ที่สร้างด้วยแรงกดระดับต่างๆ โดยการใช้การทดสอบ 2-Sample t-Test พบว่า การใช้แรงกดตั้งแต่ระดับ 1 ถึง 15 หรือการตัดด้วยแรง 7 gf ถึง 105 gf จะสามารถสร้างช่องที่มีขนาดแตกต่างกันได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) ช่องที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นร่องลึกขนาดเล็กตามลักษณะใบมีดและมีความขรุขระที่บริเวณผนังช่องดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-2 (ก.) ในทางกลับกันเมื่อสังเกตข้อมูลการตัดด้วยแรงกดระดับ 16 ถึง 33 หรือการตัดด้วยแรง 112 gf ถึง 230 gf (บริเวณ B ภาพประกอบที่ 4-1) จะพบว่าขนาดความกว้างของช่องที่เกิดขึ้นมีขนาดไม่แตกต่างกันและขนาดของช่องยังมีความแปรปรวนสูง หากพิจารณาจากภาพถ่ายเพิ่มเติมก็จะพบว่าการใช้แรงกดตั้งแต่ระดับ 18

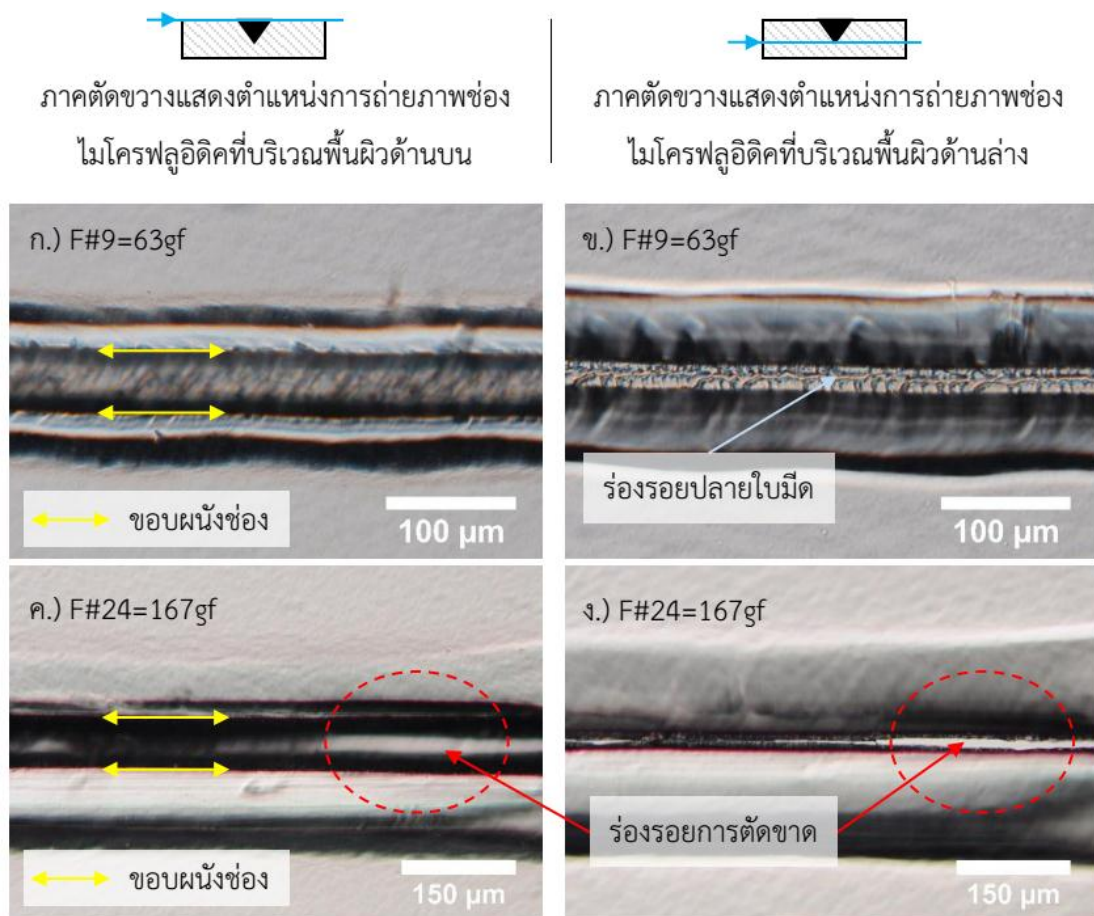


ภาพประกอบที่ 4-1 กราฟข้อมูลการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ด้วยการตัดฮาล์ฟคัทตามแนวแกนนอนของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo®

หรือการตัดด้วยแรงกด 125 gf ขึ้นไปสามารถตัดเนื้อพลาสติก PVC จนขาดจากกันได้ เมื่อสังเกตที่บริเวณพื้นผิวด้านบนของช่องที่โดนตัดขาดดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-2 (ค.) จะพบลักษณะผนังช่องที่บิดเบี้ยวทำให้ยากต่อการตรวจวัดขนาดจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ข้อมูลความกว้างในช่วงนี้มีความแปรปรวนสูง นอกจากนี้ที่บริเวณพื้นผิวด้านล่างของช่องจะเห็นเนื้อวัสดุที่ถูกตัดขาดจากกันดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-2 (ง.) การตัดด้วยระดับแรงกดมากเกินไปจนทำให้สามารถตัดเนื้อวัสดุขาดจากกันได้จะไม่ถือเป็นการตัดแบบฮาล์ฟคัท ดังนั้นขอบเขตการตัดแบบฮาล์ฟคัทลงบนแผ่นพลาสติก PVC ของเครื่องตัด Silhouette Cameo® จึงอยู่ในช่วงแรงกดตั้งแต่ระดับ 1 ถึง 15 หรือการตัดด้วยแรง 7 gf ถึง 105 gf เท่านั้น ข้อมูลจากการทดลองสามารถสรุปเป็นสมการความสัมพันธ์ระหว่างระดับแรงกดและขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกได้ดังสมการที่ 4.1

$$C_{PVC} = 0.58F + 19 \quad \dots\dots\dots(4.1)$$

สมการนี้สามารถใช้ในการประเมินขนาดแรงกด (F) ที่เหมาะสมสำหรับใช้สร้างช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีความกว้าง (C_{PVC}) ขนาดต่างๆ ลงบนพลาสติก PVC โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจอยู่ที่ 96% จากข้อมูลการทดลองและความสัมพันธ์ระหว่างระดับแรงกดและความกว้างของช่องตามสมการที่ 4.1

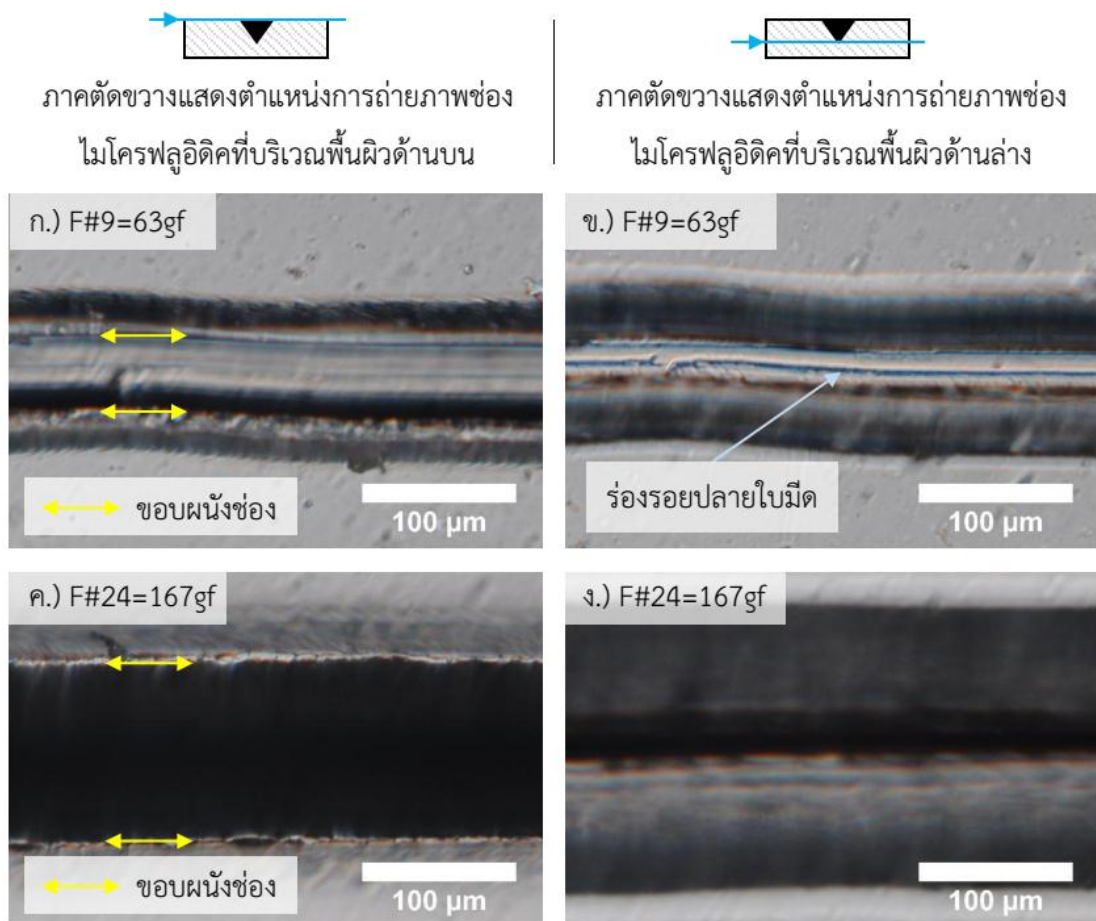


ภาพประกอบที่ 4-2 ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทลงบนพลาสติก PVC ด้วยแรงกดระดับ 9 (ก. และ ข.) และช่องจากการตัดด้วยแรงกดระดับ 24 (ค. และ ง.)

แสดงให้เห็นขอบเขตความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดฮาล์ฟคัท วิธีการนี้จึงมีความสามารถในการสร้างช่องที่มีความกว้างประมาณ 23 ถึง 80 ไมโครเมตรบนเนื้อพลาสติก PVC อย่างไรก็ตามข้อมูลการตัดในบางช่วงยังแสดงให้เห็นปัญหาบางอย่าง เช่น ปัญหาของข้อมูลในช่วงการตัดด้วยแรงกดระดับ 6 และ 9 ซึ่งในนี้ตรงกับบริเวณ A ในภาพประกอบที่ 4-1 จากผลการทดสอบ 2-Sample t-Test ระหว่างระดับแรงกดคู่นี้พบว่าขนาดความกว้างของช่องไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการใช้สมการที่ 4.1 เพื่อประเมินความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกในบางช่วงอาจมีความแม่นยำน้อยลง เช่น ที่แรงกดระดับ 6 ถึง 9 เป็นต้น

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติจากข้อมูลความกว้างของช่องบนพลาสติก PET ซึ่งเกิดจากปัจจัยจากแรงกดที่ระดับต่างๆ โดยใช้การทดสอบ 2-Sample t-Test เช่นเดียวกัน พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับแรงกดกับความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกมีความเป็นเชิงเส้นสูง ดังนั้นจึง

สามารถประเมินขนาดแรงกดที่ระดับต่างๆ เพื่อสรุปเป็นกราฟข้อมูลได้ดังภาพประกอบที่ 4-1 ข้อมูลจากกราฟแสดงให้เห็นว่าการใช้แรงกดตั้งแต่ระดับ 1 ถึง 30 หรือการตัดด้วยแรง 7 gf ถึง 209 gf สามารถสร้างช่องที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) ช่องที่เกิดจากการตัดมีลักษณะเป็นร่องลึกขนาดเล็กตามขนาดและลักษณะของใบมีดตัดดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-3 อย่างไรก็ตามลักษณะผนังช่องยังคงมีความขรุขระเช่นเดียวกับช่องที่เกิดขึ้นบนพลาสติก PVC กรณีการตัดด้วยแรงกดระดับ 33 หรือการตัดด้วยแรง 230 gf ลงบนพลาสติก PET นั้นสามารถตัดเนื้อวัสดุได้ขาดสังเกตได้จากภาพประกอบที่ 4-4 ภาพบริเวณพื้นผิวด้านล่างได้แสดงให้เห็นลักษณะวัสดุที่ถูกตัดจนขาดจากกัน ดังนั้นขอบเขตการตัดฮาล์ฟคัทของเครื่องตัด Silhouette Cameo[®] ลงบนแผ่นพลาสติก PET จึงอยู่ในช่วงการตัดด้วยแรงกดตั้งแต่ระดับ 1 ถึงระดับ 30 หรือการตัดด้วยแรง 7 gf ถึง 209 gf เท่านั้น นอกจากนี้ข้อมูลจากการทดลองสามารถนำมาสรุปเป็นสมการความสัมพันธ์ระหว่างระดับแรง



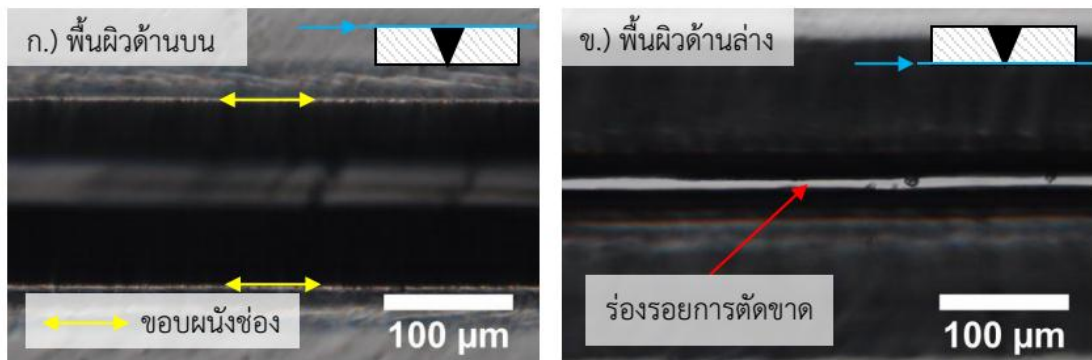
ภาพประกอบที่ 4-3 ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทด้วยเครื่องตัด

Silhouette Cameo[®] ลงบนพลาสติก PET

กตและความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกได้ตั้งสมการที่ 4.2

$$C_{PET} = 0.5F + 26 \quad \dots\dots\dots(4.2)$$

สมการนี้สามารถใช้ในการประเมินแรงกด (F) ที่เหมาะสมสำหรับใช้สร้างช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีความกว้าง (C_{PET}) ขนาดต่างๆ ลงบนพลาสติก PET โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจอยู่ที่ 99% จากข้อมูลผลการทดลองและความสัมพันธ์ตามสมการที่ 4.2 แสดงให้เห็นขอบเขตความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดฮาล์ฟคัท วิธีการนี้จึงมีความสามารถในการสร้างช่องที่มีความกว้างประมาณ 29 ถึง 130 ไมโครเมตรบนเนื้อพลาสติก PET อย่างไรก็ตามข้อมูลการตัดในบางช่วงยังแสดงให้เห็นปัญหาแบบเดียวกับผลการตัดบนพลาสติก PVC ได้แก่ ปัญหาของข้อมูลในช่วงการตัดด้วยแรงกดระดับ 1 และ 3 ซึ่งในที่นี้ตรงกับบริเวณ C ในภาพประกอบที่ 4-1 และปัญหาของข้อมูลในช่วงการตัดด้วยแรงกดระดับ 18 และ 21 ซึ่งในที่นี้ตรงกับบริเวณ D แสดงในภาพประกอบที่ 4-1 จากผลการทดสอบ 2-Sample t-Test ของแรงกดทั้งสองช่วงพบว่าขนาดความกว้างของช่องที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน การใช้สมการที่ 4.2 เพื่อประเมินความกว้างของช่องในช่วงการใช้แรงกดระดับ 1 ถึง 3 และ 18 ถึง 21 อาจมีความผิดพลาดสูงกว่าช่วงแรงกดอื่นๆ

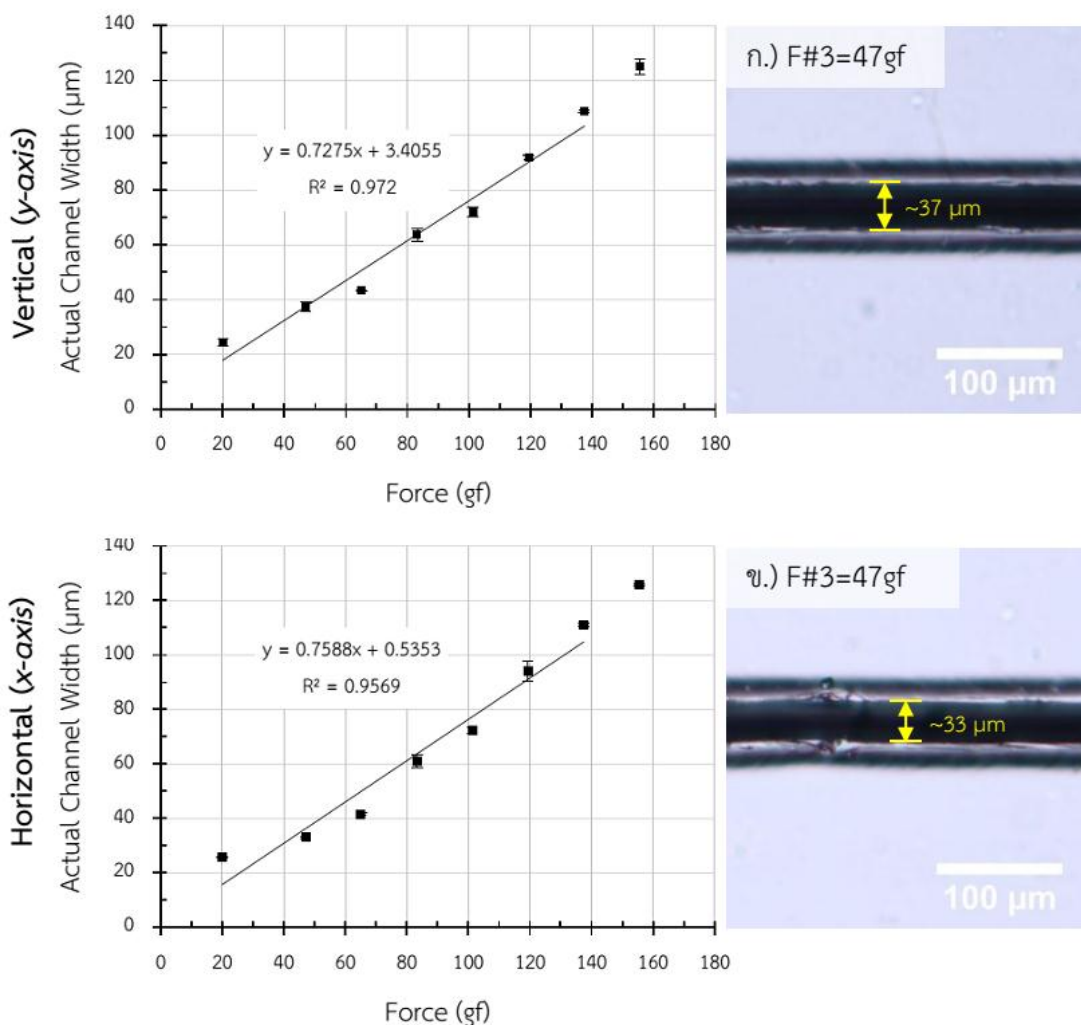


ภาพประกอบที่ 4-4 ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทด้วยแรงกดระดับ 33 บนพลาสติก PET

การวิเคราะห์ผลทางสถิติจากข้อมูลความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกที่เกิดจากการตัดฮาล์ฟคัทด้วยแรงกดระดับ 1 ถึง 15 หรือการตัดด้วยแรง 7 gf ถึง 105 gf ลงบนพลาสติกทั้งสองชนิดโดยใช้ 2-Sample t-Test พบว่าความกว้างที่เกิดจากการตัดฮาล์ฟคัทที่ระดับแรงกดเท่ากันนั้นไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามระดับแรงกดที่ตัดวัสดุได้ขาดนั้นแตกต่างกันเนื่องจากคุณสมบัติความยืดหยุ่นของแผ่นพลาสติกทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน โดยแผ่นพลาสติกใสจาก PVC มีสมบัติความ

ยืดหยุ่นประมาณ 25-1600 MPa และแผ่นพลาสติกใสจาก PET มีสมบัติความยืดหยุ่นประมาณ 2100-3100 MPa ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ช่วงการตัดฮาล์ฟคัทลงบนวัสดุทั้งสองมีความแตกต่างกัน

สำหรับการทดลองด้วยเครื่องตัดรูน Graphtec CE6000-60 ได้เลือกใช้ระดับแรงกดตั้งแต่ระดับน้อยสุดไปจนถึงระดับที่สามารถตัดวัสดุได้ขาดสมบูรณ์เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของใบมีดตัด ซึ่งกรณีนี้คือการใช้แรงกดที่ระดับ 1 ถึงระดับ 15 ผลการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับแรงกดกับความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกมีความเป็นเชิงเส้นสูงจึงสามารถประมาณค่าแรงกดในระดับต่างๆ จากความสัมพันธ์นี้ได้ โดยเครื่องตัดแบ่งแรงกดที่สามารถทำได้ตั้งแต่ 20 gf ถึง 300 gf ออกเป็น 31 ระดับ ดังนั้นในช่วงแรงกดระดับ 1 ถึงระดับ 15 จึงเป็นการตัดด้วยแรง 20 gf ถึง 155 gf ตามลำดับ ภาพประกอบที่ 4-5 แสดงกราฟผลการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดฮาล์ฟคัทตาม



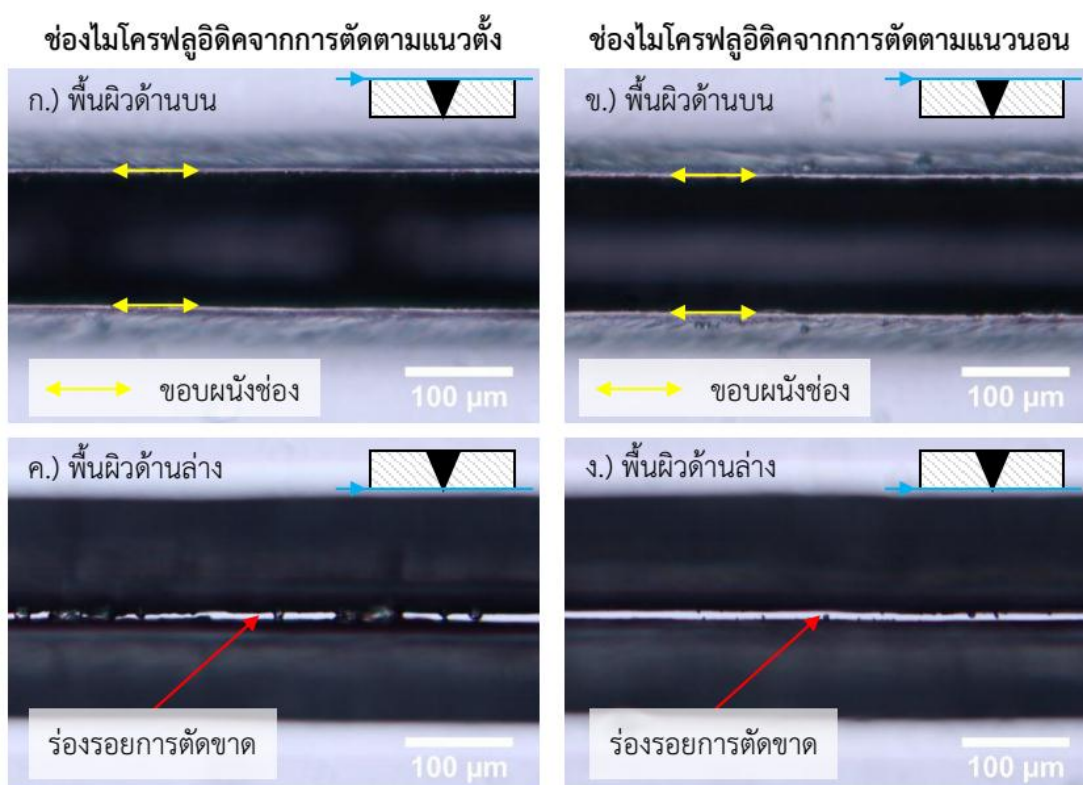
ภาพประกอบที่ 4-5 การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดแบบฮาล์ฟคัทตามแนวแกนต่างๆ ของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60

