

Šećeri u vodenim ekosustavima

Andrea Čačković

Prema radu

Engel A., Händel N. A novel protocol for

determining the concentration and composition of sugars in particulate and

in high molecular weight dissolved organic matter (HMW-DOM) in seawater. Marine Chemistry 127 (2011) 180–191

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija
Smjer: Biokemija

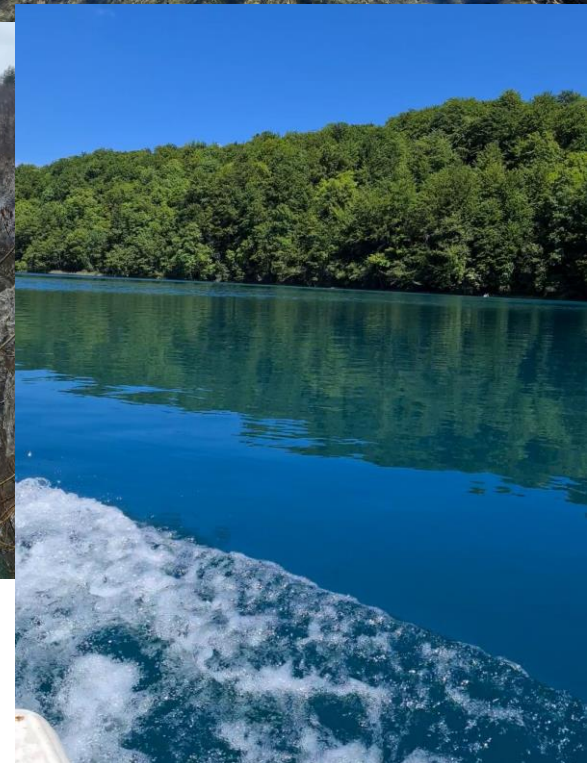
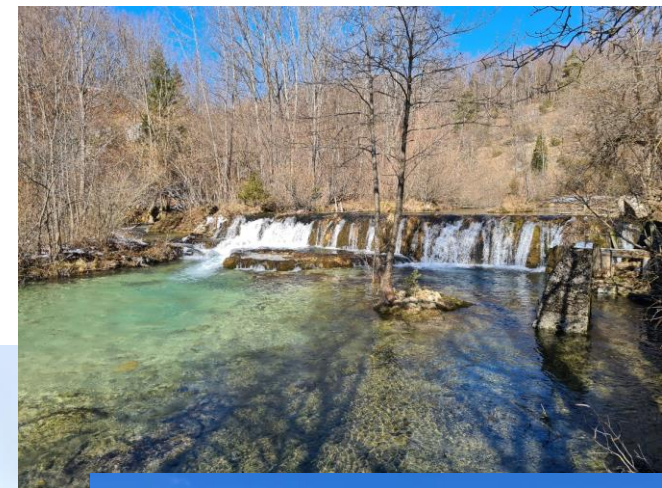
Laboratorij za procese taloženja
Zavod za kemiju materijala
Institut Ruđer Bošković

