**BME-10**

# การดักจับอนุภาคขนาดจุลภาคด้วยเทคนิคหลุมจุลภาครูปทรงสามเหลี่ยม

# Micro-Particles Trapping Using Triangular Microwell Technique

เทวัญ ตงมณี [1], เดชธชัย เกตุพันธุ์ [2,3], อลงกรณ์ พิมพ์พิณ[1]*,
วีระยุทธ ศรีธุระวานิช [1], ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล [3], อัจฉริยา ไศละสูต [2], วุฒินันท์ เจียมศักดิ์ศรี [4],
วิศรุต ศรีพุ่มไข่ [4], จีรวัฒน์ จันต๊ะวงศ์ [4], จักรพงศ์ ศุภเดช [4] และ วิน บรรจงปรุ [4]

[1] ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
[3]หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
[4]ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์แห่งชาติ อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา 24000

*ติดต่อ: Email: alongkorn.p@chula.ac.th โทรศัพท์: 02-218-6647 โทรสาร: 02-252-2889

***บทคัดย่อ***

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมเพื่อออกแบบและสร้างอุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่สามารถดักจับเซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ถูกดักแล้วจะถูกนำไปทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่อไป โดยเทคนิคที่เลือกใช้จะเป็นหลุมรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดจุลภาค อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาจะประกอบไปด้วยท่อการไหลขนาดความกว้าง 5 มิลลิเมตร ยาว 15 มิลลิเมตร และสูง 160 ไมโครเมตร โดยที่ภายในช่องการไหลจะมีหลุมรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดจุลภาคประกอบอยู่ซึ่งมีความยาวด้านละ 40 ไมโครเมตรและความลึก 15 ไมโครเมตร สำหรับการสร้างอุปกรณ์นี้จะใช้วิธีการที่เรียกว่า ซอฟลิโทรกราฟี (Soft Lithography) ซึ่งกระบวนการสร้างจะเริ่มจากการสร้างแม่พิมพ์ซิลิกอนจากนั้นเทพอลิเมอร์ PDMS (Polydimethylsiloxane) ลงไปบนแม่พิมพ์ที่สร้างไว้และปล่อยให้ PDMS แข็งตัวแล้วจึงลอกออกและนำไปประกบกับ PDMS อีกชิ้นด้วยวิธีออกซิเจนพลาสมา ในการทดลองเบื้องต้นได้ใช้เม็ดพอลิเมอร์แทนเซลล์มะเร็งซึ่งใช้เม็ดพอลิเมอร์ขนาด 10 ไมโครเมตรเนื่องจากมีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็ง ในการทดลองได้นำเม็ดพอลิเมอร์มาทำให้เป็นสารแขวนลอยที่มีความเข้มข้นประมาณ $1.8\times10^{5}$ อนุภาคต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ป้อนเข้าสู่ระบบ ผลการทดลองที่อัตราการไหล 0.1 และ 0.3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงของอุปกรณ์นี้มีประสิทธิภาพในการดักจับอนุภาคอยู่ที่ 62.5 และ 11.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการทดลองพบว่ายิ่งอัตราการไหลมีค่าน้อยจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดักอนุภาคได้มากขึ้นแต่หากมีค่าน้อยเกินไปจะทำให้อนุภาคไปติดอยู่บนผนังของท่อ และหลังจากนั้นได้ทำการจำลองการไหลเบื้องต้นด้วยโปรแกรม COMSOL พบว่าบริเวณตำแหน่งที่อยู่ติดพื้นของช่องการไหลมีโอกาสเกิดการดักได้มากกว่าที่ตำแหน่งอื่นๆ

***คำหลัก:*** ระบบของไหลจุลภาค, หลุมรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดจุลภาค, การดักเซลล์, เซลล์มะเร็ง, ซอฟลิโทรกราฟี

***Abstract***

This paper aims to examine appropriate parameters to design and fabricate a microfluidic device that can trap cancer cells. The trapped cells will be post-processing analyzed physically and biologically. Triangular microwell technique was chosen for trapping cancer cells in this current study. This trapping device consists of microchannel (5 mm wide, 15 mm long and 160 μm high) and the array of triangular microwells— fabricated on the bottom surface of microchannel. This triangular microwell has a width of 40 μm and a depth of 15 μm. Soft

lithography process was used to fabricate layers of PDMS structure and, later on, two PDMS layers were bonded using oxygen plasma technique. To examine a trapping performance, polystyrene beads were used to replicate cancer cell which their dimension was around 10 μm. The polystyrene beads were mixed with deionized water to a concentration of $1.8x10^5$ cells/ml. The results showed that the trapping efficiency at flow rate of 0.1 mL/hr was 62.5% and at the flow rate of 0.3 mL/hr was 11.6%. According to this result, the different flow rates may have an effect on the efficiency of trapping device due to strong influence of particle's velocity. It might lead to a conclusion that, within an appropriate flow rate range, lower particle's velocity, higher trapping efficiency. However at too slow velocity, the particles tended to adhere on PDMS surface. After that, the flow simulation with COMSOL software has been performed. It suggested that a particles rolling on the floor has high possibility to be trapped.