แนวแกนต่างๆ ของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 โดยใช้พลาสติก PET เป็นวัสดุตัด จากกราฟแสดงให้เห็นว่าการตัดด้วยแรงกดตั้งแต่ระดับ 1 ถึงระดับ 15 มีความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกได้อย่างแม่นยำ ช่องที่สร้างขึ้นมีขนาดความกว้างตั้งแต่ 30 ถึง 120 ไมโครเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้เครื่องตัด Silhouette Cameo[®] เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติจากข้อมูลความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกโดยใช้การทดสอบ 2-Sample t-Test ระหว่างแรงกดระดับต่างๆ พบว่า การใช้แรงกดตั้งแต่ระดับ 1 ถึง 15 สามารถสร้างช่องที่มีความกว้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) ทั้งการตัดในแนวแกนตั้งและแนวแกนนอน ช่องที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นร่องลึกขนาดเล็กตามลักษณะใบมีดตัดดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-5 (ก.) และ 4-5 (ข.) ลักษณะผนังช่องยังคงมีความขรุขระ เช่นเดียวกับการตัดฮาล์ฟคัทด้วยเครื่องตัด Silhouette Cameo[®] สำหรับการตัดด้วยแรงกดระดับ 15 ลงบนพลาสติก PET นั้นสามารถตัดเนื้อวัสดุจนขาดสังเกตได้จากภาพประกอบที่ 4-6 ภาพบริเวณพื้นผิวด้านล่างได้แสดงให้เห็นลักษณะเนื้อวัสดุที่ถูกตัดขาดจากกัน ดังนั้นช่องที่เกิดจากการตัดเนื้อพลาสติก PET ด้วยแรงกดระดับ 15 จะไม่ถือเป็นช่องที่เกิดจากการตัดฮาล์ฟคัท กรณีนี้การตัดฮาล์ฟคัทของเครื่องตัด Graphtec CE6000-60 จึงต้องใช้แรงกดตั้งแต่ระดับ 1 ถึงระดับ 13 เท่านั้น ข้อมูลจากการทดลองสามารถสรุปเป็นความสัมพันธ์ระหว่างแรงกดและขนาดช่องไมโครฟลูอิดิกตามการตัดในแนวแกนตั้งและแนวแกนนอนได้ดังสมการที่ 4.3 และสมการที่ 4.4 ตามลำดับ

$$C_{wv} = 0.73F + 3.41 \quad \dots\dots\dots(4.3)$$

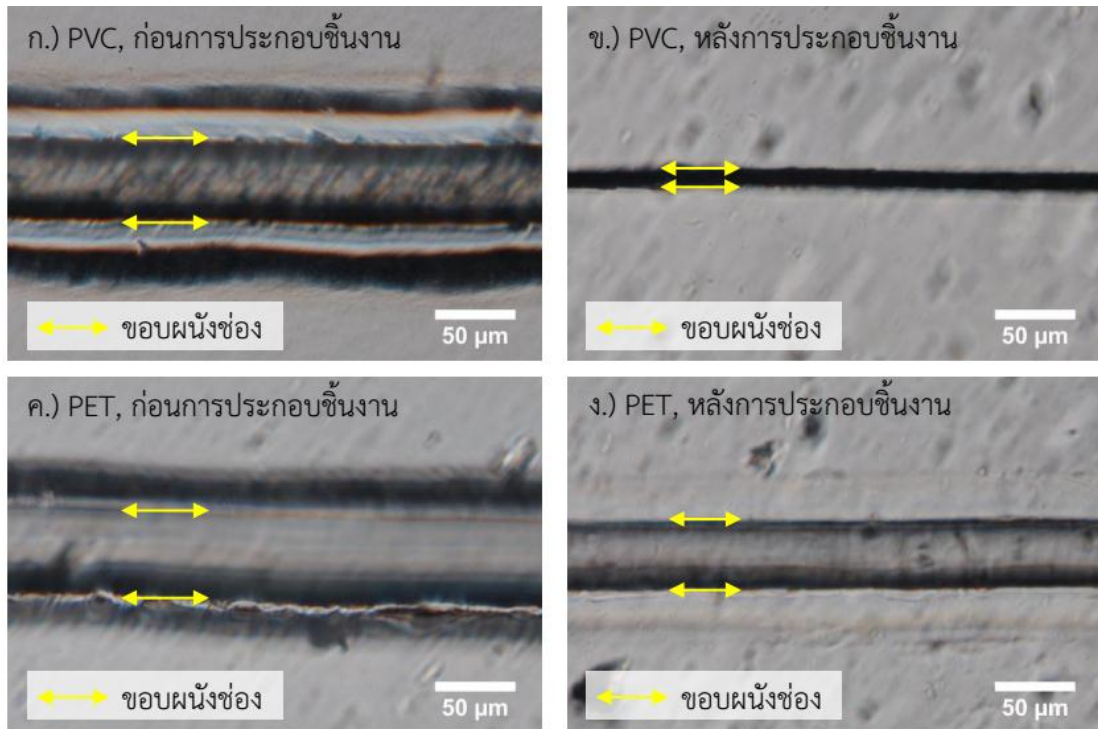
$$C_{wh} = 0.76F + 0.54 \quad \dots\dots\dots(4.4)$$

สมการทั้งสองมีความชันใกล้เคียงกันมากเนื่องจากข้อมูลขนาดความกว้างจากการตัดตามแนวแกนตั้งและแนวแกนนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สมการทั้งสองจึงสามารถใช้ในการประเมินระดับแรงกด (F) ที่เหมาะสมสำหรับใช้สร้างช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีความกว้าง (C_{wv} , C_{wh}) ขนาดต่างๆ ลงบนพลาสติก PET โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจอยู่ที่ 98% ($R^2 = 0.98$) ทั้งสองกรณี จากข้อมูลผลการทดลองและความสัมพันธ์ตามสมการที่ 4.3 และ 4.4 ได้แสดงให้เห็นความสามารถของการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดฮาล์ฟคัท โดยมีความสามารถในการสร้างช่องที่มีขนาดความกว้างประมาณ 20 ถึง 110 ไมโครเมตรบนพลาสติก PET อย่างไรก็ตามข้อมูลการตัดด้วยแรงกดบางระดับยังแสดงให้เห็นลักษณะช่องที่มีขนาดแตกต่างเมื่อใช้แนวแกนตัดต่างกัน เช่น ปัญหาของข้อมูลในช่วงการตัดด้วยแรงกดระดับ 3 5 และ 13 เนื่องจากผลการทดสอบ 2-Sample t-Test ระหว่างการตัดในแนวแกนตั้งและแนวแกนนอนด้วยระดับแรงกดดังกล่าวพบว่าช่องที่เกิดขึ้นมีขนาดความกว้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ค่าความแตกต่างของขนาดความกว้างยังไม่เกิน ± 5 ไมโครเมตร ดังนั้นขนาดของช่องที่เกิดจากการตัดฮาล์ฟคัทจะได้รับอิทธิพลจากแรงกดมากกว่าแนวแกนตัด



ภาพประกอบที่ 4-6 ภาพถ่ายช่องไมโครฟลูอิดิกบนพลาสติก PET ที่สร้างด้วยแรงกดระดับ 15 ตามแนวตั้ง (ก.) และแนวนอน (ข.) พร้อมแสดงพื้นผิวด้านล่าง (ค. และ ง.)

จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นลักษณะพิเศษของช่องไมโครฟลูอิดิกที่เกิดจากการตัดฮาล์ฟคัตอยู่ 2 แบบ คือ ลักษณะขอบผนังช่องมีความขรุขระ และลักษณะเงามืดภายในช่อง การที่ขอบผนังช่องมีความขรุขระนั้นเนื่องมาจากแรงเฉือนของใบมีดที่กระทำต่อเนื้อพลาสติก เนื้อพลาสติกในบริเวณที่ไม่สามารถทนต่อแรงเฉือนนั้นได้ก็จะขาดออกจากกันและถูกผลักให้โค้งตัวสูงขึ้นสูงกว่าพื้นผิวทั่วไปเช่นเดียวกับข้อมูลการวิจัยอื่นๆ เช่น งานวิจัยของ Do และคณะได้รายงานผลภาพถ่ายตามภาคตัดขวางของช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัตซึ่งแสดงให้เห็นว่าขอบผนังช่องมีลักษณะนูนสูงกว่าบริเวณพื้นผิวของวัสดุ [33] ผนังช่องลักษณะนี้สามารถเสียรูปได้ง่ายหากมีแรงหรือพลังงานจากภายนอกมากระทำที่ขอบผนังช่อง ลักษณะการเสียรูปที่ว่านี้จะสามารถสังเกตได้จากขนาดความกว้างของช่องที่ลดลงเมื่อผ่านกระบวนการประกอบชิ้นงานด้วยการรีดความร้อน ภาพประกอบที่ 4-7 แสดงให้เห็นลักษณะการเสียรูปที่มีผลต่อขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิก จากการทดลองประกอบชิ้นงานพบว่าช่องไมโครฟลูอิดิกจากพลาสติก PVC มีอัตราการเสียรูปสูงกว่าพลาสติก PET ดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-7 (ข.) และภาพประกอบที่ 4-7 (ง.) ตามลำดับ เนื่องจากการจัดเรียง



ภาพประกอบที่ 4-7 ช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทด้วยแรงกดระดับ 9 ลงบนพื้นผิวพลาสติก PVC ก่อนและหลังการประกอบชิ้นงาน (ก. และ ข.) และบนพื้นผิวพลาสติก PET ก่อนและหลังการประกอบชิ้นงาน (ค. และ ง.)

โมเลกุลของวัสดุเทอร์โมพลาสติกโดยจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อนสูงกว่าค่าอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (Glass Transition Temperature : Tg) พลาสติก PVC มีอุณหภูมิกลาสทรานสิชันในช่วง 50-80 °C จะมีการจัดเรียงสายโซ่โมเลกุลใหม่ที่มีการเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบเมื่อผ่านกระบวนการประกอบชิ้นงานที่อุณหภูมิ 120 °C เกิดเป็นการเสียรูปที่ไม่สามารถควบคุมได้อย่างที่ปรากฏในภาพประกอบที่ 4-7 (ข.) ในขณะที่พลาสติก PET ซึ่งมีค่าอุณหภูมิกลาสทรานสิชันในช่วง 70-80 °C เกิดการเสียรูปน้อยกว่าพลาสติก PVC ดังนั้นการประกอบชิ้นงานด้วยความร้อนสูงจึงไม่เหมาะสมกับพลาสติก PVC ในทางกลับกันพลาสติก PET แสดงให้เห็นคุณสมบัติการทนต่อความร้อนที่ดีกว่าจึงเหมาะสมกับวิธีการประกอบชิ้นงานด้วยความร้อน ลักษณะพิเศษต่อมาคือการมีเงามืดเกิดขึ้นภายในช่อง เงามืดลักษณะนี้อาจไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้งานภายในช่อง แต่ช่องลักษณะนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้สังเกตพฤติกรรมหรือการตรวจวัดต่างๆ เงาดำเหล่านี้ อาจเป็นผลมาจากลักษณะภาคตัดขวางของช่องซึ่งมีลักษณะเป็นรูปอักษรวี (V) หรือทรงสามเหลี่ยมหน้าจั่วดังที่ Do และคณะเคยรายงานผล [33] บริเวณผนังช่องที่มีความลาดเอียงประกอบกับมีความขรุขระจากการตัดส่งผลให้แสงจากกล้องจุลทรรศน์ส่องผ่านพื้นผิวบริเวณผนังช่องได้ไม่ดีเท่ากับพื้นผิวบริเวณอื่น ด้วย

เหตุนี้จึงเกิดเงามืดขึ้นภายในช่องไมโครฟลูอิดิก ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการใช้งานช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดฮาล์ฟคัทในบริเวณที่ต้องใช้เพื่อการสังเกตพฤติกรรมและการตรวจวัด

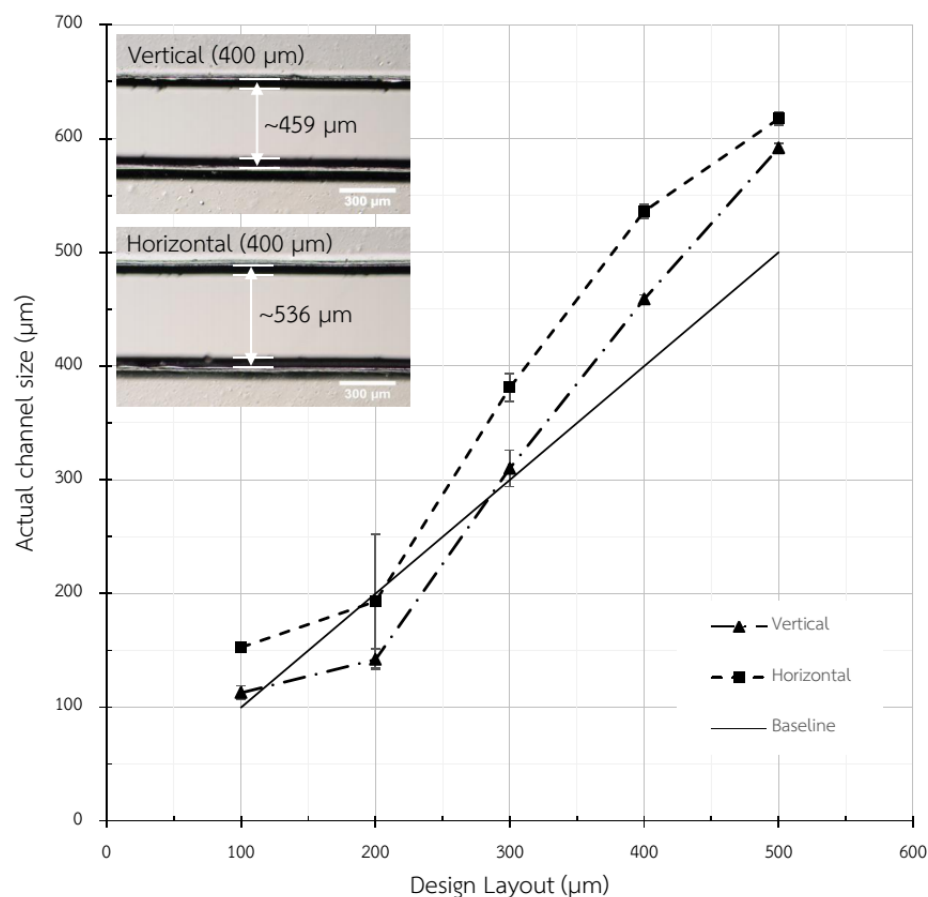
4.1.2 ผลการศึกษาวิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดไดคัท (Die cut)

การตัดไดคัทเป็นวิธีการตัดที่ต้องตัดเนื้อวัสดุให้ขาดจากกันอย่างสมบูรณ์ จากผลการศึกษาการตัดแบบฮาล์ฟคัททำให้ได้ระดับแรงกดที่เหมาะสมสำหรับการตัดแบบไดคัท การศึกษาในหัวข้อนี้จึงต้องการยืนยันขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกที่เกิดขึ้นจริงว่าสอดคล้องกับขนาดช่องที่ได้ออกแบบไว้หรือไม่ โดยศึกษาปัจจัยจากการออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกและปัจจัยจากแนวแกนตัดควบคู่กัน การทดลองนี้เลือกสร้างช่องที่ได้ออกแบบลงบนพลาสติก PET เท่านั้น เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีการเสีรูปร่างน้อยกว่าพลาสติก PVC การศึกษาและทดลองได้ดำเนินการตามแผนการทดลองที่ 2 ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 3.1.1 โดยทำการทดลองด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ทั้ง 2 ชุดเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา การตรวจวัดขนาดความกว้างของช่องจะดำเนินการตามลำดับขั้นตอนการตรวจวัดด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ ซึ่งได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 3.4.1 ข้อมูลจากการทดลองจะสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดที่ออกแบบกับขนาดช่องที่เกิดขึ้นจริง และสามารถทราบข้อจำกัดในการออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับการตัดไดคัท

การทดสอบความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดไดคัทโดยใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo[®] ได้แสดงให้เห็นความสามารถและข้อจำกัดหลายอย่างของเครื่องมือ ผลจากการทดสอบปัจจัยจากการออกแบบร่วมกับปัจจัยจากแนวแกนตัดสามารถสรุปได้ดังกราฟในภาพประกอบที่ 4-8 การทดลองครั้งนี้เลือกใช้การออกแบบช่องสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาดความกว้างตั้งแต่ 100 ถึง 500 ไมโครเมตรสำหรับการสร้างเป็นช่องไมโครฟลูอิดิก จากการทดสอบทางสถิติด้วย 2-Sample t-Test ระหว่างการตัดช่องที่ออกแบบตามแนวแกนตั้งและแนวแกนนอนพบว่าช่องที่เกิดขึ้นมีขนาดความกว้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) และผลการตรวจวัดขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกที่เกิดขึ้นจริงนั้นมีความคลาดเคลื่อนไปจากขนาดช่องที่ได้ออกแบบ

ขนาดของช่องที่เกิดขึ้นมีความคลาดเคลื่อน 2 รูปแบบ คือ เกิดช่องขนาดเล็กกว่าการออกแบบ และกลุ่มที่เกิดช่องขนาดใหญ่กว่าการออกแบบ กลุ่มแรกเป็นช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีขนาดความกว้างไม่แน่นอน ช่องลักษณะนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้การออกแบบช่องที่มีขนาดความกว้าง 100 ถึง 200 ไมโครเมตร ข้อมูลขนาดความกว้างที่ตรวจวัดได้มีความแปรปรวนสูงทำให้ได้ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างขนาดความกว้างของช่อง

ไมโครฟลูอิดิกที่เกิดจากการออกแบบในช่วงนี้ได้ หากต้องการใช้งานช่องที่มีขนาด 100 ถึง 200 ไมโครเมตรจะต้องตรวจสอบขนาดของช่องอย่างละเอียดทุกครั้ง กลุ่มที่สองแสดงให้เห็นข้อมูลขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีความเที่ยงตรงมากขึ้นซึ่งเป็นช่วงการออกแบบช่องที่มีความกว้าง 300 ถึง 500 ไมโครเมตร สังเกตได้จากข้อมูลขนาดความกว้างของช่องที่เกิดขึ้นมีความแปรปรวนน้อยลงทำให้ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติสามารถระบุได้ว่าขนาดของช่องที่เกิดจากการออกแบบในช่วงความกว้างนี้มีความแตกต่างกันตามการออกแบบอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) อย่างไรก็ตามขนาดของช่องที่สร้างได้จริงมีความคลาดเคลื่อนไปจากการออกแบบโดยมีขนาดที่กว้างกว่าขนาดที่ออกแบบประมาณ 10% ถึง 40% เช่น ขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกจากการออกแบบช่องที่มีความกว้าง 400 ไมโครเมตร มีขนาดจริงประมาณ 459 ไมโครเมตรเมื่อตัดตามแนวแกนตั้ง และ 536 ไมโครเมตรเมื่อตัดตามแนวแกนนอนดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-8 นอกจากนี้ยังพบว่าการตัดในแนวแกนที่แตกต่างกันส่งผลต่อขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิกอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) ความคลาดเคลื่อน

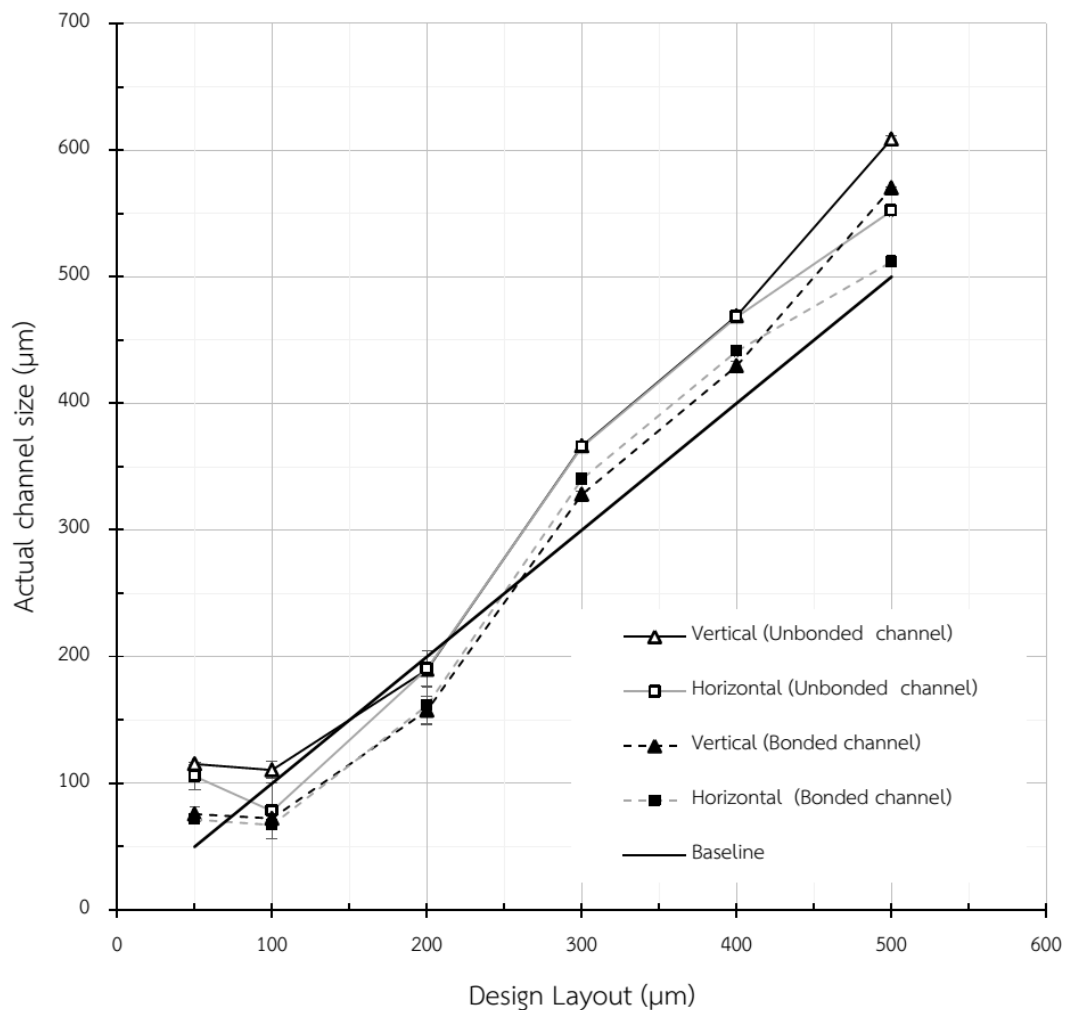


ภาพประกอบที่ 4-8 กราฟแสดงผลความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดได้คัทโดยใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo®

เหล่านี้ถือเป็นผลกระทบที่สำคัญต่อการออกแบบ ดังนั้นการจะสร้างช่องให้ได้ขนาดตรงตามความต้องการควรออกแบบช่องโดยมีการชดเชยผลกระทบจากการออกแบบ จากข้อมูลผลการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่าการสร้างช่องที่มีขนาดความกว้างประมาณ 300 ถึง 500 ไมโครเมตรจะต้องออกแบบช่องให้มีขนาดเล็กกว่าเป้าหมายประมาณ 10% สำหรับการตัดตามแนวแกนตั้ง และ 40% สำหรับการตัดตามแนวแกนนอน อย่างไรก็ตามข้อสรุปนี้มีผลกับการใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo® ในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดได้คัทเท่านั้น

การทดสอบความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดได้คัทโดยใช้เครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 แสดงให้เห็นความสามารถและข้อจำกัดหลายอย่างของเครื่องมือที่คล้ายคลึงกับเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo® ข้อมูลผลการทดสอบปัจจัยจากการออกแบบร่วมและปัจจัยจากแนวแกนตัดสามารถสรุปได้ดังกราฟในภาพประกอบที่ 4-9 การทดลองครั้งนี้เลือกใช้การออกแบบช่องสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาดความกว้างตั้งแต่ 50 ถึง 500 ไมโครเมตรสำหรับการสร้างเป็นช่องไมโครฟลูอิดิก ผลการตรวจวัดขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกที่เกิดขึ้นจริงพบที่มีความคลาดเคลื่อนไปจากขนาดช่องที่ได้ออกแบบเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา ลักษณะความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นนั้นมีความแตกต่างกัน 3 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นช่องที่มีขนาดความกว้างไม่แน่นอนซึ่งเจอในช่วงการออกแบบช่องที่มีขนาดความกว้าง 50 ถึง 100 ไมโครเมตร เนื่องจากข้อมูลความกว้างที่มีความแปรปรวนสูงทำให้การวิเคราะห์ทางสถิติไม่สามารถระบุได้ว่าขนาดของช่องที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 ยังคงมีปัญหาแบบเดียวกับเครื่องตัด Silhouette Cameo® ในกรณีการสร้างช่องที่มีขนาดความกว้าง 100 ถึง 200 ไมโครเมตร แต่การตัดด้วยเครื่องตัด Graphtec CE6000-60 มีปัญหาที่ขนาดความกว้างเล็กกว่านั้น เนื่องจากตัวเครื่องมีความละเอียดในการตัดสูงกว่าเครื่องตัด Silhouette Cameo® อย่างไรก็ตามหากต้องการสร้างช่องที่มีขนาด 50 ถึง 100 ไมโครเมตรควรมีการตรวจสอบขนาดของช่องอย่างละเอียดทุกครั้งหรือเปลี่ยนไปใช้การตัดฮาล์ฟคัท

กลุ่มที่สองเป็นลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีขนาดความกว้างน้อยกว่าขนาดที่ออกแบบ กลุ่มนี้พบเจอในช่วงการออกแบบช่องที่มีขนาดความกว้าง 100 ถึง 200 ไมโครเมตร สังเกตได้จากข้อมูลผลการตรวจวัดขนาดความกว้างมีค่าต่ำกว่าแนวเส้นในอุดมคติ (Baseline) จากกราฟผลการทดลองในภาพประกอบที่ 4-9 สรุปได้ว่าขนาดของช่องที่สร้างได้จริงมีขนาดเล็กกว่าขนาดที่ออกแบบประมาณ 5% ถึง 30% ดังนั้นหากต้องการสร้างช่องที่มีขนาด 100 ถึง 200 ไมโครเมตรควรออกแบบช่องให้กว้างกว่าขนาดที่ต้องการประมาณ 5% ถึง 30% และควรตรวจสอบชิ้นงานก่อนการใช้งานเสมอ

