

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีการสร้างภาพด้วยอัลตราซาวด์

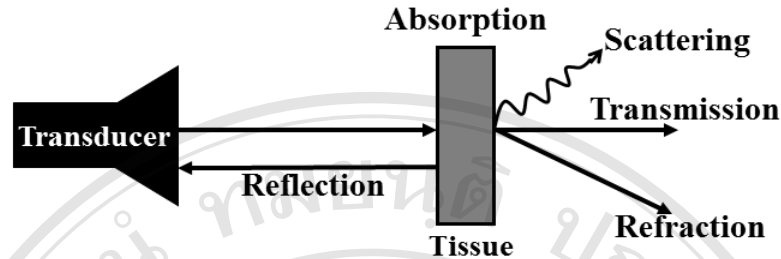
ในปี ค.ศ. 1942 Dussile ได้นำอัลตราซาวด์ หรือคลื่นเสียงความถี่สูง มาใช้ในทางการแพทย์ เพื่อเนื้อเยื่อ ที่การใช้รังสีเอกซ์ไม่สามารถมองเห็นได้ จากนั้นประมาณ 40 ปี มีการพัฒนาคุณภาพ การตรวจไปอย่างรวดเร็วจนสามารถเห็นก้อนในภาพอัลตราซาวด์ อีกทั้งสะดวกสบายในการตรวจ ไม่มีผลต่อร่างกายที่ชัดเจน และมีราคาถูกเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีอื่น [16, 17]

อัลตราซาวด์ หรือคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound) เป็นคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่าช่วง ความถี่ที่มนุษย์ได้ยิน ทางทางการแพทย์นำมาใช้สร้างภาพเพื่อวินิจฉัยโรค (Ultrasonography) และการ รักษาโรคในทางกายภาพบำบัด (Physical Therapy) โดยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ใช้สร้างภาพมีความถี่ ในช่วง 1–20 MHz [16]

การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง หรืออัลตราซาวด์ เป็นอีกการตรวจหนึ่งในหลาย วิธีเพื่อนำไปประกอบการวินิจฉัยโรค และรักษาโรคให้มีความถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้น โดยการ ตรวจจะเริ่มจากการปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูง (ในการสร้างภาพเพื่อวินิจฉัยโรคใช้ความถี่ในช่วง 1–10 MHz) จากหัวตรวจ (Transducer) ผ่านลงสู่ผิวหนัง เข้าไปสู่อวัยวะภายในที่ต้องการตรวจ เมื่อ คลื่นเสียงกระทบรอยต่อของเนื้อเยื่อ 2 ชนิด จะเกิดการสะท้อนกลับของคลื่นเสียงมายังหัวตรวจ และ สัญญาณที่กลับมาก็จะถูกแปรผลให้ปรากฏเป็นภาพแสดงบนจอ ตามเวลาที่สะท้อนกลับมา ภาพที่เห็น จึงแสดงความลึกต่างๆ กันในทันที

หลักการของอัลตราซาวด์ คือคลื่นอัลตราซาวด์เป็นคลื่นกลที่สร้างจากการให้กระแสไฟฟ้าแก่ ผลึก Piezoelectric crystal โดยจะเกิดเสียงความถี่สูงออกมาเป็นช่วงๆ (Ultrasonic pulses) ปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่า Piezoelectric effect เมื่อคลื่นอัลตราซาวด์ผ่านไปยังรอยต่อของ ตัวกลาง 2 ชนิด จะเกิดอันตรกิริยาต่อตัวกลางดังนี้ คือการสะท้อนกลับเข้าสู่หัวตรวจ (Reflection) การหักเห (Refraction) การดูดกลืนในตัวกลาง (Absorption) การเดินทางผ่านของคลื่นเสียง (Transmission) และการกระเจิงของคลื่นเสียง (Scattering) ดังภาพที่ 3