***Keywords**:* Micro-channel, Triangular microwell, Cell trapping, Cancer cell, Soft lithography

## 1. บทนำ

ในระยะเวลาหลายสิบปีที่ผ่านมาพบว่าปัญหาการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของคนไทยคือโรคมะเร็งและยังมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี โดยกระทรวงสาธารณสุขเปิดเผยเมื่อไม่นานมานี้ว่า คนไทยเสียชีวิตจากโรคนี้เป็นอันดับหนึ่ง โดยเฉลี่ยปีละประมาณ 60,000 คน ซึ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นประเภทที่คร่าชีวิตผู้ป่วยเพศชายมากที่สุด (16.2%) และในเพศหญิงเสียชีวิตจากมะเร็งเต้านมมากที่สุด (37.5%) [1]

เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีการพัฒนาอยู่ตลอดทำให้ยังไม่ทราบถึงที่มาของเซลล์มะเร็งอย่างละเอียดอีกทั้งยังมีข้อจำกัดมากมายทั้งในด้านของการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง [2] และการแยกเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติออกจากกัน ด้วยเหตุนี้จึงเกิดความสนใจที่จะนำเซลล์มะเร็งมาทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพเพื่อเป็นการศึกษาหาวิธีการรักษาโรคมะเร็ง แต่เนื่องจากเซลล์มะเร็งนั้นมีขนาดเล็กมากทำให้ต้องใช้อุปกรณ์สำหรับการคัดแยกหรือการตรึงเซลล์มะเร็งที่มีขนาดเล็กลงด้วย

ห้องปฏิบัติการบนชิพ (Lab On Chip) สามารถตอบโจทย์ความต้องการของการศึกษาเซลล์มะเร็งได้ดี เนื่องจากวิธีการนี้สามารถนำเอาทุกขั้นตอนของห้องปฏิบัติการมารวมอยู่บนชิพเล็กๆ เพียงแค่ชิ้นเดียว ดังตัวอย่างชิพของ บริษัท Agilent ที่สามารถคัดแยกและดักเซลล์ได้ในอุปกรณ์เดียว [3]

ทางคณะผู้วิจัยจึงเกิดความสนใจที่จะนำห้องปฏิบัติการบนชิพมาใช้ในการศึกษาเซลล์มะเร็งโดยจะต้องเป็นระบบที่สามารถคัดแยกเซลล์ ดักเซลล์และปลดเซลล์ออกได้ เนื่องจากการทำงานร่วมกันของทั้งสามส่วนนี้สามารถทำให้เซลล์มะเร็งแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวและนำไปศึกษาต่อได้ ซึ่งในส่วนแรกจะอาศัยการคัดแยกเซลล์ที่มีขนาดต่างๆ ออกจากกันโดยใช้ท่อรูปขดเกลียว [4] หลังจากนั้นจะทำการดักเซลล์มะเร็งด้วยหลุมขนาดจุลภาค และสุดท้ายเป็นการปลดเซลล์ออกจากระบบเพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางชีวภาพต่อไป

งานวิจัยนี้สนใจในส่วนของการดักเซลล์ ซึ่งในอดีตที่ผ่านมามีวิธีสำหรับการดักเซลล์สองหลักการคือ เทคนิคที่ไม่อาศัยการสัมผัสพื้นผิว (Contact-less) [5] ได้แก่ การดักเซลล์โดยอาศัยแรงจากแม่เหล็กด้วยแม่เหล็กขนาดเล็กที่มีการทำงานต่างกัน [6] การดักเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้าโดยการใช้คุณสมบัติทางไฟฟ้าที่ต่างกันจากอิเล็กโทรด 4 ตัว ทำให้เกิดเป็นแรงไดอิเล็กโทรฟอเรซิสแบบเนกาทีฟ (negative dielectrophoresis) [7] การศึกษาการดักเซลล์ด้วยไดอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยเป็นการควบคุมเซลล์ด้วยการใส่ความต่างศักย์ไฟฟ้าด้วยความถี่และแอมพลิจูดที่มีค่าต่างกันให้กับแท่งอิเล็กโทรดสามตำแหน่ง (บน กลาง ล่าง) จนทำให้เกิดแรงไดอิเล็กโทรฟอเรซิส [8]

อีกรูปแบบหนึ่งจะเป็นเทคนิคที่อาศัยการสัมผัสพื้นผิว (Surface Contact) [5] ได้แก่ การดักเซลล์ด้วยการเคลื่อนที่ของของไหล [9] ซึ่งใช้ของไหลเป็นตัวกลางในการนำเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นท่อการไหลคล้ายตัวดับเบิ้ลยู (W) ซึ่งมีทางเชื่อมเป็นรูเล็กๆ สำหรับดักเซลล์ เมื่อเกิดการดักเซลล์ที่ตำแหน่งทางเชื่อมแล้วเซลล์ที่ไหลตามมาจะเปลี่ยนเส้นทางไปสู่ช่องการไหลหลักและไหลออกจากอุปกรณ์ไป ซึ่งที่ตำแหน่งทางเชื่อมจะมีแผ่น

อลูมิเนียมทำหน้าที่ให้ความร้อนด้วยเลเซอร์อยู่ เพื่อใช้ในการสร้างฟองอากาศและเมื่อเกิดฟองอากาศที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมันจะไปแทนที่เซลล์ทำให้เซลล์นั้นหลุดออกจากอุปกรณ์ไป และยังมีอีกหลายวิธีสำหรับการดักเซลล์ในรูปแบบ Micro array และการเคลื่อนที่ของของเหลว [10-12]