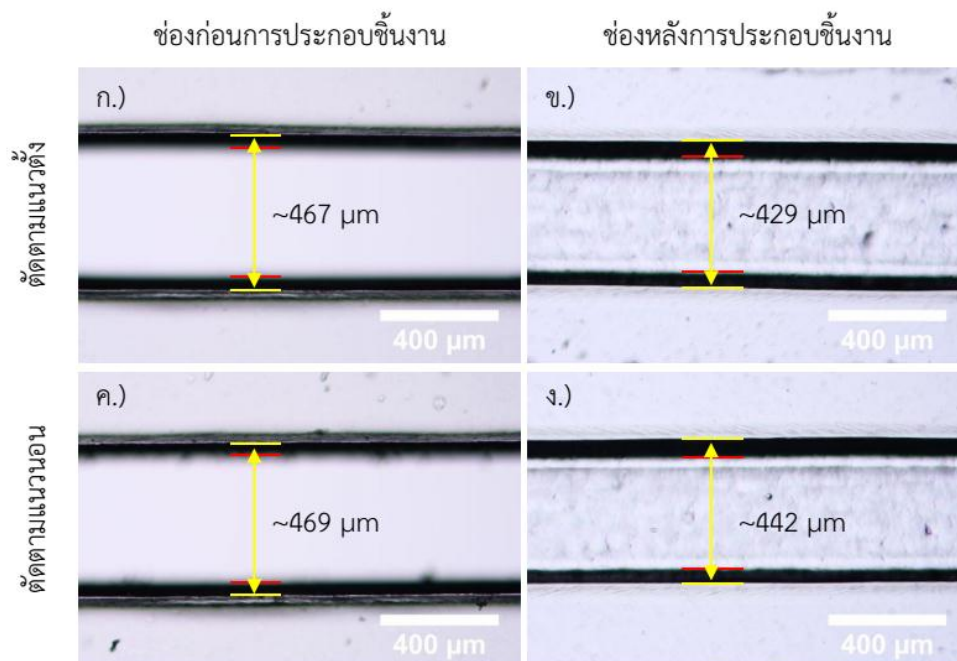


ภาพประกอบที่ 4-9 กราฟแสดงผลความสามารถในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดแบบไดคัท โดยใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60

กลุ่มที่สามเป็นลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกที่มีขนาดความกว้างจริงมากกว่าขนาดที่ออกแบบ กลุ่มนี้พบเจอในช่วงการออกแบบช่องที่มีขนาดความกว้าง 300 ถึง 500 ไมโครเมตร สังเกตได้จากข้อมูลผลการตรวจวัดขนาดความกว้างมีค่าสูงกว่าแนวเส้นในอุดมคติ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความกว้างของช่องที่สร้างได้จริงกว้างกว่าขนาดที่ออกแบบประมาณร้อยละ 10 ถึง 20 นอกจากนี้จะสังเกตเห็นว่าปัจจัยจากแนวแกนตัดเริ่มไม่ส่งผลกระทบต่อขนาดความกว้างของช่องในกลุ่มนี้ ภาพประกอบที่ 4-10 (ก.) และ 4-10 (ค.) เป็นภาพถ่ายช่องไมโครฟลูอิดิกจากการออกแบบที่ความกว้าง 400 ไมโครเมตรแล้วตัดตามแนวแกนตั้งและแนวแกนนอนของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ตามลำดับ ดังนั้นการออกแบบช่องที่มีขนาดความกว้างในช่วง 300 ถึง 500 ไมโครเมตรจะมีอิสระในการเลือกใช้แนวแกนตัด แต่จำเป็นต้องออกแบบช่องให้มีขนาดเล็กกว่าเป้าหมายประมาณ 10-20%

อย่างไรก็ตามข้อสรุปเหล่านี้ใช้อ้างอิงกับการใช้งานเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 ในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดโดคัทเท่านั้น

ช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดแบบโดคัทจะมีขนาดลดลงเล็กน้อยเมื่อผ่านกระบวนการประกอบชิ้นงานด้วยวิธีการรีดความร้อน เนื่องจากที่บริเวณขอบผนังช่องจะมีเนื้อพลาสติกกึ่งสูงขึ้นเช่นเดียวกับช่องจากการตัดแบบฮาล์ฟคัท แต่บริเวณที่เกิดการเสีรูปจะมีเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับขนาดความกว้างของช่องไมโครฟลูอิดิก สังเกตได้จากภาพประกอบที่ 4-10 (ก.) และ 4-10 (ข.) ซึ่งแสดงภาพถ่ายช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดตามแนวแกนตั้งก่อนการประกอบชิ้นงานและหลังการประกอบชิ้นงานตามลำดับ การสร้างช่องตามแนวแกนนอนก็เกิดการเสีรูปหลังการประกอบชิ้นงานเช่นกันดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-10 (ค.) และ 4-10 (ง.) จากข้อมูลผลการทดลองสรุปได้ว่าการประกอบชิ้นงานด้วยการรีดความร้อนทำให้ช่องจากการตัดแบบโดคัทเกิดการเสีรูปจนมีขนาดลดลงประมาณ 50 ไมโครเมตรจากขนาดเดิม ดังนั้นเพื่อการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกให้ได้ขนาดตรงตามความต้องการควรออกแบบช่องโดยมีการชดเชยผลกระทบจากการออกแบบและผลกระทบจากการประกอบชิ้นงาน



ภาพประกอบที่ 4-10 ภาพถ่ายช่องไมโครฟลูอิดิกจากการตัดตามแนวแกนตั้ง (ก. และ ข.) และแนวแกนนอน (ค. และ ง.) โดยใช้การออกแบบช่องกว้าง 400 ไมโครเมตร

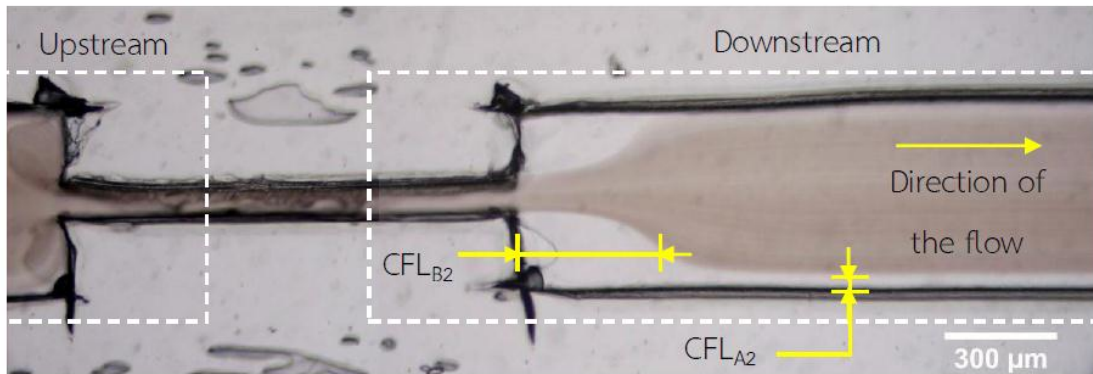
4.2 ผลการศึกษาวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์

การทดลองในหัวข้อนี้ต้องการนำช่องไมโครฟลูอิดิกซึ่งสร้างด้วยวิธีการต้นทุนต่ำมาศึกษาวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิก ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกที่นำมาใช้ศึกษานั้นมีลักษณะเป็นช่องบีบตัว-ขยายตัว (Contraction-expansion microchannels) ในอัตราส่วนต่างๆ ผลการทดสอบประสิทธิภาพจากการใช้งานช่องบีบตัวและช่องขยายตัวจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพจากอัตราการไหล ข้อมูลผลการทดลองจะสามารถใช้ประกอบการตัดสินใจเลือกวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการคัดแยกน้ำเลือดในลำดับต่อไป กลุ่มตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการทดลองได้มีการควบคุม โดยเลือกใช้เฉพาะตัวอย่างเลือดปกติที่มีระดับฮีมาโตคริต และค่าความหนืดอยู่ในระดับปกติ จากการตรวจสอบยืนยันระดับฮีมาโตคริตของตัวอย่างเลือดทั้งหมดพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 40% ถึง 45% ซึ่งเป็นระดับฮีมาโตคริตปกติ และผลการตรวจยืนยันค่าความหนืดของตัวอย่างเลือดทั้งหมดมีค่า 3 ถึง 4 เซนติพอยด์ซึ่งเป็นค่าปกติเช่นกัน แต่การทดลองเลือกใช้ตัวอย่างเลือดที่ผ่านการเจือจางที่อัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตรจึงทำให้ตัวแปรทั้งสองลดลงตามไปด้วย ดังนั้นผลการตรวจวัดต่างๆ อ้างอิงกับตัวอย่างเลือดที่ผ่านการเจือจางเป็นหลัก

4.2.1 ผลการศึกษาวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตร

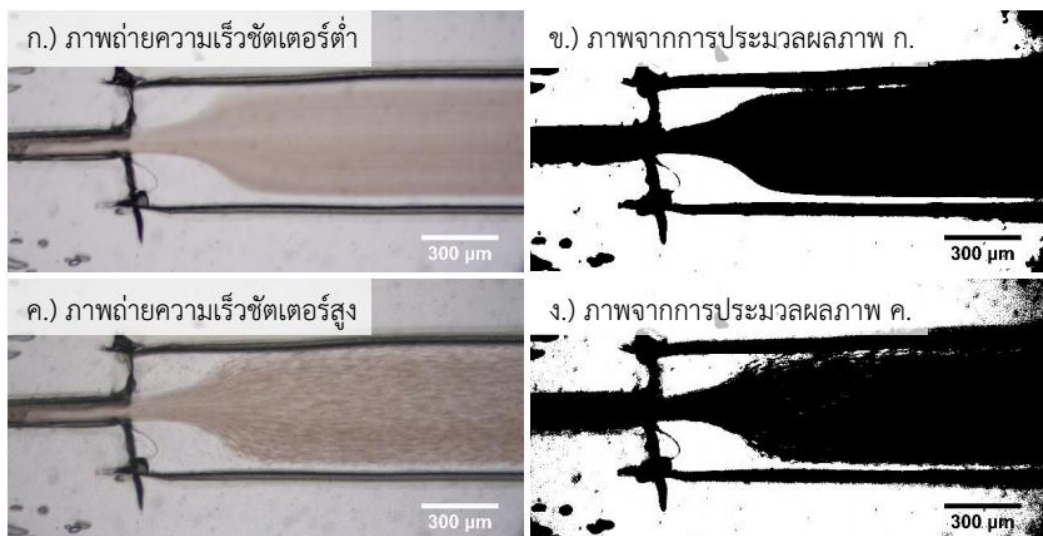
ลักษณะช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรมีการนำมาประยุกต์ใช้งานหลากหลายลักษณะ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าช่องไมโครฟลูอิดิกลักษณะนี้เหมาะสำหรับการจัดเรียงและคัดแยกอนุภาคหรือเซลล์ [25], [27] การทดลองนี้จึงเลือกใช้งานช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรมาศึกษาความสามารถในการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ตามรายละเอียดในแผนการทดลองที่ 3 ซึ่งได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 3.1.2

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรสามารถขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ได้ดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-11 หากสังเกตบริเวณต้นน้ำจะพบว่ายังไม่มีชั้นปราศจากเซลล์เกิดขึ้นหรืออาจมีเพียงเล็กน้อยจนสังเกตได้ยาก ต่อมาเมื่อเซลล์เคลื่อนที่ไปยังช่องปลายน้ำผ่านช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรจะเกิดการขยายตัวของชั้นปราศจากเซลล์อย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากลักษณะการรวมกลุ่มของเซลล์และชั้นปราศจากเซลล์ชัดเจนขึ้นดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-12 สำหรับการถ่ายภาพในการตรวจวัดขนาดของชั้นปราศจากเซลล์นั้นภาพถ่ายความเร็วชัตเตอร์ต่ำ (1/50 วินาที) จะมีความเหมาะสมกว่าภาพถ่ายความเร็วชัตเตอร์สูง



ภาพประกอบที่ 4-11 ลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงและการเกิดขึ้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณต้นน้ำเปรียบเทียบกับบริเวณปลายน้ำ

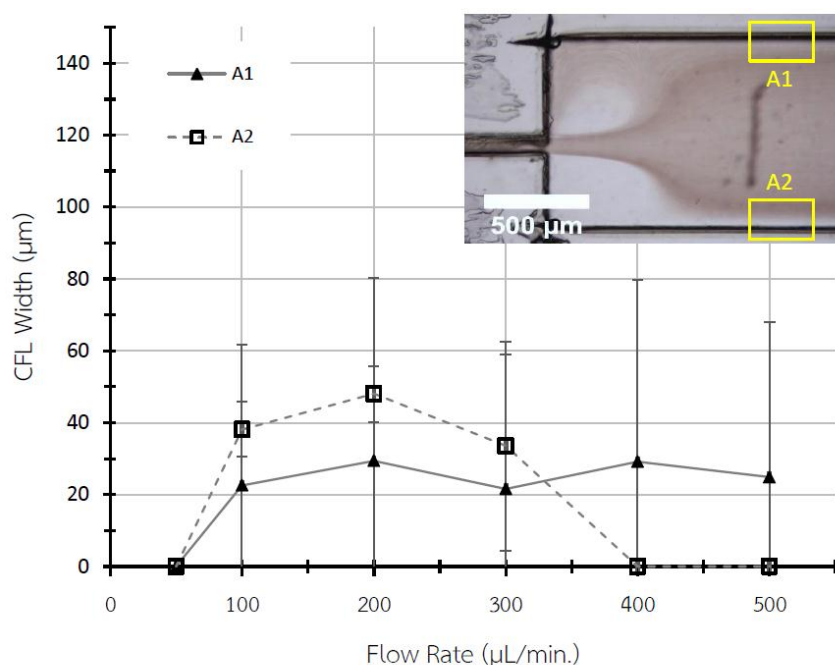
(1/2500 วินาที) เนื่องจากภาพถ่ายความเร็วช้าเตอร์ต่ำดังภาพประกอบที่ 4-12 (ก.) จะแสดงกระแสน้ำที่เคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างชัดเจนและมีสิ่งรบกวนน้อยเมื่อผ่านกระบวนการประมวลผลภาพดังภาพประกอบที่ 4-12 (ข.) สำหรับภาพถ่ายความเร็วช้าเตอร์สูงในภาพประกอบที่ 4-12 (ค.) นั้นเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงชัดเจนขึ้นแต่จะมีการรบกวนจากเซลล์มากขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการประมวลผลภาพดังภาพประกอบที่ 4-12 (ง.) ภาพถ่ายความเร็วช้าเตอร์สูงจึงเหมาะสำหรับการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่ปะปนอยู่ในชั้นปราศจากเซลล์ ดังนั้นผลการตรวจสอบขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณต่างๆ จะอ้างอิงจากภาพถ่ายความเร็วช้าเตอร์ต่ำเป็นหลัก



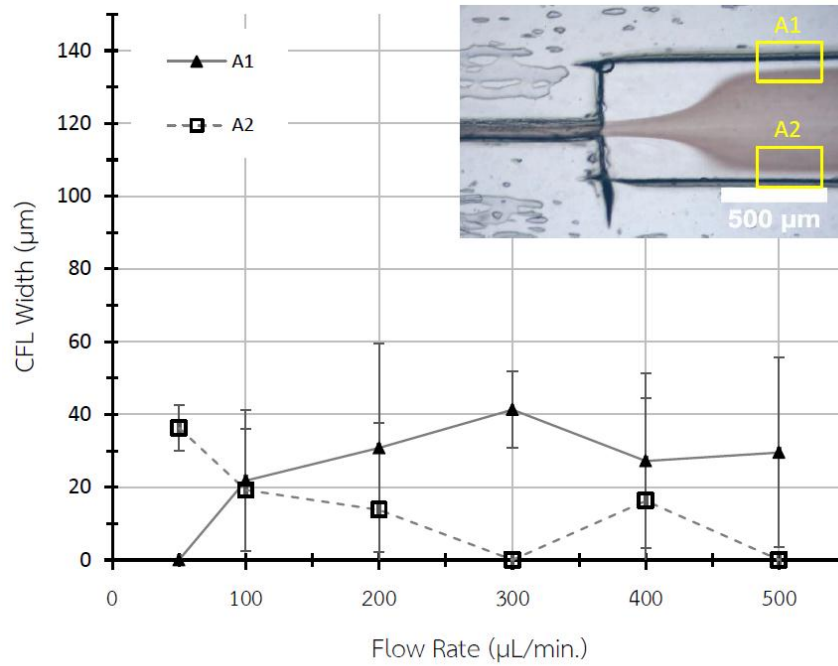
ภาพประกอบที่ 4-12 ภาพถ่ายความเร็วช้าเตอร์ต่ำ (ก. และ ข.) และเร็วช้าเตอร์สูง (ค. และ ง.) ของเลือดภายในช่องไมโครฟลูอิดิกที่อัตราการไหล 200 ไมโครลิตรต่อนาที

ความหนาของชั้นปราศจากเซลล์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรมีความแปรปรวนสูง เนื่องจากในแต่ละกลุ่มการทดลองมีความแปรปรวนจากลักษณะการบิดเบี้ยวของช่องไมโครฟลูอิดิกซึ่งไม่สามารถควบคุมได้รวมอยู่ด้วย ด้วยเหตุนี้ช่องไมโครฟลูอิดิกในกลุ่มการทดลองเดียวกันสามารถกระตุ้นให้เกิดชั้นปราศจากเซลล์ได้แตกต่างกัน สาเหตุหลักของปัญหานี้เกิดจากกระแสไหลวน (Vortex) ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-13 กระแสไหลวนที่เกิดขึ้นจะรบกวนการไหลแบบราบเรียบของเซลล์เม็ดเลือดแดงและส่งผลกระทบต่อชั้นปราศจากเซลล์ ผลการทดลองพบว่ากระแสไหลวนเกิดขึ้นได้ง่ายเมื่อใช้อัตราการไหลสูงในช่วง 400 ถึง 500 ไมโครลิตรต่อนาที

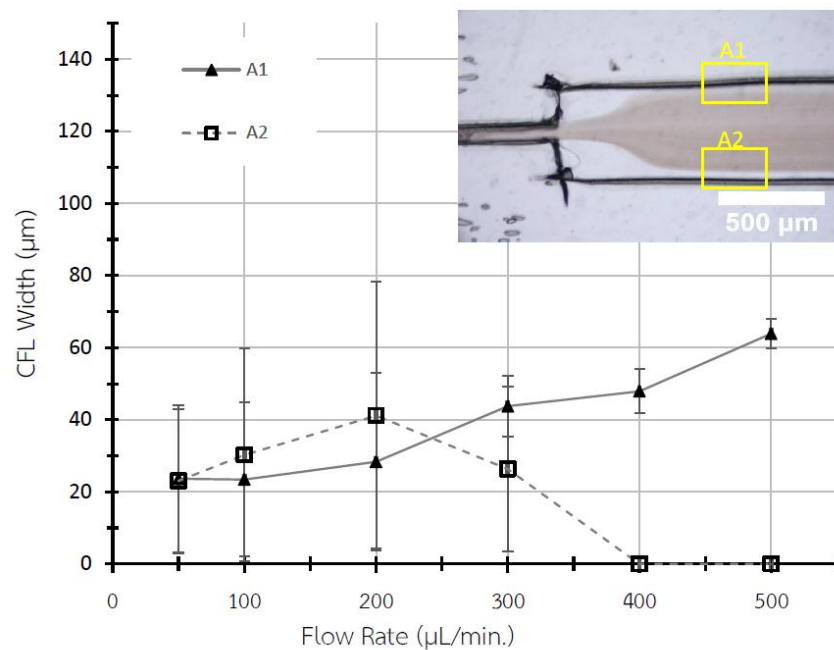
จากผลการทดลองพบว่าช่องไมโครฟลูอิดิกทั้ง 3 อัตราส่วน คือ 0.10 0.15 และ 0.20 สามารถกระตุ้นให้เกิดชั้นปราศจากเซลล์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกได้ดังภาพประกอบที่ 4-13 4-14 และ 4-15 ตามลำดับ กราฟข้อมูลผลการตรวจวัดขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 และบริเวณ A2 แสดงให้เห็นว่าชั้นปราศจากเซลล์ที่เกิดขึ้นมีความไม่แน่นอนและเกิดขึ้นอย่างไม่สมมาตร การเกิดชั้นปราศจากเซลล์เพียงด้านเดียวมักจะได้รับผลกระทบจากกระแสไหลวนที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ผลการตรวจวัดขนาดยังมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงจนไม่สามารถระบุอิทธิพลที่มีบทบาทสำคัญต่อการขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์



ภาพประกอบที่ 4-13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลที่มีผลต่อขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ในช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรที่มีอัตราส่วน 0.10



ภาพประกอบที่ 4-14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลที่มีผลต่อขนาดของ
ชั้นปราศจากเซลล์ในช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรที่มีอัตราส่วน 0.15



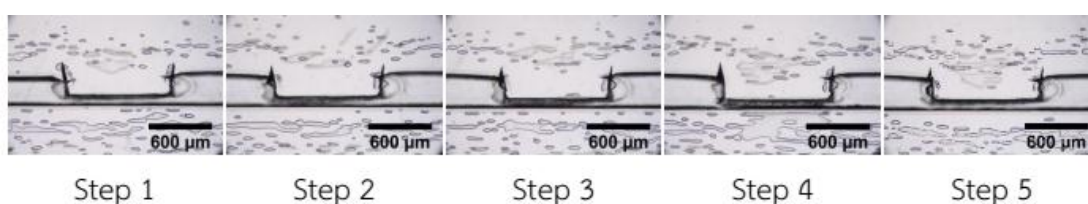
ภาพประกอบที่ 4-15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลที่มีผลต่อขนาดของ
ชั้นปราศจากเซลล์ในช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรที่มีอัตราส่วน 0.20

4.2.2 ผลการศึกษาวิธีการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องبيبตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร

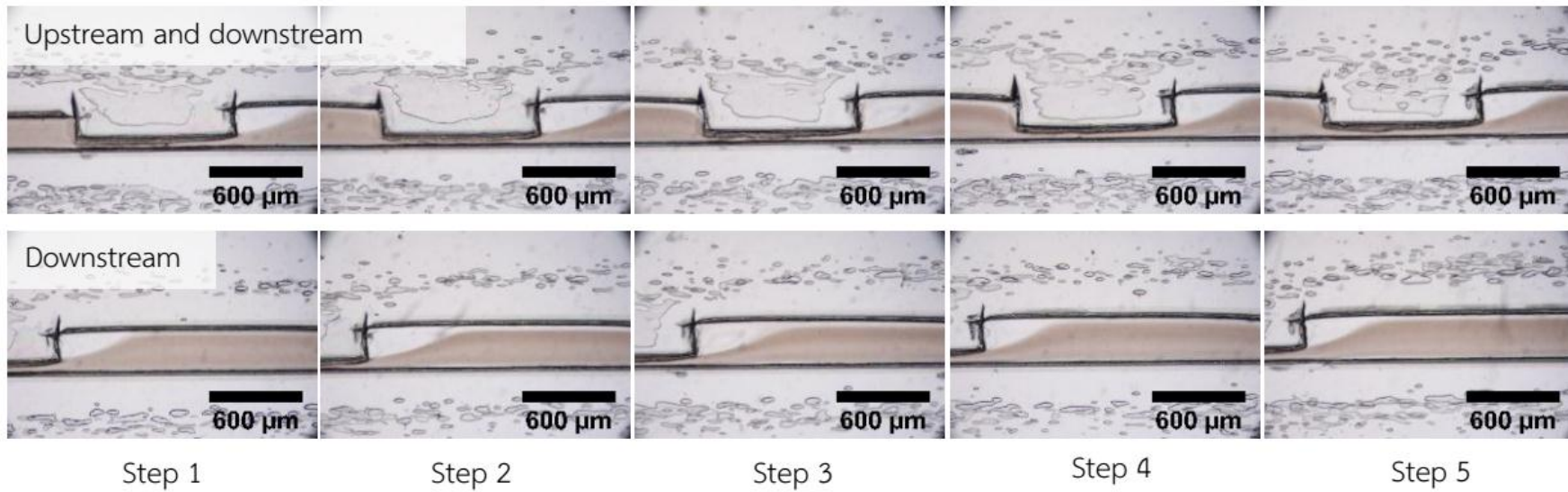
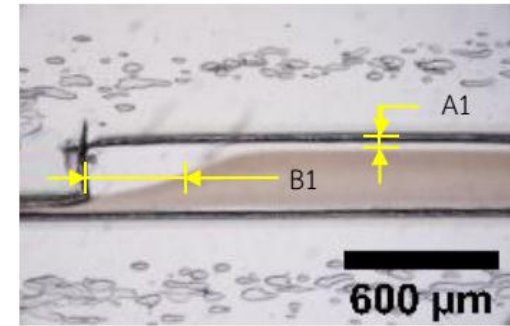
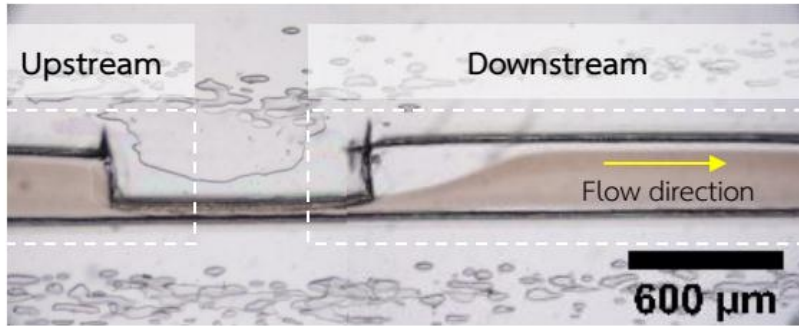
การทดลองนี้ได้ปรับปรุงรูปแบบของช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดبيبตัว-ขยายตัวให้จัดวางอย่างไม่สมมาตรเพื่อช่วยลดปัญหาการเกิดชั้นปราศจากเซลล์ที่ไม่สมมาตรและไม่แน่นอน การจัดวางอย่างไม่สมมาตรนั้นเลือกจัดวางช่องبيبตัวที่บริเวณขอบด้านล่างของช่องขยายตัวดังภาพประกอบที่ 4-18 การทดลองนี้ใช้ช่องبيبตัว-ขยายตัวที่มีขนาดความกว้างและความยาวของช่องبيبตัวเท่าเดิม และใช้ช่องขยายตัวที่มีขนาดความกว้าง 300 ไมโครเมตร นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากข้อมูลผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าช่องبيبตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรที่มีอัตราส่วนเป็น 0.15 และ 0.20 สามารถกระตุ้นให้เกิดชั้นปราศจากเซลล์ได้ดีพอสมควร ดังนั้นเมื่อพิจารณาขนาดความกว้างของช่องขยายตัวเพียงครั้งเดียวจะได้ช่องที่มีขนาดประมาณ 287 ไมโครเมตรซึ่งใกล้เคียงกับขนาดความกว้างของช่องขยายตัวที่ต้องการใช้งาน การทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ช่องبيبตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่อัตราส่วน 0.3 ที่มีความกว้างของช่องبيبตัวและช่องขยายตัวเท่ากับ 100 และ 300 ไมโครเมตร ตามลำดับ