Vodeni ekosustavi

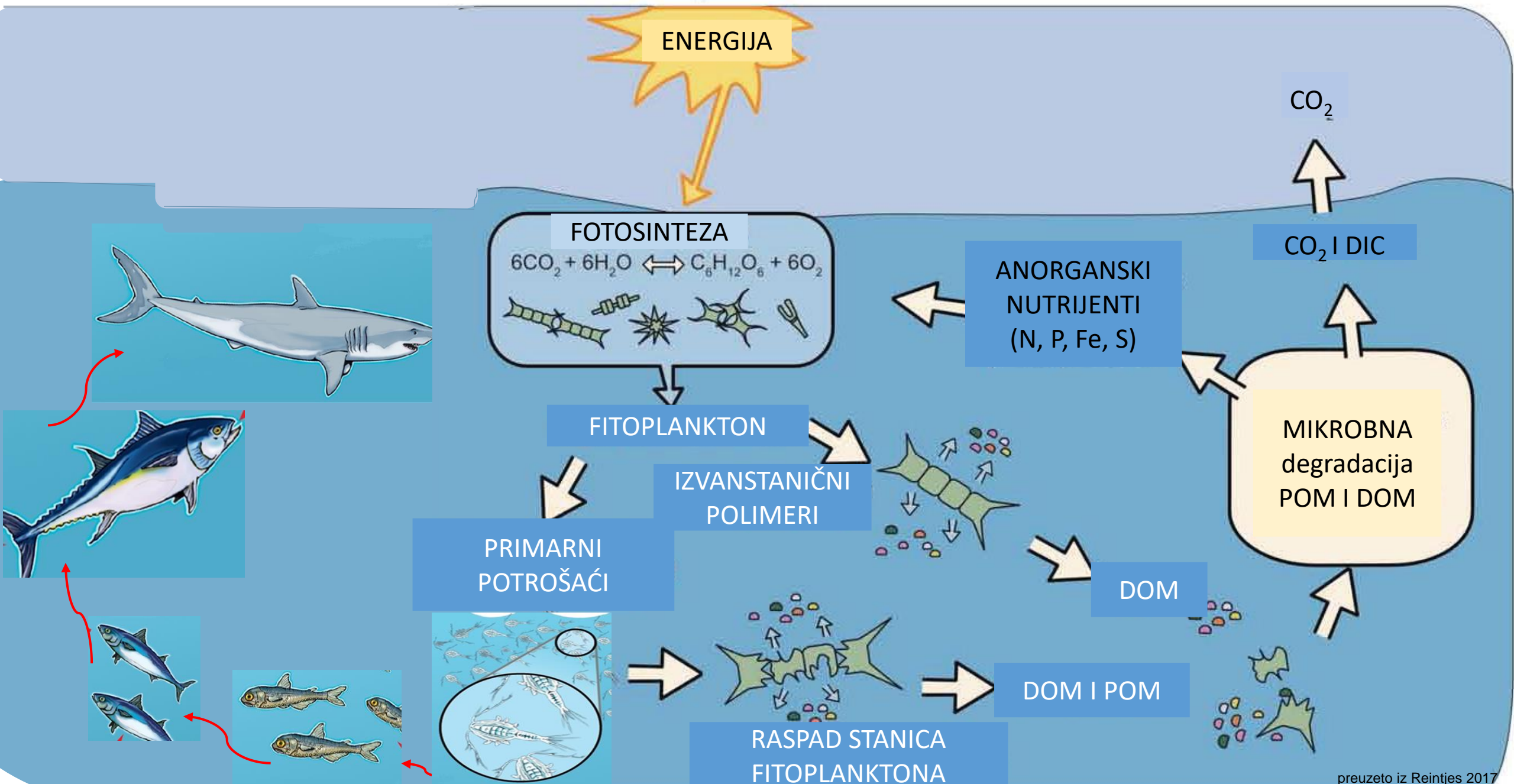
MORSKI



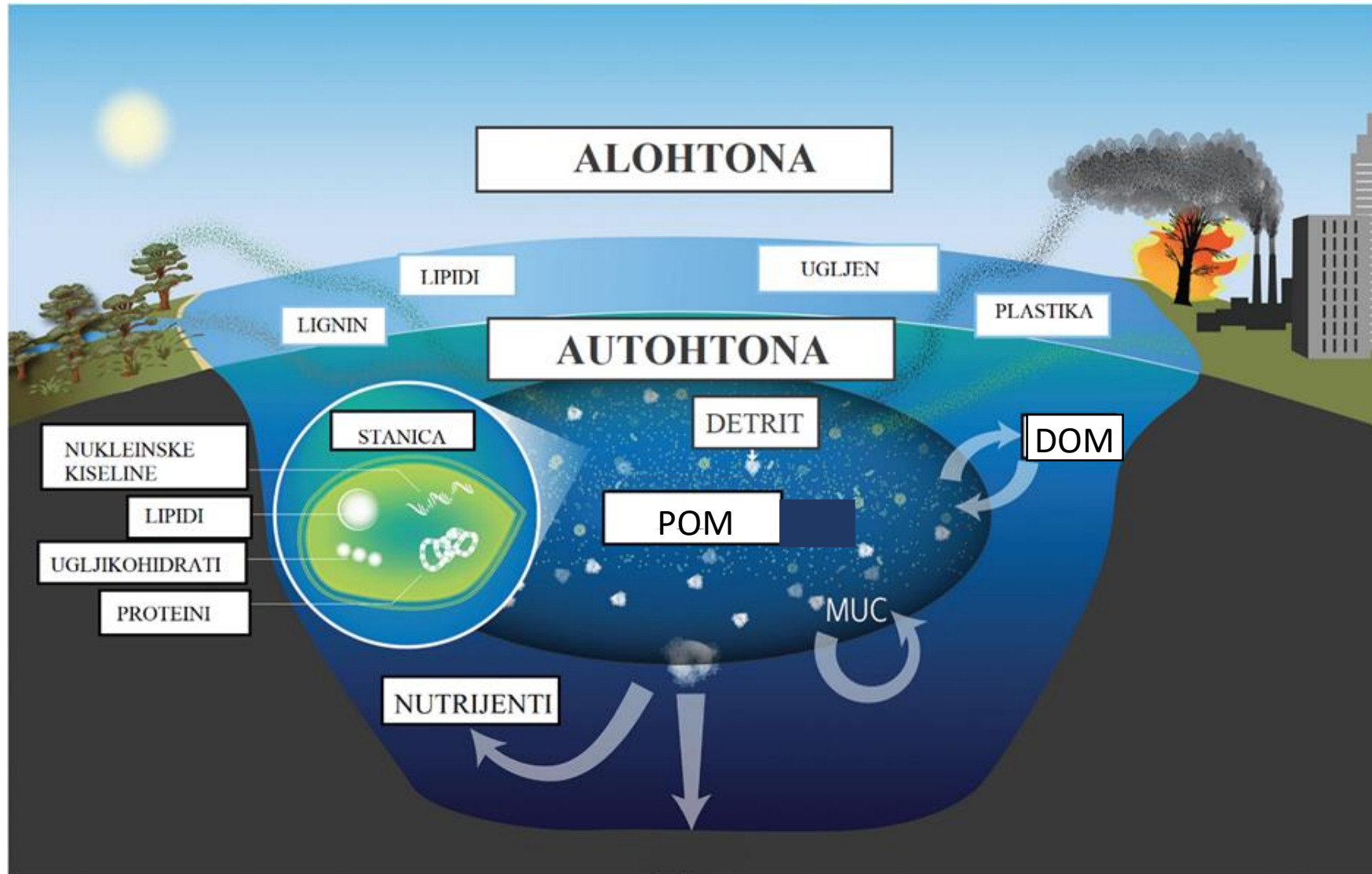
SLATKOVODNI



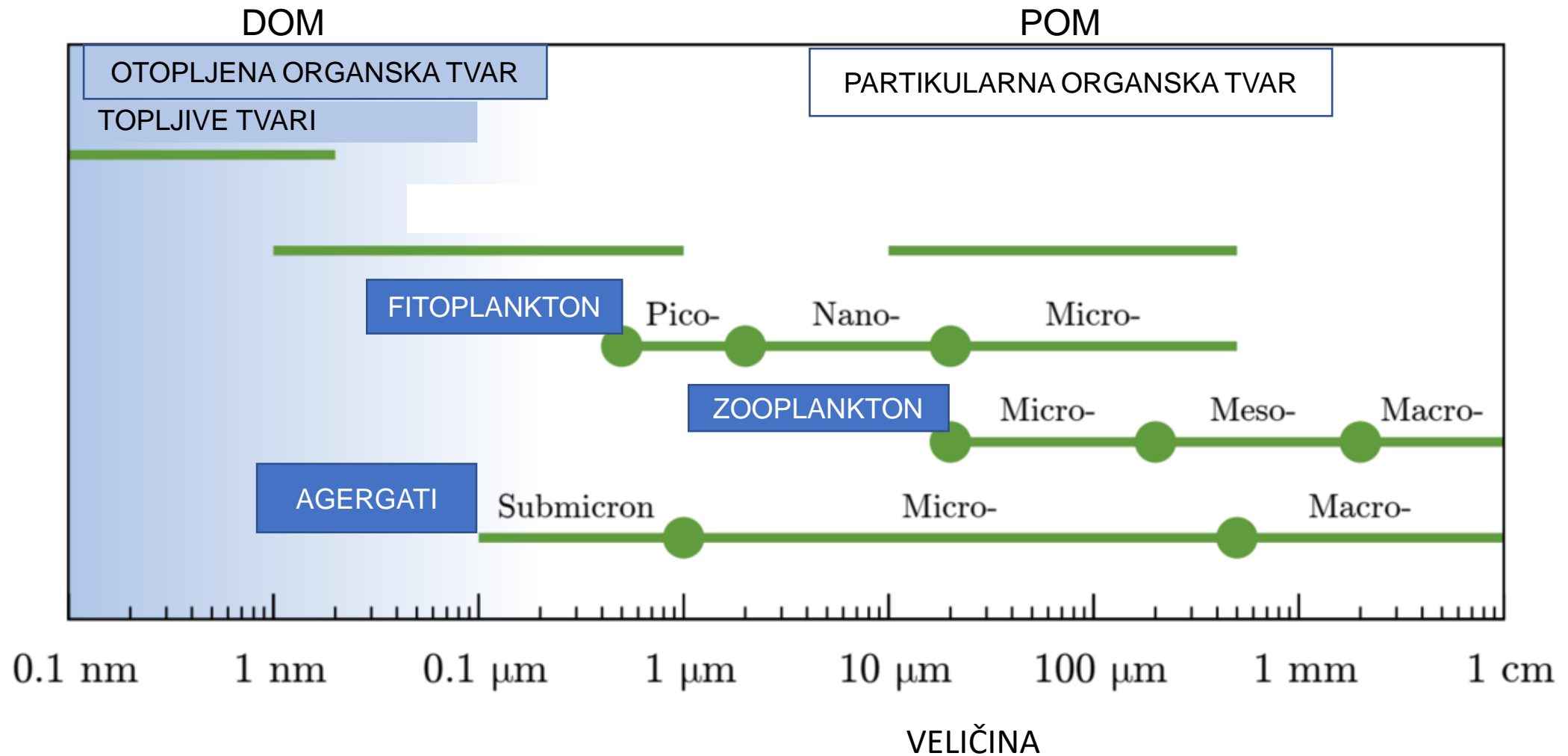
PORIJEKLO ORGANSKE TVARI U MORSKOM OKOLIŠU