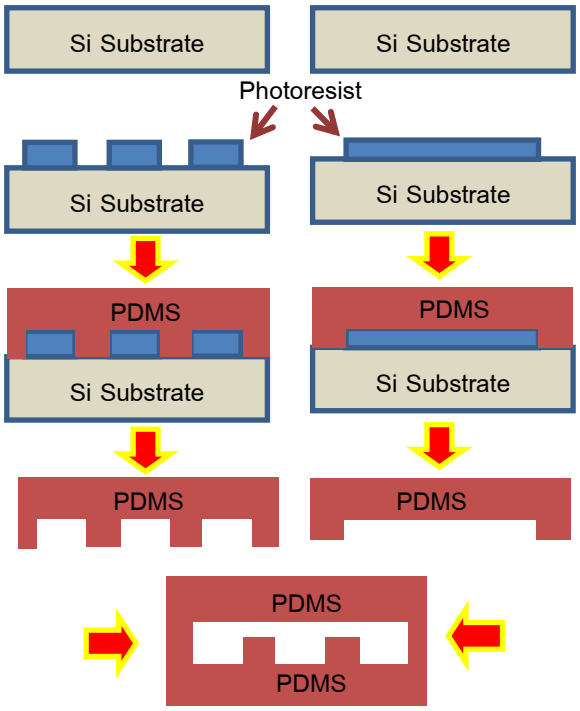
ในอดีต Joong Yull Park และคณะ [13] ได้ทำการทดลองและศึกษาเกี่ยวกับการดักเซลล์เดี่ยวด้วยหลุมขนาดจุลภาคที่มีรูปทรงต่างกัน 5 แบบ โดยแต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตรและความลึก 20 ไมโครเมตรเท่ากันทุกแบบ ซึ่งหลุมขนาดเล็กเหล่านี้จะอยู่ในช่องการไหลที่มีความสูง 200 ไมโครเมตร กว้าง 5 มิลลิเมตร และยาว 15 มิลลิเมตรโดยการดักเซลล์จะอาศัยหลักการไหลวน (Recirculation) ของของไหล ผลการศึกษาชี้ว่าหลุมรูปสามเหลี่ยมมีประสิทธิภาพในการดักเซลล์มากที่สุดอยู่ที่ 62 เปอร์เซ็นต์ แต่ในงานวิจัยดังกล่าวยังมีข้อมูลที่ไม่เพียงพอ เนื่องจากไม่ได้อธิบายถึงขนาดของความเร็วว่าควรมีความเร็วอยู่ในช่วงใดจึงจะสามารถดักเซลล์ได้ ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงข้อมูลที่ขาดหายไปจนนำไปสู่การพัฒนาเป็นงานวิจัยนี้ขึ้น

เหตุผลที่ผู้วิจัยได้เลือกวิธีการการดักเซลล์ด้วยหลุมขนาดจุลภาค (Microwell Trapping) เพราะงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเซลล์มะเร็งที่เป็นเซลล์เดี่ยว และนำเซลล์ที่ดักได้ไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ ทั้งนี้ต้องไม่มีแรงภายนอกมาเกี่ยวข้องกับการดักเซลล์ด้วย เนื่องจากหากมีแรงภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้องอาจจะส่งผลให้สมบัติของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและทำให้การวิเคราะห์ผลคลาดเคลื่อนได้ อีกทั้งวิธีการดักเซลล์ด้วยหลุมขนาดจุลภาคนี้ยังมีขั้นตอนการทดลองที่ไม่ซับซ้อนและสามารถทำการสร้างระบบได้ง่ายด้วย

## 2. การทดลอง

### 2.1 กระบวนการสร้างอุปกรณ์

วิธีการสร้างระบบของไหลขนาดเล็กจะใช้วิธีที่เรียกว่า ซอฟลิโทรกราฟี (Solf Lithography) ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งกระบวนการสร้างจะเริ่มจากการใช้โฟโต้รีซิสเคลือบลงบนฐานรองซิลิกอน จากนั้นทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตผ่านหน้ากากที่ได้ทำการออกแบบลวดลายไว้โดยแสงนั้นจะผ่านได้แค่ลวดลายที่ได้ออกแบบไว้เท่านั้น




รูปที่ 1 ขั้นตอนการขึ้นรูปอุปกรณ์ของไหลขนาดเล็กด้วย PDMS สำหรับดักจับอนุภาค

หลังจากนั้นล้างออกด้วยตัวทำละลายซึ่งโฟโต้รีซิสที่ไม่โดนแสงก็จะถูกล้างออกไป ขั้นตอนถัดไปคือการเทพอลิเมอร์เหลว PDMS (Polydimethylsiloxane) ลงบนแม่พิมพ์โฟโต้รีซิสที่ได้สร้างไว้แล้ว เมื่อสังเกตเห็นว่าพอลิเมอร์กระจายเต็มแม่พิมพ์แล้วให้นำไปอบด้วยความร้อนเพื่อทำให้พอลิเมอร์นี้แข็งตัว หลังจากก็นำพอลิเมอร์ออกจากแม่พิมพ์เพื่อทำการตกแต่ง ก่อนที่จะนำไปประกบกับพอลิเมอร์อีกชิ้นเพื่อสร้างเป็นช่องการไหลด้วยวิธีออกซิเจนพลาสมา (Oxygen Plasma)

