



CATÓLICA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

CONTRIBUTIONS TO FLOW TECHNIQUES AND MASS  
SPECTROMETRY IN WATER ANALYSIS

Thesis submitted to the Universidade Católica Portuguesa to attain  
the degree of PhD in Biotechnology – with specialization in Chemistry

By

Inês Carvalho dos Santos

October 2015



CATÓLICA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

CONTRIBUTIONS TO FLOW TECHNIQUES AND MASS  
SPECTROMETRY IN WATER ANALYSIS

Thesis submitted to the Universidade Católica Portuguesa to attain  
the degree of PhD in Biotechnology - with specialization in Chemistry

By

Inês Carvalho dos Santos

Under the supervision of António O. S. S. Rangel, Professor.

Under the co-supervision of Raquel B. R. Mesquita, Ph.D.

October 2015

“Character cannot be developed in ease and quiet. Only through experience of trial and suffering can the soul be strengthened, vision cleared, ambition inspired, and success achieved.”

Helen Keller

---

ABSTRACT



**ABSTRACT**

In this thesis, the use of different flow systems was exploited along with the use of different detection techniques for the development of simple, robust, and automated analytical procedures. With the purpose to perform in-line sample handling and pre-treatment operations, different separation units were used. The main target for these methods was waters samples. The first procedure was based on a sequential injection analysis (SIA) system for carbon speciation (alkalinity, dissolved inorganic carbon (DIC), dissolved organic carbon (DOC), and CO<sub>2</sub>) in bathing waters. The determination of alkalinity was based on the reaction with acetic acid and corresponding color change of bromocresol green ( $\lambda = 620$  nm). The DIC, DOC, and CO<sub>2</sub> determination was based in the color change of bromothymol blue (BTB) indicator ( $\lambda = 660$  nm) after the diffusion of the gaseous CO<sub>2</sub> through a hydrophobic membrane in a gas diffusion unit (GDU). For the DIC determination, an in-line acidification prior to the GDU was needed. For DOC determination, an in-line UV photo-oxidation of the sample was performed to convert all carbon forms to CO<sub>2</sub>. A multi-reflective flow cell combined with a LED was used as detection system enabling the minimization of the schlieren effect. The developed method was successfully applied to inland bathing waters. The results were in agreement with the reference procedure. The objective of the second work was the use of a SIA system to determine iodide using potentiometric determination and iodate using a spectrophotometric detection. Aiming to overcome the matrix interferences and cope with low analyte concentration levels, the standard addition method was used. The incorporation of a mixing chamber in a lateral port of the selection valve for a flow-batch approach enhanced the mixture between sample, standards and reagent. The accuracy of the method was assessed by comparing the obtained results with a reference procedure and using recovery tests. The developed method was effectively applied to bathing waters and seaweed extracts. The development of a multi-parametric system for cadmium and lead determination was the objective of the third work of this thesis. A SI-LOV method with spectrophotometric detection was used. Dithizone was chosen as the colour reagent as it forms a coloured complex with both metals at different pH conditions. Cadmium determination was attained at alkaline conditions while lead determination was attained at mid alkaline conditions. The developed method was successfully applied to marine port waters and the results were in agreement with the reference procedure. Subsequently, a solid phase spectrophotometry method was developed for cadmium, zinc, and copper determination in freshwaters. The

NTA resin was retained at the flow cell of the SI-LOV. After analyte retention, the determination was based on the colorimetric reaction between the metal ions and dithizone. Different retention and reaction pH were used to individually determine zinc and copper. Cadmium concentration was calculated using a two equation system. The results obtained were in agreement with the reference procedure. Afterwards, a flow injection analysis system was developed for the determination of bromate in drinking waters. With the goal of reaching low levels of bromate, a LWCC was coupled to the system. The spectrophotometric determination was based on the oxidation of chlorpromazine by bromate in an acidic medium, resulting in the formation of a coloured radical product. The accuracy of the developed method was assessed with recovery studies. The objective of the sixth work was to develop a cheaper and simpler method to monitor the biodegradation of ciprofloxacin and ofloxacin. A monolithic column was coupled to a flow injection analysis (FIA) system to separate both analytes. A spectrophotometer was used as detection system (295 and 275 nm). The method was successfully applied to monitor the biodegradation of both compounds by the strain *Labrys portucalensis* F11. Subsequently, a new MS-based noncovalent binding determination method was developed. For that purpose, a continuous stirred tank reactor (CSTR) was used as a flow injection device for exponential dilution of an equimolar host-guest solution over time. By combining an exponential dilution model with a previously established equimolar binding model, binding constants for host-guest complexes were determined with a single injection. This methodology was applied for the determination of binding constants between vancomycin and Ac-Lys(Ac)-Ala-Ala tripeptide stereoisomers. The determination of anionic surfactants using an ESI-MS/MS method was the objective of the eighth work. Different di-positive cationic reagents were studied using Scan, SIM and MS/MS methods and the obtained detection limits (DLs) were compared. The developed method was effectively applied for the determination of perfluorooctanesulfonic acid, perfluorooctanoic acid, sodium dodecyl sulfate, stearic acid and dodecylbenzenesulfonate in different water samples. The ninth work consisted in the rapid identification of bacteria in potentially contaminated water using MALDI-TOF MS. The possible application of the identified bacteria to bioremediation was evaluated by determining their ability to degrade toluene and chloroform.