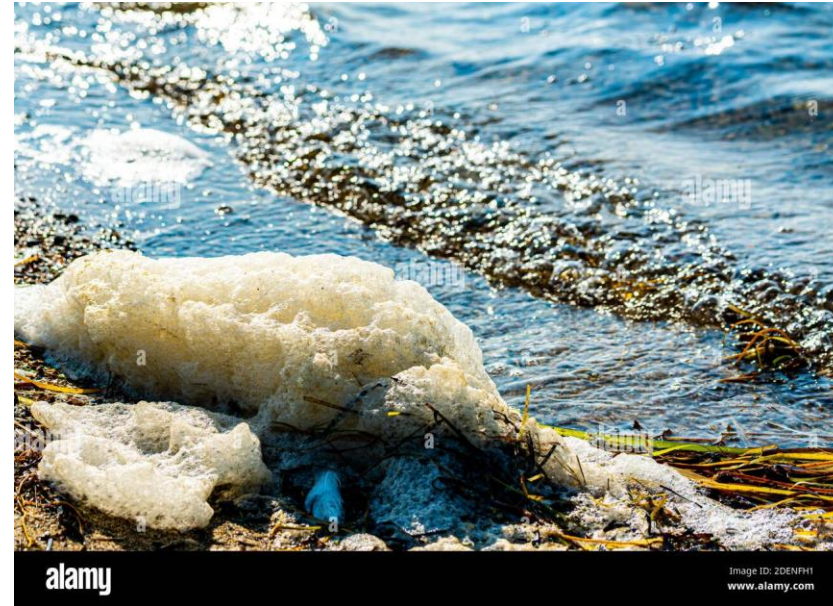
PORIJEKLO ORGANSKE TVARI U MORKSOM OKOLIŠU



ORGANSKA TVAR



Sastav organske tvari



- 25 - 50% proteini
- 5 - 50% ugljikohidrati
- 5 - 20% lipidi
- 3- 20% pigmenti
- ~ 20% nukleinske kiseline

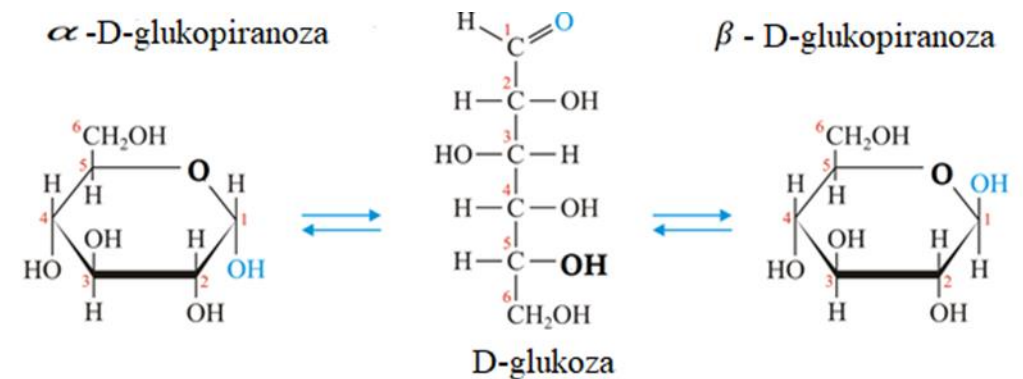
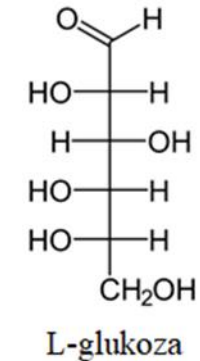
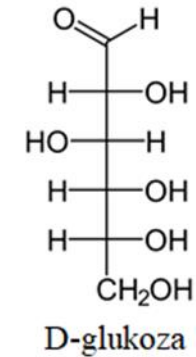
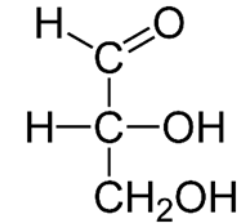
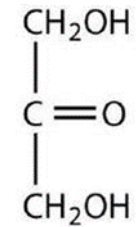
UGLJIKOHIDRATI

- Organski spojevi koji se sastoje od atoma ugljika, vodika i kisika u omjeru C:H:O = 1:2:1
- Empirijska formula $C_m(H_2O)_n$
- Podjela: monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi i polisaharidi

UGLJIKOHIDRATI

Monosaharidi

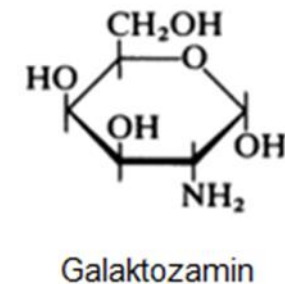
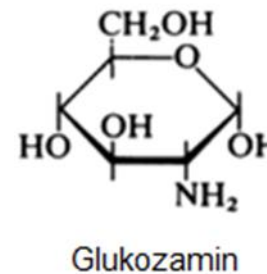
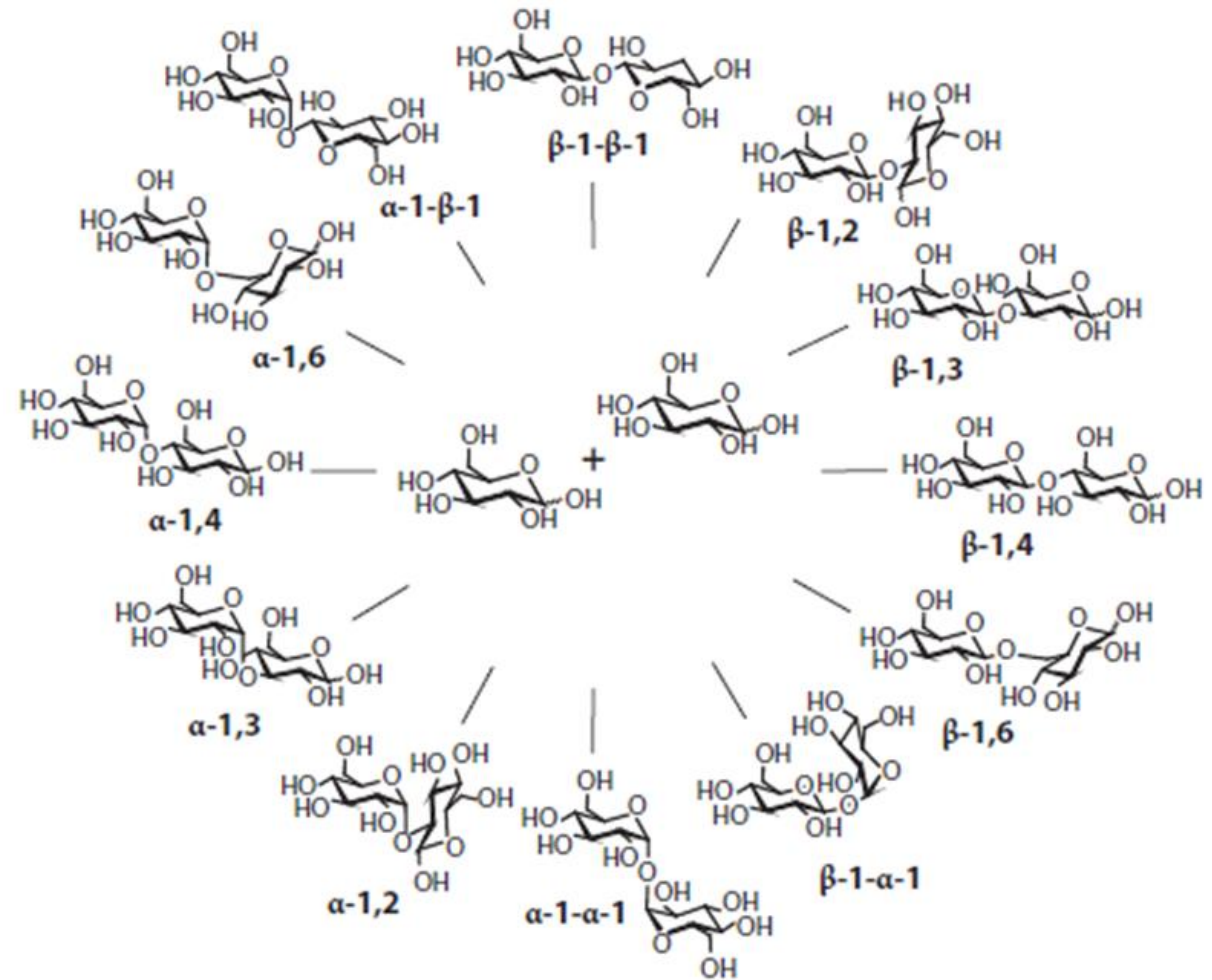
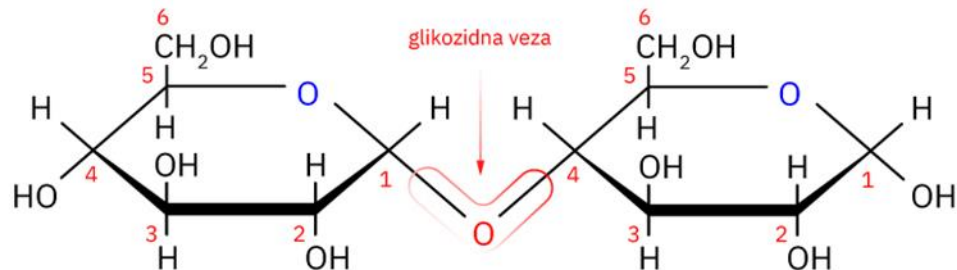
- 3 – 9 C-atoma
- Najjednostavniji ugljikohidrati
- Empirijska formula $(\text{CH}_2\text{O})_n$
- Ketoze i aldoze + hidroksilne skupine
- Tetroze, pentoze, heksoze heptoze
- Najpoznatiji: GLUKOZA
- Relativna konfiguracija – stereoizomeri
- Poluacetali ili poluketali