อุปกรณ์สำหรับดักจับเซลล์ประกอบไปด้วยท่อที่มีความกว้าง 5 มิลลิเมตร ความสูง 160 ไมโครเมตร และความยาว 15 มิลลิเมตร มีท่อทางเข้าและท่อทางออกสำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ ส่วนตรงกลางของระบบท่อได้ออกแบบหลุมให้เป็นรูปร่างสามเหลี่ยมด้านเท่าขนาด 40 ไมโครเมตร ลึก 15 ไมโครเมตร และระยะห่างระหว่างหลุมเท่ากับ 40 ไมโครเมตร จำนวนหลุมทั้งหมด 11,700 หลุม

### 2.2. ชุดการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยคอมพิวเตอร์ กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพและบันทึกภาพ อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาคที่มีสายยางต่อที่ท่อทางเข้าและท่อ

ทางออก หลอดฉีดยาและเข็มฉีดยา ขาตั้งและที่จับหลอดทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 2 สำหรับการทดลองนี้จะใช้เม็ดพอลีเมอร์ขนาด 10 ไมโครเมตรเพื่อจำลองเป็นเซลล์

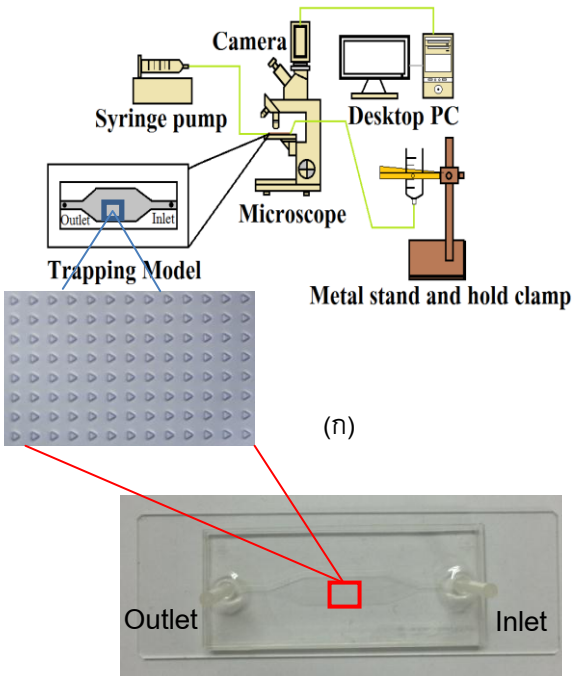
**2.3. การเตรียมสารละลาย**

2.3.1. สารทำความสะอาด

สารละลายจะประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีความบริสุทธิ์สูง (Deionized Water) มาผสมกับสารลดแรงตึงผิว (Tween-20) ในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 1 : 10 ส่วน เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยลดการยึดติดเป็นกลุ่มของเม็ดพอลิเมอร์และการเกิดฟองอากาศลงได้

2.3.2. สารละลายผสมเม็ดพอลีเมอร์

สารละลายจะประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการผสมสารลดแรงตึงผิวในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 1 : 10 ส่วนมาผสมกับเม็ดพอลีเมอร์ในอัตราส่วนเชิงปริมาตร 1 : 100 ส่วน




(ข)

รูปที่ 2 ชุดการทดลอง (ก) เครื่องวัดและอุปกรณ์ควบคุม (ข) อุปกรณ์ระบบของไหลจุลภาค

**2.4. ขั้นตอนการทดลอง**

การทดลองเริ่มต้นด้วยการนำอุปกรณ์สำหรับดักเซลล์ไปแช่น้ำแล้วนำไปเข้าระบบสุญญากาศเพื่อกำจัดฟองอากาศออกเป็นเวลา 20 นาที และนำมาประกอบกับชุดทดลอง

การประกอบชุดทดลองเข้าด้วยกัน ทำโดยนำอุปกรณ์สำหรับดักเซลล์มาต่อเข้ากับท่อสายยางที่ช่องทางเข้าและช่องทางออก โดยปลายอีกด้านหนึ่งของท่อสายยางทางเข้านั้นจะต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาสองหลอดโดยหลอดแรกบรรจุสารละลายผสมเม็ดพอลีเมอร์และหลอดที่สองบรรจุน้ำที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิวซึ่งถูกติดตั้งไว้กับขาตั้งสำหรับจับหลอดทดลอง และสำหรับปลายท่อสายยางด้านทางออกต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่บรรจุน้ำอยู่เพื่อเป็นการลดฟองอากาศ

การควบคุมอัตราการไหลในการทดลองจะนำกระบอกฉีดยาที่บรรจุน้ำต่อเข้ากับเครื่องสูบโดยทำการตั้งค่าของเครื่องสูบให้ทำงานแบบไหลย้อนกลับ แล้วกระบอกเข็มฉีดยาตั้งเอียงให้ด้านปลายกระบอกฉีดยาคว่ำหน้าลง เพื่อทำให้ฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในกระบอกฉีดยาลอยขึ้นมาที่ด้านบนเป็นการลดความดันที่เกิดจากฟองอากาศ