จากข้อมูลการทบทวนวรรณกรรมพบว่าช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดبيبตัว-ขยายตัวสามารถเรียงต่อกันแบบอนุกรมเพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการจัดเรียงอนุภาคได้ [27]–[29], [43] การทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้ช่องبيبตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรต่ออนุกรมกัน 5 ลำดับดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-16 เพื่อศึกษาปัจจัยจากอัตราการไหลและปัจจัยจากลำดับอนุกรมที่มีผลต่อการขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ตามรายละเอียดในแผนการทดลองที่ 4 ซึ่งได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 3.1.2

ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ที่มีความแน่นอนมากขึ้น เนื่องจากช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดبيبตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรช่วยลดโอกาสที่จะเกิดชั้นปราศจากเซลล์แบบไม่สมมาตร นอกจากนี้ยังช่วยลดความแปรปรวนอันเนื่องมากระแสไหลวนได้อีกตัวแปรหนึ่ง เมื่อสังเกตชั้นปราศจากเซลล์ที่เกิดขึ้นภายในช่องไมโครฟลูอิดิกดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-17 พบว่าที่บริเวณ A1 และ B1 นั้นเกิดชั้นปราศจากเซลล์ที่ชัดเจนกว่า

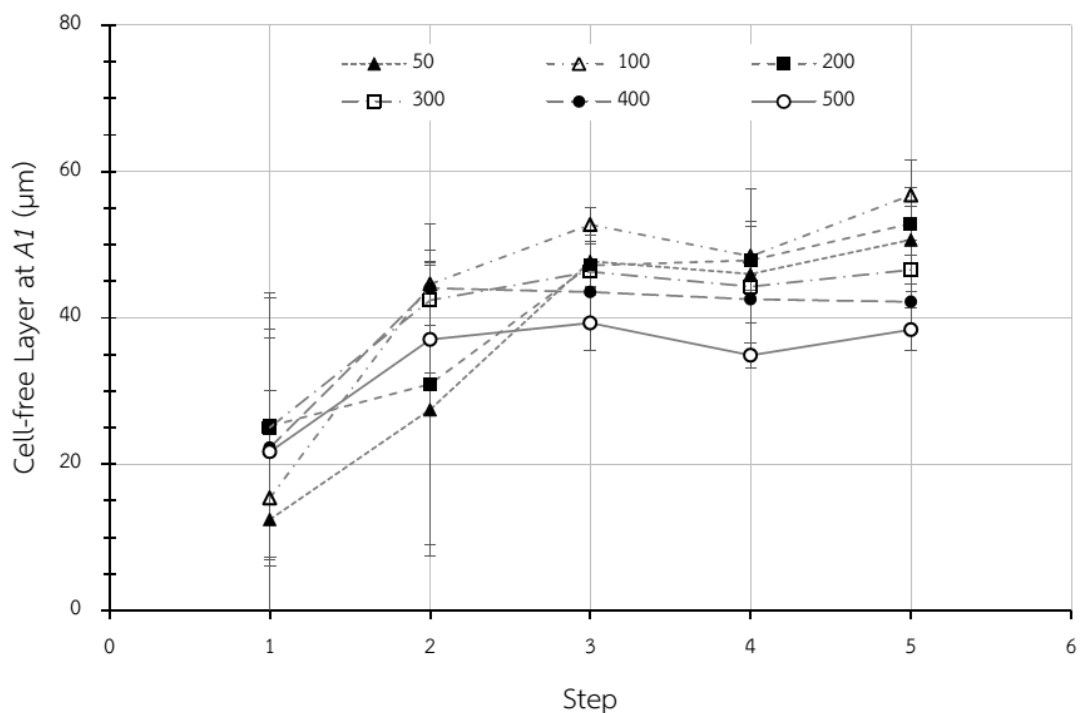


ภาพประกอบที่ 4-16 ลักษณะอนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดبيبตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร



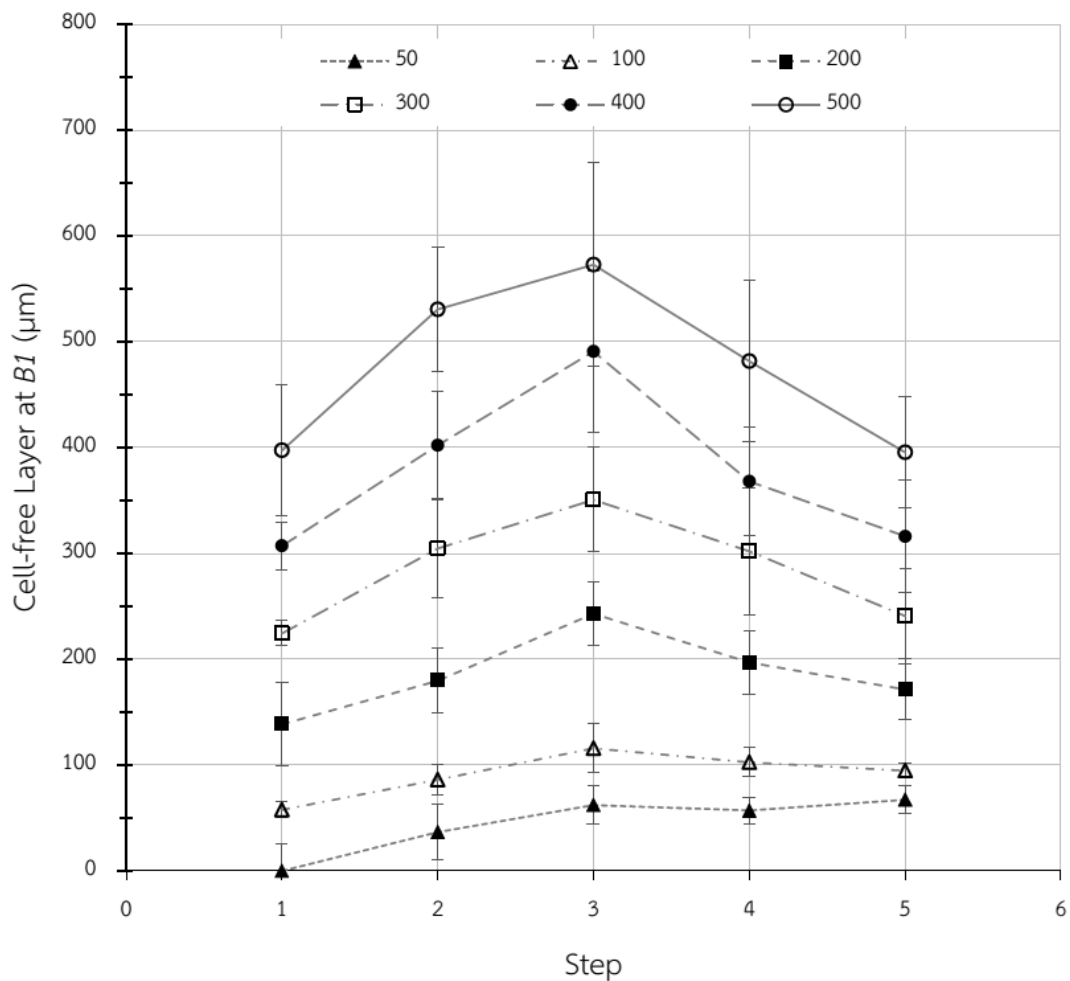
ภาพประกอบที่ 4-17 ลักษณะการเกิดขึ้นปราศจากเซลล์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่ต่อเรียงกันแบบอนุกรม 5 ลำดับ ที่อัตราการไหล 300 ไมโครลิตรต่อนาที

บริเวณอื่นๆ การทดลองนี้จึงนำผลการพิจารณาความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 และ B1 มาใช้วิเคราะห์ผล กราฟผลการพิจารณาขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 สามารถแสดงได้ดังภาพประกอบที่ 4-18 จากผลการวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างปัจจัยจากอัตราการไหลกับลำดับอนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิคสรุปได้ว่าอิทธิพลจากอนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิคมีผลต่อการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ลำดับอนุกรมที่สามารถกระตุ้นให้เกิดชั้นปราศจากเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเริ่มตั้งแต่อนุกรมลำดับที่ 2 และชั้นปราศจากเซลล์เริ่มมีความสม่ำเสมอมากขึ้นในอนุกรมลำดับที่ 3 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้อัตราการไหล 300 ไมโครลิตรต่อนาที สำหรับอนุกรมลำดับที่ 4 และ 5 นั้นมีความสามารถในการขยายชั้นปราศจากเซลล์เช่นกัน แต่ขนาดความกว้างที่ได้ไม่มีความแตกต่างจากความกว้างในลำดับที่ 3 ซึ่งมีความกว้างประมาณ 35 ถึง 55 ไมโครเมตร นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่อนุกรมลำดับต่างๆ เริ่มมีความแปรปรวนน้อยลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อนุกรมตั้งแต่ลำดับที่ 3 เป็นต้นไป ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการต่ออนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิคช่วยเพิ่มความสม่ำเสมอและความสามารถในการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์



ภาพประกอบที่ 4-18 ความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 ภายในช่องไมโครฟลูอิดิคชนิด
 บีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่ลำดับและอัตราการไหลต่างๆ

ต่อมาเป็นผลการพิจารณาความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ *B1* ซึ่งพิจารณาที่ตำแหน่งกึ่งกลางความกว้างของช่องปลายน้ำ โดยศึกษาผลการขยายชั้นปราศจากเซลล์จาก 2 ปัจจัยเช่นเดียวกัน คือ ปัจจัยจากอัตราการไหลและปัจจัยจากลำดับอนุกรม ผลการทดลองแสดงดังกราฟในภาพประกอบที่ 4-19 โดยจากผลการวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างปัจจัยทั้ง 2 สรุปได้ว่าอิทธิพลจากอัตราการไหลและอิทธิพลจากอนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิคล้วนมีผลต่อการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่อิทธิพลร่วมจากทั้งสองปัจจัยนั้นไม่มีผลต่อการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ จากข้อมูลผลการทดลองพบว่าการใช้อัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาทีขึ้นไปเริ่มมีผลต่อการขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ *B1* เมื่อสังเกตอิทธิพลจากอนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิคร่วมด้วยจะเห็นลักษณะความสัมพันธ์ที่ไปในทางเดียวกันเมื่อใช้จำนวนอนุกรมไม่เกิน 3 ลำดับ ความสัมพันธ์ในช่วงการใช้อุณหภูมิไม่เกิน 3 ลำดับมี



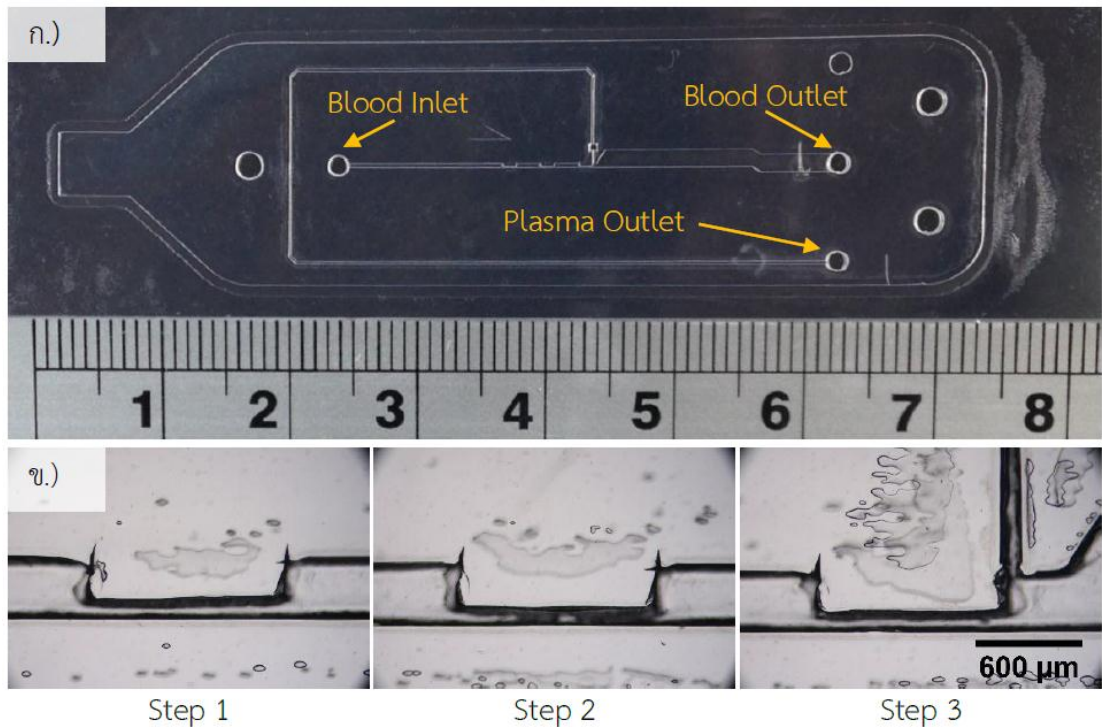
ภาพประกอบที่ 4-19 ความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ *B1* ภายในช่องไมโครฟลูอิดิคชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรที่ลำดับและอัตราการไหลต่างๆ

แนวโน้มนำช่วยขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ให้กว้างขึ้น แต่ในทางกลับกันหากใช้จำนวนอนุกรมมากกว่า 3 ลำดับจะเริ่มส่งผลให้ความสามารถในการขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ลดลง ดังนั้นการใช้งานช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรเพื่อขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ควรใช้การต่ออนุกรมไม่เกิน 3 ลำดับ

4.3 ความสามารถและคุณภาพของวิธีการคัดแยกน้ำเลือดด้วยช่องไมโครฟลูอิดิก

จากผลการทดลองที่ผ่านมาทั้งหมดสามารถสรุปรูปแบบช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับใช้ทดสอบคัดแยกน้ำเลือดได้ดังนี้ ควรใช้งานอนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตร โดยใช้ช่องที่มีอัตราส่วนช่องของบีบตัว-ขยายตัวที่ 0.3 ต่ออนุกรมกัน 3 ลำดับ ลักษณะโดยรวมของช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรจึงมีขนาดความกว้างของช่องขยายตัว (W_3) ขนาดความกว้างของช่องบีบตัว (W_2) และขนาดความยาวของช่องบีบตัว (L) ที่ขนาด 300 100 และ 1,000 ไมโครเมตรตามลำดับ ขึ้นต่อมาเป็นการออกแบบเพิ่มเติมในส่วนช่องคัดแยกน้ำเลือด ผู้วิจัยได้ออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดเล็กสำหรับใช้คัดแยกน้ำเลือดที่บริเวณอนุกรมลำดับที่ 3 โดยใช้ขนาดความกว้างของช่องไม่เกิน 100 ไมโครเมตรเพื่อลดการรบกวนขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ $A1$ และ $B1$ ความยาวของช่องคัดแยกน้ำเลือดได้ปรับปรุงให้เหมาะสม โดยคำนวณจากค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิก เนื่องจากข้อมูลจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกให้สามารถใช้งานได้จริงจะต้องคำนึงถึงค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิก จากการนำข้อมูลการออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดในงานวิจัยต่างๆ [26], [44] มาคำนวณหาค่าความต้านทานไฮดรอลิกตามสมการที่ 2-16 พบว่าค่าความต้านทานภายในช่องคัดแยกน้ำเลือด (R_p) มีค่ามากกว่าค่าความต้านทานภายในช่องทางไหลหลักของตัวอย่างเลือด (R_B) ประมาณ 50 ถึง 58 เท่าดังรายละเอียดการคำนวณในภาคผนวก ข. งานวิจัยนี้จึงอ้างอิงอัตราส่วนในช่วงนี้มาใช้ออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับการคัดแยกน้ำเลือด

ช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบสำหรับคัดแยกน้ำเลือดได้ออกแบบให้มีค่า R_p มากกว่าค่า R_B ประมาณ 50 เท่า และพยายามออกแบบช่องให้มีการสูญเสียน้ำเลือดภายในระบบน้อยที่สุด ในที่นี้ได้ปรับปรุงด้วยการใช้ช่องคัดแยกน้ำเลือดขนาดเล็กเพื่อช่วยเพิ่มค่าความต้านทานภายในช่องแทนการปรับปรุงความยาวของช่องเพียงอย่างเดียว สุดท้ายจึงได้ช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-20 จากการตรวจสอบขนาดและคำนวณค่าความต้านทานภายในช่องที่เกิดขึ้นจริงจะได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4-1 จากการคำนวณตามสมการที่ 2-16 พบว่าค่า R_p มากกว่าค่า R_B



ภาพประกอบที่ 4-20 ชิปไมโครฟลูอิดิคสำหรับคัดแยกน้ำเลือดที่มีค่าความต้านทานไฮดรอลิกระหว่างช่องคัดแยกน้ำเลือดและช่องทางออกหลักต่างกัน 52 เท่า

ประมาณ 52 เท่า ซึ่งใกล้เคียงกับเป้าหมายการออกแบบในช่วง 50 ถึง 58 เท่า ซึ่งงานต้นแบบของช่องไมโครฟลูอิดิคชุดนี้จะนำมาใช้ในการทดสอบหาอัตราการคัดแยก ประสิทธิภาพในการคัดแยกและตรวจสอบคุณภาพของน้ำเลือดดังกล่าวจะได้นำเสนอผลการทดสอบในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 4-1 ตารางแสดงขนาดและค่าความต้านทานของระบบไมโครฟลูอิดิคสำหรับคัดแยกน้ำเลือดที่มีค่าความต้านทานระหว่างช่องคัดแยกน้ำเลือดและช่องทางออกหลักต่างกัน 52 เท่า

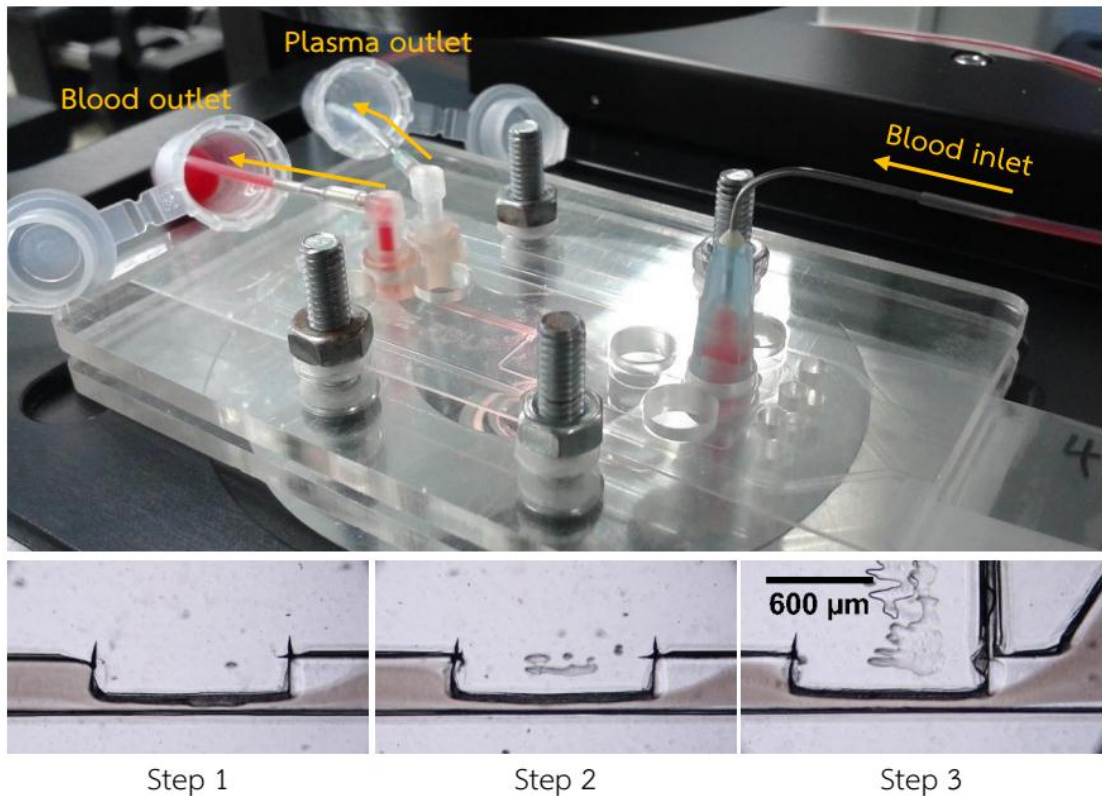
Channel	No.	Width (mm)	Length (mm)	Depth (mm)	Resistance (Pa·s· μm^{-3})
Main blood channel at downstream	1	0.300	1.000	0.150	2.667E-09
	2	1.200	20.000	0.150	7.500E-08
	Total channel resistance				7.767E-08
Plasma channel	1	0.075	1.00	0.150	4.267E-07
	2	0.220	80.000	0.150	3.657E-06
	Total channel resistance				4.084E-06

4.3.1 ผลการทดสอบความสามารถของวิธีการคัตแยกน้ำเลือดด้วยช่องไมโครฟลูอิดิก

จากการทดลองที่ผ่านมาเราได้ระบบไมโครฟลูอิดิกที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการคัตแยกน้ำเลือด ตัวระบบใช้งานช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรนำมาเรียงต่อกัน 3 ลำดับ นอกจากนี้ยังออกแบบช่องคัตแยกน้ำเลือดที่ช่วยลดการสูญเสียเลือดภายในระบบพร้อมกับทำการคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องต่างๆ จนท้ายที่สุดได้ค่าความต้านทานของช่องคัตแยกน้ำเลือดมีค่ามากกว่าค่าความต้านทานจริงของช่องทางไหลหลักประมาณ 52 เท่าซึ่งใกล้เคียงกับเป้าหมาย การทดสอบในครั้งนี้จะดำเนินการตามรายละเอียดการทดสอบในหัวข้อที่ 3.1.3 โดยเลือกทำการทดสอบที่อัตราการไหล 100 200 และ 300 ไมโครลิตรต่อนาทีเพราะผลการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าอัตราการไหลในช่วงนี้สามารถขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 จนมีความกว้างมากกว่า 40 ไมโครเมตร และความกว้างที่บริเวณ B1 มากกว่า 100 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงที่จะเกิดกระแสไหลวนภายในช่องน้อยกว่าที่อัตราการไหล 400 และ 500 ไมโครลิตรต่อนาที