ตัวกลางที่แตกต่างกันจะมีการสะท้อนกลับของคลื่นเสียงเข้าสู่หัวตรวจแตกต่างกัน ทั้งความถี่และความยาวคลื่น ดังนั้นคุณสมบัติการสะท้อนกลับของคลื่นเสียง จึงถูกนำมาใช้ในการสร้างภาพอัลตราซาวด์ เพื่อแยกเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน หรือแยกเนื้อเยื่อปกติกับรอยโรคออกจากกัน



ภาพที่ 3 แสดงอันตรกิริยาของคลื่นเสียงความถี่สูง กับเนื้อเยื่อ

เมื่อคลื่นเสียงความถี่สูงตกกระทบบนรอยต่อระหว่างตัวกลางที่ 1 กับตัวกลางที่ 2 ด้วยมุม θ_i คลื่นเสียงความถี่สูงจะสะท้อนกลับด้วยมุม θ_r ซึ่งมุมทั้งสองจะต้องมีค่าเท่ากันเสมอ และคลื่นเสียงความถี่สูงจะหักเหเข้าสู่ตัวกลางที่ 2 ด้วยมุม θ_t ถ้าความเร็วของคลื่นเสียงความถี่สูงในตัวกลางที่ 2 มีค่าสูงกว่าตัวกลางที่ 1 มุมหักเหจะกว้างกว่ามุมตกกระทบบน และหากมุมตกกระทบบนกว้างมากขึ้น ทำให้มุมหักเหกว้างเพิ่มขึ้นจนทำให้มุมหักเหกว้างเกิน 90 องศา ส่งผลให้ไม่มีคลื่นเสียงความถี่สูงผ่านเข้าสู่ตัวกลางที่ 2 เรียกมุมตกกระทบบนดังกล่าว ว่ามุมวิกฤต (Critical angle) อย่างไรก็ตามยังมีคุณสมบัติการก้องของเสียงมาเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างภาพ เนื่องจากหัวตรวจจะส่งคลื่นเสียงออกมาในแนวตั้งฉากกับเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจ ดังนั้นมุมตกกระทบบน และมุมสะท้อน มีค่าเท่ากับ 0 องศา และสัญญาณเสียงที่ใช้ในนำมาสร้างภาพเป็นสัญญาณเสียงที่สะท้อน (Echo) กลับจากตัวกลาง ดังนั้น ค่า Acoustic Impedance (Z) จึงมีความสำคัญ โดยค่าดังกล่าวบ่งบอกถึงการสะท้อนของคลื่นเสียงมากหรือน้อย แสดงความสัมพันธ์ดังสมการ

$$Z = \rho c$$

โดยที่ $Z =$ Acoustic impedance (rayls)

$\rho =$ ความหนาแน่นเฉลี่ยของตัวกลาง (g/cm^3)

$c =$ ความเร็วของอัลตราซาวด์ (m/s)

การหาค่าการสะท้อนของคลื่นเสียงความถี่สูงในรอยต่อของตัวกลาง สามารถหาได้จาก การหาค่าอัตราส่วนของแอมพลิจูดสะท้อนของ Echo ที่เกิดขึ้นที่รอยต่อ กับแอมพลิจูดตกกระทบบนของ Echo ที่เกิดขึ้นที่รอยต่อนั้น (amplitude reflection coefficient :R) แสดงดังสมการ

$$R = \frac{P_r}{P_i} = \left| \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right|$$

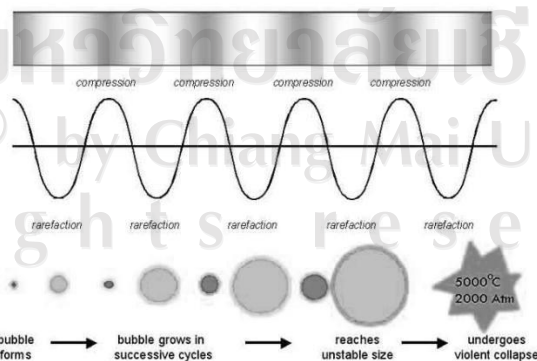
- เมื่อ Z_1 คือค่า Acoustic impedance ของตัวกลางที่ 1
 Z_2 คือค่า Acoustic impedance ของตัวกลางที่ 2
 P_r คือ แอมปริจูดของคลื่นสะท้อน
 P_i คือ แอมปริจูดของคลื่นตกกระทบ