ระหว่างทำการทดลองได้มีการบันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านซึ่งมีการติดตั้งกล้องบันทึกภาพร่วมกับคอมพิวเตอร์ โดยใช้กล้องที่มีความละเอียด 3 ล้านพิกเซลและความไว 30 เฟรมต่อวินาที จากนั้นปรับระยะโฟกัสของภาพและกำลังขยายให้เหมาะสม

ในการทดลองนี้ใช้อัตราการไหลของสารละลายผสมเม็ดพอลีเมอร์ 0.3 และ 0.1 mL/hr สำหรับป้อนเม็ดพอลิเมอร์ให้เข้าไปในอุปกรณ์ และใช้อัตราการไหลของสารทำความสะอาด 0.5 mL/hr เพื่อทำให้เม็ดพอลิเมอร์ที่ตกค้างอยู่หลุดออกจากอุปกรณ์

ในการทดลองของแต่ละอัตราการไหลนั้นจะต้องเริ่มจากฉีดสารละลายพอลิเมอร์เข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/hr จนสังเกตได้ว่าสารละลายไหลมาเกินครึ่งของสายยางทางเข้าจึงทำการปรับอัตราการไหลให้ลดลงเหลือ 0.1 mL/hr (เพื่อลดเวลาในการทดลอง) ซึ่งต้องทำการกวนหลอดฉีดยาที่บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ทุก 1 นาที เพื่อไม่ให้สารละลายนั้นเกิดการตกตะกอน

การบันทึกวิดีโอจะเริ่มเมื่อเม็ดพอลิเมอร์เคลื่อนที่ผ่านเฟรมที่ตั้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาตามกำหนดให้เปลี่ยนจากการฉีดสารละลายพอลิเมอร์มาเป็นสารทำความสะอาดด้วยสวิตซ์สามทางและเพิ่มอัตราการไหลให้เป็น 0.5 mL/hr เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อกำจัดเม็ดพอลิเมอร์ที่ไม่อยู่ในหลุมให้ไหลออกจากอุปกรณ์ทำให้ง่ายต่อการนับอนุภาคที่ลงหลุม หลังจากนั้นจึงปิดเครื่องสูบและทำการ

บันทึกภาพนิ่งที่บริเวณด้านหน้าทางเข้าของอุปกรณ์เพื่อใช้เปรียบเทียบกับการทดลองอื่น

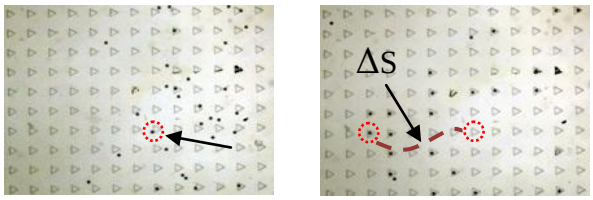
หากมีการทดลองซ้ำกับอุปกรณ์ชุดเดิมจะต้องเริ่มจากการฉีดสารทำความสะอาดเข้าไปภายในอุปกรณ์ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/hr เพื่อเป็นการล้างทำความสะอาดเม็ดพอลิเมอร์ที่ตกค้างจากการทดลองที่อัตราการไหลอื่นๆ อีก ทั้งยังเป็นการช่วยไล่ฟองอากาศ และเพิ่มขั้นตอนการบันทึกภาพนิ่งก่อนเริ่มการทดลองเพื่อใช้เป็นการเปรียบเทียบผลการทดลอง

## 3. ผลการทดลอง

การวัดประสิทธิภาพของอุปกรณ์นี้จะทำโดยการนับอนุภาคทุกอนุภาคที่ไหลเข้ามาในระยะเฟรมที่ตั้งกล้องไว้ หลังจากนั้นจะทำการนับอนุภาคที่ลงหลุมและวัดความเร็ว ดังรูปที่ 3 ซึ่งจะวัดความเร็วเฉลี่ยของอนุภาคจากวิดีโอ และดูว่าอนุภาคเคลื่อนที่ไปได้เท่าใดและใช้เวลาเท่าใด ด้วยสมการการเคลื่อนที่เส้นตรง $V = \Delta S/\Delta T$ ด้วยเทคนิคนี้จะมีความไม่แน่นอนของขนาดความเร็วประมาณ 10%

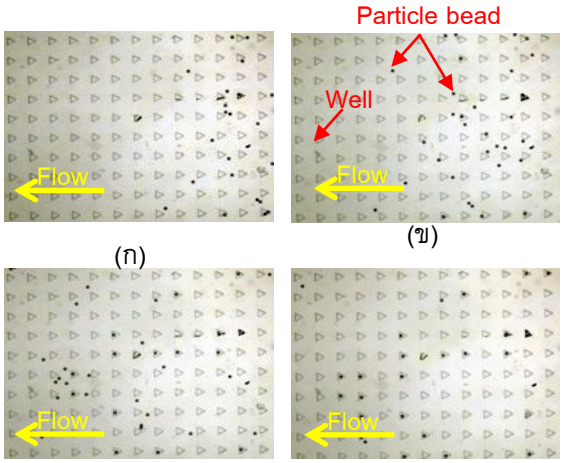
### 3.1 อัตราการไหล 0.1 mL/hr

การทดลองกับเม็ดพอลิเมอร์ขนาด 10 ไมโครเมตร แสดงในรูปที่ 4 พบว่าอุปกรณ์นี้สามารถดักเม็ดพอลิเมอร์ได้ 35 อนุภาคจากทั้งหมด 56 อนุภาคคิดเป็นประสิทธิภาพ 62.5 เปอร์เซ็นต์ โดยความเร็วเฉลี่ยที่สามารถทำให้เม็ดโพลิเมอร์ลงหลุมได้คือ 540 ไมโครเมตรต่อวินาที ซึ่งความเร็วต่ำสุดและสูงสุดที่ทำให้เม็ดโพลิเมอร์ลงหลุมได้คือ 178 และ 1,085 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ และช่วงความเร็วที่อนุภาคถูกดักมากที่สุดคือช่วง 600-900 ไมโครเมตรต่อวินาที




