



การวิเคราะห์โพลีนิวเคลียร์ อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ในน้ำ  
โดยเทคนิคการสกัดระบบจุบภาค และไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี

นางสาว วศินา นรพัลลภ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชา เคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2533

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017725

117299809

The Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Water  
by  
Microextraction and High Performance Liquid Chromatographic  
Techniques

Miss Vasina Noraphallop

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science  
Department of Chemistry  
Graduate School  
Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-577-156-2

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University.

Thesis Title            The Analysis of Polynuclear Aromatic  
                                 Hydrocarbons in Water by  
                                 Microextraction and High Performance  
                                 Liquid Chromatographic Techniques  
By                            Miss Vasina Noraphallop  
Department              Chemistry  
Thesis Advisor          Sittichai Leepipatpiboon, Ph.D.



---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn  
University in Partial Fulfillment of the Requirements for  
The Master's Degree.

*Thavorn Vajrabhaya* .....Dean of Graduate School  
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

*M. Amarasit* .....Chairman

(Associate Professor Maen Amarasit)

*Prapin Wilairat* .....Member

(Associate Professor Prapin Wilairat, Ph.D.)

*Rucha Phongbetchara* .....Member

(Rucha Phongbetchara, Ph.D.)

*S. Leepipatpiboon* .....Member

(Sittichai Leepipatpiboon, Ph.D.)

พิมพ์ด้วยระบบผลิตด้วยวิธีพิมพ์หินภายในโรงพิมพ์เอกชนที่เชียงใหม่แล้ว

วศินา นรพัลลภ : การวิเคราะห์โพลีนิวเคลียร์ อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ในน้ำ โดยเทคนิคการสกัดระบบจุลภาคและไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี (THE ANALYSIS OF POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER BY MICROEXTRACTION AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES). อ. ที่ปรึกษา : ดร. สิทธิชัย สิริพัฒน์ไพบุลย์, 178 หน้า. ISBN 974-577-156-2

การพัฒนาการสกัดระบบจุลภาคร่วมกับการหาปริมาณ โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี ที่ใช้อัลตราไวโอเล็ต ดีเทกเตอร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารโพลีนิวเคลียร์ อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน อาทิเช่น แอนทราซีน ฟลูออแรนทีนและไพรีน ในตัวอย่างน้ำนั้น ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดวิธีนี้ ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ซึ่งได้เลือกใช้เฮกเซน เมธิลีนคลอไรด์และโทลูอิน อัตราส่วนของปริมาตรสารตัวอย่างกับตัวทำละลาย ซึ่งอัตราส่วนที่ได้ศึกษาคือ 50:1 และ 10:1 นอกจากนี้ยังศึกษาผลจากการเติมเกลือ โดยได้ศึกษาทั้ง เกลือโซเดียมคลอไรด์ และ เกลือโซเดียมซัลเฟต ผลการศึกษาพบว่า การสกัดสารโพลีนิวเคลียร์ อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำ โดยใช้โทลูอิน อัตราส่วน 50:1 และใช้เกลือโซเดียมซัลเฟต เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดระบบจุลภาค โดยที่ประสิทธิภาพของการสกัดมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 76.54 ถึง 100.30 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD ) ระหว่าง 0.91 ถึง 5.51 เปอร์เซ็นต์ วิธีนี้มีความจำเพาะสูง ไม่มีปัญหาการควบแน่นของสารบริเวณดีเทกเตอร์ ความถูกต้องของวิธีการสกัดและความไวต่อการวิเคราะห์สูง (พบว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ในช่วง 0.33 ถึง 3.28 เปอร์เซ็นต์) และทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำที่มีสารนี้อยู่ในระดับต่ำกว่า 1 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb) ได้



ภาควิชา .....เคมี.....  
สาขาวิชา .....เคมีวิเคราะห์.....  
ปีการศึกษา .....2532.....

