

การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย :
หลักการและการพัฒนาในส่วนของตัวทำละลายสกัด
Dispersive Liquid-Liquid Microextraction :
Principle and Development of Extraction Solvent

พิมพา สร้อยสูงเนิน*

Phimpha Soisungnoen*

สาขาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

Applied Chemistry Department, Faculty of Sciences and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan

Received : 11 July 2018

Accepted : 3 September 2018

Published online : 13 September 2018

บทคัดย่อ

การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (DLLME) จัดเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นที่นิยมมาก เนื่องจากมีข้อดีคือ ทำได้ง่ายโดยมีค่าการเพิ่มความเข้มข้นสูง ราคาถูก รวดเร็ว และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย วิธี DLLME จะอาศัยการกระจายตัวของตัวทำละลายสกัดเป็นหยดเล็กๆ ในตัวอย่างที่เป็นน้ำ สารเป้าหมายจะถูกแยกไปอยู่ในเฟสสกัดได้ทันทีเนื่องจากหยดตัวทำละลายมีพื้นที่ผิวสูงมาก ส่งผลให้ใช้ตัวทำละลายน้อยมากเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลวหรือของแข็งอื่นๆ บทความนี้ได้รวบรวมหลักการของ DLLME และการพัฒนาเทคนิค DLLME โดยใช้ตัวทำละลายสกัดที่หลากหลาย รวมทั้งตัวอย่างการประยุกต์ใช้อีกด้วย

คำสำคัญ : การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของเหลว, การเตรียมตัวอย่าง, การสกัดระดับจุลภาค

Abstract

Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) has become a very popular environmentally benign sample preparation technique, possessing advantages of simple operation with a high enrichment factor, low cost, fast and low consumption of organic solvents. DLLME method involves the dispersion of fine droplets of extraction solvent in an aqueous sample. Partitioning of analytes into the extraction phase is instantaneous due to the very high collective surface area of the droplets. This leads to very low solvent consumption, relative to other liquid or solid phase extraction methods. This review includes the principle of DLLME and the development of DLLME using various extraction solvents and its applications.

Keywords : liquid-phase microextraction, sample preparation, microextraction

*Corresponding author. E-mail : ann_chem@hotmail.com

บทนำ

การเตรียมตัวอย่างถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในกระบวนการวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งจัดเป็นขั้นตอนที่ก่อให้เกิดมลพิษมากที่สุดในการวิเคราะห์สาร เพราะส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ขั้นตอนนี้อาจจะประกอบด้วย การสกัด (extraction) การแยก (isolation) และการเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) เป็นต้น การสกัดถือเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ใช้มากในทางเคมีวิเคราะห์ เป็นวิธีการแยกสารที่สนใจออกจากตัวอย่างโดยการใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งการเลือกวิธีการสกัดนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ชนิดของตัวอย่าง ความยากง่ายของการสกัด ชนิดและปริมาณของตัวสกัดที่ใช้ และความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การสกัดแบบดั้งเดิมหรือการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) หรือการสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction, LLE) จัดเป็นวิธีที่สามารถสกัดสารและเพิ่มความเข้มข้นได้ด้วย แต่มีข้อเสียคือต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นจำนวนมากและใช้เวลาในการสกัดนาน ทำให้งานวิจัยทางเคมีวิเคราะห์ได้มีการพัฒนาเทคนิคการสกัดเพื่อกำจัดข้อเสียนี้ โดยเฉพาะการลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างใหม่ๆ ขึ้น ตัวอย่างเช่น การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction, SPE), การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase microextraction, SPME), การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของเหลว (liquid-phase microextraction, LPME) เป็นต้น (Tobiszewski *et al.*, 2009)

การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) เป็นวิธีการสกัดที่การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์น้อยลงเมื่อเทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิมแต่ยังคงต้องใช้ในปริมาณมากคือยังต้องใช้ปริมาตรในระดับมิลลิลิตรและใช้เวลาในการสกัดนาน ในปี 1990 Arthur และ Pawliszyn (Arthur & Pawliszyn, 1990) ได้เสนอเทคนิคการสกัดแบบใหม่เรียกว่า การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของแข็ง (SPME) ซึ่งถือเป็นการเริ่มต้นของการใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาค (microextraction techniques) SPME จัดเป็นวิธีเตรียมตัวอย่างสีเขียว (green sample preparation) ที่สำคัญวิธีหนึ่งโดยอาศัยการดูดซับของสารที่สนใจบนตัวดูดซับที่เคลือบบนไฟเบอร์ ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลาย แต่ก็ยังมีข้อเสียคือไฟเบอร์มีราคาค่อนข้างสูงและหักง่าย

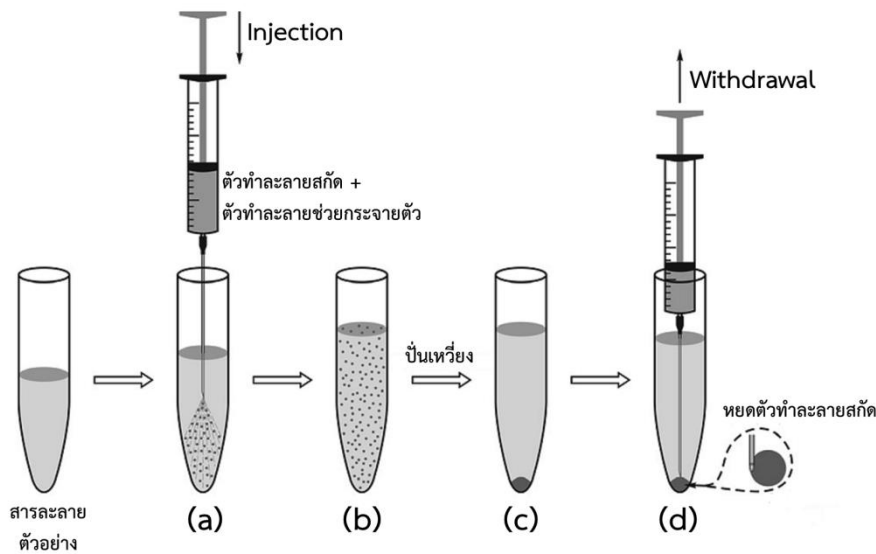
การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของเหลว (LPME) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิค LLE โดยลดปริมาณตัวทำละลายในการสกัดให้เหลือเพียงในระดับไมโครลิตร ซึ่งสามารถแบ่งเป็นเทคนิคสำคัญได้ 3 เทคนิค คือ การสกัดระดับจุลภาคแบบหยดเดียว (single-drop microextraction, SDME) (Liu & Dasgupta, 1996) การสกัดระดับจุลภาคด้วยไฟเบอร์ที่เป็นโพรง (hollow fiber microextraction, HF-LPME) (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 1999) และการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) (Rezaee *et al.*, 2006)