UGLJIKOHIDRATI

POLISAHARIDI

- Složeni ugljikohidrati
- Povezivanje monosaharida
- Glikozidna veza
- Velika raznolikost
- Dodatne funkcionalne skupine

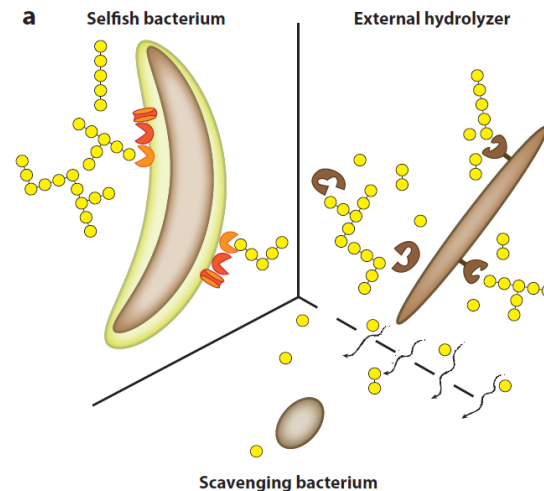


UGLJIKOHIDRATI U MORSKOM EKOSUSTAVU

- KOMBINIRANI UGLJIKOHIDRATI – linearni ili razgranati polisaharidi koji uključuju heksoze, pentze, deoksi šećere i amino šećere.
- Važne uloge: kruženju elemenata, toku organske tvari, općenito dinamici ekosustava

DCCHO

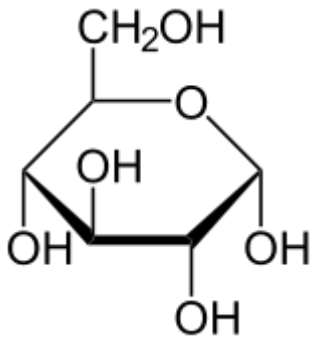
- Fitoplanktonski „bloom”
- Enzimatska razgradnja CCHO
- 50-70% HMW-DOC zbog stalnog otpuštanja od strane fitoplanktona i sporijeg metabolizma hetrotrofnih bakterija