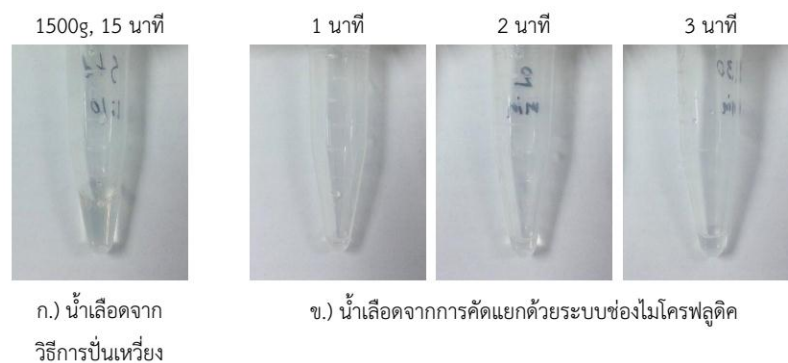
ชิ้นงานที่พร้อมสำหรับการทดสอบคัตแยกน้ำเลือดได้ผ่านการตรวจสอบขนาดความกว้างที่บริเวณต่างๆ ให้มีความผิดพลาดไม่เกิน 10% จากนั้นชิ้นงานจำนวน 3 ชิ้นจะถูกนำทดสอบการคัตแยกโดยเชื่อมต่อผ่านแท่นยึดจับที่สร้างขึ้นมาให้เหมาะสมกับการใช้งานร่วมกับกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 4-21 ระบบประกอบไปด้วย 1 ช่องทางเข้า 2 ช่องทางออก ช่องทางเข้าใช้สำหรับการป้อนตัวอย่างเลือดเข้าสู่ระบบ ช่องทางออกที่ 1 สำหรับการไหลออกของน้ำเลือดที่ผ่านการคัตแยกด้วยระบบไมโครฟลูอิดิก และช่องทางออกที่ 2 สำหรับการไหลออกของตัวอย่างเลือดที่ระบบไมโครฟลูอิดิกได้คัตแยกน้ำเลือดส่วนหนึ่งออกไปแล้ว ดังนั้นเราจึงสามารถจัดเก็บน้ำเลือดและตัวอย่างเลือดที่ผ่านกระบวนการคัตแยกได้ในเวลาเดียวกัน

ปริมาณน้ำเลือดที่ได้จากการคัตแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกนั้นขึ้นอยู่กับอัตราการคัตแยกของระบบและระยะเวลาในการคัตแยก ผลการทดสอบคัตแยกน้ำเลือดด้วยอัตราการไหล 100 และ 200 ไมโครลิตรต่อนาทีไม่สามารถจัดเก็บน้ำเลือดจากภายนอกช่องไมโครฟลูอิดิกได้ ในขณะที่ผลการทดสอบคัตแยกน้ำเลือดที่อัตราการไหล 300 ไมโครลิตรต่อนาทีสามารถจัดเก็บน้ำเลือดจากภายนอกช่องไมโครฟลูอิดิกได้ จากภาพประกอบที่ 4-22 จะเห็นได้ว่าสามารถจัดเก็บน้ำเลือดได้มากขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการจัดเก็บมากขึ้น สำหรับการจัดเก็บน้ำเลือดเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของงานวิจัยนี้เลือกใช้การจัดเก็บทุกๆ 2 นาที เนื่องจากเมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำเลือดที่ได้พบว่าที่ 1 นาทีนั้นได้ปริมาณน้ำเลือดที่น้อยเกินไปจนไม่เหมาะสมที่จะใช้ข้อมูลจากกราฟเปรียบเทียบ



ภาพประกอบที่ 4-21 การทดสอบคัดแยกน้ำเลือดโดยใช้แทนยัดจับชิ้นงานช่วยเชื่อมต่อแผ่นชิประบบไมโครฟลูอิดิคต้นแบบกับท่อนำส่งตัวอย่างเลือด

น้ำหนักต่อปริมาตรในภาคผนวก ค. เพื่อการคำนวณ ในขณะที่การจับน้ำเลือด 3 นาทีนั้นใช้ตัวอย่างเลือดและระยะเวลาในการจับมากเกินไปทำให้ไม่สามารถจับตัวอย่างเลือดได้ครบ 3 ชุดภายใน 1 รอบการทดลองซึ่งใช้ตัวอย่างเลือด 3 มิลลิลิตร การเลือกใช้ระยะเวลาจับน้ำเลือดเพียง 2 นาทีจึงมีความเหมาะสมมากที่สุดเพราะว่าได้น้ำเลือดที่มีปริมาณอยู่ระหว่างชุดข้อมูลของกราฟเปรียบเทียบน้ำหนักต่อปริมาตรและไม่สิ้นเปลืองตัวอย่างเลือดมากเกินไป



ก.) น้ำเลือดจากวิธีการปั่นเหวี่ยง

ข.) น้ำเลือดจากการคัดแยกด้วยระบบช่องไมโครฟลูอิดิค

ภาพประกอบที่ 4-22 น้ำเลือดที่ได้จากวิธีการปั่นเหวี่ยง (ก.) และระบบไมโครฟลูอิดิคที่เวลาต่างๆ (ข.)

ผลการจัดเก็บน้ำเลือดทุกๆ สองนาที่ที่เหมาะสมสำหรับใช้ประเมินประสิทธิภาพในการคัดแยกของช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบ ข้อมูลในตารางที่ 4-2 บันทึกผลการจัดเก็บน้ำเลือดจากการคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิคทุก 2 นาที จากตารางสามารถสรุปได้ว่าช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบสามารถคัดแยกน้ำเลือดได้ประมาณ 10 ไมโครลิตรโดยใช้เวลา 2 นาที เนื่องจากทำการคัดแยกที่อัตราการไหล 300 ไมโครลิตรต่อนาที ดังนั้นช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบที่ใช้ทดสอบจึงมีอัตราการคัดแยกน้ำเลือดประมาณ 5 ไมโครลิตรต่อนาที เมื่อพิจารณาอัตราการคัดแยกของระบบเปรียบเทียบกับอัตราการไหลของตัวอย่างเลือดที่เข้าสู่ระบบจึงสามารถสรุปได้ว่าระบบมีอัตราการคัดแยกประมาณร้อยละ 1.66 ถือว่าเป็นอัตราการคัดแยกที่ค่อนข้างน้อยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นซึ่งทำได้อยู่ที่ร้อยละ 10 ถึง 25 [26], [43], [44]

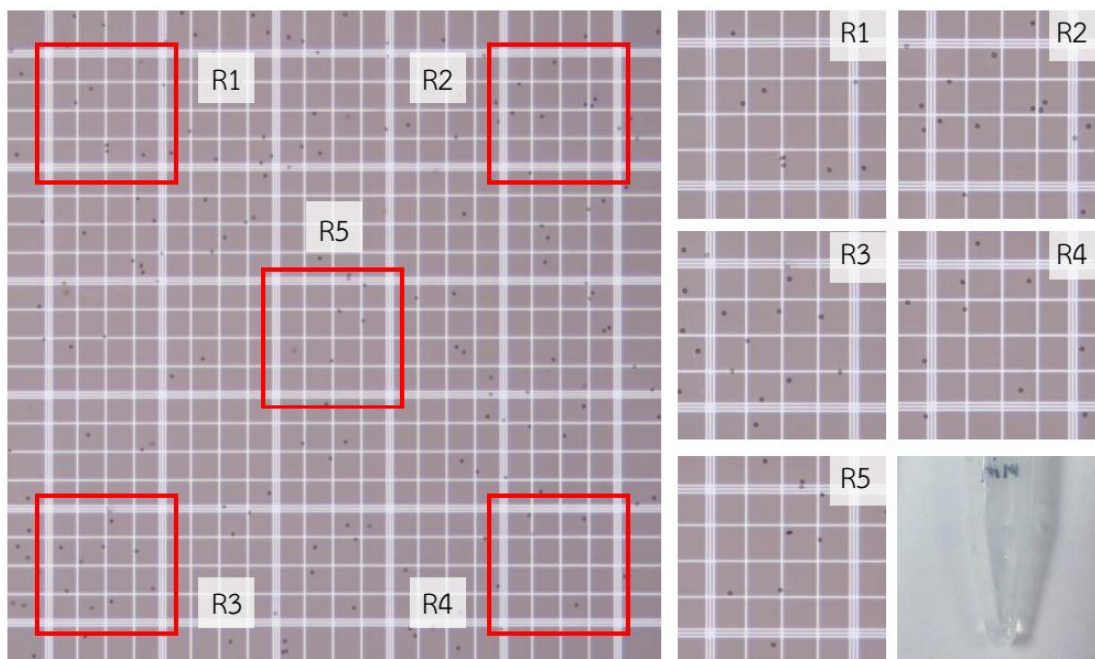
ตารางที่ 4-2 ผลการเก็บน้ำเลือดจากระบบไมโครฟลูอิดิคทุกๆ 2 นาที

Chip No.	Plasma weight (g)				Volume (μ L)	Yield (%)
	1	2	3	Avg.		
1	0.012	0.014	0.012	0.013	11.178	1.863
2	0.008	0.010	0.012	0.010	8.937	1.489
3	0.008	0.014	0.010	0.011	9.497	1.583

4.3.2 ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำเลือดที่คัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิค

จากผลการตรวจสอบปริมาณน้ำเลือดทำให้เราจำเป็นต้องนำน้ำเลือดจากการจัดเก็บทั้ง 3 ครั้งมารวมกันให้ได้ปริมาณมากพอสำหรับการตรวจนับจำนวนเซลล์ การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดำเนินการตามรายละเอียดการตรวจนับในหัวข้อที่ 3.1.3 ภาพประกอบที่ 4-23 แสดงให้เห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนในน้ำเลือดและพื้นที่สำหรับการตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้ง 5 จุด น้ำเลือดที่สามารถคัดแยกได้ถูกผสมกับ Gower's solution ที่อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เพื่อการสังเกตเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีขึ้นและสามารถเก็บบันทึกภาพได้ชัดเจน กรณีนี้จะต้องคำนวณจำนวนเซลล์โดยคิดค่าระดับความเจือจาง (Dilution factor) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2 ร่วมด้วย

ผลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดซึ่งได้จากการคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิคแสดงให้เห็นน้ำเลือดที่ยังมีการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดง ข้อมูลในตารางที่ 4-3 แสดงให้เห็นจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนในน้ำเลือดซึ่งมีค่าโดยเฉลี่ยประมาณ 3,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร เมื่อกำหนดประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์โดยอ้างอิงจำนวนเซลล์ตั้งต้นตามจำนวน



ภาพประกอบที่ 4-23 การปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดจากการแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกและภาพขยายของพื้นที่สำหรับการตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้ง 5 บริเวณ

เซลล์ในเลือดปกติที่ 4.5 ถึง 6 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร ดังนั้นจำนวนเซลล์ตั้งต้นของตัวอย่างเลือดเจือจางที่ระดับ 1:10 โดยปริมาตรจะเหลือประมาณ 0.45 ถึง 0.60 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร เมื่อคำนวณประสิทธิภาพในการคัดแยกตามสมการที่ 3.1 จะพบว่าช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบมีประสิทธิภาพในการคัดแยกสูงถึงร้อยละ 99 เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ [26], [41], [43], [44] ดังนั้นน้ำเลือดที่ได้จากการคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบยังมีคุณภาพทัดเทียมกับระบบไมโครฟลูอิดิกจากกลุ่มงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งใช้เทคโนโลยีขั้นสูงในการผลิต

การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดที่ได้จากวิธีการปั่นเหวี่ยงและระบบไมโครฟลูอิดิกนั้นมีความแตกต่างกันมาก เนื่องจากตรวจพบเซลล์ในน้ำเลือดที่ได้จากวิธีการปั่น

ตารางที่ 4-3 ผลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนในน้ำเลือด

Chip No.	RBC-count from five R-boxes (Cells)						Dilution factor	RBC Count (Cells/ μ L)
	1	2	3	4	5	Total		
1	9	6	14	5	10	44	1	2,200
2	19	12	20	14	19	84	1	4,200
3	9	4	5	7	5	30	2	3,000

เหวี่ยงได้น้อยมากประมาณ 1 ถึง 2 เซลล์ต่อไมโครลิตรเท่านั้น หากนำข้อมูลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำเลือดที่ได้จากช่องไมโครฟลูอิดิกมาทำการเปรียบเทียบจะมีความแตกต่างกันมาก อาจพูดได้ว่าวิธีการปั่นเหวี่ยงสามารถคัดแยกได้ 100% อย่างไรก็ตามช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบสามารถคัดแยกเซลล์ได้ถึง 99% ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องทำการเปรียบเทียบข้อมูลการตรวจนับจำนวนเซลล์เพื่อยืนยันคุณภาพของน้ำเลือดที่ได้จากวิธีการปั่นเหวี่ยงและช่องไมโครฟลูอิดิก

จากผลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนในน้ำเลือดซึ่งมีค่าโดยเฉลี่ยประมาณ 3,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร หากนำมาคำนวณหาสัดส่วนของสารฮีโมโกลบิน (Hb) เบื้องต้นตามสมการที่ 3.2 พบว่าน้ำเลือดที่ได้จากการคัดแยกจะมีความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินประมาณ 0.0094 กรัมต่อเดซิลิตรหรือ 0.094 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งต่ำกว่าข้อมูลกำหนดของห้องปฏิบัติการทางเคมีคลินิก โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการทางเคมีคลินิกยอมรับการปนเปื้อนของสารฮีโมโกลบินในน้ำเลือดได้ที่ระดับความเข้มข้น 2–10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อมูลการประเมินเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าน้ำเลือดที่คัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกต้นแบบมีการปนเปื้อนของสารฮีโมโกลบินต่ำกว่าระดับที่ห้องปฏิบัติการทางเคมีคลินิกกำหนด ดังนั้นน้ำเลือดที่ได้จากวิธีการคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกได้

4.4 สรุป

จากการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยในการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกขนาดต่างๆ ด้วยเครื่องตัดพลาสมาสรุปได้ว่าเราสามารถสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกได้ด้วยการตัดฮาล์ฟคัทและการตัดไดคัท การตัดฮาล์ฟคัทเหมาะสำหรับใช้สร้างช่องที่มีขนาดเล็กประมาณ 30 ถึง 100 ไมโครเมตรโดยสามารถควบคุมได้ด้วยระดับแรงกด การตัดไดคัทเหมาะสำหรับใช้สร้างช่องที่มีขนาดความกว้างมากกว่า 100 ไมโครเมตรขึ้นไปโดยควบคุมขนาดความกว้างด้วยการออกแบบ นอกจากนี้สิ่งที่จะต้องคำนึงเพิ่มเติมคือแนวแกนหรือทิศทางในการตัดและวัสดุตัด เนื่องจากเครื่องตัดพลาสมาแต่ละรุ่นย่อมมีความสามารถแตกต่างกัน ดังนั้นการใช้งานเครื่องตัดพลาสมารุ่นอื่นๆ จึงอาจมีผลกระทบจากปัจจัยเหล่านี้ได้เช่นเดียวกับเครื่องตัดพลาสมา Silhouette Cameo[®] อย่างไรก็ตามด้วยข้อมูลการทดสอบต่างๆ ทำให้เราสามารถนำเครื่องตัดพลาสมาไปใช้สร้างระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่องานต่างๆ ได้อย่างสะดวกและมีต้นทุนต่ำ

การขยายขนาดของชั้นปราคาจากเซลล์ด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการขยายขนาดความกว้างของชั้น

ปราศจากเซลล์อย่างมีคุณภาพ และยังสามารถเพิ่มขึ้นเมื่อเรานำช่องไมโครฟลูอิดิกนี้มาเรียงต่อกันแบบอนุกรม อย่างไรก็ตามการเรียงต่อกันแบบอนุกรมนั้นได้แสดงให้เห็นว่าไม่มีความจำเป็นจะต้องใช้อุณหภูมิจำนวนมากเพื่อการขยายชั้นปราศจากเซลล์ จากผลการทดลองเราสามารถขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 ได้จนมีความกว้างประมาณ 30 ถึง 60 ไมโครเมตร และบริเวณ B1 มีความกว้างประมาณ 100 ถึง 300 ไมโครเมตรโดยใช้การต่ออนุกรมกัน 3 ลำดับ ความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ชุดนี้เพียงพอที่จะนำไปใช้คัดแยกน้ำเลือด

การคัดแยกน้ำเลือดด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำได้แสดงให้เห็นว่าสามารถทำงานได้จริง แต่อัตราการคัดแยกของระบบยังทำได้เพียง 5 ไมโครลิตรต่อนาทีซึ่งถือว่าน้อยกว่างานวิจัยกลุ่มอื่นๆ ที่ใช้เทคโนโลยีขั้นสูงในการสร้างอยู่ประมาณ 4 เท่า อย่างไรก็ตามระบบที่นำเสนอมีประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์ได้ร้อยละ 99 จากจำนวนเซลล์ตั้งต้นเช่นเดียวกับกลุ่มวิจัยอื่นๆ ข้อมูลจากการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเลือดพบว่าการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ยประมาณ 3,000 เซลล์ต่อไมโครลิตรได้แสดงให้เห็นว่าที่ประสิทธิภาพในการคัดแยกน้ำเลือดร้อยละ 99 นั้นยังคงมีการปนเปื้อนของเซลล์อยู่เล็กน้อยซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์สารทางเคมีคลินิกได้ ดังนั้นหากต้องการยืนยันคุณภาพของน้ำเลือดในระดับการใช้งานทางคลินิกจึงควรมีการศึกษาและยืนยันผลด้วยการทดสอบทางเคมีคลินิกเพิ่มเติม

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

เนื้อหาในบทนี้เป็นการกล่าวสรุปผลการดำเนินการศึกษาวิจัยด้านต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ ซึ่งมีรายละเอียดวิธีการดำเนินงานและผลการดำเนินงานตามข้อมูลในบทที่ 3 และบทที่ 4 ตามลำดับ ระหว่างการดำเนินงานตามขั้นตอนต่างๆ ในการพัฒนาระบบคัดแยกน้ำเลือดด้วยช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำย่อมพบเจอปัญหาและอุปสรรคมากมาย ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ปรับปรุงและแก้ไขแล้วในส่วนงานที่สามารถทำได้ เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง จึงได้สรุปผลพร้อมข้อเสนอแนะที่จำเป็นไว้ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

5.1 ผลสรุปการวิจัย

การศึกษาระบบในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้นำเสนอวิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ และนำเสนอการประยุกต์ใช้จริงด้วยการใช้คัดแยกน้ำเลือดเพื่อเป็นตัวอย่างการประยุกต์ใช้งานจริงทางด้านวิทยาศาสตร์ด้านการแพทย์ ด้วยความสามารถและข้อจำกัดของเทคนิคต้นทุนต่ำที่นำเสนอในครั้งนี้ทำให้ผู้วิจัยที่สนใจสามารถนำไปประยุกต์ใช้พัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่องานด้านอื่นๆ ได้อย่างเหมาะสม

5.1.1 การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำ

งานวิจัยนี้เลือกใช้งานเครื่องตัดพลาสมา 2 รุ่นซึ่งมีความสามารถแตกต่างกัน จากการทดสอบความสามารถในการตัดของเครื่องตัดทั้งสองรุ่นได้แสดงให้เห็นว่าเราสามารถสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกได้ด้วยการตัดฮาล์ฟคัทและการตัดโดคัท การตัดฮาล์ฟคัทนั้นเหมาะสมกับการสร้างช่องที่มีขนาดเล็กประมาณ 30 ถึง 100 ไมโครเมตร โดยควบคุมขนาดของช่องด้วยการจ่ายแรงกดที่ระดับต่างๆ ส่วนการตัดโดคัทนั้นมีความเหมาะสมกับการสร้างช่องที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 หรือ 200 ไมโครเมตรขึ้นไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความละเอียดในการตัดของเครื่องมือ การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยการตัดโดคัทสามารถควบคุมได้ด้วยการออกแบบช่องตามขนาดความกว้างที่ต้องการ แต่จำเป็นจะต้องทำการออกแบบโดยชดเชยค่าความผิดพลาดในการตัดเพื่อให้ได้ช่องที่มีขนาดตรงตามเป้าหมายมากที่สุด จากผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าเครื่องตัดทั้งสองรุ่นมีค่าความผิดพลาดในการตัดต่างกัน การสร้างช่องที่มีขนาดความกว้างประมาณ 300 ถึง 500 ไมโครเมตรด้วยเครื่องตัดพลาสมา

เตอร์ Silhouette Cameo[®] จะต้องทำการออกแบบช่องให้มีขนาดเล็กกว่าเป้าหมายประมาณร้อยละ 10 สำหรับการตัดตามแนวแกนตั้ง และร้อยละ 40 สำหรับการตัดตามแนวแกนนอน ในขณะที่การสร้างช่องด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60 นั้นมีข้อผิดพลาดที่ต่างไปดังนี้ การสร้างช่องที่มีขนาด 100 ถึง 200 ไมโครเมตรควรออกแบบช่องให้กว้างกว่าขนาดเป้าหมายประมาณร้อยละ 5 ถึง 30 และการสร้างช่องที่มีขนาดความกว้าง 300 ถึง 500 ไมโครเมตรจะมีอิสระในการเลือกใช้แนวแกนตัด แต่จำเป็นต้องออกแบบช่องให้มีขนาดเล็กกว่าขนาดเป้าหมายประมาณร้อยละ 10 ถึง 20 เนื่องจากเครื่องตัดพล็อตเตอร์มีความผิดพลาดในการตัดเกิดขึ้นเสมอ ดังนั้นควรตรวจสอบขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิกทุกครั้งก่อนการนำชิ้นงานไปใช้งานจริง

ลักษณะของช่องไมโครฟลูอิดิกที่สร้างด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์มี 2 ลักษณะที่สำคัญ ดังนี้ ลักษณะช่องรูปทรงสามเหลี่ยมซึ่งได้จากการตัดฮาล์ฟคัทจะมีรูปทรงสามเหลี่ยมหน้าจั่ว เช่นเดียวกับลักษณะใบมีดตัด และลักษณะช่องรูปทรงสี่เหลี่ยมคางหมูซึ่งได้จากการตัดไดคัท ช่องรูปทรงสามเหลี่ยมที่ได้จะมีขนาดความกว้างของฐานสามเหลี่ยมตั้งแต่ 30 ถึง 100 ไมโครเมตร เนื่องจากการตัดฮาล์ฟคัท ส่วนความลึกของช่องจะขึ้นอยู่กับขนาดของใบมีดตัดตามภาพประกอบที่ 3-9 ซึ่งแสดงไว้ในบทที่ 3 ช่องรูปทรงสามเหลี่ยมหน้าจั่วส่งผลให้เกิดเงามีติภายในช่อง ถึงแม้เงามีตินี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้งานในช่องแต่ช่องลักษณะนี้จะไม่เหมาะสำหรับการใช้สังเกตพฤติกรรมการไหลหรือการตรวจวัดด้วยแสง สำหรับช่องรูปทรงสี่เหลี่ยมคางหมูที่ได้จะมีขนาดความกว้างของด้านคู่ขนานใกล้เคียงกับขนาดช่องที่ออกแบบ แต่ขนาดความกว้างของด้านคู่ขนานจะไม่เท่ากันเนื่องจากลักษณะของใบมีดตัด โดยขนาดความกว้างของช่องที่เกิดจากบริเวณปลายใบมีดมีความกว้างจะน้อยกว่าความกว้างที่เกิดจากบริเวณโคนใบมีด ส่วนความลึกจะขึ้นอยู่กับความหนาของแผ่นวัสดุตัด ช่องรูปทรงสี่เหลี่ยมคางหมูมีเงามีติภายในช่องที่บริเวณขอบผนังช่องเพียงเล็กน้อยจึงสามารถใช้สังเกตพฤติกรรมการไหลหรือการตรวจวัดด้วยแสงได้ ดังนั้นการเลือกใช้งานช่องลักษณะต่างๆ จึงควรพิจารณาจากความต้องการที่จะนำไปประยุกต์ใช้งาน

สิ่งที่ต้องพึงระวังสำหรับการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิกด้วยเครื่องตัดพล็อตเตอร์คือการเสีรูปของช่องไมโครฟลูอิดิกระหว่างกระบวนการประกอบชิ้นงาน อัตราการเสีรูปจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการประกอบและคุณสมบัติของวัสดุ การประกอบชิ้นงานด้วยวิธีการรีดความร้อนที่ได้นำเสนอนั้นทำได้ง่ายและสะดวก แต่เป็นวิธีการที่มีอัตราการเสีรูปสูง จากการทดลองพบว่าช่องที่มีขนาด 50 ถึง 100 ไมโครเมตรบนพลาสติก PET เกิดการเสีรูปหลังการประกอบชิ้นงานประมาณร้อยละ 35 สำหรับช่องที่มีขนาด 200 ถึง 500 ไมโครเมตรหรือใหญ่กว่านี้จะมีอัตราการเสีรูปน้อยลงซึ่งผลการทดลองพบว่ามีกว่าอัตราการเสีรูปประมาณร้อยละ 20 การเสีรูปเนื่องจากการรีด

ความร้อนอาจส่งผลต่อขนาดของช่องเป็นอย่างมากเมื่อใช้กับวัสดุที่ไม่เหมาะสม เช่น กรณีที่ใช้พลาสติก PVC เป็นวัสดุตัดจะเกิดการเสียรูปหลังการประกอบชิ้นงานเกือบร้อยละ 80 เนื่องจากพลาสติก PVC มีค่าอุณหภูมิกลาสทรานสิชันต่ำกว่าอุณหภูมิที่ใช้ประกอบชิ้นงานจึงเกิดการบิดเบี้ยวและหดตัวได้ง่าย นอกจากนี้การประกอบชิ้นงานด้วยความร้อนจะไม่เหมาะสมหากมีการใช้งานวัสดุชีวภาพชนิดต่างๆ ภายในชิ้นงาน ดังนั้นควรพิจารณาเลือกใช้วิธีการประกอบชิ้นงานที่เหมาะสมกับลักษณะงานและวัสดุที่นำมาใช้งาน