---

RESUMO





**RESUMO**

Nesta tese utilizaram-se diferentes técnicas de fluxo e detectores para o desenvolvimento de procedimentos analíticos mais simples, robustos e automatizados. Com o objectivo de manusear, transportar e tratar as amostras, utilizaram-se diferentes unidades de separação. O primeiro procedimento baseou-se no uso de um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para a especiação de carbono. A determinação da alcalinidade foi realizada por reacção com ácido acético em que se monitorizou a mudança de cor do verde de bromocresol a 620 nm. A determinação de carbono inorgânico e orgânico dissolvido e CO<sub>2</sub> foi baseada na mudança de cor ( $\lambda = 660$  nm) do indicador azul de bromotimol após difusão de CO<sub>2</sub> na forma gasosa através de uma membrana hidrofóbica numa unidade de difusão de gás. Para conversão de carbono inorgânico e orgânico dissolvido em CO<sub>2</sub>, a amostra foi acidificada ou foto-oxidada em linha, respectivamente. Como detector, utilizou-se uma célula de fluxo multi-reflectora combinada com um LED para minimizar o índice de refração. O método desenvolvido foi aplicado a águas balneares de interior e os resultados obtidos estavam de acordo com o método de referência. O objectivo do segundo trabalho foi determinar o anião iodeto com detecção potenciométrica e o anião iodato com detecção espectrofotométrica, num sistema SIA. Utilizou-se o método de adição com o objectivo de superar as interferências de matriz e os baixos níveis de concentração do analito. De forma a melhorar a mistura, utilizou-se uma câmara de mistura acoplada a uma porta lateral da válvula de selecção. A exactidão do método foi avaliada comparando os resultados obtidos com os do método de referência e realizando testes de recuperação. O método desenvolvido foi eficazmente aplicado a amostras de águas balneares e extractos de algas. O desenvolvimento de um sistema bi-paramétrico para a determinação de cádmio e chumbo foi o objectivo do terceiro trabalho. Foi utilizada uma metodologia de análise por injeção sequencial *Lab-on-valve* (SI-LOV) com detecção espectrofotométrica. Escolheu-se o reagente ditizona visto que forma complexos corados com ambos os metais a diferentes valores de pH. A determinação de cádmio foi realizada em condições alcalinas e a determinação de chumbo foi realizada em condições semi-alcalinas. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso a amostras de água de um porto e os resultados obtidos estavam de acordo com o método de referência. Subsequentemente desenvolveu-se um método de espectrofotometria em fase sólida para a determinação de cádmio, zinco e cobre em águas naturais. A determinação foi baseada na

reação colorimétrica da ditizona com os metais, após estes terem sido imobilizados na resina NTA, previamente retida na célula de fluxo do SI-LOV. Para a determinação individual de zinco e cobre foram utilizados diferentes valores de pH para imobilização e reacção. A concentração de cádmio foi calculada utilizando um sistema de duas equações. Os resultados obtidos estavam de acordo com o método de referência. Um sistema FIA foi desenvolvido para a determinação de bromato em amostras de água mineral. Uma célula de fluxo de percurso óptico longo foi acoplada ao sistema de fluxo com o objectivo de determinar os baixos níveis de bromato. A determinação espectrofotométrica foi baseada na oxidação, em meio ácido, da clorpromazina pelo bromato, resultando na formação de um produto radical corado. A exactidão do método foi determinada realizando testes de recuperação. O objectivo do sexto trabalho consistiu no desenvolvimento de um método mais simples para monitorizar a biodegradação de ciprofloxacina e ofloxacina. Acoplou-se uma coluna monolítica a um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) para separar ambos os analitos. Como detector, utilizou-se um espectrofotómetro (295 e 275 nm). O método desenvolvido permitiu monitorizar a biodegradação dos dois compostos pela estirpe *Labrys portucalensis* F11. De seguida, desenvolveu-se um novo método baseado em espectrometria de massa para a determinação de ligações não-covalentes. Nesse sentido, utilizou-se um reactor contínuo de tanque agitado para obter uma diluição exponencial ao longo do tempo da solução equimolar de hospedeiro:hóspede. As constantes de associação dos complexos foram determinadas com apenas uma injeção e combinando um modelo de diluição exponencial com um modelo de associação equimolar, previamente estabelecido. O método foi aplicado à determinação de constantes de associação entre a vancomicina e estereoisómeros do tripéptido Ac-Lys(Ac)-Ala-Ala. A determinação de tensioactivos aniónicos utilizando espectrometria de massa em tandem foi o objectivo do oitavo trabalho. O estudo de diferentes reagentes catiónicos foi realizado utilizando os métodos *Scan*, *SIM* e *MS/MS* e os respectivos limites de detecção foram comparados. O método desenvolvido foi eficazmente aplicado à determinação de ácido perfluoro-octanossulfónico, ácido perfluoro-octanoico, dodecil sulfato de sódio, ácido esteárico e dodecilbenzenossulfonato de sódio em diferentes amostras de água. O último trabalho consistiu na utilização de MALDI-TOF MS para a rápida identificação de microrganismos em águas potencialmente contaminadas. A capacidade de degradação de tolueno e clorofórmio pelos microrganismos identificados foi avaliada para possível aplicação na biorremediação.