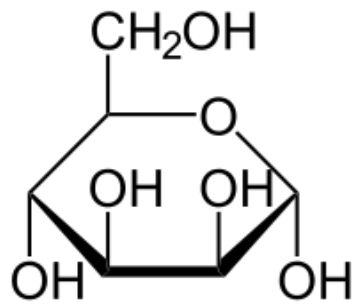
PCCHO

- Strukturni
- Skladišni
- Raspad stanica

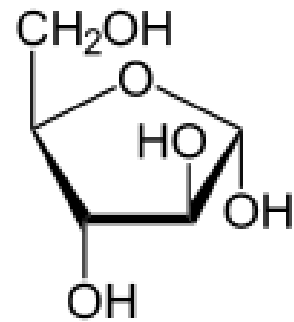




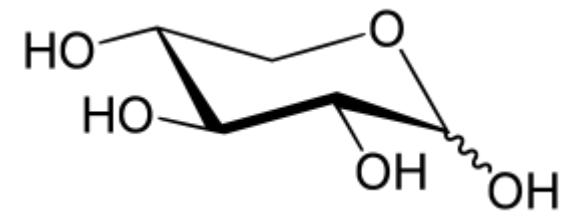
glukoza



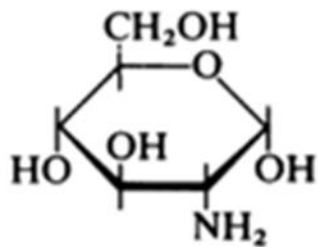
manoza



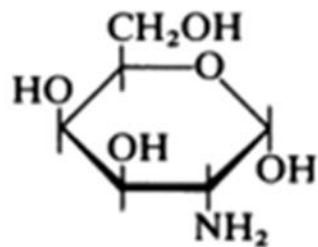
arabinoza



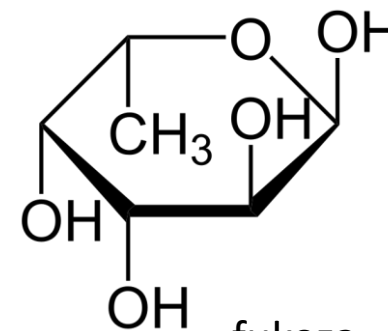
ksiloza



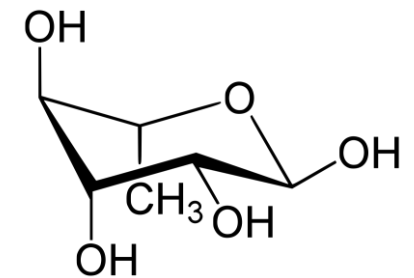
Glukozamin



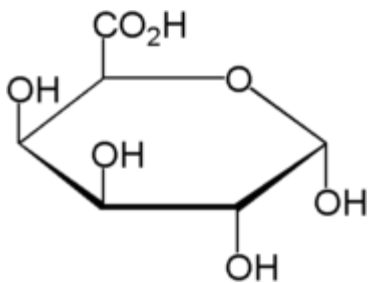
Galaktozamin



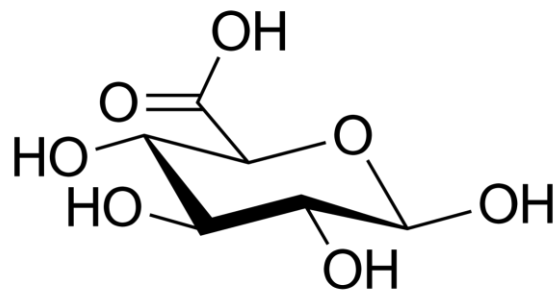
fukoza



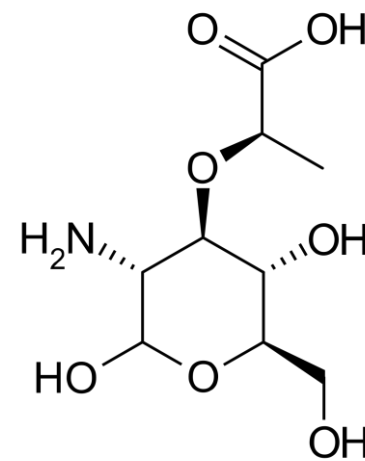
ramnoza



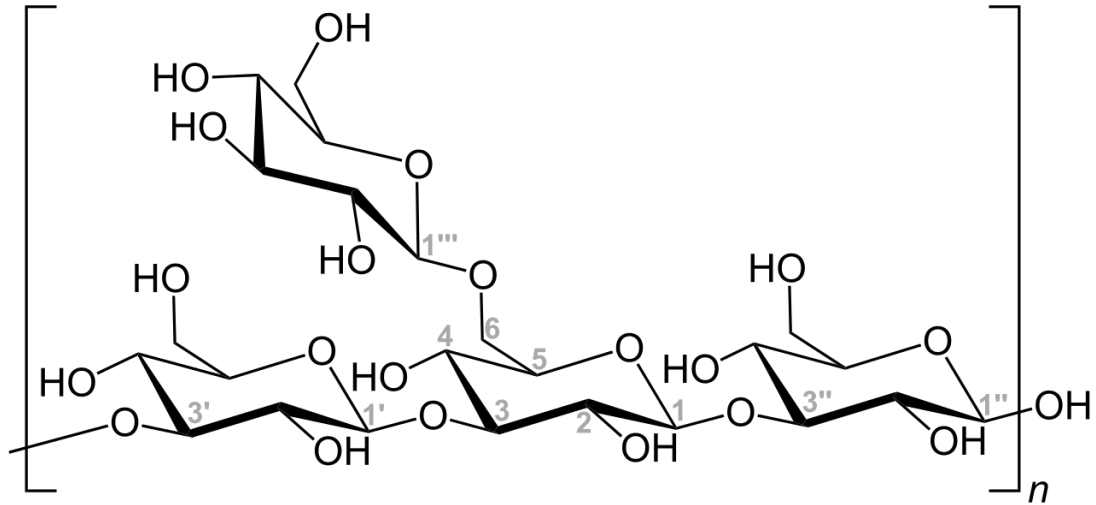
galakturonska kiselina



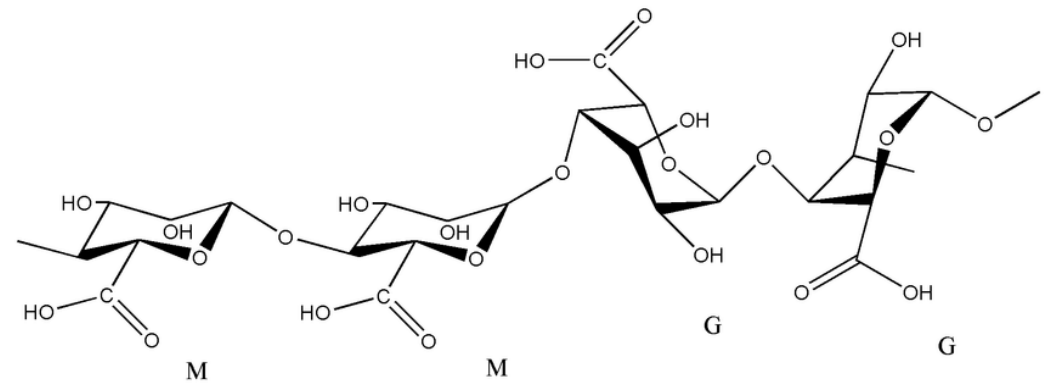
glukuronska kiselina



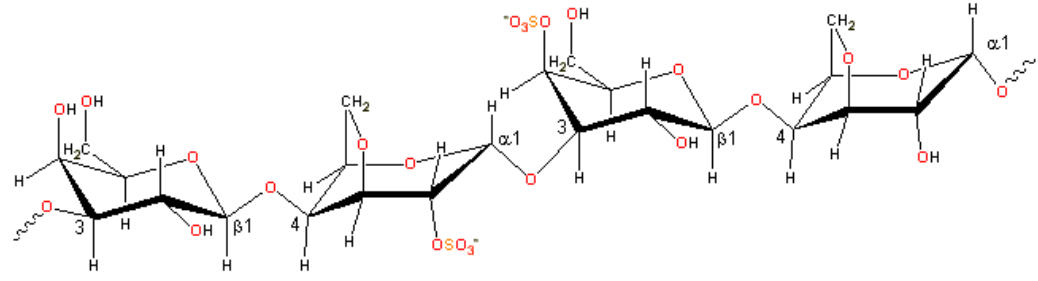
muraminska kiselina



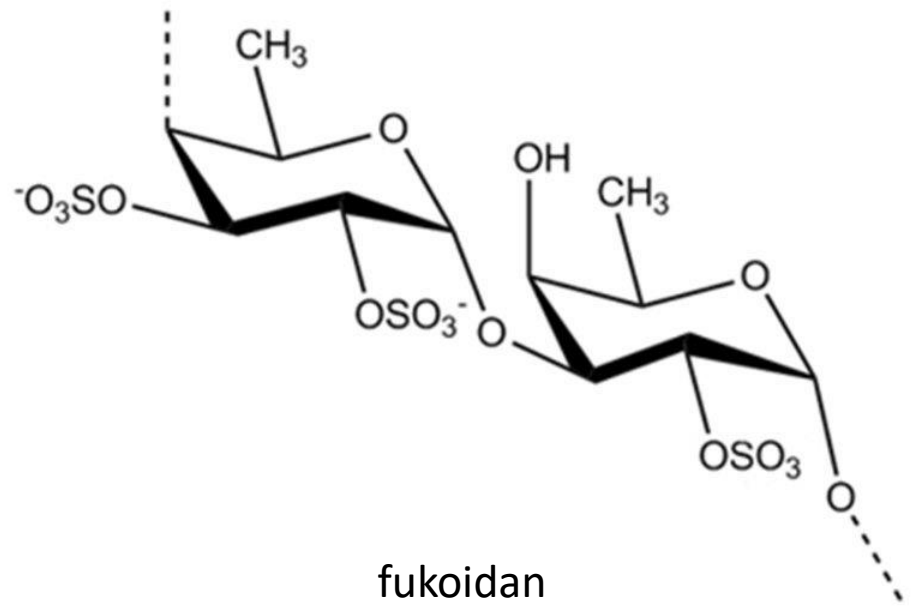
laminarin



alginat



karagenan



fukoidan

Zašto su slabo istraženi?