2.2 ผลของอัลตราซาวด์ต่อเซลล์ร่างกาย

2.2.1 Cavitation

คาวิตชัน เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากการบีบอัดและขยายของตัวกลางที่เป็นน้ำทำให้เกิดฟองอากาศและการแตกตัวของฟองอากาศ ซึ่งสามารถพบได้ในตัวกลางที่ถูกกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งฟองอากาศที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น ลูงไขมัน (vesicles) เป็นต้น นักวิจัยแยกปรากฏการณ์คาวิตชันตามลักษณะการเกิดฟองอากาศ ออกเป็น 2 แบบ กล่าวคือเมื่อฟองอากาศได้รับการกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงอย่างต่อเนื่อง ฟองอากาศจะเกิดการขยายขนาดตามรอบคลื่น ส่งผลให้ฟองอากาศมีการสั่นไหว (Oscillations) ตามรอบคลื่นนั้น ซึ่งฟองอากาศมีการสะสมพลังงานภายในฟองอากาศ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Stable cavitation และเมื่อมีการสะสมพลังงานมากจนฟองอากาศไม่สามารถสะสมได้อีกทำให้ฟองอากาศนั้นแตกทันที เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Acoustic cavitation ดังภาพที่ 4 ในทางการแพทย์ใช้ประโยชน์ของปรากฏการณ์นี้ในการขนส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมาย โดยการบรรจุยาในลูงไขมัน และกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงประมาณ 1 MPa เรียกว่า Inertial cavitation [5]

ACOUSTIC CAVITATION



ภาพที่ 4 แผนผังการเกิดปรากฏการณ์คาวิตชัน (cavitation)

ที่มา : <http://electrowavecorp.com/cavitation/>

การเกิดปรากฏการณ์ควิเตชันต่อถุงไขมันบรรจุแก๊ส ส่งผลต่อสภาพทางกายภาพของ เซลล์ภายในร่างกาย ดังนี้

- 1) คุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยปล่อยให้สาร หรือโมเลกุลในระบบสามารถผ่านเข้าออกอย่างอิสระ
- 2) เพิ่มโอกาสในการผ่านเข้าออกเซลล์ ของสารหรือโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ โดยใน สภาวะปกติไม่สามารถผ่านเข้าออกได้
- 3) ช่วยกระตุ้นให้ยา หรือสารเคมี ที่อยู่ในระบบไหลเวียนโลหิตสามารถเข้าเซลล์ได้ ส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่ทั้งนี้ต้องอยู่ในตำแหน่งเป้าหมาย (Specification vesicles)

จากผลของปรากฏการณ์ควิเตชัน ทำให้นักวิทยาศาสตร์นำหลักการดังกล่าวไปใช้ เพื่อ ช่วยเพิ่มปริมาณยาในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย สำหรับเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านสูง หรือไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ หรือสารแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ ซึ่งพบว่าสามารถใช้ได้ทั้งใน ร่างกายของสิ่งมีชีวิต (*In vivo study*) และในระบบจำลองร่างกายสิ่งมีชีวิต (*In vitro study*) และสามารถกำหนดตำแหน่งที่ต้องการการสะสมของยาได้

2.2.2 ความร้อน

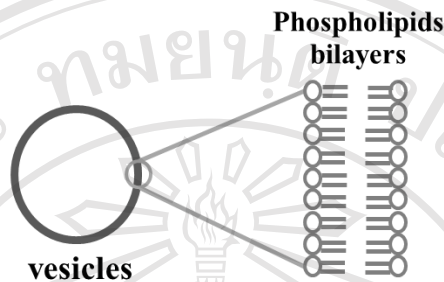
เมื่อมีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงกระตุ้นเข้าสู่ร่างกาย จะมีการส่งคลื่นเสียงผ่านเนื้อเยื่อ ชนิดต่างๆที่อยู่ระหว่างหัวตรวจ กับตำแหน่งที่ต้องการตรวจ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายใน ร่างกาย โดยพบว่าพลังงานบางส่วนของคลื่นเสียงความถี่สูงถูกเนื้อเยื่อดูดกลืนไว้ แล้วจะ เปลี่ยนคลื่นเสียงดังกล่าวเป็นพลังงานความร้อน