เทคนิค SDME เป็นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตร 1-3 ไมโครลิตรบนปลายเข็มของไมโครไซริง หลังจากเกิดการสกัดจึงดึงตัวทำละลายกลับเข้าไปในเข็มและนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป ซึ่งเทคนิค SDME ถือว่าเป็นการใช้ตัวทำละลายในการสกัดน้อยมากเมื่อเทียบกับ LLE แต่มีข้อเสียคือผู้ใช้ต้องมีความชำนาญในการทำให้หยดของตัวทำละลายเกาะอยู่กับปลายเข็มระหว่างการสกัด และหยดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไม่เสถียร และต้องใช้เวลาในการสกัดนาน (López-Darias *et al.*, 2010) ในปี 1999 Pedersen-Bjergaard และ Rasmussen (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 1999) ได้เสนอเทคนิค HF-LPME เพื่อแก้ปัญหาความไม่เสถียรของหยดตัวทำละลายในเทคนิค SDME โดยใช้ไฟเบอร์ที่เป็นโพรง (hollow fiber) เป็นตัวช่วยในการบรรจุตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด แต่ยังคงต้องใช้เวลาในการสกัดนาน เนื่องจากมีการเกิดฟองอากาศภายในไฟเบอร์ได้ง่ายทำให้การสัมผัสกันของตัวทำละลายกับตัวอย่างไม่ดี ซึ่งส่งผลให้การสกัดสารได้ช้า (Shen & Lee, 2002) ในปี 2006 Rezaee และคณะ (Rezaee *et al.*, 2006) ได้พัฒนาการสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของเหลวแบบใหม่ ชื่อว่า การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (DLLME) เป็นการ

สกัดโดยทำให้ตัวทำละลายสกัดกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งช่วยลดข้อเสียที่เกิดจากวิธี SDME และ HF-LPME อีกทั้งมีข้อดีคือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว เพิ่มความเข้มข้นได้สูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในบทความนี้ จึงได้นำเสนอหลักการและการพัฒนาเทคนิค DLLME พร้อมทั้งนำเสนอตัวอย่างการประยุกต์ใช้ DLLME อีกด้วย

หลักการของเทคนิค DLLME

เทคนิค DLLME ได้รับการพัฒนาขึ้นในปี 2006 (Rezaee *et al.*, 2006) โดยอาศัยหลักการสกัดด้วยระบบตัวทำละลาย 3 องค์ประกอบ ได้แก่ ตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว (dispersive หรือ disperser solvent) และสารตัวอย่างที่เป็นน้ำ (aqueous sample) ขั้นตอนการสกัดแสดงดังภาพที่ 1 โดยการฉีดตัวทำละลายสกัดซึ่งผสมกับตัวทำละลายช่วยกระจายตัวลงในสารตัวอย่างที่เป็นน้ำอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 1a) ในขั้นตอนนี้ตัวทำละลายสกัดจะเกิดการกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ และเป็นสารละลายลักษณะขุ่น (cloudy solution) (ภาพที่ 1b) ทำให้สารเป้าหมายเข้าไปอยู่ในตัวทำละลายสกัดได้ เนื่องจากการเกิดหยดขนาดเล็กของตัวทำละลายสกัดเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวทำละลายและสารละลายตัวอย่าง ทำให้เกิดการสกัดได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วย ซึ่งถือเป็นข้อดีที่สำคัญของวิธี DLLME จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการแยกเฟสระหว่างตัวทำละลายสกัดและสารตัวอย่าง (ภาพที่ 1c) แล้วจึงทำการแยกตัวทำละลายสกัดออกไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ ต่อไป (ภาพที่ 1d)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค DLLME (Zgoła-Grzeskowiak & Grzeskowiak, 2011)

ประสิทธิภาพของเทคนิค DLLME

สำหรับการศึกษาสถานะของการสกัดด้วยเทคนิค DLLME สามารถอธิบายความสามารถของการสกัดโดยรายงานในรูปของค่าการเพิ่มความเข้มข้น (enrichment factor, EF) และค่าการกลับคืนของการสกัด (extraction recovery, ER) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ (Rezaee *et al.*, 2006) ถ้าค่า EF และ ER มีค่าสูง แสดงว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพของการสกัดสูง

$$\text{Enrichment factor} = \frac{C_{\text{sed}}}{C_0} \tag{1}$$

$$\text{Extraction recovery} = \frac{n_{\text{sed}}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{\text{sed}} \times V_{\text{sed}}}{C_0 \times V_{\text{aq}}} \times 100 \tag{2}$$

เมื่อ	C_{sed}	คือ ความเข้มข้นของสารเป้าหมายในเฟสสกัด
	C_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารเป้าหมายในตัวอย่าง
	n_{sed}	คือ ปริมาณของสารเป้าหมายในเฟสสกัด
	n_0	คือ ปริมาณเริ่มต้นของสารเป้าหมายในตัวอย่าง
	V_{sed}	คือ ปริมาตรของเฟสสกัด
	V_{aq}	คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง

จากสมการ (1) และ (2) สามารถเขียนความสัมพันธ์ระหว่าง EF กับ ER ได้ดังสมการ (3)

$$\text{ER} = \frac{V_{\text{sed}}}{V_{\text{aq}}} \times \text{EF} \times 100 \tag{3}$$

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค DLLME

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดด้วยเทคนิค DLLME ได้แก่ ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายสกัด ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายช่วยกระจายตัว เวลาในการสกัด และการเติมเกลือ (Zang *et al.*, 2009)

1. ชนิดของตัวทำละลายสกัด

การเลือกตัวทำละลายสกัดให้เหมาะสมถือเป็นปัจจัยหลักสำหรับเทคนิค DLLME เนื่องจากมีผลต่อการดึงสารที่สนใจจากตัวอย่างเข้าสู่เฟสสกัด โดยทั่วไปตัวทำละลายสกัดที่เลือกใช้ควรมีค่าการละลายน้ำต่ำและมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ เพื่อให้สามารถแยกตัวทำละลายออกจากชั้นน้ำได้ง่ายโดยอาศัยการปั่นเหวี่ยง อีกทั้งตัวทำละลายควรมีคุณสมบัติในการสกัดสารที่สนใจได้ดีและสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ ต่อได้ง่าย ตัวทำละลายที่นิยมใช้ได้แก่ สารอินทรีย์ที่มีอนุพันธ์เป็นฮาโลเจน ตัวอย่างเช่น คลอโรเบนซีน คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น