- analitički vrlo izazovni za analizu – prvenstveno zbog morske soli
 - velike raznolikosti
 - bez spektroskopskih oznaka
 - izolacija problematična - PCCHO vezani za druge čestice, DCCHO dobro topljivi u vodi
-
- CILJ RADA: DETERMINIRATI NEUTRALNE, AMINO I KISELE MONOSAHARIDE IZ MORSKOG UZORKA

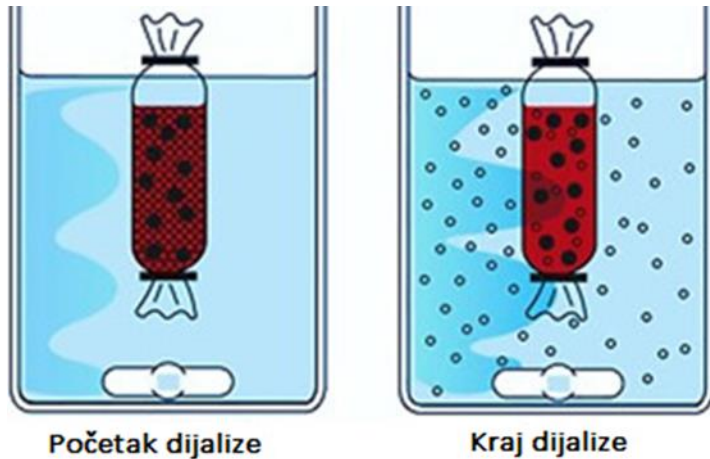
ANALIZA UGLJIKOHIDRATA

Anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (HPAEC-PAD)

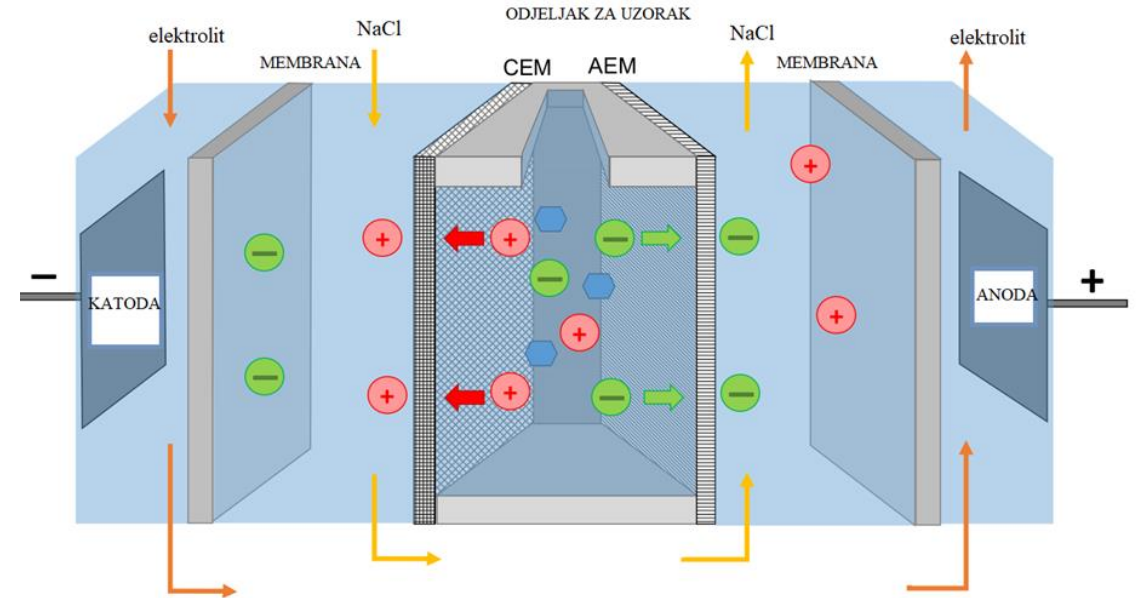
- Nije potrebna derivatizacija
- Izravna detekcija ugljikohidrata
- Minimalno čišćenje uzorka
- Minimalna priprema uzorka



DESALINIZACIJA



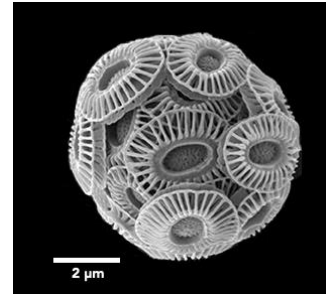
- Membranska dijaliza
- 1kDa MWCO membrana
- Uzorak morske vode, miliQ voda, magnetska miješalica
- 4 °C
- sonificiranje



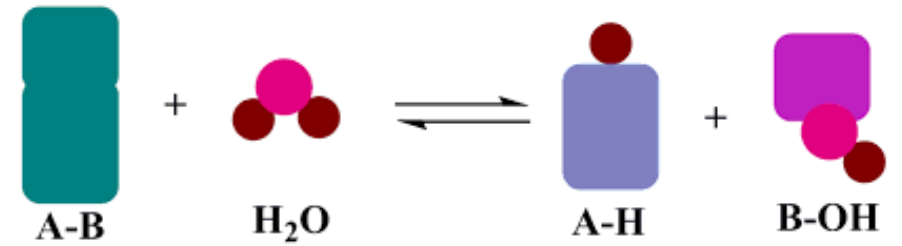
- Elektrodijaliza – dijaliza ubrzana električnim djelovanjem
- 3 odjeljka (uzorak morske vode, NaCl)
- Kationska/anionska izmjenjivačka membrana
- Katoda (-) / anoda (+)

USPOREDBA S DESALINIZACIJOM NA KATION/ANION IZMJENJIVAČKIM SMOLAMA

- Uzorci se prvo hidroliziraju potom desaliniziraju pa se mogu determinirati i prisutni monosaharidi
- Usporedba dobivenih koncentracija DCCHO izoliranih iz kulture kokolitoforida *Emiliana huxleyi*
- Veći gubitak pojedinih šećera, u potpunosti kiselih šećera