ลายมือชื่อนิสิต ..... วศินา นรพัลลภ .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... สิริพัฒน์ไพบุลย์ .....

นายวิชา.....

VASINA NORAPHALLOP : THE ANALYSIS OF POLYNUCLEAR AROMATIC HYDRO-CARBONS IN WATER BY MICROEXTRACTION AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES. THESIS ADVISOR : SITTICHAI LEEPIPATPIBOON, Ph.D. 178 PP. ISBN 974-577-156-2

The analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), i.e., anthracene, fluoranthene, fluorene and pyrene in water samples has been developed by microextraction with using subsequent determination by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Factors having effect on the percent recovery, such as, the extracting solvents (hexane, methylene chloride or toluene), the sample to solvent ratios (50:1 or 10:1) and the salting out with sodium chloride or anhydrous sodium sulfate were studied. The most suitable condition for microextraction of PAHs in water was using toluene, the sample to solvent ratio of 50:1, and salting out with anhydrous sodium sulfate, 76.54% to 100.30% recoveries with 0.91% to 5.15% RSD were obtained. This technique has high selectivity, no condensation problem at detector, high accuracy (% error of PAHs were in the range of 0.33 to 3.28) and high sensitivity. Aqueous samples containing subnanogram per millilitre of these PAHs could be easily determined.

ภาควิชา .....เคมี.....  
สาขาวิชา .....เคมีวิเคราะห์.....  
ปีการศึกษา .....2532.....

ลายมือชื่อนิสิต ..... วดีทศ นพพัคคท .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... สิริทิศา ลีปิปปิบูน .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....



## ACKNOWLEDGEMENTS

The author is particularly grateful to her advisor, Dr. Sittichai Leepipatpiboon for his guidance, assistance and intention throughout the entire study. She wishes to thanks to department of chemistry, Chulalongkorn University, especially the staffs of its laboratory, for affording her all facilities and appreciations are also expressed to graduate students at department of chemistry and Mr. Anucha Euapermkiatti for their helpful, their understanding and their encouragement. She also thanks to the Graduate school, Chulalongkorn University, for their financial support for this thesis, Mr. Chaimon Atipaetaya from Production Quality Control, Samsean-Thonburi Watertreatment Plant who provided the water samples, and, very warmly, the thesis committee for their useful comments.

Finally, She should express her deep gratitude to her parents for their support, their assistance and their kindness which help her to complete her study.



## CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI).....	
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	XI
LIST OF FIGURES.....	XIV
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
1.1 THE PURPOSES OF THIS STUDY.....	3
1.2 BACKGROUND.....	4
CHAPTER II: THEORY.....	15
2.1 PHASE RULE.....	15
2.2 DISTRIBUTION LAW.....	17
2.3 DISTRIBUTION RATIO.....	21
2.4 PERCENTAGE EXTRACTION.....	22
2.5 SALTING OUT EFFECT.....	25
2.6 CHOICE OF SOLVENT.....	26
CHAPTER III: EXPERIMENTAL.....	30
3.1 APPARATUS.....	30

	PAGE
3.1.1 Instrumentation for HPLC.....	30
3.1.2 UV-Visible Spectrophotometer.....	31
3.1.3 Other Apparatuses.....	31
3.2 GLASSWARES.....	31
3.3 CHEMICALS.....	32
3.3.1 Standard of PAHs.....	32
3.3.2 Solvents.....	32
3.3.3 Reagents.....	33
3.4 PREPARATION OF STANDARD SOLUTIONS.....	34
3.4.1 The Single Component Standard Solution of PAHs in Methanol.....	34
3.4.2 The Standard Mixture of PAHs in Methanol.....	34
3.4.3 The Standard Solution of Internal Standard.....	35
3.4.4 The 1.00 ppm Single Component Aqueous Standard Solution of PAHs.....	35
3.4.5 The 50.00 ppb Single Component Aqueous Standard Solution of PAHs.....	36