2. ชนิดของตัวทำละลายช่วยกระจายตัว

ตัวทำละลายช่วยกระจายตัวจะต้องละลายได้ทั้งในตัวทำละลายสกัดและในน้ำ ซึ่งจะมีผลทำให้ตัวทำละลายสกัดสามารถกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำและเกิดเป็นสารละลายขุ่นได้ ส่งผลให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวทำละลายสกัดและสารละลายตัวอย่างเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการสกัดจึงเพิ่มขึ้นนั่นเอง โดยทั่วไปตัวทำละลายช่วยกระจายตัวที่นิยมใช้ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน ไทโธล อะซิโตน เป็นต้น

3. ปริมาตรของตัวทำละลายสกัด

ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดมีผลอย่างมากต่อค่า EF เมื่อเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายสกัดจะทำให้ปริมาตรของเฟสสกัดที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารเป้าหมายในเฟสสกัดลดลงจึงทำให้ค่า EF ลดลงด้วย ดังนั้นปริมาตรของตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสมจะต้องคำนึงถึงทั้งการได้ค่า EF ที่สูง และต้องมีปริมาตรมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อหลังจากปั่นเหวี่ยง ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดที่นิยมใช้อ้อยู่ในช่วง 5-100 ไมโครลิตร

4. ปริมาตรของตัวทำละลายช่วยกระจายตัว

ปริมาตรของตัวทำละลายช่วยกระจายตัวส่งผลโดยตรงต่อการกระจายตัวของตัวทำละลายสกัดในสารละลายตัวอย่าง ถ้าปริมาตรตัวทำละลายช่วยกระจายตัวน้อยเกินไปจะทำให้ตัวทำละลายสกัดกระจายตัวในสารละลายตัวอย่างไม่สมบูรณ ในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาตรตัวทำละลายช่วยกระจายตัวมากเกินไปจะทำให้สารเป้าหมายละลายในน้ำได้ดีขึ้นเนื่องจากทำให้ความเข้มข้นระหว่างน้ำและตัวทำละลายสกัดแตกต่างกันน้อยลง ส่งผลให้สกัดสารเป้าหมายเข้าสู่ตัวทำละลายสกัดได้ไม่ดี ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลงนั่นเอง โดยทั่วไปปริมาตรตัวทำละลายช่วยกระจายตัวที่ใช้อยู่ในช่วง 0.5-1.5 มิลลิลิตร

5. เวลาที่ใช้ในการสกัด

เวลาในการสกัดหมายถึงระยะเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารผสมของตัวทำละลายสกัดกับตัวทำละลายช่วยกระจายตัวลงในสารตัวอย่างจนถึงการปั่นเหวี่ยง ซึ่งเวลาในการสกัดจะมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดน้อยมาก เนื่องจากเมื่อตัวทำละลายสกัดเกิดการกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ทำให้การถ่ายโอนมวลของสารเป้าหมายจากสารละลายตัวอย่างไปยังตัวทำละลายสกัดเกิดได้อย่างรวดเร็ว การสกัดจึงใช้เวลาน้อย ซึ่งถือเป็นข้อดีสำคัญของเทคนิค DLLME

6. การเติมเกลือ

การเติมเกลือหรือการเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ของสารละลายมักส่งผลต่อการละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์หรือสารอินทรีย์ในน้ำ โดยจะส่งผลอย่างไรนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารเป้าหมายที่ศึกษา สารบางชนิดอาจจะละลายในน้ำได้ลดลง ซึ่งส่งผลให้ค่าการกลับคืนของการสกัดมีค่ามาก แต่สารบางชนิดอาจจะผลในทิศทางตรงกันข้าม อย่างไรก็ตามการเติมเกลือมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดน้อยมากเมื่อเทียบกับปัจจัยอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้น

การพัฒนาเทคนิค DLLME

เทคนิค DLLME มีการประยุกต์ใช้ครั้งแรกโดย Rezaee และคณะ (Rezaee *et al.*, 2006) สำหรับใช้สกัดและเพิ่มความเข้มข้นสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ในตัวอย่างน้ำ จากนั้นได้มีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้เทคนิค DLLME ในการเตรียมตัวอย่าง โดยทั่วไปจะนิยมใช้กับตัวอย่างที่มีสารรบกวนน้อย เช่น ตัวอย่างน้ำ (Saraji & Tansazan, 2009; Sousa *et al.*, 2013) เนื่องจากเทคนิค DLLME เป็นเทคนิคที่มีความเลือกจำเพาะต่ำและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารรบกวนน้อย แต่ต่อมาได้มีการนำมาใช้กับตัวอย่างที่มีสารรบกวนค่อนข้างมาก เช่น ตัวอย่างน้ำเสีย (Negreira *et al.*, 2010; Saraji & Marzban, 2010) น้ำผลไม้ (Fu *et al.*, 2009; Viñas *et al.*, 2013) ไวน์ (Fariña *et al.*, 2007; Arroyo-Manzanares *et al.*, 2012) นม (Farajzadeh *et al.*, 2012; Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014) และตัวอย่างทางชีวภาพ (Ranjbari *et al.*, 2012; Jouyban *et al.*, 2015) เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้จำเป็นต้องมีวิธีการลดหรือกำจัดสารรบกวนก่อนที่จะใช้เทคนิค DLLME วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ การเจือจาง การปั่นเหวี่ยง การกรอง และการตกตะกอนโปรตีน เป็นต้น