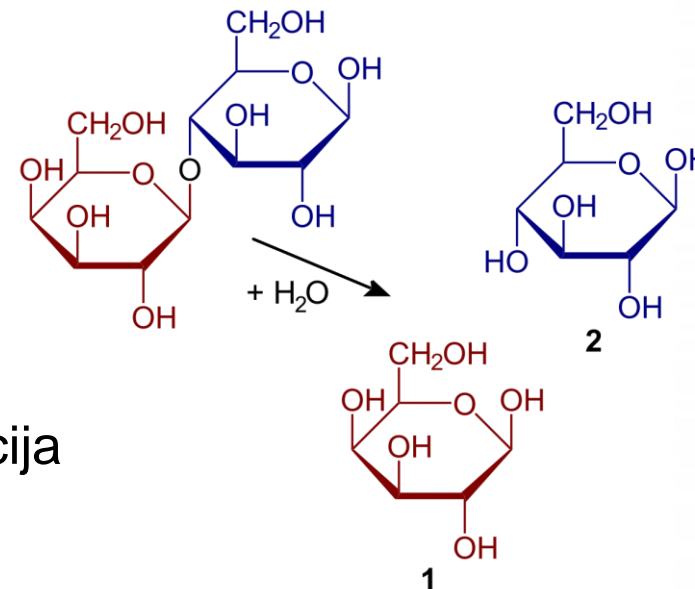


HIDROLIZA UZROKA



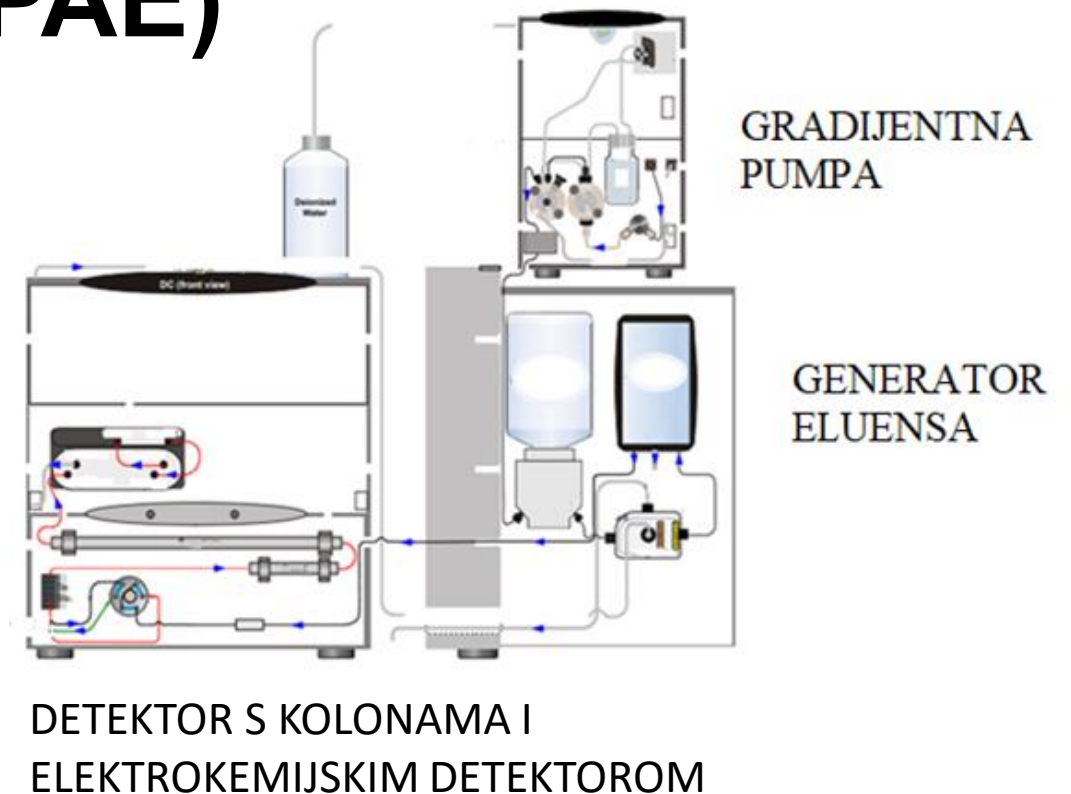
- Dodatkom vode molekuli polisaharida glikozidna veza puca i nastaju oligo- i monosaharidi
- Uz dodatak kiseline ili lužine
- OH⁻ ion napada O atom iz glikozidne veze i spaja s jednim produktom raspada, a H⁺ se spaja s drugim
- Kisele hidrolize – OH⁻ ion veže se na atom kisika iz glikozidne veze i razdvaja monomerne jedinice
- Potiču je enzimi hidrolaze

- HCl (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 2, 4 i 8 M)
- 100 °C
- Neutralizacija, resuspendiranje s MQ, homogenizacija



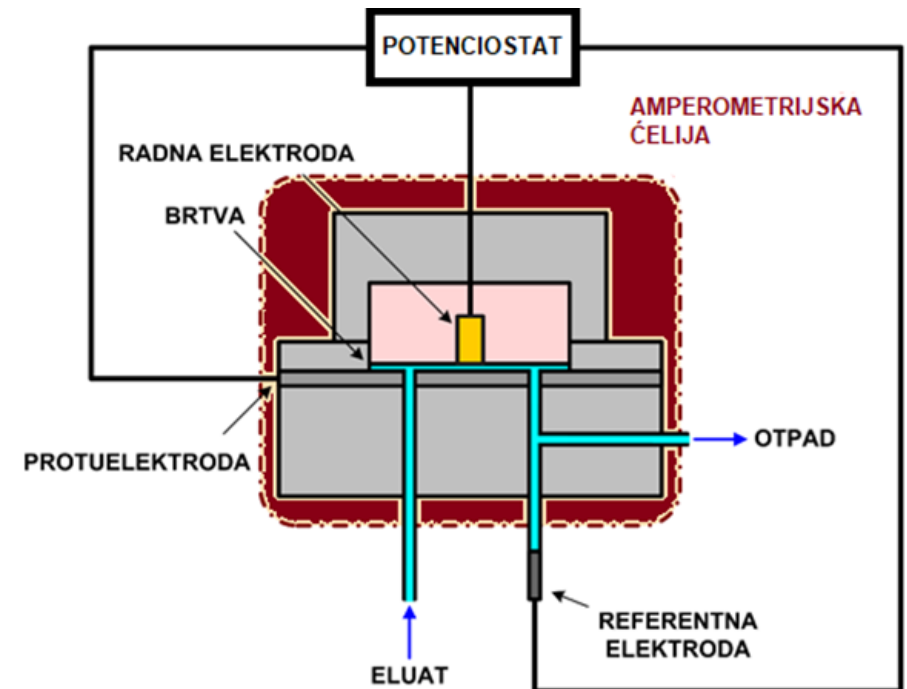
Anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti (HPAE)

- Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti
- Stacionarna i mobilna faza
- autosamplerom (4 °C) uzorak se unosi u sustav, pumpa se kroz kolone, čestice iz uzorka zaustavljaju se na kolonama (25 °C), a jednako nabijene čestice iz eluensa zamjenjuju ione analita, ioni analita detektiraju se amperometrijskim detektorom



Pulsna amperometrijska detekcija (PAD)

- AMPEROMETRIJA – elektrokemijska metoda pri kojoj je jakost struje proporcionalna koncentraciji određivane tvari koja generira struju
- Elektrokemijski detektor
- 3 elektrode: radna, referentna i protuelektroda
- Razlika potencijala između radne i referentne
- Redoks iona analita – struja elektrona



Pulsna amperometrijska detekcija (PAD)

- 4 potencijala u 4 različita vremena na radnu elektrodu
- Čišćenje radne elektrode
- E_1 – detekcija jakosti struje nastale oksidacijom ugljikohidrata
- E_2 – visoko negativan, oksidativno se ukloni produkt redoks reakcije
- E_3 – pozitiviniji, održava aktivacijski potencijal
- E_4 – negativniji redukcija radne elektrode



Anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (HPAEC-PAD)

- ugljikohidrati - pKa u rasponu 12-13 – slabije kiseline – pri visokom pH ioniziraju u anione
- Dva koraka: izokratno eluiranje (18 mM NaOH) + gradijentno eluiranje (NaOH + CH₃COONa)
- PAD: radna elektroda – zlatna, referentna Ag/AgCl

E1 = 100 mV (t1 = 0.4 s)

E2 = -200 mV (t2 = 0.42 s)

E3 = 600 mV (t3 = 0.43 s)

E4 = -100 mV (t4 = 0.5 s)

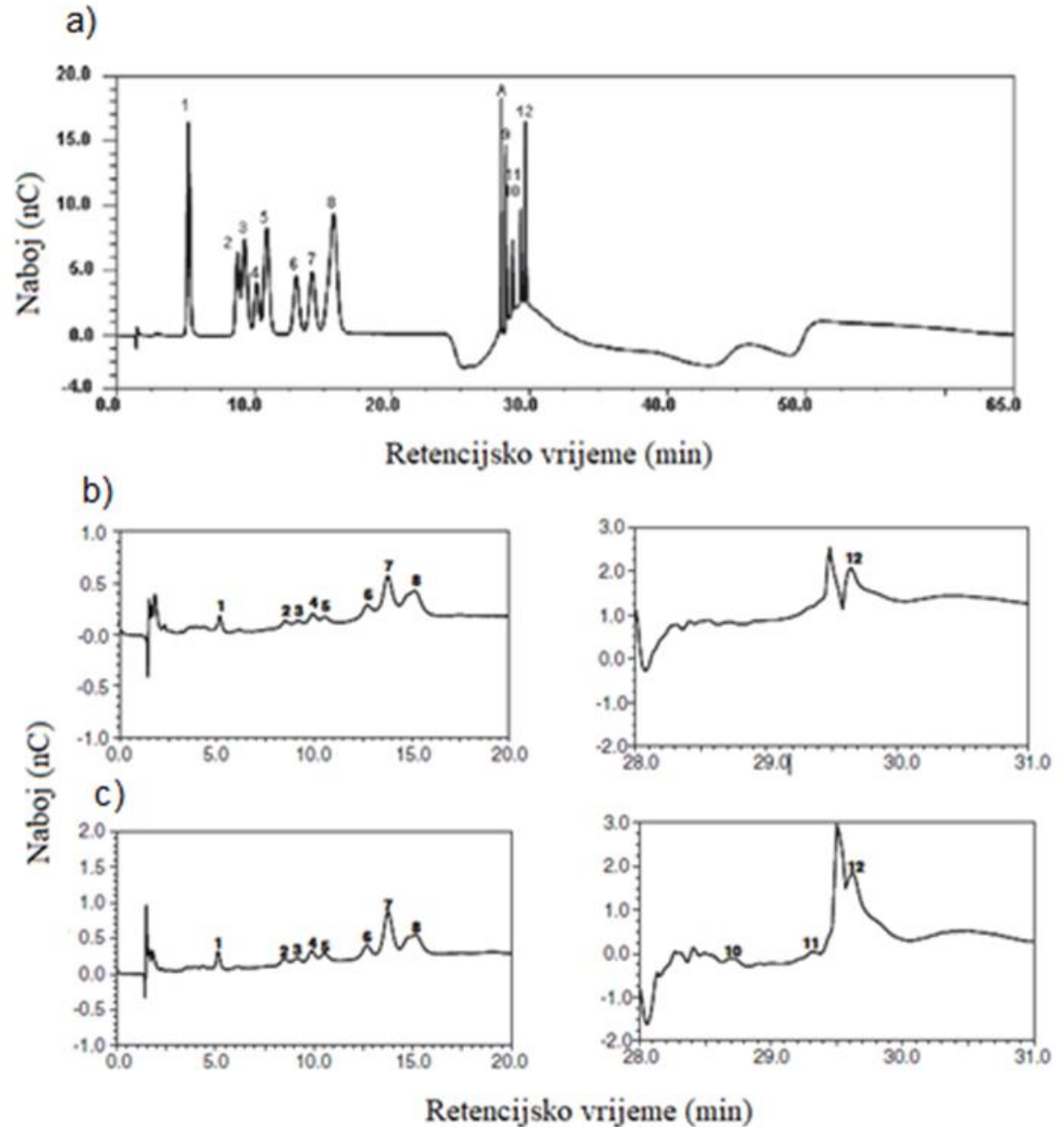
Time (min)	Eluent I NaOH (mM)	Eluent II NaAc (mM)
0.00	18	-
20.00	18	-
21.00	100	-
25.00	100	200
35.00	100	200
40.00	75	-
45.00	75	-
46.00	18	-
55.10	18	-
65.20	18	-

a) cijeli kromatogram otopine standardnih različitih šećera

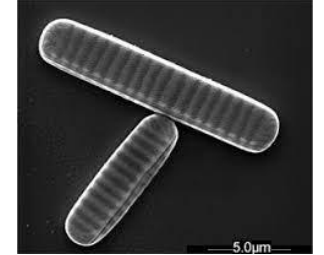
- 1-8 neutralni i amino šećeri
- 9-12 kiseli šećeri
- 1 Fukoza
- 2 Ramnoza
- 3 Galaktozamin
- 4 Arabinosa
- 5 Glukozamin
- 6 Galaktoza
- 7 Glukoza
- 8 Ksilozza/Manoza
- 9 Glukonska kiselina
- 10 Muraminska kiselina
- 11 Galakturonska kiselina
- 12 Glukouronska kiselina

b) kromatogram DCCHO iz uzorka mora

c) kromatogram tCCHO



USPOREDBA S TPTZ metodom



- TPTZ metoda uključuje oksidiranje hidroliziranih ugljikohidrata fericijanidom i determinaciju kolorimetrijom nakon kondenzacije s kromogenom 2,4,6-tripidril-s-triazinom
- Usporedba dobivenih koncentracija DCCHO izoliranih iz kulture morske dijatomeje *Fragilariopsis cylindrus* analiziranih HPAEC-PAD i TPZT
- Dobivene veće koncentracije jer TPZT metoda sve reducirajuće šećere dok HPAEC-PAD je ograničena na standardne šećere

ZAKLJUČAK

- Visoka razlučivost i osjetljivost
- bez prethodne derivatizacije ugljikohidrata
- PAD zbog osjetljive metode detekcije lako kvantificira vrlo malo koncentracije ugljikohidrata (pmol)
- PAD ne detektira spojeve s neutralnim ili pozitivnim nabojem.
- ključni dio analize ugljikohidrata – desalinizacija i hidroliza stoga se vrlo oprezno treba odrediti protokol pripreme uzorka.
- Membranska dijaliza - jednostavna i brza metoda za desalinizaciju HMW-ugljikohidrata i iz uzorka se ne gube kiseli šećeri
- istovremeno određivanje neutralnih, amino i kiselih šećera sadržanih u HMW-DOM ili u POM.
- Prednost istovremenog određivanja tri razreda šećera u odnosu na njihovu individualnu analizu prvenstveno je dobitak u učinkovitosti i usporedivosti.

HVALA NA PAŽNJI!