ความร้อนที่เกิดขึ้นจากการส่งคลื่นเสียงความถี่สูงเข้าไปในร่างกาย ยังขึ้นอยู่กับปัจจัย จากภายนอก และภายในร่างกาย เช่น ความเข้ม ความถี่ของสัญญาณที่ใช้กระตุ้น ค่า สัมประสิทธิ์การดูดกลืนพลังงานของเนื้อเยื่อแต่ละชนิด และชนิดของหัวตรวจ ซึ่งพบว่าการใช้ หัวตรวจชนิดแบนเรียบ (Planar) ให้สัญญาณคลื่นเสียงที่มีความเข้มมากกว่าหัวตรวจแบบจุด (Focal point) [5]

2.3 สารเปรียบต่างสำหรับการตรวจอัลตราซาวด์

สารเปรียบต่างของการตรวจอัลตราซาวด์ หรือ Ultrasound Contrast Agents (USCAs) คืออนุภาคที่สามารถตอบสนองต่อสัญญาณอัลตราซาวด์ มักเป็นถุงไขมันเรียงตัว 2 ชั้น ดังภาพที่ 5 การแบ่งประเภทของสารเปรียบต่างดังกล่าวขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค ได้แก่ Multilamellar vesicles (MLV) เป็นสารเปรียบต่างที่มีขนาดอนุภาค 0.5–10 μm Small unilamellar vesicles

(SUV) เป็นสารเปรียบต่างที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 50 nm Large unilamellar vesicles (LUV) เป็นสารเปรียบต่างที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 50 nm และ Giant vesicles เป็นสารเปรียบต่างที่มีขนาดอนุภาค 10–10,000 μm ในทางคลินิกมีการใช้สารเปรียบต่าง เช่น SonoVue® มีขนาดในระหว่าง 700 nm–10 μm [18, 19] ซึ่งการสังเคราะห์สารเปรียบต่างของการตรวจอัลตราซาวด์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น lipid hydration, solvent spherule, sanitation, French pressure cell หรือเทคนิค freeze-thaw [18, 20]



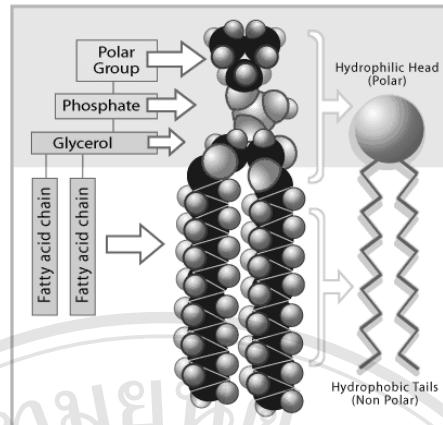
ภาพที่ 5 ถุงไขมันมีการเรียงตัวฟอสโฟไลปิด 2 ชั้น โดยหันด้านไม่มีขั้ว (hydrophobic) เข้าหากัน และหันด้านมีขั้ว (hydrophilic) ออกจากกัน

เมื่อเร็วๆ นี้ USCAs สังเคราะห์โดยใช้พอลิเมอร์ ฟอสโฟไลปิด และสารอื่นที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุลเดียวกัน (amphipatic molecules) ประกอบเป็นผิวของ USCAs และบรรจุ liquid perfluorocarbon gas (PFC) เพื่อใช้เพิ่มสัญญาณเสียงที่สะท้อนกลับมายังหัวตรวจอัลตราซาวด์ โดยการฉีดสารเปรียบต่างเข้าสู่ระบบโลหิต