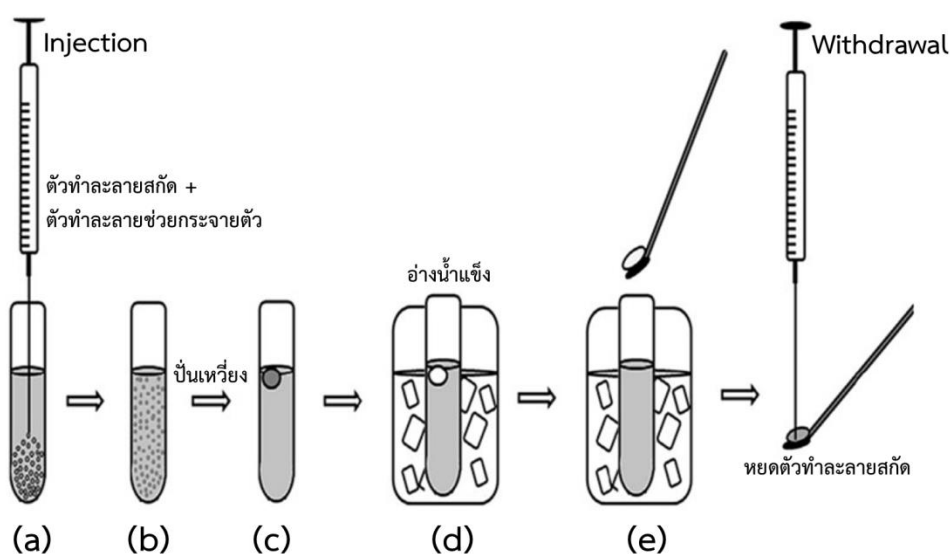
สำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เช่น ตัวอย่างดิน (Naeeni *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2015) ผักและผลไม้ (Huo *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012; Rezaee *et al.*, 2013) ชา (Moinfar & Hosseini, 2009; Sereshti & Samadi, 2014) ซีเรียล (Campone *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013) ธัญพืช (Lai *et al.*, 2014; Rezaee *et al.*, 2014) เนื้อสัตว์ (Kamankesh *et al.*, 2015; Mookantsa *et al.*, 2016) เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้จำเป็นต้องมีการใช้วิธีการสกัดแบบอื่นเข้ามาช่วยก่อนที่จะใช้เทคนิค DLLME โดยสามารถเลือกใช้ได้หลากหลาย ตัวอย่างเช่น เทคนิค SPE การสกัดด้วยตัวทำละลาย การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction, SFE) การสกัดด้วยไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction, MAE) เป็นต้น

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค DLLME เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด เพิ่มความสามารถในการกำจัดสารรบกวน และทำให้สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างที่หลากหลายมากขึ้น ในบทความนี้จะขอกล่าวถึงการพัฒนาเทคนิค DLLME โดยการปรับเปลี่ยนตัวทำละลายสกัด ซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดในเทคนิค DLLME โดยทั่วไปตัวทำละลายสกัดที่ใช้ในเทคนิค DLLME จะเป็นอนุพันธ์ฮาโลเจนของสารอินทรีย์ เช่น คลอโรเบนซีน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และ เตตระคลอโรเอธิลีน เป็นต้น เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำและไม่ละลายในน้ำทำให้แยกออกจากสารตัวอย่างได้ง่าย แต่ข้อเสียของการใช้สารประกอบอินทรีย์กลุ่มนี้คือ มีให้เลือกใช้น้อยและมีความเป็นพิษสูง ทำให้มีการพัฒนาเทคนิค DLLME โดยเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายสกัดเพื่อให้สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายและมีความเป็นพิษต่ำ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ และตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษต่ำคือของเหลวไอออนิก

1. ตัวทำละลายสกัดที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ

1.1 การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายโดยอาศัยการแข็งตัวของหยดอินทรีย์ลอย (DLLME based on solidification of floating organic drop, DLLME-SFO)

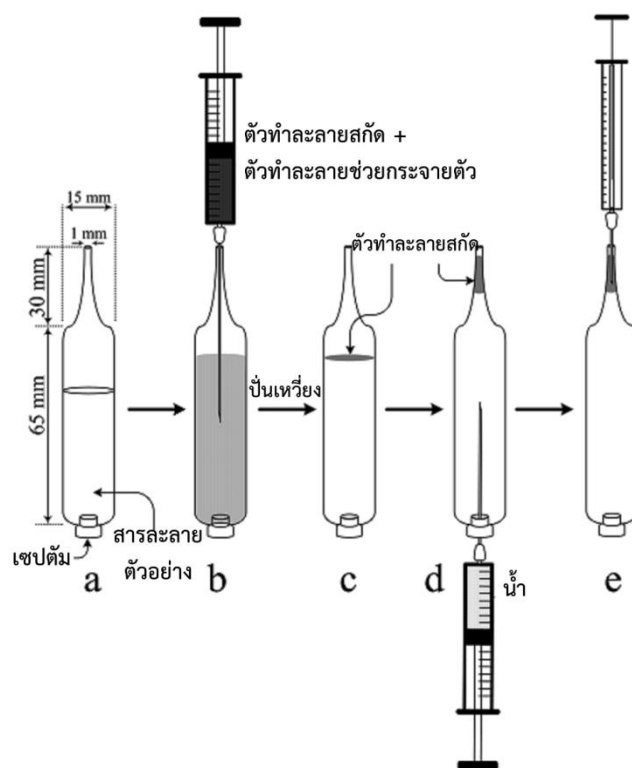
แนวคิดที่น่าสนใจสำหรับการนำตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำมาใช้ คือ จุดหลอมเหลว ซึ่งตัวทำละลายสามารถแข็งตัวได้ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ง่ายต่อการแยกเฟส เรียกว่าเทคนิค DLLME-SFO ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดย Khalili-Zanjani และคณะ (Khalili-Zanjani *et al.*, 2007) โดยใช้ตัวทำละลายสกัดที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำและมีจุดหลอมเหลวใกล้อุณหภูมิห้องคือในช่วง 10-30 องศาเซลเซียส ขั้นตอนการสกัดแสดงดังภาพที่ 2 โดยการฉีดตัวทำละลายสกัดซึ่งผสมกับตัวทำละลายช่วยกระจายตัวลงในสารตัวอย่างที่เป็นน้ำอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 2a) ทำให้ได้สารละลายลักษณะขุ่น เนื่องจากมีตัวทำละลายสกัดหยดเล็กๆ กระจายอยู่ในตัวอย่าง (ภาพที่ 2b) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เกิดการแยกเฟสระหว่างตัวทำละลายสกัดและสารตัวอย่างโดยตัวทำละลายจะลอยอยู่ด้านบน (ภาพที่ 2c) แล้วทำให้ตัวทำละลายแข็งตัวโดยแช่ในน้ำแข็งจะทำให้สามารถแยกตัวทำละลายสกัดออกได้ง่ายขึ้น (ภาพที่ 2d-2e) ซึ่งตัวทำละลายนี้จะหลอมกลับมาเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ ต่อไป เทคนิค DLLME-SFO มีข้อดีเช่นเดียวกับ DLLME แต่ใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษน้อยกว่า ตัวทำละลายสกัดที่นิยมใช้ ได้แก่ 1-ฮุนเดคานอล 1-โดเดคานอล และ 2-โดเดคานอล เป็นต้น ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค DLLME-SFO แสดงดังตารางที่ 1(A)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO (Primer *et al.*, 2017)