	PAGE
3.4.6 The 1.00 ppm Aqueous Standard Mixture of PAHs.....	36
3.4.7 The 50.00 ppb Aqueous Standard Mixture of PAHs.....	36
3.5 PROCEDURE.....	37
3.5.1 Study of UV-Visible Spectra for Each PAH.....	37
3.5.2 The Effect of Shaking Time.....	38
3.5.3 Microextraction.....	39
3.6 HPLC OPERATING CONDITION.....	41
3.6.1 The Study of Single Component Solution.....	41
3.6.2 The Study of Mixture .....	42
3.7 INTERNAL STANDARDIZATION METHOD.....	43
CHAPTER IV: RESULTS AND DISCUSSION.....	58
4.1 THE STUDY OF SHAKING TIME.....	58
4.2 MICROEXTRACTION OF SINGLE COMPONENT. AQUEOUS STANDARD SOLUTION.....	59
4.2.1 The Effect of Sample to Solvent Ratios on % Recovery.....	59
4.2.2 The Effect of Extracting Solvents	

	PAGE
on % Recovery.....	60
4.2.3 The Salting Out Effect	
on % Recovery.....	62
4.3 THE STUDY OF UV DETECTION WAVELENGTHS...	63
4.4 MICROEXTRACTION OF STANDARD MIXTURE.....	64
4.5 THE MINIMUM DETECTABLE LEVEL (MDL)	
OF PAHs.....	66
4.6 THE ACCURACY OF MICROEXTRACTION METHOD..	67
4.7 THE DETERMINATION OF PAHs IN REAL	
WATER SAMPLES.....	68
CHAPTER V: CONCLUSION.....	165
REFERENCES.....	168
VITA.....	178

## LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
4.1	The results of the effect of shaking time on % recovery of fluorene in various sample to solvent ratios.....	70
4.2	The results of the effect of shaking time on % recovery of anthracene in various sample to solvent ratios.....	71
4.3	The results of the effect of shaking time on % recovery of fluoranthene in various sample to solvent ratios.....	72
4.4	The results of the effect of shaking time on % recovery of pyrene in various sample to solvent ratios.....	73
4.5	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of fluorene solution....	74
4.6	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of anthracene solution..	78
4.7	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of fluoranthene	

TABLE		PAGE
	solution.....	82
4.8	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of pyrene solution.....	86
4.9	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of fluorene solution.....	90
4.10	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of anthracene solution.....	94
4.11	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of fluoranthene solution.....	98
4.12	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of pyrene solution.....	102
4.13	The results of salting out effect on % recovery of fluorene solution.....	106
4.14	The results of salting out effect on % recovery of anthracene solution.....	110
4.15	The results of salting out effect on % recovery of fluoranthene solution.....	114
4.16	The results of salting out effect on % recovery of pyrene solution.....	118
4.17	The microextraction of fluorene in mixture...	120
4.18	The microextraction of anthracene	

TABLE	PAGE
in mixture.....	124
4.19 The microextraction of fluoranthene in mixture.....	126
4.20 The microextraction of pyrene in mixture.....	128
4.21 The minimum detectable level of PAHs detected at 254.0 nm and at the optimum wavelengths...	130
4.22 The results of the analysis of synthetic unknown solutions.....	130

## LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	The effect of the solvent to water ratio on both the % recovery and the relative concentration of analytes with different distribution coefficients ( $K_d$ ).....	24
3.1	The calibration curve of fluorene in methanol.....	45
3.2	The calibration curve of anthracene in methanol.....	46
3.3	The calibration curve of fluoranthene in methanol.....	47
3.4	The calibration curve of pyrene in methanol.....	48
3.5	UV absorption spectra of fluorene in methanol.....	49
3.6	UV absorption spectra of anthracene in methanol.....	50
3.7	UV absorption spectra of fluoranthene in methanol.....	51