2.4 ฟอสโฟไลปิดกับการสังเคราะห์ถุงไขมัน

ฟอสโฟไลปิดหรือฟอสโฟกลีเซอรไรด์ เป็นสารชีวเคมีชนิดหนึ่ง ที่เป็นอนุพันธ์ของเอสเอ็น-กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต (*sn*-glycerol-3-phosphate) และมีกรดไขมัน 2 ตัว มาต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (esterification) ที่ตำแหน่ง คาร์บอน 1 และ 2 โดยฟอสโฟไลปิดเป็นโมเลกุลชนิดแอมฟิพาติก (amphipatic) กล่าวคือประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic part) หรือส่วนหัว “head” และส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic part) หรือส่วนหาง “tail” ดังภาพที่ 6

โดยทั่วไปฟอสโฟไลปิดมีค่าการละลายน้ำต่ำมาก เนื่องจากสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว เมื่อฟอสโฟไลปิดมีความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่ม (Aggregation) ทำให้เกิดการแยกเป็นส่วน คือเมื่อละลายฟอสโฟไลปิดในน้ำ ส่วนหัวของฟอสโฟไลปิดจะหันออกด้านนอก และส่วนหางของฟอสโฟไลปิดจะหันเข้าสู่ด้านใน ซึ่งโครงสร้างการเกาะกลุ่มขึ้นอยู่กับชนิดของฟอสโฟไลปิด โดยมีการรวมตัวกันเป็นถุงไขมัน (Vesicles) ที่มีการเรียงตัวของฟอสโฟไลปิดเป็น 2 ชั้นซ้อนกัน ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของฟอสโฟไลปิด (Phospholipids)

ที่มา : <http://www.freethought-forum.com/forum/showthread.php?t=24978&garp=6>

เทคนิค Freeze thaw เป็นเทคนิคหนึ่งในการสังเคราะห์ถุงไขมัน ซึ่งจะสังเคราะห์ถุงไขมันหลังจากทำการจัดเรียงฟอสโฟไลปิดให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง (Thin film) กล่าวคือฟอสโฟไลปิดจะเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบโดยส่วนมีขี้จะหันเข้าหาส่วนมีขี้ และส่วนไม่มีขี้จะหันเข้าหาส่วนไม่มีขี้ และติดอยู่กับภาชนะที่ใช้บรรจุ การสร้างถุงไขมันทำได้โดยเติมตัวทำละลายวัฏภาคที่เป็นน้ำ (aqueous phase) ซึ่งทำให้แผ่นฟิล์มบางดังกล่าวหลุดจากภาชนะที่ใช้บรรจุ ในลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม และจะจับตัวแบบสุ่มเป็นถุงไขมัน โดยอาศัยลักษณะทางโครงสร้างของฟอสโฟไลปิดเมื่อได้รับความร้อนและความเย็น คือเมื่อฟอสโฟไลปิดได้รับความร้อน ส่วนไม่มีขี้ หรือ hydrophobic tail จะกางออก ในทางกลับกันเมื่อได้รับความเย็นก็จะหุบเข้ามาชิดกัน ดังนั้นการจุ่มร้อนครั้งแรก ทำให้ส่วนไม่มีขี้ของฟอสโฟไลปิดกางออก ส่งผลให้ถุงไขมันมีการจับตัวแบบหลวมๆ จนทำให้ถุงไขมันที่มีขนาดใหญ่ ไม่เสถียร และหลุดออกแบ่งเป็นถุงไขมันที่มีขนาดเล็กลง จากนั้นทำการจุ่มเย็นทำให้ส่วนไม่มีขี้ของถุงไขมันหุบเข้า ส่งผลให้ถุงไขมันมีความเสถียรมากขึ้น ทำการจุ่มร้อนสลับกับจุ่มเย็น (Freeze-thaw) ผลลัพธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวคือถุงไขมันชนิด large unilamellar vesicles (LUV) โดยมีลักษณะเป็นทรงกลม มีการจัดเรียงฟอสโฟไลปิด 2 ชั้น หันส่วนไม่มีขี้เข้าหากัน และหันส่วนมีขี้เข้าหาส่วนมีขี้ของตัวทำละลาย [18]