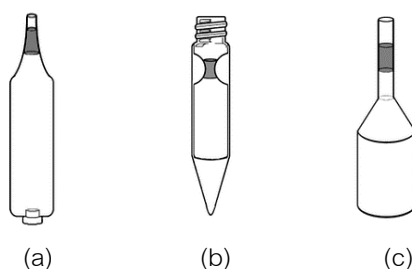
1.2 การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายโดยใช้ตัวทำละลายความหนาแน่นต่ำ (Low density solvent-based DLLME, LDS-DLLME)

ในปี 2009 Farajzadeh และคณะ (Farajzadeh *et al.*, 2009) ได้พัฒนาวิธีการนำตัวทำละลายสกัดที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำโดยออกแบบหลอดที่มีลักษณะพิเศษดังภาพที่ 3a เพื่อประยุกต์ใช้กับเทคนิค DLLME ซึ่งสามารถใช้กับตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำได้ทุกชนิด ขั้นตอนการสกัดสามารถทำได้เช่นเดียวกับ DLLME แบบดั้งเดิม คือ การฉีดตัวทำละลายสกัดซึ่งผสมกับตัวทำละลายช่วยกระจายตัวลงในสารตัวอย่างที่เป็นน้ำอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 3b) และเกิดเป็นสารละลายลักษณะขุ่น เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงตัวทำละลายสกัดจะแยกออกจากสารตัวอย่างโดยลอยอยู่ด้านบนเนื่องจากมีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ (ภาพที่ 3c) จากนั้นทำให้ตัวทำละลายลอยสูงขึ้นจนถึงส่วนแคบๆ บนปากหลอดโดยการเติมน้ำเพิ่มจากด้านล่างของหลอดผ่านเซปตัม (ภาพที่ 3d) แล้วจึงทำการแยกตัวทำละลายสกัดออกไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ ต่อไป (ภาพที่ 3e)



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค LDS-DLLME (Farajzadeh *et al.*, 2009)

ต่อมาได้มีการออกแบบหลอดสำหรับการสกัดเพื่อให้เหมาะสมกับเทคนิค LDS-DLLME โดยทำให้ด้านบนของหลอดแคบเพื่อให้สามารถแยกตัวทำละลายสกัดออกได้ง่าย ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งหลักการยังคงคล้ายกับวิธีของ Farajzadeh และคณะ เทคนิค LDS-DLLME มีข้อดีคือสามารถเลือกใช้ตัวทำละลายสกัดได้หลากหลายมากขึ้น อีกทั้งยังมีความเป็นพิษน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ DLLME แบบดั้งเดิม ตัวทำละลายสกัดที่นิยมใช้ ได้แก่ ไฮโคคลเฮกเซน เอ็น-เฮกเซน โทลูอีน ไชลีน และ 1-ออกทานอล เป็นต้น เทคนิค LDS-DLLME มีข้อเสียคือต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความจำเพาะ อีกทั้งยังต้องใช้เวลานานในการปั่นเหวี่ยงจึงจะทำให้เกิดการแยกเฟสระหว่างตัวทำละลายกับตัวอย่าง (Kocúrová *et al.*, 2012) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค LDS-DLLME แสดงดังตารางที่ 1(B)

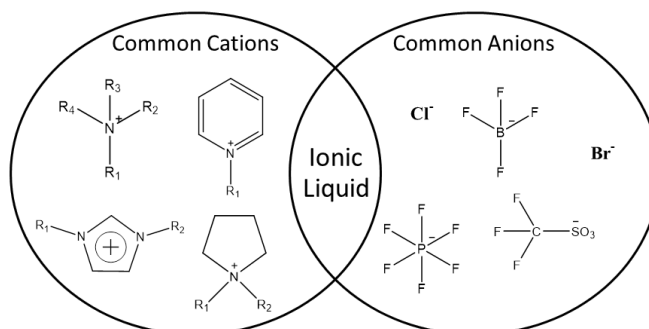


ภาพที่ 4 ตัวอย่างหลอดสำหรับการสกัดที่ออกแบบเพื่อเทคนิค LDS-DLLME (a) Farajzadeh *et al.*, 2009, (b) Hashemi *et al.*, 2009 และ (c) Ghambari & Hadjmohammadi, 2012

เนื่องจากปัญหาที่พบในเทคนิค LDS-DLLME ทำให้ Chen และคณะ (Chen *et al.*, 2010) ได้พัฒนาวิธีการใช้ตัวทำละลายสกัดที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำโดยมีการฉีดตัวทำละลายช่วยกระจายตัวซ้ำอีกรอบเพื่อช่วยให้ตัวทำละลายสกัดเกิดการแยกเฟสออกจากน้ำได้เร็วขึ้น เรียกว่า เทคนิค ST-DLLME (solvent terminated-DLLME) หรือ LDS-SD-DLLME (low density solvent-based solvent demulsification-DLLME) ซึ่งตัวทำละลายช่วยกระจายตัวที่ฉีดเพิ่มจะทำหน้าที่เป็นสารเร่งการแยกชั้น (demulsifier) จึงทำให้สารละลายขุ่นเกิดการแยกเฟสได้รวดเร็วโดยไม่จำเป็นต้องมีการปั่นเหวี่ยงและไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความจำเพาะ ขั้นตอนการสกัดจะคล้ายกับ DLLME คือ การฉีดตัวทำละลายสกัดซึ่งผสมกับตัวทำละลายช่วยกระจายตัวลงในสารตัวอย่างที่เป็นน้ำอย่างรวดเร็ว และเกิดเป็นสารละลายลักษณะขุ่น จากนั้นฉีดสารเร่งการแยกชั้น (ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว) ลงไปอีกครั้ง จะทำให้ตัวทำละลายสกัดแยกออกจากสารตัวอย่างโดยลอยอยู่ด้านบน แล้วจึงแยกเฟสสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ ต่อไป ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค LDS-SD-DLLME แสดงดังตารางที่ 1(C)

2. ตัวทำละลายสกัดชนิดของเหลวไอออนิก

ตัวทำละลายสกัดอีกกลุ่มที่นิยมนำมาใช้แทนอนุพันธ์ฮาโลเจนของสารอินทรีย์ในเทคนิค DLLME คือ ของเหลวไอออนิก (Ionic liquids, ILs) ซึ่งมีสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ปลอดภัย (green solvents) เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำจัดเป็นเกลืออินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยแคทไอออนอินทรีย์ และแอนไอออนอินทรีย์หรืออนินทรีย์ (ภาพที่ 5) ILs สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเทคนิค DLLME ได้เนื่องจากมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำทำให้สามารถสกัดสารเป้าหมายออกจากตัวอย่างน้ำได้ อีกทั้งยังมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำทำให้แยกเฟสได้ง่ายเช่นเดียวกับ DLLME และเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย เทคนิคการสกัดโดยใช้ ILs เป็นตัวทำละลายสกัดเรียกว่า IL-DLLME (Yan & Wang, 2013)