FIGURE		PAGE
3.8	UV absorption spectra of pyrene in methanol.....	52
3.9	Liquid chromatograms of microextractions of fluorene with UV absorbance detection at 254.0 nm(A) and at its optimum wavelength, 260.4 nm(B).....	53
3.10	Liquid chromatograms of microextractions of anthracene with UV absorbance detection at 254.0 nm(A) and at its optimum wavelength, 254.0 nm(B).....	54
3.11	Liquid chromatograms of microextractions of fluoranthene with UV absorbance detection at 254.0 nm(A) and at its optimum wavelength, 286.4 nm(B).....	55
3.12	Liquid chromatograms of microextractions of pyrene with UV absorbance detection at 254.0 nm(A) and at its optimum wavelength, 272.4 nm(B).....	56
3.13	Liquid Chromatogram of microextractions of a standard mixture of PAHs with UV absorbance detection at 254.0 nm.....	57

FIGURE		PAGE
4.1	The effect of shaking time on % recovery of each PAH with toluene as solvent.....	131
4.2	The effect of shaking time on % recovery of each PAH with hexane as solvent.....	132
4.3	The effect of shaking time on % recovery of each PAH with methylene chloride as solvent..	133
4.4	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 50.00 ppb fluorene solution.....	134
4.5	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 1.00 ppm fluorene solution.....	135
4.6	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 50.00 ppb anthracene solution.....	136
4.7	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 1.00 ppm anthracene solution.....	137
4.8	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 50.00 ppb fluoranthene solution.....	138



FIGURE		PAGE
4.9	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 1.00 ppm fluoranthene solution.....	139
4.10	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 50.00 ppb pyrene solution.....	140
4.11	The results of the effect of sample to solvent ratios on % recovery of 1.00 ppm pyrene solution.....	141
4.12	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 50.00 ppb fluorene solution.....	142
4.13	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 1.00 ppm fluorene solution.....	143
4.14	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 50.00 ppb anthracene solution.....	142
4.15	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 1.00 ppm anthracene solution.....	145

FIGURE		PAGE
4.16	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 50.00 ppb fluoranthene solution.....	146
4.17	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 1.00 ppm fluoranthene solution.....	147
4.18	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 50.00 ppb pyrene solution.....	148
4.19	The results of the effect of extracting solvents on % recovery of 1.00 ppm pyrene solution.....	149
4.20	The results of salting out effect on % recovery of 50.00 ppb fluorene solution....	150
4.21	The results of salting out effect on % recovery of 1.00 ppm fluorene solution.....	151
4.22	The results of salting out effect on % recovery of 50.00 ppb anthracene solution..	152
4.23	The results of salting out effect on % recovery of 1.00 ppm anthracene solution...	153
4.24	The results of salting out effect on	

FIGURE	PAGE
% recovery of 50.00 ppb fluoranthene solution	154
4.25 The results of salting out effect on % recovery of 1.00 ppm fluoranthene solution.	155
4.26 The results of salting out effect on % recovery of 50.00 ppb pyrene solution.....	156
4.27 The results of salting out effect on % recovery of 1.00 ppm pyrene solution.....	157
4.28 The microextraction of fluorene in mixture.....	158
4.29 The microextraction of anthracene in mixture.....	159
4.30 The microextraction of fluoranthene in mixture.....	160
4.31 The microextraction of pyrene in mixture.....	161
4.32 Liquid chromatogrames of microextractions of a real sample collected from a pool in front of Chulalongkorn University (A) and a blank solution (B).....	162
4.33 Liquid chromatogrames of microextractions of real samples collected from intake of	

FIGURE	PAGE
Samsean station (A), at 200 m from intake (Soi Satsana) (B) and at 500 m from intake (Soi Aree) (C).....	163
4.34 Liquid chromatogrames of microextractions of a real sample spiked with fluorene for quali- fication analysis using different mobile phase, 75% (A) and 85% (B) acetonitrile in water....	164