จากข้อมูลงานวิจัยแสดงให้เห็นแล้วว่าเครื่องตัดพลาสมาสามารถใช้สร้างช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบเพื่องานต่างๆ ได้อย่างสะดวกและมีต้นทุนต่ำ นอกจากต้นทุนของเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการสร้าง เช่น เครื่องตัดพลาสมา เครื่องรีดความร้อน เทปกาว มีดตัด กรรไกร และอุปกรณ์อื่นๆ ซึ่งมีราคารวมแล้วไม่เกิน 150,000 บาท หากคำนวณต้นทุนเฉพาะวัสดุจะพบว่าเรามีต้นทุนจากราคาวัสดุอย่างน้อย 0.6 บาทต่อชิ้นงาน วิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิคที่นำเสนอจะช่วยให้เปิดโอกาสในการออกแบบและพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิคอย่างรวดเร็วและสามารถใช้สำหรับการทดลองเพื่อใช้ประเมินผลเบื้องต้นได้

5.1.2 การขยายขนาดของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องไมโครฟลูอิดิค

การขยายขนาดความกว้างของชั้นปราศจากเซลล์ด้วยช่องไมโครฟลูอิดิคในงานวิจัยนี้อยู่บนพื้นฐานทฤษฎีผลกระทบของ Fåhræus ซึ่งคณะวิจัยของ Faivre และ Marchalot เคยนำมาประยุกต์ใช้งาน [42], [43] โดยงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้งานร่วมกับทฤษฎีการแยกอนุภาคในการไหลแบบมัลติออริฟิซ (Multiorifice flow fractionation : MOFF) ซึ่งนิยมใช้ในการคัดแยกและจัดเรียงเซลล์หรืออนุภาคตามขนาด [27]–[29] ทฤษฎีทั้งสองสามารถทำงานร่วมกันในช่องไมโครฟลูอิดิคชนิดบีบตัว-ขยายตัวซึ่งมีรูปแบบที่ไม่ซับซ้อน ความสามารถของวิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิคด้วยเครื่องตัดพลาสมาที่นำเสนอไปนั้นเพียงพอสำหรับใช้สร้างช่องไมโครฟลูอิดิคชนิดบีบตัว-ขยายตัวที่มีอัตราส่วนต่างๆ ได้ ผลการวิจัยพบว่าช่องไมโครฟลูอิดิคชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบสมมาตรมีปัญหาจากเสถียรภาพระหว่างการประกอบชิ้นงานทำให้ไม่มีศักยภาพในการขยายชั้นปราศจากเซลล์ การเสถียรภาพจึงกลายเป็นตัวแปรที่เพิ่มเข้ามาในระบบและเป็นตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ ในขณะที่อนุกรมของช่องไมโครฟลูอิดิคชนิดบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรสามารถกระตุ้นให้เกิดชั้นปราศจากเซลล์เฉพาะบริเวณ A1 และ B1 ได้แน่นอนขึ้น สังเกตได้จากข้อมูลชั้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ A1 มีความแปรปรวนน้อยลงเริ่มตั้งแต่อนุกรมลำดับที่ 3 อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปผลในทางสถิติได้ว่าปัจจัยจากอัตราการไหลหรือปัจจัยจากลำดับอนุกรมที่ส่งผลให้เกิดการขยายตัวของชั้นปราศจากเซลล์ที่

บริเวณ A1 เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการทดลองยังมีความแปรปรวนสูงอันเนื่องมาจากตัวแปรภายนอก โดยเฉพาะข้อมูลในอนุกรมลำดับที่ 1 และ 2 ตัวแปรภายนอกที่สำคัญและยังไม่สามารถควบคุมได้คือการเสีรูปหรือความบิดเบี้ยวของช่องระหว่างการประกอบชิ้นงาน สำหรับข้อมูลขนาดของชิ้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ B1 นั้นมีความแปรปรวนน้อยกว่าและสามารถใช้ยืนยันผลการวิเคราะห์ทางสถิติได้ ผลการทดลองพบว่าปัจจัยจากอัตราการไหลและปัจจัยจากลำดับอนุกรมล้วนส่งผลต่อการขยายตัวของชิ้นปราศจากเซลล์ที่บริเวณ B1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ปัจจัยจากอัตราการไหลมีผลต่อการขยายตัวไปในทิศทางที่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้อัตราการไหลสูงขึ้น แต่ปัจจัยจากลำดับอนุกรมจะมีผลในทิศทางเดียวกับปัจจัยจากอัตราการไหลเฉพาะอนุกรมลำดับที่ 1-3 เท่านั้น สำหรับอนุกรมลำดับที่ 4 และ 5 จะเริ่มส่งผลในทิศทางตรงข้ามหรือส่งผลให้ชิ้นปราศจากเซลล์มีขนาดลดลง งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรมาต่ออนุกรมกันเพียง 3 ลำดับเพื่อใช้ในการพัฒนาช่องไมโครฟลูอิดิคสำหรับการคัดแยกน้ำเลือด

5.1.3 การประยุกต์ใช้ระบบไมโครฟลูอิดิคในการคัดแยกน้ำเลือด

การพัฒนาาระบบไมโครฟลูอิดิคสำหรับการคัดแยกน้ำเลือดใช้ช่องบีบตัว-ขยายตัวแบบไม่สมมาตรต่อเรียงแบบอนุกรม 3 ลำดับตามข้อสรุปที่ผ่านมา จากนั้นจึงออกแบบช่องสำหรับคัดแยกน้ำเลือดที่บริเวณช่องขยายตัวของอนุกรมลำดับที่ 3 ตามทฤษฎีผลกระทบของ Zweifach-Fung ซึ่ง Yang และคณะเคยนำมาประยุกต์ใช้งาน [26] การเพิ่มเติมช่องคัดแยกน้ำเลือดเข้ามาในระบบจะต้องมีการประเมินค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องต่างๆ ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกใช้รูปแบบช่องที่มีความต้านทานภายในช่องคัดแยกน้ำเลือดสูงกว่าช่องทางหลักของเลือดที่ประมาณ 50 ถึง 58 เท่า เช่นเดียวกับรูปแบบของช่องไมโครฟลูอิดิคที่งานวิจัยอื่นๆ ใช้งาน [26], [44] เมื่อนำข้อมูลขนาดของช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบที่บริเวณต่างๆ มาคำนวณตามสมการที่ 2.16 ซึ่ง Marchalot และคณะได้นำเสนอไว้ [43] พบว่าค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องคัดแยกน้ำเลือดสูงกว่าช่องทางออกของตัวอย่างเลือดประมาณ 52 เท่า ซึ่งใกล้เคียงกับเป้าหมายการออกแบบ

การทดสอบคัดแยกน้ำเลือดจากตัวอย่างเลือดเจือจาง 1:10 โดยปริมาตรหรือเลือดที่มีระดับฮีมาโตคริตประมาณร้อยละ 4.5 แสดงให้เห็นว่าช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้คัดแยกน้ำเลือดได้จริง ผลการจัดเก็บน้ำเลือดสรุปได้ว่าสามารถจัดเก็บน้ำเลือดได้ประมาณ 5 ไมโครลิตรต่อนาทีเมื่อใช้อัตราการไหล 300 ไมโครลิตรต่อนาที ดังนั้นอัตราการคัดแยกของระบบ (Volumetric extraction rate or plasma yield : η_{plasma}) จึงมีค่าประมาณร้อยละ 1.66 ของเลือดที่เข้าสู่ระบบ ซึ่งถือว่าทำได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการคัดแยกที่งานวิจัยอื่นทำได้ประมาณ

ร้อยละ 3.47 ด้วยตัวอย่างเลือดเจือจาง 1:20 โดยปริมาตร [44] จากผลการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเลือดพบว่าการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ยประมาณ 3,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร ในขณะที่นำเลือดจากการปั่นเหวี่ยงนั้นมีการปนเปื้อนของเซลล์น้อยมากจนสรุปได้ว่าไม่มีเซลล์ปนเปื้อน เมื่อคำนวณประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์โดยเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ตั้งต้นของตัวอย่างเลือดที่มีระดับฮีมาโตคริตร้อยละ 4.5 ถึง 6 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงประมาณ 0.45 ถึง 0.60 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร การคัดแยกด้วยช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบจึงมีประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์ออกจากน้ำเลือดได้ถึงร้อยละ 99 เช่นเดียวกับกลุ่มวิจัยอื่นๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลการตรวจสอบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงได้แสดงให้เห็นว่าที่ประสิทธิภาพในการคัดแยกเซลล์ร้อยละ 99 ยังคงมีการปนเปื้อนของเซลล์อยู่ระดับหนึ่งซึ่งอาจมีผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์ผลทางเคมีคลินิกได้ เมื่อทำการคำนวณหาสัดส่วนความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินเบื้องต้นจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตามสมการที่ 3.2 จะพบว่าน้ำเลือดที่ได้จากการคัดแยกมีความเข้มข้นของสารฮีโมโกลบินประมาณ 0.094 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งต่ำกว่าระดับที่ห้องปฏิบัติการทางเคมีคลินิกกำหนด น้ำเลือดจากการคัดแยกจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ทดสอบทางเคมีคลินิกได้ ดังนั้นหากต้องการยืนยันคุณภาพของน้ำเลือดในระดับการใช้งานทางคลินิกจึงควรมีศึกษาและยืนยันผลด้วยการทดสอบทางเคมีคลินิกเพิ่มเติม

โดยสรุปแล้วการวิจัยครั้งนี้สามารถนำเสนอวิธีการสร้างช่องไมโครฟลูอิดิคด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำและสามารถสร้างชิ้นงานต้นแบบเพื่อคัดแยกน้ำเลือดได้จริง แต่ช่องไมโครฟลูอิดิคต้นแบบเพื่อคัดแยกน้ำเลือดยังให้ผลการคัดแยกต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับระบบคัดแยกในงานวิจัยอื่น ในขณะที่คุณภาพของน้ำเลือดที่คัดแยกได้มีความใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการทดสอบทางเคมีคลินิกได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาวิจัยเพื่อสร้างช่องไมโครฟลูอิดิคด้วยเทคนิคต้นทุนต่ำสำหรับงานคัดแยกน้ำเลือดในวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะเพื่อการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. การสร้างช่องไมโครฟลูอิดิคที่มีขนาดเล็กกว่า 100 ไมโครเมตรเพื่อใช้งานนั้นจะต้องระมัดระวังและทำการตรวจสอบขนาดของช่องก่อนใช้งานทุกครั้ง เนื่องจากในงานวิจัยมีการใช้งานช่องขนาดประมาณ 100 ไมโครเมตรที่บริเวณช่องบีบตัวและช่องคัดแยกน้ำเลือด โดยพบว่าช่อง

ลักษณะนี้สามารถเสียรูปและมีเนื้อกาวมาอุดตันได้ง่ายจนไม่สามารถนำมาใช้งานได้ ดังนั้นหากมีวิธีการยึดประกอบชิ้นงานโดยไม่ต้องพึ่งพาความร้อนและกาวจะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ได้ดี

2. การตัดของเครื่องตัดพลาสมาส่วนใหญ่จะมีร่องรอยการหมุนปลายใบมีดก่อนการตัดเสมอ หากร่องรอยเหล่านี้เกิดขึ้นภายในชิ้นงานหรือตรงกับบริเวณช่องทางไหลจะเกิดเป็นเงารบกวนและทำให้ช่องไมโครฟลูอิดิกผิดรูปได้ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหานี้ควรมีการควบคุมลำดับการตัด แต่เครื่องตัดพลาสมาส่วนใหญ่ไม่สามารถกำหนดลำดับการตัดภายในรูปแบบชุดเดียวกันได้โดยตรง การร่างเส้นนำตัดให้มีตำแหน่งอยู่ใกล้จุดเริ่มต้นมากกว่าตำแหน่งที่ออกแบบจะช่วยลดปัญหานี้ได้ เมื่อเครื่องตัดเริ่มตัดที่บริเวณเส้นนำตัดก็จะมีอาการหมุนปลายใบมีดให้มีทิศทางตรงกับทิศทางการตัดในลำดับต่อไป ด้วยเหตุนี้การร่างเส้นนำตัดจึงสามารถช่วยลดร่องรอยการหมุนปลายใบมีดภายในชิ้นงานได้

3. การเก็บบันทึกภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ หากเป็นข้อมูลชุดที่ต้องทำการวิเคราะห์ผลร่วมกันควรควบคุมระดับการให้แสงของแหล่งกำเนิดแสงจากกล้องจุลทรรศน์ให้อยู่ในระดับเดียวกัน และควบคุมรูปแบบการเก็บบันทึกภาพให้เป็นแบบเดียวกันโดยเฉพาะความละเอียดของภาพ ข้อมูลในบทที่ 3 ผู้วิจัยได้กล่าวถึงรายละเอียดการเก็บบันทึกภาพสำหรับงานวิจัยนี้ไว้เป็นแบบอย่างแล้ว อย่างไรก็ตามรูปแบบการเก็บบันทึกภาพเหล่านี้สามารถปรับปรุงแก้ไขเพื่อให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการเก็บบันทึกภาพ

4. การไหลวนภายในช่องป้อน-ขยายตัวส่งผลกระทบต่อการศึกษาการเกิดชั้นปราศจากเซลล์ภายในช่องไมโครฟลูอิดิก การไหลวนนอกจากจะรบกวนการเกิดชั้นปราศจากเซลล์แล้วยังเป็นต้นเหตุที่ก่อให้เกิดการจับกลุ่มกันเป็นก้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงจนเกิดการอุดตันภายในช่องไมโครฟลูอิดิก งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้อัตราการไหล 300 ไมโครลิตรต่ออนาทีในการคัดแยกน้ำเลือดเนื่องจากเป็นช่วงอัตราการไหลที่ยังไม่ก่อให้เกิดการไหลวนอย่างชัดเจน และระบบสามารถคัดแยกน้ำเลือดจนสามารถจัดเก็บจากภายนอกชิ้นงานได้ อย่างไรก็ตามในบางกรณีการไหลวนนั้นมีประโยชน์ เช่น การใช้เพื่อสกัดจับเซลล์ที่สนใจ [53], [54] เป็นต้น สำหรับการประยุกต์ใช้งานเพื่อคัดแยกน้ำเลือดแล้วการไหลวนเป็นปัญหาที่จะต้องมีการแก้ไข

5. การนำส่งตัวอย่างเลือดเข้าสู่ช่องไมโครฟลูอิดิกจะมีปัญหาเนื่องจากฟองอากาศได้หากใช้อัตราการไหลสูงเกินไป ระหว่างการทำวิจัยได้เลือกใช้อัตราการไหล 20 ไมโครลิตรต่ออนาทีในการนำส่งตัวอย่างเลือดเข้าสู่ระบบจนมีตัวอย่างเลือดอยู่เต็มช่องทั้งบริเวณต้นน้ำและปลายน้ำ การไหลในช่วงนี้ตัวอย่างเลือดจะอยู่ภายในช่องทางไหลหลักเท่านั้น เนื่องจากความต้านทานภายในช่องคัดแยกน้ำเลือดมีค่าสูงเกินกว่าการไหลของเลือดที่อัตราการไหล 20 ไมโครลิตรต่ออนาทีจะสามารถ

เอาชนะได้ จากนั้นจึงเริ่มปรับอัตราการไหลเพิ่มขึ้นครั้งละ 100 ไมโครลิตรต่อนาทีจนถึงระดับที่ใช้คัดแยกน้ำเลือด

6. สุดท้ายควรนำน้ำเลือดที่ได้จากกระบวนการคัดแยกไปตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก เนื่องจากข้อมูลการประเมินเบื้องต้นพบว่าน้ำเลือดที่คัดแยกด้วยระบบไมโครฟลูอิดิกมีการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงประมาณ 3,000 เซลล์ต่อไมโครลิตรซึ่งเป็นจำนวนที่น้อยมากจนระดับสารฮีโมโกลบินที่คำนวณได้มีค่าต่ำกว่าระดับที่ห้องปฏิบัติการทางเคมีคลินิกกำหนด ดังนั้นน้ำเลือดที่ได้จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกได้ อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกอาจจำเป็นต้องมีการปรับปรุงเพื่อใช้ตรวจวัดสารจากน้ำเลือดที่มีการเจือจาง

บรรณานุกรม

- [1] E. Sollier, M. Cubizolles, Y. Fouillet, and J.-L. Achard, Fast and continuous plasma extraction from whole human blood based on expanding cell-free layer devices, *Biomed. Microdevices*, vol. 12, no. 3, pp. 485–497, Jun. 2010.
- [2] P. Yager, G. J. Domingo, and J. Gerdes, Point-of-care diagnostics for global health, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 10, no. 1, pp. 107–144, Aug. 2008.
- [3] National Statistical Office (Thailand), The 2014 survey of the older persons in thailand, 2014.
- [4] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 1, no. 1–6, pp. 244–248, Jan. 1990.
- [5] R. Daw and J. Finkelstein, Lab on a chip, *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 367–367, Jul. 2006.
- [6] S. Haeberle and R. Zengerle, Microfluidic platforms for Lab-on-a-Chip applications, *Lab. Chip*, vol. 7, no. 9, p. 1094, 2007.
- [7] J. Kk, Applications of biochips: from diagnostics to personalized medicine., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, vol. 7, no. 3, pp. 285–289, May 2004.
- [8] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, and B. H. Weigl, Microfluidic diagnostic technologies for global public health, *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 412–418, Jul. 2006.
- [9] M. A. Qasaimeh, S. G. Ricoult, and D. Juncker, Microfluidic probes for use in life sciences and medicine, *Lab. Chip*, vol. 13, no. 1, p. 40, 2013.
- [10] O. Skurtys and J. M. Aguilera, Applications of microfluidic devices in food engineering, *Food Biophys.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–15, Mar. 2008.
- [11] S. Neethirajan, I. Kobayashi, M. Nakajima, D. Wu, S. Nandagopal, and F. Lin, Microfluidics for food, agriculture and biosystems industries, *Lab. Chip*, vol. 11, no. 9, p. 1574, 2011.
- [12] L. Marle and G. M. Greenway, Microfluidic devices for environmental monitoring, *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 24, no. 9, pp. 795–802, Oct. 2005.

- [13] M. Miró and E. H. Hansen, Miniaturization of environmental chemical assays in flowing systems: The Lab-on-a-Valve approach vis-à-vis Lab-on-a-Chip microfluidic devices, *Anal. Chim. Acta*, vol. 600, no. 1–2, pp. 46–57, Sep. 2007.
- [14] J. Ducreé, S. Haeberle, S. Lutz, S. Pausch, F. von Stetten, and R. Zengerle, The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform, *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 17, no. 7, pp. S103–S115, Jul. 2007.
- [15] J. Zhang, Q. Guo, M. Liu, and J. Yang, A Lab-on-CD prototype for high-speed blood separation, *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 18, no. 12, p. 125025, Dec. 2008.
16. Pommer MS, Zhang Y, Keerthi N, Chen D, Thomson JA, Meinhart CD, et al. Dielectrophoretic separation of platelets from diluted whole blood in microfluidic channels. *Electrophoresis*. 2008;29(6):1213–8.
- [17] A. Menachery, C. Kremer, P. E. Wong, A. Carlsson, S. L. Neale, M. P. Barrett, and J. M. Cooper, Counterflow dielectrophoresis for trypanosome enrichment and detection in blood, *Sci. Rep.*, vol. 2, Oct. 2012.
- [18] F. Petersson, L. Åberg, A.-M. Swärd-Nilsson, and T. Laurell, Free flow acoustophoresis: microfluidic-based mode of particle and cell separation, *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 14, pp. 5117–5123, 2007.
- [19] M. K. Araz, C.-H. Lee, and A. Lal, Ultrasonic separation in microfluidic capillaries, in 2003 IEEE Symposium on Ultrasonics, 2003, vol. 2, pp. 1111–1114 Vol.2.
- [20] X.-B. Zhang, Z.-Q. Wu, K. Wang, J. Zhu, J.-J. Xu, X.-H. Xia, and H.-Y. Chen, Gravitational sedimentation induced blood delamination for continuous plasma separation on a microfluidics chip, *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 8, pp. 3780–3786, Apr. 2012.
- [21] Y. Nakashima, S. Hata, and T. Yasuda, Blood plasma separation and extraction from a minute amount of blood using dielectrophoretic and capillary forces, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 145, no. 1, pp. 561–569, Mar. 2010.

- [22] A. Nabatiyan, Z. A. Parpia, R. Elghanian, and D. M. Kelso, Membrane-based plasma collection device for point-of-care diagnosis of HIV, *J. Virol. Methods*, vol. 173, no. 1, pp. 37–42, Apr. 2011.
- [23] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, and W. Laiwattanapaisal, Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices, *Lab. Chip*, vol. 12, no. 18, pp. 3392–3398, Aug. 2012.
- [24] C. Liu, M. Mauk, R. Gross, F. D. Bushman, P. H. Edelstein, R. G. Collman, and H. H. Bau, Membrane-based, sedimentation-assisted plasma separator for point-of-care applications, *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 21, pp. 10463–10470, 2013.
- [25] M. Faivre, M. Abkarian, K. Bickraj, and H. A. Stone, Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: An approach to separate blood plasma, *Biorheology*, vol. 43, no. 2, pp. 147–159, Jan. 2006.
- [26] S. Yang, A. Ündar, and J. D. Zahn, A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation, *Lab. Chip*, vol. 6, no. 7, p. 871, 2006.
- [27] J.-S. Park and H.-I. Jung, Multiorifice flow fractionation: Continuous size-based separation of microspheres using a series of contraction/expansion microchannels, *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 20, pp. 8280–8288, Oct. 2009.
- [28] J.-S. Park, S.-H. Song, and H.-I. Jung, Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels, *Lab Chip*, vol. 9, no. 7, pp. 939–948, 2009.
- [29] J. Zhang, M. Li, W. H. Li, and G. Alici, Inertial focusing in a straight channel with asymmetrical expansion–contraction cavity arrays using two secondary flows, *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 23, no. 8, p. 085023, Aug. 2013.
- [30] D. Nguyen, J. McLane, V. Lew, J. Pegan, and M. Khine, Shrink-film microfluidic education modules: Complete devices within minutes, *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 2, Jun. 2011.
- [31] D. A. Bartholomeusz, R. W. Boutte, and J. D. Andrade, Xurography: rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter, *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 14, no. 6, pp. 1364–1374, Dec. 2005.

- [32] P. K. Yuen and V. N. Goral, Low-cost rapid prototyping of flexible microfluidic devices using a desktop digital craft cutter, *Lab. Chip*, vol. 10, no. 3, p. 384, 2010.
- [33] J. Do, J. Y. Zhang, and C. M. Klapperich, Maskless writing of microfluidics: Rapid prototyping of 3D microfluidics using scratch on a polymer substrate, *Robot. Comput.-Integr. Manuf.*, vol. 27, no. 2, pp. 245–248, Apr. 2011.
- [34] A. C. Glavan, R. V. Martinez, E. J. Maxwell, A. B. Subramaniam, R. M. D. Nunes, S. Soh, and G. M. Whitesides, Rapid fabrication of pressure-driven open-channel microfluidic devices in omniphobic RF paper, *Lab. Chip*, vol. 13, no. 15, p. 2922, 2013.
- [35] M. Li, S. Li, J. Wu, W. Wen, W. Li, and G. Alici, A simple and cost-effective method for fabrication of integrated electronic-microfluidic devices using a laser-patterned PDMS layer, *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 12, no. 5, pp. 751–760, Mar. 2012.
- [36] D. A. Fedosov, B. Caswell, A. S. Popel, and G. E. Karniadakis, Blood flow and cell-free layer in microvessels, *Microcirculation*, vol. 17, no. 8, pp. 615–628, 2010.
- [37] P. S. P. Kritpetcharat, Jiraporn Sithithaworn, Evaluation of plasma separation for coagulation testing by high-speed centrifugation, *J Hematol Transfus Med*, vol. 2013, no. 3, pp. 211–216, Mar. 2013.
38. Saisuksa-ard J, others. Errors of electrolyte level analysis caused by in-vitro hemolysis. *Lampang Med J*. 2011;31(2):75–82.
- [39] C. P. Wilirat B., Blood chemistry values in Thai patients receiving a check-up at Songklanagarind Hospital in the year 2004, *Songkla Med J*, vol. 2006, no. 3, pp. 215–222, Apr. 2006.
- [40] A. A. S. Bhagat, H. Bow, H. W. Hou, S. J. Tan, J. Han, and C. T. Lim, Microfluidics for cell separation, *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 48, no. 10, pp. 999–1014, Oct. 2010.