ภาพที่ 5 ตัวอย่างแคทไอออนอินทรีย์และแอนไอออนของ ILs (Joshi & Anderson, 2012)

ILs ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในเทคนิค DLLME ครั้งแรกโดย Zhou และคณะ (Zhou *et al.*, 2008) ซึ่งใช้ IL คือ $[C_6MIM][PF_6]$ (1-เฮกซิล-3-เมธิลอิดาโซเลียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต) เป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดสารกำจัดแมลงไพรีทรอยด์ในตัวอย่างน้ำ โดยมีการให้ความร้อนแก่สารละลายเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายให้เข้าสู่ IL และปล่อยให้เย็นลงแล้วจึงใช้การปั่นเหวี่ยงเพื่อช่วยในการแยกเฟสระหว่าง IL กับตัวอย่างน้ำ ต่อมา Liu และคณะ (Liu *et al.*, 2009) ได้นำตัวทำละลายช่วยกระจายตัวมาใช้ร่วมด้วยเพื่อลดขั้นตอนการให้ความร้อนแก่สารละลาย ซึ่งขั้นตอนการสกัดด้วย IL-DLLME จะคล้ายกับ DLLME แบบดั้งเดิมโดยเปลี่ยนเพียงชนิดของตัวทำละลายสกัดเป็นการใช้ ILs เท่านั้น ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค IL-DLLME แสดงดังตารางที่ 1(D)

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างการนำเทคนิค DLLME ที่มีการพัฒนาตัวทำละลายสกัดมาใช้เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารเป้าหมายชนิดต่างๆ และในตัวอย่างที่มีสารรบกวนแตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างที่มีสารรบกวนน้อย เช่น ตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างที่มีสารรบกวนค่อนข้างมาก เช่น ตัวอย่างนม น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ หรือ เนื้อสัตว์ เป็นต้น จะเห็นว่าเทคนิค DLLME สามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายโดยมีการพัฒนาวิธีการสกัดให้เหมาะสมกับสารเป้าหมายและตัวอย่างที่สนใจ และยังคงมีแนวโน้มการพัฒนาเทคนิคอย่างต่อเนื่อง

บทสรุป

เทคนิค DLLME จัดเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายหรือสารที่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม แต่มีข้อจำกัดสำคัญคือตัวทำละลายสกัดมีให้เลือกใช้น้อยชนิด จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ โดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกับ DLLME และยังคงมีข้อดีเช่นเดียวกับ DLLME คือ ทำได้ง่าย ราคาถูก ประสิทธิภาพการสกัดสูง สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้สูง เวลาในการสกัดน้อย โดยในบทความนี้ได้นำเสนอการพัฒนาเทคนิค DLLME ในแง่ของการปรับเปลี่ยนตัวทำละลายสกัด จากเดิมเทคนิค DLLME ใช้ตัวทำละลายสกัดที่มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำเท่านั้น ต่อมาได้มีการพัฒนาโดยประยุกต์ใช้ตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำในเทคนิค DLLME-SFO, LDS-DLLME และ LDS-SD-DLLME อีกทั้งยังใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษน้อยในเทคนิค IL-DLLME ทำให้สามารถเลือกใช้ตัวทำละลายสกัดได้หลากหลายมากขึ้น ในปัจจุบันเทคนิค DLLME ยังมีแนวโน้มการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งนอกจากการพัฒนาตัวทำละลายสกัดดังที่กล่าวในบทความนี้ยังสามารถพัฒนาในส่วนของตัวทำละลายช่วยกระจายตัวได้อีกด้วย นอกจากนี้อาจจะมีการนำเทคนิคการสกัดแบบอื่นๆ มาใช้ร่วมด้วยเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด อีกทั้งทำให้สามารถใช้งานได้กว้างขวางมากขึ้น

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค DLLME ที่ปรับเปลี่ยนตัวทำละลายสกัด

(A) DLLME-SFO							
สารเป้าหมาย	ตัวอย่าง	วิธีวิเคราะห์	ตัวทำละลายสกัด	ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว	LOD	EF	อ้างอิง
สารประกอบอินทรีย์ฮาโลเจน (HOCs)	น้ำ	GC-ECD GC-MS	2-โดเดคานอล	อะซิโตน	0.005-0.05 µg/L	174-322	Leong & Huang, 2008
ไดเอโอเพนคาร์บ และ ไพริเมทานิด	เนื้อและเปลือกแอปเปิล	HPLC-DAD	1-ฮุนเดคานอล	อะซิโตไนโตรล์	1.2-1.6 µg/kg	-	Zhou <i>et al.</i> , 2011
ไทรอาซีน	น้ำ และ อ้อย	GC-MS	1-ฮุนเดคานอล	อะซิโตไนโตรล์	0.037-0.008 ppb	195-322	Sanagi <i>et al.</i> , 2012
แอมเฟตามีน	บัสสาวะ	HPLC-UV	1-ฮุนเดคานอล	อะซิโตไนโตรล์	2-8 µg/L	117-125	Ahmadi-Jouibari <i>et al.</i> , 2014
สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสฟอรัส (OPPs)	นม	GC-FPD	1-โดเดคานอล	เมทานอล	0.1-0.3 µg/L	159-213	Miao <i>et al.</i> , 2015
(B) LDS-DLLME							
สารเป้าหมาย	ตัวอย่าง	วิธีวิเคราะห์	ตัวทำละลายสกัด	ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว	LOD	EF	อ้างอิง
สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสฟอรัส (OPPs)	น้ำ	GC-FID GC-MS	ไซโคลเฮกเซน	อะซิโตน	3-4 µg/L 0.003 µg/L	100-150	Farajzadeh <i>et al.</i> , 2009
วาร์ฟาริน	ปลาสด	HPLC-UV	1-ออกทานอล	เมทานอล	5 ng/mL	72.9	Ghambari & Hadjmohammadi, 2012
สารแอนติออกซิแดนต์สังเคราะห์	น้ำผลไม้	HPLC-UV	2-เฮกซิล-1-เฮกซานอล	อะซิโตน	0.9-2.5 µg/L	203-208	Biparva <i>et al.</i> , 2012
คลอโรฟีนอล	น้ำ	HPLC-UV	โทลูอีน	เมทานอล	0.016-0.084 µg/L	67-309	Li <i>et al.</i> , 2013