Transition temperature (T_m) คืออุณหภูมิที่ทำให้ฟอสโฟไลปิดเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ กล่าวคือเมื่อสิ่งแวดล้อมมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ทำให้สายไฮโดรคาร์บอนของฟอสโฟไลปิดกางออก ส่งผลต่อความเสถียรของฟอสโฟไลปิด มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง หรืออาจเกิดการระเหยได้ [21, 22] ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ความร้อนเพื่อสังเคราะห์ถุงไขมัน ดังนั้นอุณหภูมิที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์ถุงไขมันต้องน้อยกว่าค่า T_m ของฟอสโฟไลปิดที่เลือกใช้ การศึกษาเลือกใช้ฟอสโฟไลปิด (PC:PG) ที่มีค่า T_m เท่ากับ 41°C ดังนั้นในกระบวนการสังเคราะห์ถุงไขมันจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 41°C

2.5 สารติดตามเรืองแสง (fluorescence probe) กับการวัดเสถียรภาพของถุงไขมัน

ในการติดตามถุงไขมันเพื่อคุณสมบัติโดยใช้อาหารติดตามเรืองแสง 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งอาศัยหลักการการเรืองแสงของสารติดตามเรืองแสง เมื่อสารดังกล่าวอยู่ในวัฏภาคที่เป็นน้ำ (aqueous phase) สารเรืองแสง DPH จะเกาะตัวเป็นกลุ่ม (aggregation form) ส่งผลให้ไม่แสดงคุณสมบัติการเรืองแสง (fluorescence) หรือมีการเรืองแสงน้อยมาก แต่เมื่อสารเรืองแสง DPH ละลายในสารละลายอินทรีย์ (organic phase) หรือแทรกอยู่ในส่วนไม่มีขั้วของฟอสโฟไลปิดบนผิวถุงไขมัน DPH จะอยู่ในรูปโมเลกุลเดี่ยว (monomer) ส่งผลให้แสดงคุณสมบัติการเรืองแสงขึ้น

เทคนิคสเปกโตรฟลูออโรเมทรี เป็นวิธีการวัดการคายพลังงานแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโมเลกุลที่มีคุณสมบัติการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของสารติดตามสูง เนื่องจากในการวัดด้วยเทคนิคนี้มีการเลือกกระตุ้นอิเล็กตรอนที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับโมเลกุลของสารติดตาม ($\lambda_{excitation}$, DPH มีค่าการกระตุ้นสูงสุดที่ความยาวคลื่น $\lambda_{excitation} = 370$ nm) และทำการวัดพลังงานแสงที่ปล่อยออกมา ($\lambda_{emission}$, DPH ค่าการคายพลังงานสูงสุดที่ความยาวคลื่น $\lambda_{emission} = 427$ nm) [23-25] โดยที่ปริมาณความเข้มของการเรืองแสงจะสัมพันธ์กับปริมาณสารที่เรืองแสง

จากหลักการการเรืองแสงของสารเรืองแสง DPH และเทคนิคการวัดการเรืองแสงข้างต้นสามารถนำมาใช้เพื่อติดตามถุงไขมันได้ จากปริมาณการเรืองแสงของ DPH ที่อยู่ในระบบที่เป็นน้ำและมีถุงไขมันละลายในลักษณะแขวนลอย ดังนั้นปริมาณการเรืองแสงของ DPH จะขึ้นอยู่กับปริมาณของถุงไขมัน เมื่อตรวจวัดการเรืองแสงได้ค่าน้อย แสดงว่าถุงไขมันมีปริมาณน้อย ในทางกลับกันหากตรวจวัดการเรืองแสงได้ค่ามาก แสดงว่าถุงไขมันมีปริมาณมาก เราจึงสามารถนำปรากฏการณ์ดังกล่าวไปบ่งชี้ความเสถียรของถุงไขมันที่สังเคราะห์ได้ โดยทำการวัดค่าการเรืองแสงของสารติดตามเรืองแสงที่แทรกอยู่ในส่วนไม่มีขั้วของฟอสโฟไลปิดบนผิวถุงไขมัน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลาใด ๆ