- [41] M. Kersaudy-Kerhoas, R. Dhariwal, M. P. Y. Desmulliez, and L. Jouvét, Hydrodynamic blood plasma separation in microfluidic channels, *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 8, no. 1, pp. 105–114, Jan. 2010.
- [42] M. Faivre, M. Abkarian, K. Bickraj, and H. A. Stone, Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: An approach to separate blood plasma, *Biorheology*, vol. 43, no. 2, pp. 147–159, Jan. 2006.
- [43] J. Marchalot, Y. Fouillet, and J.-L. Achard, Multi-step microfluidic system for blood plasma separation: architecture and separation efficiency, *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, no. 1, pp. 167–180, Jul. 2014.
- [44] A. I. Rodríguez-Villarreal, M. Arundell, M. Carmona, and J. Samitier, High flow rate microfluidic device for blood plasma separation using a range of temperatures, *Lab. Chip*, vol. 10, no. 2, pp. 211–219, Dec. 2009.
- [45] R. Arayanarakool, S. Le Gac, and A. van den Berg, Low-temperature, simple and fast integration technique of microfluidic chips by using a UV-curable adhesive, *Lab. Chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2115–2121, 2010.
- [46] C. H. Ahn, J.-W. Choi, G. Beaucage, J. H. Nevin, J.-B. Lee, A. Puntambekar, and J. Y. Lee, Disposable smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics, *Proc. IEEE*, vol. 92, no. 1, pp. 154–173, Jan. 2004.
- [47] L. J. Kricka, P. Fortina, N. J. Panaro, P. Wilding, G. Alonso-Amigo, and H. Becker, Fabrication of plastic microchips by hot embossing, *Lab. Chip*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2002.
- [48] J. S. Jeon, S. Chung, R. D. Kamm, and J. L. Charest, Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform, *Biomed. Microdevices*, vol. 13, no. 2, pp. 325–333, Apr. 2011.
- [49] S. Miserere, G. Mottet, V. Taniga, S. Descroix, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, Fabrication of thermoplastics chips through lamination based techniques, *Lab. Chip*, vol. 12, no. 10, p. 1849, 2012.
- [50] B. Weigl, R. Bardell, T. Schulte, F. Battrell, and J. Hayenga, Design and rapid prototyping of thin-film laminate-based microfluidic devices, *Biomed. Microdevices*, vol. 3, no. 4, pp. 267–274, Dec. 2001.

- [51] D. Di Carlo, Inertial microfluidics, *Lab. Chip*, vol. 9, no. 21, p. 3038, 2009.
- [52] S. Ahmed and J. Orakah, Cellular changes in stored whole blood and the implication on efficacy of transfusion therapy in Nigeria, *Internet J. Third World Med.*, vol. 8, no. 2, 2009.
- [53] A. J. Mach, J. H. Kim, A. Arshi, S. C. Hur, and D. Di Carlo, Automated cellular sample preparation using a Centrifuge-on-a-Chip, *Lab. Chip*, vol. 11, no. 17, p. 2827, 2011.
- [54] H. Yun and S. C. Hur, Sequential multi-molecule delivery using vortex-assisted electroporation, *Lab. Chip*, vol. 13, no. 14, p. 2764, 2013.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รายละเอียดข้อมูลความสามารถของเครื่องตัดพืดเตอร์จากผู้ผลิต

รายละเอียดข้อมูลความสามารถของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Silhouette Cameo®

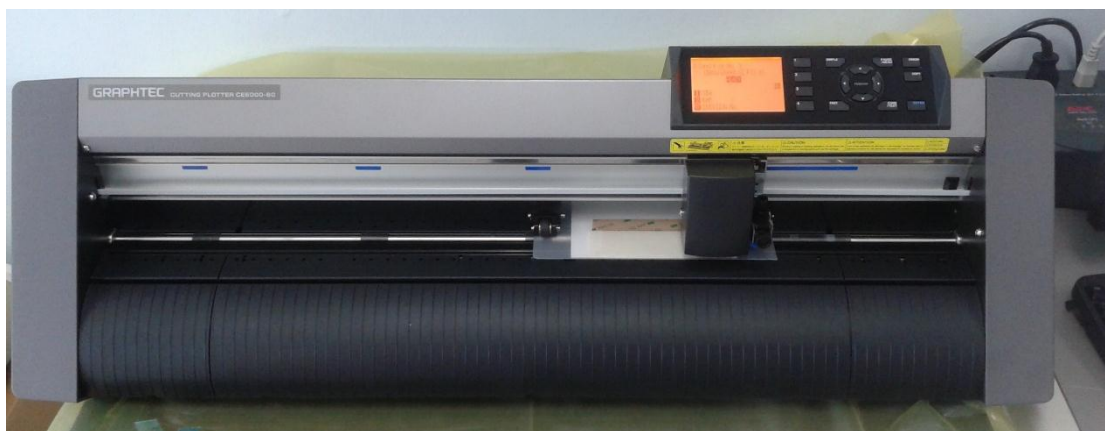


ITEM	DETAIL
MAXIMUM CUTTING AREA	12 in x12 in (304.8 mm x 304.8 mm) with carrier sheet, 11.6 in x 10 ft. (295 mm x 3048 mm) in expanded mode with roll media
COMPATIBLE MEDIA WIDTHS	2 in to 12 in (50 mm to 305 mm)
MAXIMUM MEDIA THICKNESS	20 mils (0.5 mm)
MAXIMUM CUT SPEED	3.9 in/sec (10 cm/s)
PROGRAMMABLE CUTTING FORCE	7 gf - 230 gf in 33 steps
CUT THRU MEDIA AND BACKING	When using Carrier Sheet only ^{*1}
SD CARD	Read only. 16GB, SDHC compatible

ITEM	DETAIL
COMPATIBLE MEDIA TYPES	Film media 0.1m or less in thickness, Heat transfer, Paint Mask, Postcards, Scrapbooking paper, Inkjet photo paper, Chipboard, Rhinestone template material.
INTERFACE	USB 2.0 High-speed
COMMAND MODES	GP-GL™, HP-GL®
DISPLAY PANEL	Graphical Liquid Crystal Display
UNIT DIMENSIONS	20.9 in x 5.0 in x 6.5 in (532 x 128 x 164.6 mm)
SHIPPING WEIGHT	11 lbs (5 kg)
SHIP DIMENSIONS	24 in x 11 in x 11 in (610 x 280 x 280 mm)
WARRANTY	1 Year Parts & Labor

*1 Must use Carrier Sheet for all cut thru applications : cutting paper, cardstock, and cutting thru sticker plus backing.

รายละเอียดข้อมูลความสามารถของเครื่องตัดพล็อตเตอร์ Graphtec CE6000-60



ITEM	DETAIL
MAXIMUM CUTTING AREA	32.7 in x 164 ft (603 mm x 50 m)
COMPATIBLE MEDIA WIDTHS	2 in to 28 in (50 mm to 712 mm)
MAXIMUM MEDIA THICKNESS	10 mils (0.25 mm)
MAXIMUM CUT SPEED	35 in/sec (90 cm/s) at 45° direction
PROGRAMMABLE CUTTING FORCE	20 gf – 300 gf in 31 steps
CUT THRU MEDIA AND BACKING	When using Cutting Mat/Carrier Sheet only ^{*1}
SD CARD	-
INTERFACE	USB 2.0 High-speed / Serial RS-232C
COMMAND MODES	GP-GL™ : 0.01, 0.025, 0.05, 0.1mm HP-GL® : 0.001 in (0.025mm)
DISPLAY PANEL	Graphical Liquid Crystal Display with backlight (240 dots x 128 dots). Supports 10 languages

ITEM	DETAIL
UNIT DIMENSIONS	35.4 in x 23.2 in x 41.2 in (900 x 593 x 1046 mm)
SHIPPING WEIGHT	66 lbs (30 kg) with stand
WARRANTY	1 Year Parts & Labor

*1 Must use Cutting Mat/Carrier Sheet for any/all cut thru (media and backing) applications.

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิก

การคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกของ Yang และคณะ

งานวิจัยของ Yang และคณะได้ออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดโดยอาศัยผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist (Fåhræus-Lindqvist effect) เป็นหลัก [26] การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกมีรายละเอียดตามภาพประกอบที่ ข-1 ดังนั้นจึงสามารถสรุปขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกบริเวณต่างๆ ได้ดังตารางที่ ข-1 จากการคำนวณพบว่าค่าความต้านทานภายในช่องคัดแยกน้ำเลือด (R_p) มีค่ามากกว่าช่องทางไหลหลักบริเวณปลายน้ำ (R_B) ประมาณ 58 เท่า

ตารางที่ ข-1 ข้อมูลขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกของ Yang และคณะ

ช่องไมโครฟลูอิดิก	ความกว้าง	ความยาว	ความสูง	ความต้านทานไฮดรอลิก
ช่องทางไหลหลักบริเวณปลายน้ำ (R_B)	154 μm	5 mm	10 μm	4.419E-04
ช่องคัดแยกน้ำเลือด (R_p)	9.6 μm	5 mm	10 μm	2.605E-02

การคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกของ Rodríguez-Villarreal และคณะ

งานวิจัยของ Rodríguez-Villarreal และคณะได้ออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือด โดยใช้ผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist ร่วมกับช่องบีบตัว-ขยายตัว [44] การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกมีรายละเอียดตามภาพประกอบที่ ข-1 ดังนั้นจึงสามารถสรุป

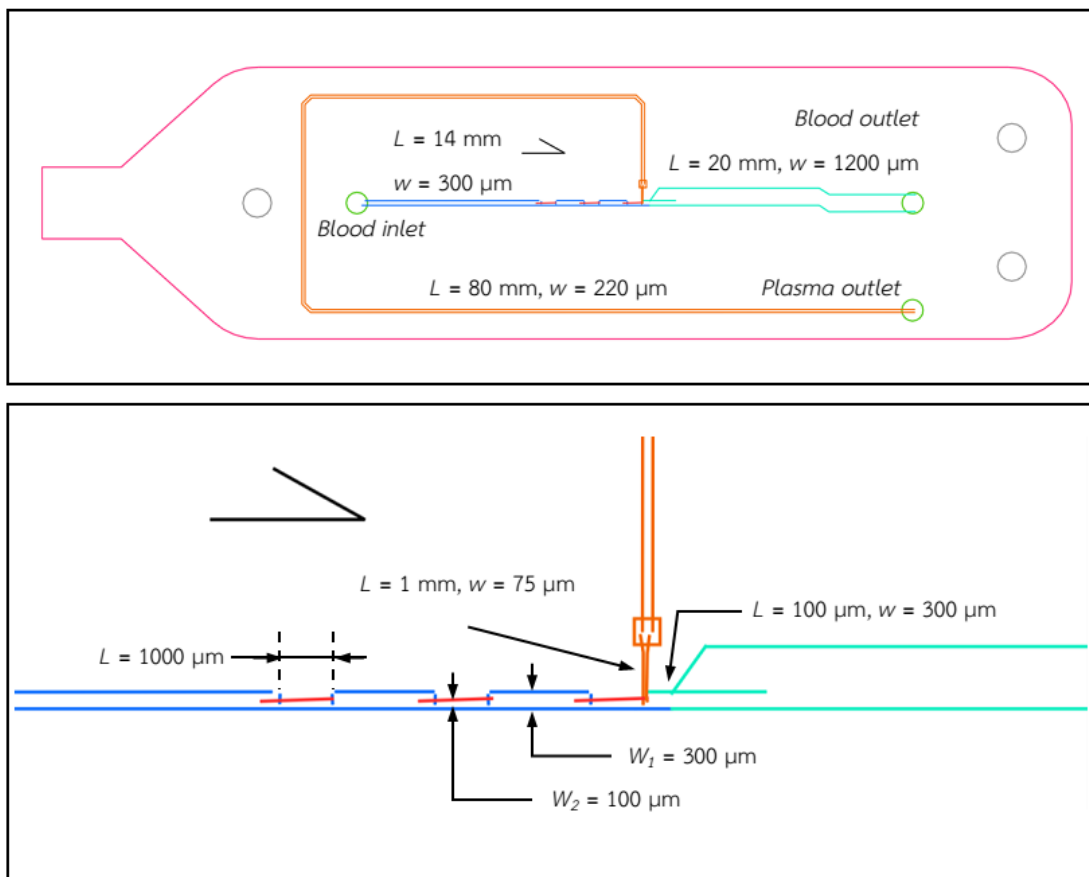
ตารางที่ ข-2 ข้อมูลขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกของ Rodríguez-Villarreal และคณะ

ช่องไมโครฟลูอิดิก	ความกว้าง	ความยาว	ความสูง	ความต้านทานไฮดรอลิก
ช่องทางไหลหลักบริเวณปลายน้ำ (R_B)	600 μm	1 cm	40 μm	3.556E-06
ช่องคัดแยกน้ำเลือด (R_p)	60 μm	2.05 cm	40 μm	1.780E-04

ขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกบริเวณต่างๆ ได้ดังตารางที่ ข-2 จากการคำนวณพบว่าค่าความต้านทานภายในช่องคัดแยกน้ำเลือด (R_p) มีค่ามากกว่าช่องทางไหลหลักบริเวณปลายน้ำ (R_B) ประมาณ 50 เท่า

การคำนวณค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกของงานวิจัยนี้

งานวิจัยนี้ได้ออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดโดยอาศัยผลกระทบของ Fåhræus-Lindqvist ร่วมกับการใช้นุกรมของช่องبيبตัว-ขยายตัว การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกมีรายละเอียดตามภาพประกอบที่ ข-1 ดังนั้นจึงสามารถสรุปขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกบริเวณต่างๆ ได้ดังตารางที่ ข-3 จากการคำนวณพบว่าค่าความต้านทานภายในช่องคัดแยกน้ำเลือด (R_p) มีค่ามากกว่าช่องทางไหลหลักบริเวณปลายน้ำ (R_B) ประมาณ 52 เท่า ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมา [26], [44]



ภาพประกอบที่ ข-1 การออกแบบช่องไมโครฟลูอิดิกสำหรับคัดแยกน้ำเลือดในงานวิจัยนี้

ตารางที่ ข-3 ข้อมูลขนาดความกว้างในมิติต่างๆ และค่าความต้านทานไฮดรอลิกภายในช่องไมโครฟลูอิดิกในงานวิจัยนี้

ช่องไมโครฟลูอิดิก	ความกว้าง	ความยาว	ความสูง	ความต้านทานไฮดรอลิก
ช่องทางไหลหลัก บริเวณปลายน้ำ (R_b)	300 μm	0.1 mm	150 μm	2.667E-09
	1200 μm	20 mm	150 μm	7.500E-08
	Total			7.767E-08
ช่องคัตแยกน้ำเลือด (R_p)	75 μm	1 mm	150 μm	4.267E-07
	220 μm	80 mm	150 μm	3.657E-06
	Total			4.084E-06

ภาคผนวก ค

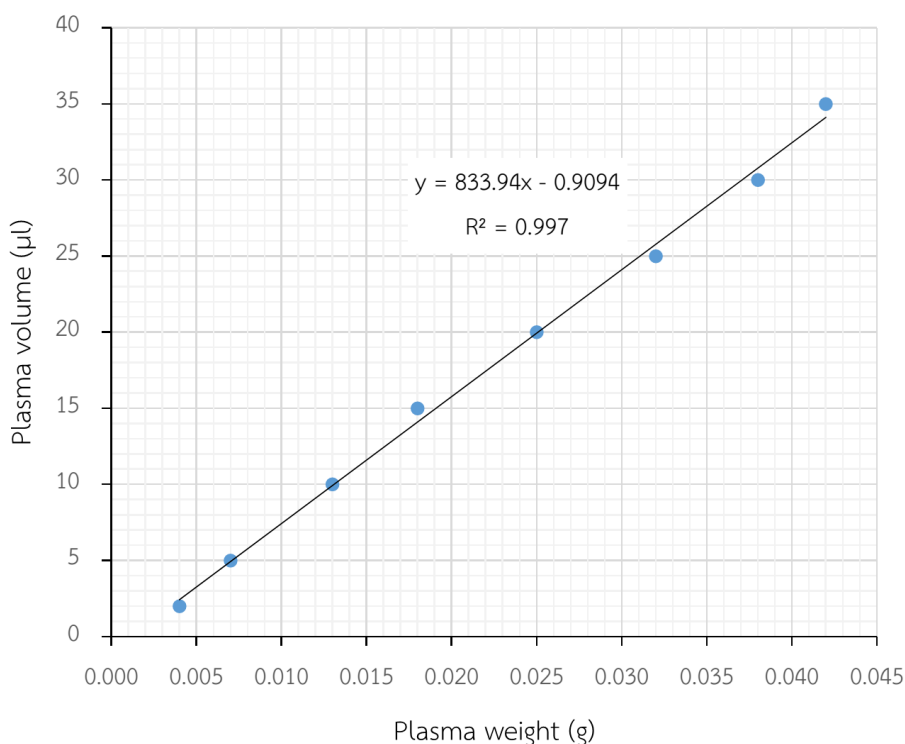
ข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบปริมาตรน้ำเลือดต่อน้ำหนัก

ข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบปริมาตรน้ำเลือดต่อน้ำหนัก

ตารางที่ ง-1 ข้อมูลการชั่งน้ำหนักของตัวอย่างน้ำเลือดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง

Plasma Volume (μL)	Plasma Weight (g)			Mean	Std. Dev.
	1	2	3		
2	0.004	0.004	0.005	0.004	0.001
5	0.008	0.007	0.007	0.007	0.001
10	0.013	0.013	0.012	0.013	0.001
15	0.018	0.018	0.018	0.018	0.000
20	0.025	0.026	0.023	0.025	0.002
25	0.032	0.032	0.031	0.032	0.001
30	0.037	0.038	0.038	0.038	0.001
35	0.043	0.042	0.041	0.042	0.001

ข้อมูลชุดนี้อ้างอิงจากการชั่งน้ำหนักของตัวอย่างน้ำเลือดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ตัวอย่างเลือดเจือจางที่อัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร น้ำเลือดในปริมาตรต่างๆ ตั้งแต่ 2 ถึง 35 ไมโครลิตรถูกนำมาชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูลดังตารางที่ ง-1 จากนั้นจึงนำข้อมูลมาเขียนกราฟดัง



ภาพประกอบที่ ง-1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรน้ำเลือดและน้ำหนักของน้ำเลือด

แสดงในภาพประกอบที่ ง-1 การประเมินปริมาตรน้ำเลือดจากการคัดแยกด้วยระบบไมโครฟลูอิดิคต้นแบบจึงสามารถใช้ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรและน้ำหนักของน้ำเลือดตามสมการที่ ง.1 ในการ

$$Plasma\ volume\ (\mu L) = 833.94 \times Plasma\ weight\ (g) - 0.9094 \quad \dots\dots\dots(ง.1)$$

คำนวณ ดังนั้นปริมาตรน้ำเลือดที่คัดแยกด้วยระบบไมโครฟลูอิดิคในงานวิจัยนี้จึงมาจากการประเมินด้วยสมการที่ ง.1 เป็นหลัก

ภาคผนวก ง

รายละเอียดการปรับแก้ชุดคำสั่ง Analyze Stripes สำหรับซอฟต์แวร์ ImageJ

การปรับแก้ชุดคำสั่ง Analyze Stripes สำหรับซอฟต์แวร์ ImageJ

ชุดคำสั่ง Analyze Stripes ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการคำนวณความขรุขระของเส้นหรือแถบคู่ขนานภายในภาพ การคำนวณหาค่าความขรุขระนั้นจำเป็นต้องมีการคำนวณหาระยะห่างระหว่างเส้นรวมอยู่ด้วย ดังนั้นจึงสามารถปรับแก้ชุดคำสั่ง Analyze Stripes เพื่อเข้าถึงข้อมูลการคำนวณหาขนาดความกว้างได้ ในที่นี่ได้ปรับแก้ชุดคำสั่งในบรรทัดที่ 280 ถึง 292 ตามข้อมูลด้านล่าง โดยปิดการทำงานของชุดคำสั่งเหล่านั้นเพื่อที่จะสามารถเข้าถึงข้อมูลการคำนวณหาขนาดความกว้างและนำมาใช้งานต่อไปได้

```

1 macro "Mfs Analyze Stripes" {
2 /* Edited note by xZer0 [Nov 1, 2015]
3 - Change roi color of two different line.]
4 */
5
6
7 /* Written by Justin Bickford
8 * I suggest running in Fiji, although this macro will certainly work in ImageJ1.
9 *
10 * v2.4.4 (20140707) now converts all images to 8-bit grayscale after opening. This will
11 * lower the dynamic range of any 16-bit grayscale images, but will convert any color
12 * images to grayscale. I have yet to analyze a 16-bit image anyway.
13 *
14 * v2.4.3 (20140123) fixed an error in my rms edge roughness error propagation.
15 *
16 * v2.4.1 (20130610) found a more efficient and more stable way of correcting the
17 * nearly horizontal line bug.
18 *
19 * v2.4 (20130607) bug fixed regarding nearly horizontal lines.
20 *
21 * v2.3 (20130415) bug fixed regarding when script attempts to close windows that are
22 * already closed by user. Added instructions output to the Log window.
23 *
24 * v2.2 (20130401) writes a tab-delimited file with the results for import into Excel.
25 * It always appends to the same file in the same directory as the last opened image.
26 *
27 * v2.1 (20130328) uses gradient^4 and selects a threshold based on the mean value. It's
28 * pretty robust, but I still kept in the part that allows the user to choose a different
29 * threshold value if they desire.
30 *
31 * v3.0 (20130328) SPUR attempted to implement a wand method, but stopped after success
32 * with v2.1.
33 *
34 * v2.0 (20130327) gives a slightly better estimate for the threshold and lets the user
35 * decide the final threshold value. It no longer keeps lowering the threshold.
36 *
37 * v1.2 (20130320) keeps lowering the threshold until it finds at least two distinct
38 * edges.
39 *
40 * v1.1 (20130320) makes sure there are at least two edges to avoid errors.
41 *
42 * v1.0 (20130320) first port of my Matlab script.
43
44 Copyright 2013 Justin R. Bickford.
45
46 Permission is hereby granted, free of charge, to any person obtaining a copy of this
47 software and associated documentation files (the "Software"), copy, modify, merge, publish,
48 or otherwise alter this software for educational or academic purposes subject to the
49 following conditions:
50
51 The above copyright notice and this permission notice shall be included in all copies or
52 substantial portions of the Software.
53
54 The copyright holders of other software modified and included in the Software retain their
55 rights and the licenses on that software should not be removed.
56
57 Cite the author (above) of this macro in any publication that relies on the Software. Also
58 cite those projects on which the Software relies when applicable.
59
60 THE SOFTWARE IS PROVIDED "AS IS", WITHOUT WARRANTY OF ANY KIND, EXPRESS OR IMPLIED,
61 INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR
62 PURPOSE AND NONINFRINGEMENT. IN NO EVENT SHALL THE AUTHORS OR COPYRIGHT HOLDERS BE LIABLE
63 FOR ANY CLAIM, DAMAGES OR OTHER LIABILITY, WHETHER IN AN ACTION OF CONTRACT, TORT OR
64 OTHERWISE, ARISING FROM, OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE SOFTWARE OR THE USE OR OTHER
65 DEALINGS IN THE SOFTWARE.
66 */

```

```

67
68 // house cleaning
69 if (isOpen("Results")){
70     selectWindow("Results");
71     run("Close"); // closes the Results window only
72 }
73 if (isOpen("ROI Manager")){
74     selectWindow("ROI Manager");
75     run("Close"); // closes the ROI Manager window only
76 }
77
78 // output instructions if the Log is not open (ie: only for the first session of this script)
79 if (isOpen("Log"))
80     print("Instructions:\n When drawing the ROI, note that only the outermost edges will be analyzed, inner edges will be
81
82
83 /* prompt to open an image
84 Imagename = File.openDialog("Open an Image to analyze");
85 if (Imagename=="")
86     exit();
87 write("Image name = "+Imagename);
88 open(Imagename);
89 */
90 getPixelSize(unit, pw, ph, pd);
91 if ( unit==" " || unit==" " || unit=="pixels" ) {
92     unit = "pixels";
93     print("To calibrate units: 1) open a calibration image, 2) draw a line along a known distance, 3) choose Analyze/Set Sc
94 }
95
96 run("8-bit"); // This is a quick fix for color images, but will downconvert any 16-bit grayscale image resulting in lower
97
98 // prompt to crop to ROI
99 setTool("rectangle");
100 run("Select All"); // just prevents errors if nothing is selected by the user
101 waitForUser("ROI Selection", "Draw a Region of Interest and click OK\n \nNOTE- all closed shapes are valid including:\n re
102 run("Crop");
103 run("16-bit"); // normalize equalize requires a maximum of 16-bit
104 run("Enhance Contrast...", "saturated=0");// equalize");
105 saveAs("Tiff", getDirectory("temp")+"tmp_cropped.tif"); // saves image to revert to later
106
107 // find edges
108 run("Set Measurements...", "area mean standard min centroid fit redirect=None decimal=3");
109 roiManager("reset");
110 run("32-bit");
111 run("Find Edges");
112 run("Square"); // turns the gradient into gradient squared
113 run("Square"); // further enhances the good edges
114 run("Enhance Contrast", "saturated=0");
115
116 run("Select All");
117 getStatistics(area, mean, min, max);
118 setThreshold(8*mean,max);
119
120 /* This part allows the user to tweak the threshold if necessary
121 run("Threshold...");
122 waitForUser("Adjust the threshold to highlight only\nedges of interest, then click OK.");
123 run("View 100%");
124 if (isOpen("Threshold")){
125     selectWindow("Threshold");
126     run("Close");
127 }
128 */
129
130 run("Convert to Mask");
131 //run("Dilate");
132 run("Skeletonize");
133 run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-0.10 show=Nothing clear include add");
134 run("Clear Results"); // makes sure the Results are cleared before analyzing
135 roiManager("Measure");
136
137 // determine the average angle orientation
138 cumarea = 0;
139 sina = 0;
140 cosa = 0;
141 for (n=0;n<nResults;n++) {
142     area = getResult("Area", n);
143     angle = 2*getResult("Angle", n); // original range: 0° < angle < 180° changed to 0°-360°, for which it is far ea
144     sina = sina+area*sin(angle*PI/180);
145     cosa = cosa+area*cos(angle*PI/180);
146     cumarea = cumarea+area;
147 }
148 aveangle = abs(0.5*(180/PI)*atan2(sina/cumarea,cosa/cumarea)); // this is the area weighted average angle
149
150 print("average angle = "+aveangle+" degrees");
151