ตารางที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค DLLME ที่ปรับเปลี่ยนตัวทำละลายสกัด

สารเป้าหมาย	ตัวอย่าง	วิธีวิเคราะห์	ตัวทำละลายสกัด	ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว	LOD	EF	อ้างอิง
(C) LDS-SD-DLLME							
สารกำจัดแมลงคาร์บาเมท	น้ำ	GC-MS-MS	โทลูอีน	อะซิโตไนโตรล์	0.001-0.50 ng/mL	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs)	น้ำ	GC-MS	เอ็น-เฮกเซน	อะซิโตน	3.7-39.1 ng/L	-	Guo & Lee, 2011
สารกำจัดแมลงแบบไฮออน	น้ำ	HPLC-DAD	โทลูอีน	อะซิโตน	0.60-2.33 µg/L	-	Tolcha <i>et al.</i> , 2013
2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติกแอซิด และ 2-เมธิล-4-คลอโรฟีนอกซีอะซิติกแอซิด	น้ำ และ ปัสสาวะ	HPLC-UV	1-ออกทานอล	อะซิโตไนโตรล์	0.2-1.6 µg/L	123-131	Behbahani <i>et al.</i> , 2014
(D) IL-DLLME							
สารเป้าหมาย	ตัวอย่าง	วิธีวิเคราะห์	ตัวทำละลายสกัด	ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว	LOD	EF	อ้างอิง
สารกำจัดแมลงเฮเทอโรไซคลิกคลิก	น้ำ	HPLC-DAD	[C ₆ MIM][PF ₆]	เมทานอล	0.53-1.28 µg/L	209-276	Liu <i>et al.</i> , 2009
Rh	น้ำ	FAAS	[Omim][Tf ₂ N]	อะซิโตน	0.37 ng/mL	29.1	Molaakbari <i>et al.</i> , 2011
ยาเตตราไซคลิน	ไข่	HPLC-DAD	[C ₄ MIM][PF ₆]	อะซิโตไนโตรล์	2.0-12 ng/g	12-44	Song <i>et al.</i> , 2014
พทาเลท เอสเทอร์	เครื่องดื่มแอลกอฮอล์	HPLC-DAD	[C ₈ MIM][PF ₆]	เอทานอล	1.5-4.2 ng/L	-	Fan <i>et al.</i> , 2014
ยาฟลูออโรควิโนโลน	เนื้อ	HPLC-DAD	[C ₄ MIM][PF ₆]	อะซิโตไนโตรล์	0.5-1.1 ng/L	11-42	Wang <i>et al.</i> , 2015
เมทแอมเฟตามีน	ปัสสาวะ	HPLC-UV	[C ₈ MIM][PF ₆]	เมทานอล	1.7 ng/L	220	Wang <i>et al.</i> , 2016

เอกสารอ้างอิง

- Ahmadi-Jouibari, T., Fattahi, N. & Shamsipur, M. (2014). Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, 145-151.
- Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L. & García-Campaña, A.M. (2012). Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chemistry*, 135(2), 368-372.
- Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L. & García-Campaña, A.M. (2014). Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 143, 459-464.
- Arthur, C.L. & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- Behbahani, M., Najafi, F., Bagheri, S., Bojdi, M.K., Hassanlou, P.G. & Bagheri, A. (2014). Coupling of solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction with high performance liquid chromatography for simultaneous simple and rapid trace monitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(4), 2609-2618.
- Biparva, P., Ehsani, M. & Hadjmohammadi, M.R. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 87-94.
- Campone, L., Piccinelli, A.L., Celano, R. & Rastrelli, L. (2011). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cereal products. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7648-7654.
- Chen, H., Chen, R. & Li, S. (2010). Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(8), 1244-1248.
- Fan, Y., Liu, S. & Xie, Q. (2014). Rapid determination of phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 119, 291-298.
- Farajzadeh, M.A., Djozan, D., Reza, M., Mogaddam, A. & Norouzi, J. (2012). Determination of phthalate esters in cow milk samples using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography followed by flame ionization and mass spectrometric detection. *Journal of Separation Science*, 35 (5-6), 742-749.

- Farajzadeh, M.A., Seyedi, S.E., Shalamzari, M.S. & Bamorowat, M. (2009). Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. *Journal of Separation Science*, 32(18), 3191-3200.
- Fariña, L., Boido, E., Carrau, F. & Dellacassa, E. (2007). Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1157(1-2), 46-50.
- Fu, L., Liu, X., Hu, J., Zhao, X., Wang, H. & Wang, X. (2009). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 289-295.
- Ghambari, H. & Hadjmohammadi, M. (2012). Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 899, 67-71.
- Guo, L. & Lee, H.K. (2011). Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218(31), 1244-1248.
- Hashemi, P., Beyranvand, S., Mansur, R.S. & Ghiasvand, A.R.. (2009). Development of a simple device for dispersive liquid-liquid microextraction with lighter than water organic solvents: Isolation and enrichment of glycyrrhizic acid from licorice. *Analytica Chimica Acta*, 655(1-2), 60-65.
- Joshi, M.D. & Anderson, J.L. (2012). Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry. *RSC Advances*, 2(13), 5470-5484.
- Jouyban, A., Sorouraddin, M.H., Farajzadeh, M.A., Somi, M.H. & Fazeli-Bakhtiyari, R. (2015). Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Talanta* 134, 681-689.
- Kamankesh, M., Mohammadi, A., Hosseini, H. & Tehrani, Z.M. (2015). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Meat Science*, 103, 61-67.
- Khalili-Zanjani, M.R., Yamini, Y., Shariati, S. & Åke Jönsson, J. (2007). A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta* 585(2), 286-293.
- Kocúrová, L., Balogh, I.S., Šandrejová, J. & Andruch, V. (2012). Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchemical Journal*, 102, 11-17.
- Lai, X.-W., Sun, D.-L., Ruan, C.-Q., Zhang, H. & Liu, C.-L. (2014). Rapid analysis of aflatoxins B₁, B₂, and ochratoxin A in rice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC. *Journal of Separation Science*, 37(1-2), 92-98.