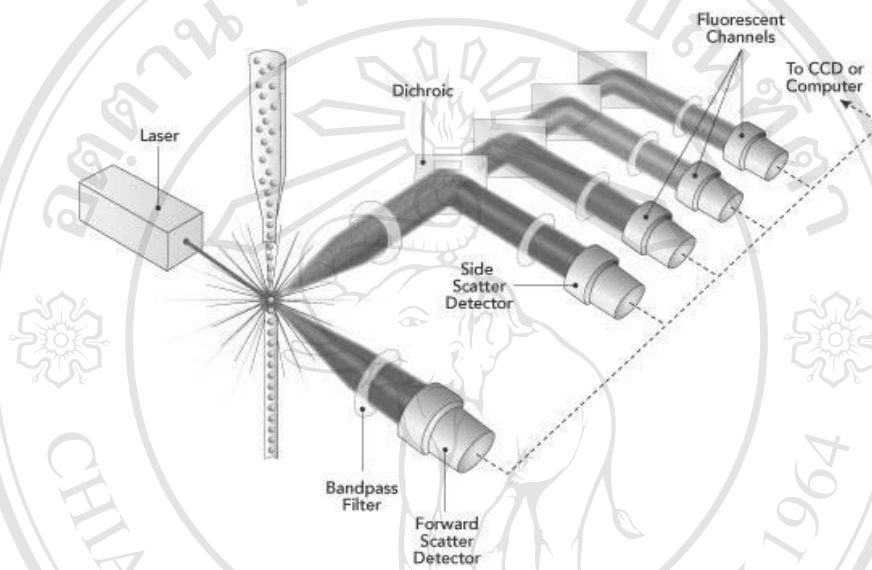
2.6 หลักการวัดขนาดของถุงไขมัน

2.6.1 Flowcytometry

Flowcytometry เป็นวิธีการหนึ่งในการวัดขนาดสารตัวอย่าง ซึ่งจะวัดการกระเจิงแสงขณะที่อนุภาคไหลผ่านทางพรวย (nozzle) ของเครื่องเป็นอนุภาคเดี่ยวๆ เมื่ออนุภาคการไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ แสงที่กระทบอนุภาคนั้นจะเกิดการหักเห โดยในตัวเครื่องจะมีตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) มารับสัญญาณการหักเหของแสง 2 ทิศทาง คือการหักเหของแสงเป็นมุม

แถบทางด้านหน้า (Forward scattering) ที่สัมพันธ์กับขนาดของอนุภาค และการหักเหของแสงที่ออกจากอนุภาค (Side scattering) ทำให้สามารถทราบส่วนประกอบต่างๆภายในอนุภาคได้ จากนั้นเครื่องจะเปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้า และส่งข้อมูลไปยังระบบคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลออกมาเป็นค่าทางดิจิทัลเป็นขนาด และรูปร่างของอนุภาคหรือโมเลกุลที่ต้องการวัด [26] ดังภาพที่ 7

การหาค่าขนาดดว้ไขมันที่สังเคราะห์ขึ้น ทำได้โดยการวัดขนาดดว้ไขมันที่สังเคราะห์เทียบกับขนาดอนุภาคที่ทราบค่า (Standard particles)



ภาพที่ 7 ส่วนประกอบ และการทำงานของเครื่อง flowcytometer
ที่มา: <http://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>