```

```

152 // rotate the data (not the image itself)
153 run("Select All");
154 run("32-bit"); // this allows the v... pixel math to generate 32-bit values rather than 8-bit integers
155 run("Macro...", "code=[v= x*cos(PI/180*(90-aveangle+))+y*sin(PI/180*(90-aveangle+))]");
156 run("Clear Results");
157 roiManager("Measure");
158
159 // collect data
160 n = nResults;
161 roiindex = newArray(n);
162 mean = newArray(n);
163 rms = newArray(n);
164 extrema = newArray(n);
165 for (i=0;i<n;i++) {
166     roiindex[i] = i;
167     mean[i] = getResult("Mean", i);
168     rms[i] = getResult("StdDev", i);
169     extrema[i] = getResult("Max", i)-getResult("Min", i);
170 }
171
172 // sort data by Mean
173 do {
174     newn = 0;
175     for (i=1;i<n;i++) {
176         if (mean[i-1]>mean[i]) {
177             // swap mean[i-1] with mean[i]
178             tmp = mean[i-1];
179             mean[i-1] = mean[i];
180             mean[i] = tmp;
181
182             // swap rms[i-1] with rms[i]
183             tmp = rms[i-1];
184             rms[i-1] = rms[i];
185             rms[i] = tmp;
186
187             // swap extrema[i-1] with extrema[i]
188             tmp = extrema[i-1];
189             extrema[i-1] = extrema[i];
190             extrema[i] = tmp;
191
192             // swap roiindex[i-1] with roiindex[i]
193             tmp = roiindex[i-1];
194             roiindex[i-1] = roiindex[i];
195             roiindex[i] = tmp;
196
197             newn = i;
198         }
199     }
200     n = newn;
201 } while (n != 0);
202 //Array.print(roiindex);
203
204 // analyze data
205 similarity = 5; // controls how wide to cast the net of similarity
206
207 // collect ROI's to combine into group1
208 group1 = newArray(1); // though not necessary, this is the most compatible method
209 Array.fill(group1,roiindex[0]);
210 for (i=1;i<(nResults-1);i++) {
211     if ( (mean[i]-similarity*rms[i]) < (mean[0]+similarity*rms[0]) ) { // if the lines are similar to the minimum line, ad
212         group1 = Array.concat(group1,roiindex[i]);
213     }
214 }
215 //print("Group 1:");
216 //Array.print(group1);
217
218 // collect ROI's to combine into group2
219 group2 = newArray(1);
220 Array.fill(group2,roiindex[nResults-1]);
221 for (i=(nResults-2);i>1;i--) {
222     if ( (mean[i]+similarity*rms[i]) > (mean[nResults-1]-similarity*rms[nResults-1]) ) { // if the lines are similar to
223         group2 = Array.concat(roiindex[i],group2);
224     }
225 }
226 //print("Group 2:");
227 //Array.print(group2);
228
229 // measure all ROI's in each group, exclusive of ROI's outside both groups
230 run("Select None"); // deselects everything in the image window
231 roiManager("Deselect"); // deselects all ROI's
232 roiManager("Select", group1); // I can only get this to work with Save Selected, so...
233 roiManager("Save Selected",getDirectory("temp")+roi_group1.zip");
234 roiManager("Select", group2);
235 roiManager("Save Selected",getDirectory("temp")+roi_group2.zip");
236 run("Clear Results"); // clears contents of Results
237
238 roiManager("Reset"); // clears contents of ROI Manager
239 roiManager("Open",getDirectory("temp")+roi_group1.zip");
240 roiManager("Combine"); // OR's all roi's
241 run("Add to Manager");

```



```

242 roiManager("Select", roiManager("count")-1);
243 Roi.setStrokeColor("green");
244 roiManager("Measure");
245
246 roiManager("Reset");
247 roiManager("Open",getDirectory("temp")+roi_group2.zip");
248 roiManager("Combine");
249 run("Add to Manager");
250 roiManager("Select", roiManager("count")-1);
251 Roi.setStrokeColor("red");
252 roiManager("Measure");
253
254 roiManager("Open",getDirectory("temp")+roi_group1.zip"); // re-display group1 with group2
255 roiManager("Show All"); // removes the labels, which a user may find confusing in the context of this macro
256
257
258 // analyze data
259 linewidth = getResult("Mean", 1) - getResult("Mean", 0);
260 RMS_edge_roughness = sqrt( ( pow( getResult("StdDev", 1), 2 ) + pow( getResult("StdDev", 0), 2 ) )/2 ); // this is the corr
261 pkpk_edge_roughness = maxOf(getResult("Max", 1) - getResult("Min", 1),getResult("Max", 0) - getResult("Min", 0));
262
263
264 // output data
265 toScaled(linewidth);
266 toScaled(RMS_edge_roughness);
267 toScaled(pkpk_edge_roughness);
268 print("linewidth = "+d2s(linewidth,-3)+" "+unit);
269 if (linewidth==0)
270 | print("Failed to find distinct edges.");
271 print("RMS edge roughness (Rq)= "+d2s(RMS_edge_roughness,-3)+" "+unit);
272 print("peak-to-peak edge roughness (Rt)= "+d2s(pkpk_edge_roughness,-3)+" "+unit);
273 print(" ");
274
275 // reverts to the cropped image and overlays the ROI's
276 run("Revert");
277 run("From ROI Manager");
278
279
280 /*****
281 * This area is disabled to show
282 * the results and ROI tables.
283 *****/
284 if (isOpen("Results")){
285 | selectWindow("Results");
286 | run("Close"); // closes the Results window only
287 }
288 if (isOpen("ROI Manager")){
289 | selectWindow("ROI Manager");
290 | run("Close"); // closes the ROI Manager window only
291 }
292 */
293
294 // write output to file
295 shortimagename = File.nameWithoutExtension;
296 logfile = File.directory+File.separator+"Analyze_Stripes_log.txt";
297 if (!File.exists(logfile))
298 | File.append("image name \tlinewidth \tRMS edge roughness (Rq) \tpeak-to-peak edge roughness (Rt) \tunits",logfile);
299 File.append(shortimagename+" \t"+linewidth+" \t"+RMS_edge_roughness+" \t"+pkpk_edge_roughness+" \t"+unit,logfile);
300 //File.close(logfile); // file will close automatically when macro exits
301 }
302 |

```

ภาคผนวก จ
ข้อมูลการเผยแพร่วิทยานิพนธ์



A low cost, rapid prototyping of microfluidic device: an approach to separate blood plasma

Cheewarak Rodniam, Somyot Chirasatitsin*

Prince of Songkla University, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Engineering, Thailand

*Email of corresponding author: somjot.c@psu.ac.th

Abstract: This study applied a low-cost and rapid fabrication technique using a cutting plotter to address the prototype of microfluidic device for blood plasma separation. Microchannels were carved into commercial clear plastic films made from polyvinylchloride with plasticizer and polyethylene terephthalate. The results revealed the capability to create negative microchannels whose sizes less than 100 μm on to the films. The channel distortion occurred on the horizontal cutting axis more than the vertical one. The final microfluidic device established the drift or cell-free layer (CFL) enhanced at downstream channel about 10 μm thick, which provided the region to separate blood plasma.

Key Words: Microfluidics / Rapid Prototyping / Cutting plotters / Cell-free layer

1. INTRODUCTION

The development of microfluidics has grown rapidly over the past decade. Microfluidic devices (μF) have been widely applied in many fields including scientific, industrial, and biomedical fields. Most of the microfluidic devices are made from the method based on a microelectronic fabrication technique, called photolithography, on materials like glass, quartz, or silicon and poly(dimethylsiloxane) (PDMS). However, this technique is quite complicated and required expensive apparatus.

For developing countries, the major challenge is how to fabricate the devices in a rapid, simple, and inexpensive way. Numerous of unconventional low cost fabrication techniques have been presented, such as patterning SU-8 photoresist and wax onto papers[1], x-y desktop plotting[1] and xurography[2]–[4], to address these challenges. Some drawbacks, e.g., less precise, unsmooth surface, low resolution, appeared among the fabrication methods. Xurographic prototyping is a useful and inexpensive research tool to focus on the microfluidic device development before moving to higher qualitative techniques[2]. The hardware resolution is specified by the resolution of motors, while the software resolution is limited with the resolution down to 25 μm of step size[2]. Craft cutting plotters, with thin cutting blade, are presented to carve microchannels directly to the surface of various materials[2]. This easy-to-

prototype, inexpensive, method enhances the micro-channel fabrication without clean room facilities.

This study applied the low-cost fabrication technique using a cutting plotter with inexpensive materials of transparent plastic films to address the microfluidic device for blood plasma separation. Because blood samples are usually separated into blood plasma before performing blood tests, separating plasma on microfluidic devices would be a challenge. Many researches

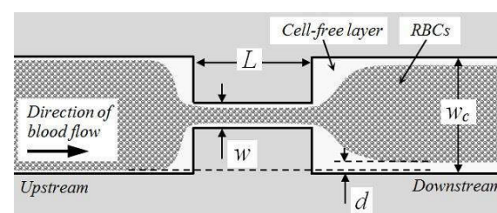


Fig. 1. Layout of microchannel for the microfluidic cell focusing device., where w_c is the width of the main channel upstream and downstream. The length (L) and width (w) were geometry of rectangular constriction channel.

reported that manipulating geometry of microchannel affected the hydrodynamic separation of red blood cells (RBCs) and plasma. Faivre *et al.* presented the manipulation in width (w) and length (L) of the rectangular constriction channel shown in Fig.1 to enhance CFL or drift d at downstream[5]. Then, the enhanced CFL was applied to separate blood plasma in microfluidic devices[6]. This passive technique was possible to extract plasma 10-25% out of the injected volume, with an excellent purity, low contamination rate, even for 1:10 and 1:20 diluted blood[6], [7]. For this study, the microchannel based on the xurographic technique was investigated. Finally, the prototype of the microfluidic device for enhancing the CFL thickness, which provided the region to separate blood plasma, was developed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Choice of materials

Two types of clear plastic films, Polyvinylchloride with plasticizer (PVC) and Polyethylene terephthalate (PET) were selected for carved material in this study. Their advantages also include lightweight, flexibility,

smooth surface, good optical transparency and inexpensive material. The A4 sheet of the films which normally used for presentation and laser printing were purchased from OfficeMate Co., Ltd. Thailand (~\$10 per 100 sheets). Although the nominal thicknesses of both films are ~100 μm , other mechanical properties are different. Young's modulus of PVC and PET films are 25-1600 MPa and 2100-3100 MPa, respectively. Moreover their thermal properties are also different.

2.2. Fabrication of clear plastic microfluidic devices

The craft cutting plotter (Silhouette Cameo™, Silhouette America Inc.), with commercial thin cutting blade and cutting mat, was introduced to carve microchannels directly onto the surface of the plastic films. Computer-aided design software (Solid Edge 2D Drafting ST6 Free License, Siemens Product Lifecycle Management Software Inc.) was used to design the layouts of microchannels. The layouts were saved as the DXF file format and imported to the plotter software of Silhouette Studio® V3 for cutting control. The plotter software has the ability to assign cutting parameters such as cutting speed, cutting force, cutting style and etc. The rapid fabrication processes from carving the designed layout to the completed chip have shown in Fig. 2. A piece of plastic film was adhered onto a recyclable cutting mat and then carved the designed layout. After peeling off the layer from the mat, the layer was sealed using double layers of thermal laminating films (Laminating pouch film 125 μm thick, Value Choice®, OfficeMate Co., Ltd.) with pre-cut inlets and the outlets to finish the microfluidic chip. A roller thermal laminator was preheated at 140°C before the chip bonding. Finally, a custom acrylic chip holder, with tubing connectors and rubber plugs of continuous ink supply systems (CISS) for an inkjet printer, polyethylene tubing (I.D. 0.58 mm, O.D. 0.965 mm), was used to connect the fabricated microfluidic chip to a syringe (1 mL, Terumo Inc.) during experiments.

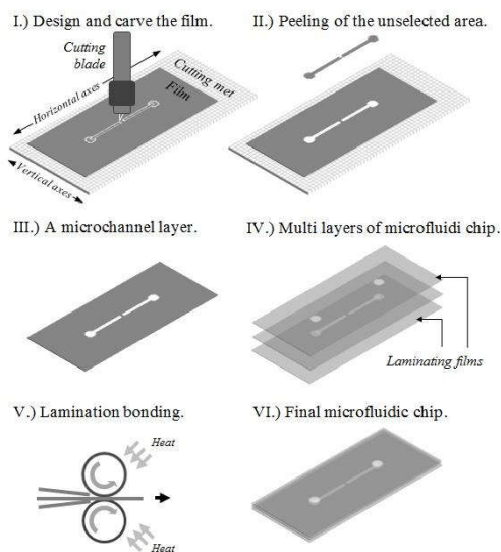


Fig. 2. Illustration of the microfluidic fabrication

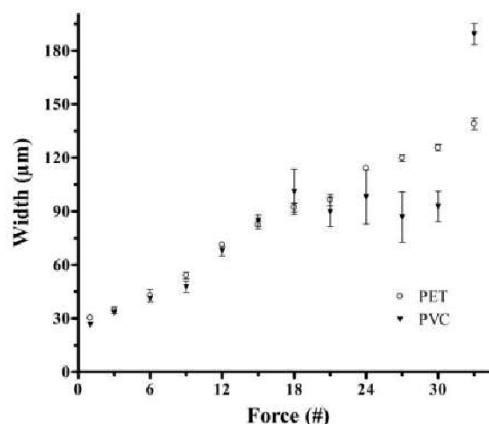


Fig. 3. Plot of microchannel width specified by different cutting forces on to both plastic films.

2.2. Blood sample preparation

Blood sample used in the experiments was obtained from a healthy hamster in EDTA tubes (Vacutainer, BD). The hematocrit percentage of blood sample was 41%. The sample was diluted to 1:10 by normal saline solution (NSS) with heparin (IP, 1000 USP/mL). Experiments were conducted on the same day of blood collection.

2.3. Experimental procedures

2.3.1. Characterization of microchannels

To investigate microchannel feature size, the straight-carving lines of 10-mm-long at various applied forces (Level 1 to 33 as maximum cutting force of 210 gf) and the rectangular-carving patterns of 10 mm long and 100 μm to 1000 μm width were cut onto the surface of both types of plastic films. The microstructures on the surfaces were captured using a CCD camera (D90, Nikon) attached to a light microscope (CKX41, Olympus). Finally, the feature size was measured, at the microchannel positions of 2.5, 5.0 and 7.5 mm length, using the image processing software of ImageJ.

2.3.2. Enhancement of the downstream CFL after the constriction

The layout of the microfluidic cell focusing device has shown in Fig. 1. This device geometry and drift parameter d were reported by Faivre *et al.*[5] as shown in equation (1) below. The following layout: $L=300 \mu\text{m}$, $w_c=500 \mu\text{m}$, $w=100 \mu\text{m}$ was designed with the predicted drift d more than 10 μm using equation (1). The channel height was 100 μm .

$$d = 0.26 + 0.24 \frac{Lw_c}{w^2} \quad (1)$$

The fluid flow in microchannels was controlled by a standard motor-driven pump (Harvard 33 Twin Syringe Pump, Harvard Apparatus) with constant flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Movies and images were taken with the CCD camera.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The rapid fabrication steps from carving the designed layout to the completed chip was able to be finished less than ten minutes like previous study[4]: Step-I, a complete carving of individual microchannel layer can be done in a minute. Step-II, approving the microchannel layer with light microscope and image processing software would take ~5 min, and Step-III, the assembly and bonding of the final device spent ~1 min. Though, this low cost microfluidic chip could be achieved simply and rapidly, channel distortion and dimensional variation were typically occurred during the fabrication process.

The smallest feature size of negative microchannel was obtained, approximately 30 μm both on PVC and polyester films, by the minimum nominal applied force of level 1. As shown in Fig. 3, numerous feature size of microchannel occurred when applied the different cutting forces. The feature size was low deviation, when half cutting (not carving through out the thickness of materials). Die-cutting (carving through out) the PVC and PET films occurred when the applied force more than level 20 and 30, respectively. The different Young's modulus of plastic films affected the variability of

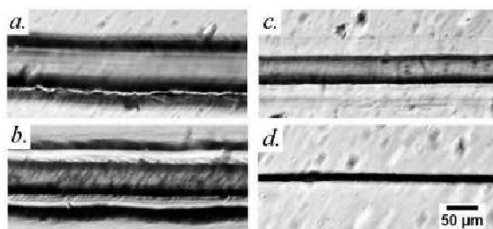


Fig. 4. Light microscope image of microchannel: the microchannels were obtained with an apply force level 9 onto the surface of PET(a) and PVC(b). Size of the microchannels on PET(c) and PVC(d) have changed after bonding with thermal lamination film.

feature size. However, this results have shown the capability to create negative microchannel whose size less than 100 μm onto the PVC and PET.

The negative microchannel size close to 50 μm was found in PET and PVC shown in Fig. 4(a) and Fig. 4(b), respectively. Some roughness on the channel edge of both materials was appeared. It would be a key factor of the change in velocity profile as a result of increasing in average velocity[8]. Moreover, the laminated channels after bonding were narrower than the channels after cutting. This could be the bonding temperature of 140°C was higher than the glass transition temperature (70-80°C) so that the channels were creep during pressed. Despite these size changes, the laminated PET channel width in Fig. 4(c) was less deviated than that of PVC shown in Fig. 4(d). The thermal expansion property of the PET films promoted the stability over the PVC. The other bonding technique with glue[9] should be more suitable for the PVC. Although chip bonding with thermal laminating films affect the channel width on plastic, this technique provide rapid bonded in a minute.

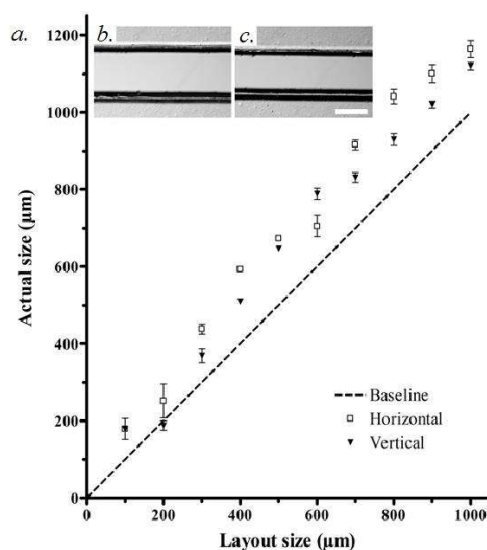


Fig. 5. A comparison of actual microchannel width from horizontal and vertical cutting axes; (a) Plot of the drawing versus actual sizes of microchannels and the light microscope images of 400- μm -wide microchannel by die-cutting in (b) horizontal and (c) vertical axes, respectively. The scale bar is 400 μm .

The other cutting study was the die-cutting 10 mm long of rectangular channels with varying the width sizes. Fig. 5(a) shows the comparison of the actual sizes and the drawing sizes of the rectangular channels. The baseline (dash line) was the target width. However, the carved channels were overcut. It was found that the width of carved channels was about 10% more than which of the drawing. Because of the certain overcut, therefore drawing a layout 10% smaller than the target size could fit the final target width.

The carving directions of rectangular channels were also examined, *i.e.* along the horizontal and vertical axes of the plotter. The plot of varies target channels on horizontal (opened square dots) and vertical cutting (rigid triangular dots) has also shown in Fig. 5(a). The phase contrast images in Fig. 5(b) and Fig. 5(c), were carved from 400 μm layouts on PET films along the horizontal and vertical axes, respectively; however, the target channels were different. It found that cutting along the vertical axis was occurred less distorted than the horizontal one. Therefore, the more accurate channel size to the drawing would run in the vertical. This issue may cause by the different motion control system and motor drives on the horizontal and vertical or x-y axes. Normally, the cutting plotters work with different motion control system on x-y axes. For this study, the cutting plotter was a motion shaft control system on x-axis and a machine rollers system on y-axis. It was noticed that the channel distortion occurred on a single cutting plotter. It may provide the distortion less than 10% if working with other resolution plotters or higher grade cutting plotter.

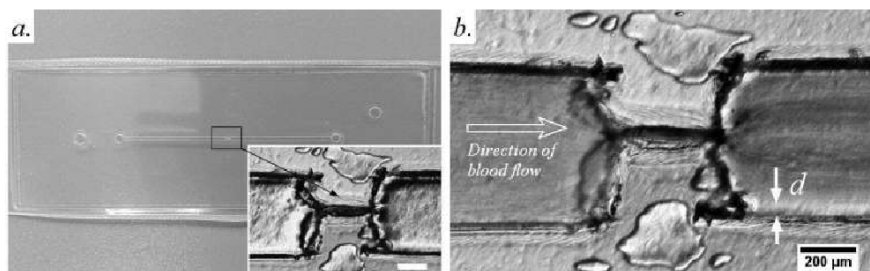


Fig. 6. The final microfluidic chip for cell focusing(a) and the light microscope image of the microfluidic chip between blood flowing(b) through the channel. All scale bars are 200 μm .

For approaching to a microfluidic device for blood plasma separation, the sample channel geometry reported by Faivre *et al.*[5] was chosen. Although the designed was very small constriction channel at 15 μm , this research extended the constriction to 25 - 100 μm like previous research[6] with the predicted drift d more than 10 μm . The final device with the constriction area was shown in Fig. 6(a). The geometry of laminated microfluidic device was measured as $L=396 \mu\text{m}$, $w_c=558 \mu\text{m}$, and $w=78 \mu\text{m}$ as shown in small figure of Fig. 6(a). The constriction channel was slightly deformed at the end of the channel. As shown in Fig. 6(b), the picture of 1:10 diluted blood at the flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ was captured. The thin layer of CFL or the drift d of $\sim 10 \mu\text{m}$, occurred clearly on a side of the downstream channel. The single side CFL could be affected by the deformation at the end of the constriction channel. However the channel deformation could not be control during the thermal lamination process. The uncontrollable channel deformation would possibly be improved by eliminating the surface roughness of the channel before bonding process.

4. CONCLUSION

The microfluidic fabrication processes from the drawing layout to the final device could be finish within ten minutes by xurography with thermal lamination films. The small negative microchannels, from 100 μm to 30 μm width, were fabricated with line carving. To fabricate bigger channels more than 100 μm , die-cutting along the vertical axis was applied to obtain more accurate feature sizes than the horizontal one. However the actual microchannels were distorted 10% more than the drawing ones. The cell focusing chip using this fabrication technique was presented. Despite the uncontrollable channel deformation, the enhanced CFL at downstream was $\sim 10 \mu\text{m}$ thick. For the future works, the channel geometry to get the appropriate enhancement of CFL for blood plasma separation would be varied as well as an improvement of surface roughness of the constriction channel.

5. ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the Cardiovascular Engineering Research Laboratory: CERL for providing blood sample and Asst. Prof. Dr. Warakorn Limbut for suggestions. This research was supported by Faculty of Medicine, Prince of Songkla University and NSTDA funding.

6. REFERENCES

- [1] H. Sharma, D. Nguyen, A. Chen, V. Lew, and M. Khine, "Unconventional Low-Cost Fabrication and Patterning Techniques for Point of Care Diagnostics," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 39, no. 4, pp. 1313–1327, Dec. 2010.
- [2] D. A. Bartholomeusz, R. W. Boutte, and J. D. Andrade, "Xurography: rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 14, no. 6, pp. 1364–1374, Dec. 2005.
- [3] J. Do, J. Y. Zhang, and C. M. Klapperich, "Maskless writing of microfluidics: Rapid prototyping of 3D microfluidics using scratch on a polymer substrate," *Robot. Comput.-Integr. Manuf.*, vol. 27, no. 2, pp. 245–248, Apr. 2011.
- [4] A. C. Glavan, R. V. Martinez, E. J. Maxwell, A. B. Subramaniam, R. M. D. Nunes, S. Soh, and G. M. Whitesides, "Rapid fabrication of pressure-driven open-channel microfluidic devices in omniphobic RF paper," *Lab. Chip*, vol. 13, no. 15, p. 2922, 2013.
- [5] M. Faivre, M. Abkarian, K. Bickraj, and H. A. Stone, "Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: An approach to separate blood plasma," *Biorheology*, vol. 43, no. 2, pp. 147–159, Jan. 2006.
- [6] J. Marchalot, Y. Fouillet, and J.-L. Achard, "Multi-step microfluidic system for blood plasma separation: architecture and separation efficiency," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, no. 1, pp. 167–180, Jul. 2014.
- [7] E. Sollier, H. Rostaing, P. Pouteau, Y. Fouillet, and J.-L. Achard, "Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 141, no. 2, pp. 617–624, Sep. 2009.
- [8] S. Prentner, D. M. Allen, L. Larcombe, S. Marson, K. Jenkins, and M. Saumer, "Effects of channel surface finish on blood flow in microfluidic devices," *Microsyst. Technol.*, vol. 16, no. 7, pp. 1091–1096, Jan. 2010.
- [9] R. Arayanarakool, S. Le Gac, and A. van den Berg, "Low-temperature, simple and fast integration technique of microfluidic chips by using a UV-curable adhesive," *Lab. Chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2115–2121, 2010.