(ก) (ข)

รูปที่ 3 การวัดความเร็วเฉลี่ยของอนุภาค (ก) เริ่มจับเวลาสำหรับการวัด (ข) สิ้นสุดการจับเวลาเมื่ออนุภาคลงหลุม



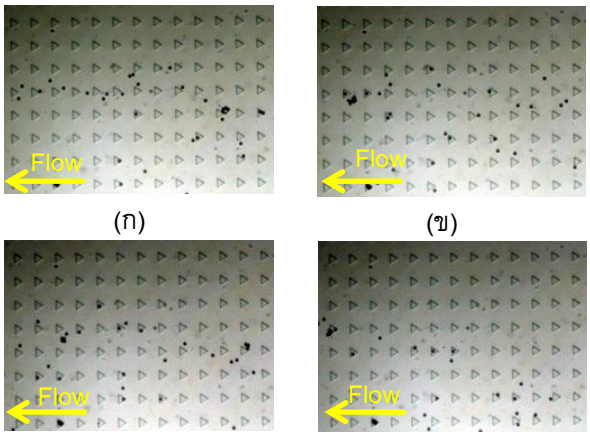

(ก) (ข)

(ค) (ง)

รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากการทดลองที่อัตราการไหล 0.1 mL/hr (ก) ณ เวลาเริ่มต้น (ข) เมื่อเวลาผ่านไป 33 วินาที (ค) เมื่อเวลาผ่านไป 2 นาที (ง) สิ้นสุดการทดลอง

### 3.2 อัตราการไหล 0.3 mL/hr

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5 พบว่าอุปกรณ์นี้สามารถดักเม็ดพอลิเมอร์ได้ 9 อนุภาคจากทั้งหมด 77 อนุภาคคิดเป็นประสิทธิภาพเพียง 11.7 เปอร์เซ็นต์ โดยความเร็วเฉลี่ยที่สามารถทำให้เม็ดพอลิเมอร์ลงหลุมได้คือ 836 ไมโครเมตรต่อวินาที ซึ่งความเร็วต่ำสุดและสูงสุดที่ทำให้เม็ดพอลิเมอร์ลงหลุมได้คือ 432 และ 1,423 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ และช่วงความเร็วที่อนุภาคถูกดักมากที่สุดคือช่วง 1,200-1,500 ไมโครเมตรต่อวินาที




(ก) (ข)

(ค) (ง)

รูปที่ 5 ภาพถ่ายจากการทดลองที่อัตราการไหล 0.3 mL/hr (ก) ณ เวลาเริ่มต้น (ข) เมื่อเวลาผ่านไป 15 วินาที (ค) เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที (ง) สิ้นสุดการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบจากทั้งสองอัตราการไหลแล้วพบว่าประสิทธิภาพของการดักจับอนุภาคน่าจะขึ้นอยู่กับความเร็วของเม็ดพอลิเมอร์

## 4. การจำลองการไหล

เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ยังขาดข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ผลเช่น ความเร็ว ขนาดของช่องการไหล ซึ่งการจำลองการไหลสามารถบอกความเป็นไปได้ของการทดลองที่จะเกิดขึ้นและยังช่วยให้คาดเดาถึงเหตุการณ์ต่างๆที่จะเกิดขึ้นระหว่างการทดลองได้ทำให้ผู้วิจัยเลือกการทำการจำลองการไหลและแสดงผลที่บริเวณด้านล่างของช่องการไหลเพื่อหาเหตุผลที่ทำให้อนุภาคหลุดออกจากหลุมได้ ซึ่งขั้นตอนการจำลองการไหลเป็นดังนี้

### 4.1. การวาดโดเมนในการคำนวณ

การสร้างรูปร่างที่ต้องการจำลองการไหลเป็นขั้นตอนแรก สำหรับในงานวิจัยนี้จะสร้างเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมโดยมีด้านกว้าง 0.08 มิลลิเมตร ด้านยาว 1.5 มิลลิเมตร และสูง 160 ไมโครเมตร ซึ่งที่บริเวณด้านล่างของรูปสี่เหลี่ยมจะประกอบไปด้วยหลุมรูปสามเหลี่ยมขนาด 40x40x15 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 6ก-ข

### 4.2. การกำหนดสมบัติ

การกำหนดสมบัติถือว่าเป็นส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งโดยต้องเลือกสมบัติให้เหมาะสมกับระบบที่กำลังศึกษา ในการศึกษานี้จะทำการสมมติให้ของเหลวเป็นน้ำบริสุทธิ์ (ความหนาแน่น 998.2 kg/$m^3$ และความหนืด 0.001 kg/m.s) [13] และกำหนดให้การไหลเป็นแบบราบเรียบ