- Leong, M. & Huang, S. (2008). Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1211(1-2), 8-12.
- Li, X., Xue, A., Chen, H. & Li, S. (2013). Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction combined with single-drop microextraction for the fast determination of chlorophenols in environmental water samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1280, 9-15.
- Liu, H. & Dasgupta, P.K. (1996). Analytical chemistry in a drop. solvent extraction in a microdrop. *Analytical Chemistry*, 68(11), 1817-1821.
- Liu, S., Xie, Q., Cao, J., Song, P., Chen, J. & Bai, W. (2013). Rapid determination of α -tocopherol in cereal grains using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC. *Journal of Separation Science*, 36(6), 1135-1141.
- Liu, Y., Zhao, E., Zhu, W., Gao, H. & Zhou, Z. (2009). Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216(6), 885-891.
- López-Darias, J., Germán-Hernández, M., Pino, V. & Afonso, A.M. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. *Talanta*, 80, 1611-1618.
- Miao, X.-X., Liu, D.-B., Wang, Y.-R., Yang, Y.-Y., Yang, X.-Y. & Gong, H.-R. (2015). Modified QuEChERS in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of the Floating Organic Droplet Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Milk Samples. *Journal of Chromatographic Science*, 53(10), 1813-1820.
- Moinfar, S. & Hosseini, M.-R.M. (2009). Development of dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 907-911.
- Molaakbari, E., Mostafavi, A. & Afzali, D. (2011). Ionic liquid ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction method for preconcentration of trace amounts of rhodium prior to flame atomic absorption spectrometry determination. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3), 647-652.
- Mookantsa, S.O.S., Dube, S. & Nindi, M.M. (2016). Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry. *Talanta*, 148, 321-328.
- Naeeni, M.H., Yamini, Y., Rezaee, M. & Seidi, S. (2012). Microwave-assisted extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a new approach to determination of chlorophenols in soil and sediments. *Journal of Separation Science*, 35(18), 2469-2475.

- Negreira, N., Rodríguez, I., Rubí, E. & Cela, R. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of UV filters in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 995-1004.
- Pedersen-Bjergaard, S. & Rasmussen, K.E. (1999). Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 71(14), 2650-2656.
- Primel, E.G., Caldas, S.S., Marube, L.C. & Escarrone, A.L.V. (2017). An overview of advances in dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 14, 1-18.
- Ranjbari, E., Golbabanezhad-Azizi, A.-A. & Hadjmohammadi, M.R. (2012). Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. *Talanta*, 94, 116-122.
- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.-R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F. & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9.
- Rezaee, M., Khalilian, F., Mashayekhi, H.A. & Fattahi, N. (2014). A novel method for the high preconcentration of trace amounts of the aflatoxins in pistachios by dispersive liquid-liquid microextraction after solid-phase extraction. *Analytical Methods*, 6(10), 3456-3461.
- Rezaee, M., Mashayekhi, H.A., Saleh, A., Abdollahzadeh, Y., Naeeni, M.H. & Fattahi, N. (2013). Determination of abamectin in citrus fruits using SPE combined with dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection. *Journal of Separation Science*, 36(16), 2629-2634.
- Sanagi, M.M., Abbas, H.H., Ibrahim, W.A.W. & Aboul-Enien, H.Y. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplet for the determination of triazine herbicides in water and sugarcane samples. *Food Chemistry*, 133(2), 557-562.
- Saraji, M. & Marzban, M. (2010). Determination of 11 priority pollutant phenols in wastewater using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode-array detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(7), 2685-2693.
- Saraji, M. & Tansazan, N. (2009). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of phenylurea herbicides in water samples by HPLC-diode array detection. *Journal of Separation Science*, 32(23-24), 4186-4192.
- Sereshti, H. & Samadi, S. (2014). A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. *Food Chemistry*, 158, 8-13.
- Shen, G. & Lee, H.K. (2002). Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Analytical Chemistry*, 74(3), 648-654.

- Song, J., Zhang, Z.H., Zhang, Y.Q., Feng, C., Wang, G.N. & Wang, J.P. (2014). Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for determination of tetracycline drugs in eggs. *Analytical Methods*, 6(16), 6459-6466.
- Sousa, R., Homem, V., Moreira, J.L., Madeira, L.M. & Alves, A. (2013). Optimisation and application of dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of carbamates and organophosphorus pesticides in waters. *Analytical Methods*, 5(11), 2736-2745.
- Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Zygmunt, B. & Namieśnik. (2009). Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(8), 943-951.
- Tolcha, T., Merdassa, Y. & Megersa, N. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. *Journal of Separation Science*, 36(6), 1119-1127.
- Viñas, P., Bravo-Bravo, M., López-García, I. & Hernández-Córdoba, M. (2013). Quantification of β -carotene, retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate in enriched fruit juices using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1275, 1-8.
- Wang, G.N., Feng, C., Zhang, H.C., Zhang, Y.Q., Zhang, L. & Wang, J.P. (2015). Determination of fluoroquinolone drugs in meat by ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 7(3), 1046-1052.
- Wang, R., Qi, X., Zhao, L., Liu, S., Gao, S., Ma, X. & Deng, Y. (2016). Ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the forensic determination of methamphetamine in human urine. *Journal of Separation Science*, 39(13), 2444-2450.
- Wang, Y.-Y., Zhao, G.-Y., Chang, Q.-Y., Zang, X.-H., Wang, C. & Wang, Z. (2010). Development in liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38(10), 1517-1522.
- Xing, H.-Z., Wang, X., Chen, X.-F., Wang, M.-L. & Zhao, R.-S. (2015). Accelerated solvent extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction before gas chromatography with mass spectrometry for the sensitive determination of phenols in soil samples. *Journal of Separation Science*, 38(8), 1419-1425.
- Yan, H. & Wang, H. (2013). Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1295, 1-15.
- Zang, X.H., Wu, Q.H., Zhang, M.Y., Xi, G.H. & Wang, Z. (2009). Development of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(2), 161-168.
- Zgoła-Grześkowiak, A. & Grześkowiak, T. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(9), 1382-1399.

- Zhou, Q., Bai, H., Xie, G. & Xiao, J. (2008). Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction. *Journal of Chromatography A*, 1177(1), 43-49.
- Zhou, Q., Wang, G. & Xie, G. (2013). Dispersive liquid-phase microextraction in combination with HPLC for the enrichment and rapid determination of benzoylurea pesticides in environmental water samples. *Journal of Separation Science*, 36(14), 2323-2329.
- Zhou, S., Chen, H., Wu, B., Ma, C. & Ye, Y. (2012). Sensitive determination of carbamates in fruit and vegetables by a combination of solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction prior to HPLC. *Microchimica Acta*, 176(3-4), 419-427.
- Zhou, Y., Han, L., Cheng, J., Guo, F., Zhi, X., Hu, H. & Chen, G. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(5), 1901-1906.