2.6.2 Dynamic Light Scattering (DLS)

Dynamic Light Scattering (DLS) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดขนาดสารตัวอย่างที่มีระดับตั้งแต่ 5 nm ถึง 5 μm โดยอาศัยหลักการวัดการกระเพื่อมความเข้มแสง (Photo correlation spectroscopy) กล่าวคืออนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 μm มีการเคลื่อนที่อย่างไร้ทิศทางไปทั่วทั้งตัวกลาง (randomly diffuse) จนก่อให้เกิดการกระเจิงของแสงได้ การวัดความถี่ของการกระเจิงแสงสามารถตรวจวัด โดยใช้หลอดทวีพลังแสง (photomultiplier) และสามารถบอกขนาดของอนุภาคได้ โดยการคำนวณจากความถี่โดยใช้สมการสโตกและไอสไนด์ (Stokes–Einstein equation) ด้วยการหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เลื่อนตำแหน่ง (translational diffusion coefficient, DT) ของอนุภาค ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของอนุภาค

$$a = \frac{k_B T}{3\pi\eta_L D_T}$$

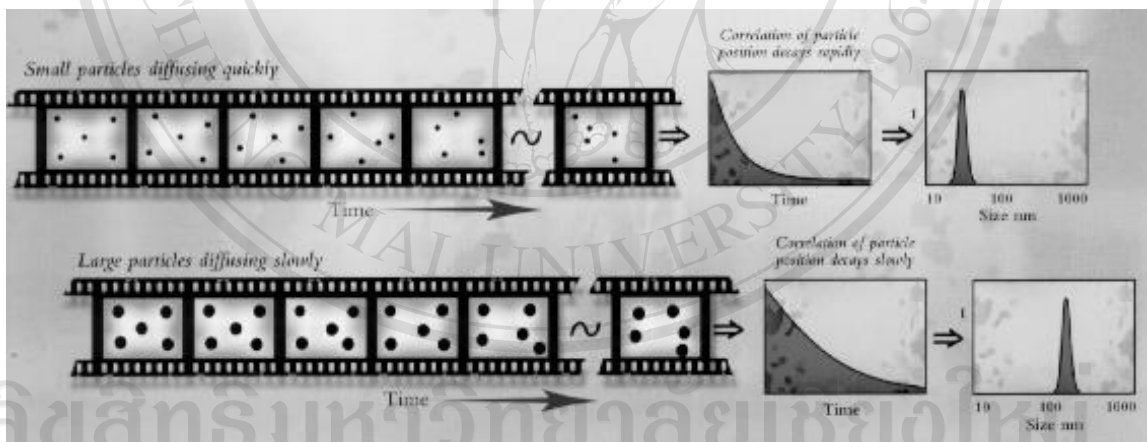
โดยที่ a คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค (nm)

T คือ อุณหภูมิองศาเคลวิน (K)

η_L คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความหนืดของตัวทำละลาย (Pa·s)

k_B คือ ค่าคงที่ของโบลทซ์มาน (Boltzman constant) (J/K)

การเคลื่อนที่ของอนุภาคแบบบราวน์เนียน (Brownian) ส่งผลกระทบต่อความเข้มแสงที่กระเจิงจากอนุภาค กล่าวคืออนุภาคขนาดใหญ่ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เคลื่อนที่ตำแหน่ง (translation diffusion coefficient) ต่ำ จะเคลื่อนที่ช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก ทำให้ความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น-ลงของแสงที่กระเจิงต่ำ และอนุภาคขนาดเล็กมีการเคลื่อนที่เร็วกว่า ความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น-ลงของแสงที่กระเจิงสูงกว่า ดังนั้นอัตราการเปลี่ยนแปลงของแสงที่กระเจิงจะช้ากว่าสัญญาณที่ได้จากการวัดความเข้มแสงในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ของอนุภาคขนาดเล็ก และความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น-ลงของความเข้มแสงนี้จะถูกส่งไปยัง correlator ดังภาพที่ 8 เพื่อนำไปคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เคลื่อนที่ตำแหน่ง และนำไปหาขนาดอนุภาคต่อไป [27]



ภาพที่ 8 ผลกระทบลักษณะการแพร่เคลื่อนที่ตำแหน่งของอนุภาคที่มีขนาดไม่เท่ากันต่อความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น-ลงของแสง [27]