### 4.3 การกำหนดเงื่อนไขขอบเขต

ทางเข้าและทางออกจะกำหนดให้เป็นเงื่อนไขที่สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยกำหนดความเร็วที่ทางเข้าเป็น 540 ไมโครเมตรต่อวินาที เพราะจากผลทดลองพบว่าความเร็วเฉลี่ยที่สามารถทำให้อนุภาคลงหลุมโดยเทียบเป็นอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และเงื่อนไขด้านข้างของช่องสี่เหลี่ยมจะกำหนดเป็นแบบสมมาตร ซึ่งการกำหนดด้านข้างให้เป็นแบบสมมาตรนั้นเพื่อลดระยะเวลาในการคำนวณและจะส่งผลให้มีความแม่นยำในการคำนวณอีกด้วย สำหรับด้านบนและด้านล่างของช่องการไหลจะกำหนดให้ไม่มีการเคลื่อนที่บนผนังของช่องการไหล (No Slip)

การกำหนด mesh นั้นจะทำการกำหนดจำนวน mesh ที่บริเวณหลุมให้มีความละเอียดกว่าบริเวณอื่น ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการคำนวณแต่ยังคงประสิทธิภาพให้มีความแม่นยำอยู่

### 4.4 ผลของการจำลองการไหล

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการดูพฤติกรรมการไหลของ Streamline ที่มีผลต่อรูปทรงสามเหลี่ยมผู้วิจัยจึงใช้การจำลองการไหลเพื่อศึกษาดู Streamline ว่ามีลักษณะและรูปร่างอย่างไร ผู้วิจัยสนใจที่จะแสดงผลของ Streamline ที่บริเวณด้านล่างของช่องการไหลเนื่องจากที่บริเวณด้านล่างนี้จะเป็นตำแหน่งที่สามารถดักจับอนุภาคได้มากที่สุด ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นสิ่งเปรียบเทียบกับผลการทดลองว่าเหตุใดเม็ดพอลิเมอร์ถึงมีการเคลื่อนที่ลงหรือไม่ลงหลุม ในงานนี้จึงแบ่งวิธีการแสดงผลดังนี้

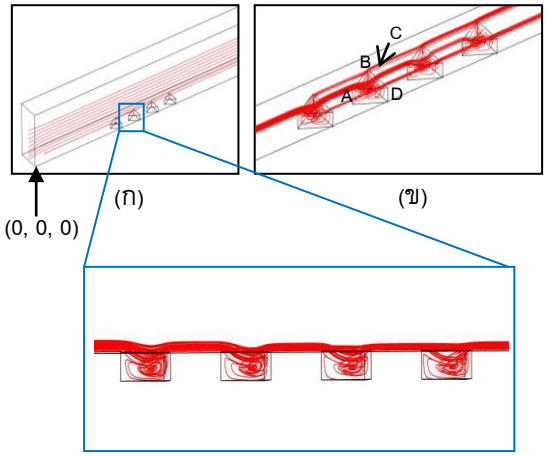
4.4.1 ตำแหน่งความสูงต่างกัน

จากการจำลองการไหลพบว่าตำแหน่ง Streamline ที่บริเวณด้านล่างของช่องการไหลมีโอกาสดักอนุภาคได้มากกว่าตำแหน่งอื่น (รูปที่ 6ก) เนื่องจากการไหลบริเวณใกล้กับผนังด้านล่างจะไหลวนเข้าไปในหลุมรูปสามเหลี่ยมเป็นเหตุให้อนุภาคที่ไหลตาม Streamline ดังกล่าวถูกดักไว้ในหลุม แต่หากอนุภาคไหลตาม Streamline ที่ไม่เกิดการไหลในลักษณะดังกล่าวก็จะส่งผลให้อนุภาคนั้นไม่สามารถลงหลุมได้ ทั้งนี้ทางผู้วิจัยได้แสดงผลของ Streamline ทั้งหมด 10 เส้น โดยแต่ละเส้นมีพิกัดอยู่ที่ (0, 40, 0-10 ไมโครเมตร)

ผลที่ได้จากการจำลองการไหลมีความสอดคล้องกับการทดลองจริงที่ว่าบริเวณด้านล่างจะสามารถดักเม็ดโพลิเมอร์ได้ดีกว่าตำแหน่งอื่นเนื่องจากที่บริเวณดังกล่าวมีความเร็วที่ต่ำกว่าตำแหน่งอื่น

4.4.2 ตำแหน่งด้านขวางต่างกัน

การแสดงผลของตำแหน่งนี้จะเลือกแสดงผลโดยเริ่มจากพิกัด (0, 20-60, 0 ไมโครเมตร) เพื่อดู Streamline ที่เกิดขึ้นภายในหลุมและบริเวณรอบๆหลุมสามเหลี่ยม ผลปรากฏว่าเมื่อเม็ดพอลิเมอร์ไหลมาตาม Streamline ที่ตำแหน่ง A ซึ่งเป็นตำแหน่งตรงปลายสามเหลี่ยม อนุภาคจะถูกการไหลวนดักไว้ในหลุมได้ แต่ถ้าหากเม็ดพอลิเมอร์เคลื่อนที่ผ่านหลุมในตำแหน่ง B และ D ซึ่งเป็นตำแหน่งเอียงไปทางฐานของสามเหลี่ยมแล้ว การไหลวนในบริเวณดังกล่าวเกิดไม่มากพอและอาจจะส่งผลให้อนุภาคหลุดออกจากหลุมผ่านไปทางปลายด้านฐานของหลุมสามเหลี่ยมได้ (ตำแหน่ง C) ดังแสดงในรูป 6ข




รูปที่ 6 ผลการจำลองการไหลด้วยซอฟแวร์ (ก) เส้น streamline ที่ตำแหน่งความสูงต่างๆ (ข) เส้น streamline ที่ตำแหน่งต่างๆ ทางด้านขวางบนพื้นของช่องการไหล

## 5. สรุปผลการทดลอง

การทดลองเบื้องต้นของอุปกรณ์ดักเซลล์ด้วยหลุมขนาดจุลภาคกับเม็ดโพลิเมอร์พบว่าที่อัตราการไหล 0.1 mL/hr สามารถดักเม็ดโพลิเมอร์ได้มากกว่าอัตราการไหล 0.3 mL/hr เพราะว่าความเร็วมีผลต่อการดักอนุภาคโดยตรงยิ่งมีค่าน้อยจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดักอนุภาคได้มากขึ้นแต่หากมีค่าน้อยหรือมากเกินไปจะทำให้อนุภาคไม่สามารถลงหลุมได้ ทั้งนี้ในการทดลองควรควบคุมความเร็วให้มีค่าที่เหมาะสม ซึ่งประสิทธิภาพของการดักอนุภาคคิดเป็น 62.5 และ 11.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การจำลองการไหลเบื้องต้นพบว่าบริเวณตำแหน่งที่ติดพื้นของช่องการไหลมีโอกาสเกิดการดักได้มากกว่าที่ตำแหน่งอื่นๆ เนื่องจากตำแหน่งดังกล่าวเกิดการไหลในลักษณะการไหลวนขึ้นทั้งนี้เม็ดพอลิเมอร์อาจเกิดการหลุดออกจากหลุมได้หากตำแหน่งดังกล่าวเกิดการไหลวนไม่มากพอที่จะดักเม็ดพอลิเมอร์เอาไว้

## 6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากโครงการยุทธศาสตร์การวิจัยเชิงลึก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช คลัสเตอร์สุขภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU-57- CU-57-004-HRHR) และได้รับการช่วยเหลือในกระบวนการสร้างอุปกรณ์ระบบการไหลจุลภาคจากศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์แห่งชาติ

## 7. เอกสารอ้างอิง

[1] http://www.phukethospital.com/Thai/Health-Information/Cancer.php accessed on 19/11/2014

[2] I. Meyvantsson, D. J. Beebe, “Cell Culture Models in Microfluidic Systems,” Annual Review of Analytical Chemistry, Vol.1, 2008, pp.423-449

[3] www.agilent.com, accessed on 10/09/2014.

[4] A. Thanormsridetchai, D. Ketpun, A. Pimpin, W. Srituravanich, P. Piyaviriyakul, A. Sailasuta, W. Jeamsaksiri, W. Sripumkhai, J. Jantawong, J. Supadech, “Sorting of Multiple-Size Cells Using Spiral Microchannels,” MNC 2014, Japan.

[5] R. M. Johann, “Cell trapping in microfluidic chips,” Anal Bioanal Chem, 385, 2006, pp. 408–412

[6] J. Pivetal, D. Royet, G. Ciuta, M. F. Robin, N. Haddour, N. M. Dempsey, F. D. Bouchiat, P. Simonet, “Micro-magnet arrays for specific single bacterial cell positioning” Magnetism and Magnetic Materials, vol. 10, 2014

[7] G. Fuhr, T. Muller, V. Baukloh, K. Lucas, “High-frequency electric field trapping of individual human spermatozoa,” Human Reproduction, Vol.13, 1998, pp.136–141

[8] M. Bocchi, M. Lombardini, A. Faenza, L. Rambelli, L. Giulianelli, N. Pecorari, R. Guerrieri, “Dielectrophoretic trapping in microwells for manipulation of single cells and small aggregates of particles,” Biosensors and Bioelectronics, Vol.24, 2009, pp.1177–1183

[9] W. H. Tan, S. Takeuchi, “A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications,” PNAS, vol. 104, no. 4, 2007, pp.1146–1151

[10] A. A. Banaeiyan, D. Ahmadpour, C. B. Adiels and M. Goksör, “Hydrodynamic Cell Trapping for High Throughput Single-Cell Applications,” Micromachines, Vol.4, 2013, pp.414-430

[11] S. F. Romanuik, S. M. Grist, M. Haq, B. L. Gray, N. Gulzar, J. K. Scott, D. Hohertz, K. L. Kavanagh, R. Nirwan, C. Hui, A. G. Brolo, R. Gordon, “Microfluidic

Trapping of Antibody-secreting Cells," Journal of Medical and Biological Engineering, Vol.31(2), 2010, pp.121-127

[12] J. L. Wilson, S. Suri, A. Singh, C. A. Rivet, H. Lu, T. C. McDevitt, "Single-cell analysis of embryoid body heterogeneity using microfluidic trapping array," Biomed Microdevices , Vol.16, 2014, pp.79–90

[13] J. Y. Park, M. Morgan, A. N. Sachs, J. Samorezov, R. Teller, Y. Shen, K. J. Pienta, S. Takayama, "Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation," Microfluid Nanofluid, Vol.8, 2010, pp. 263–268