



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
KEMIJSKI ODSJEK

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija  
Smjer: Biokemija

Andrea Čačković

# ŠEĆERI U VODENIM EKOSUSTAVIMA

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

Kemijski seminar I

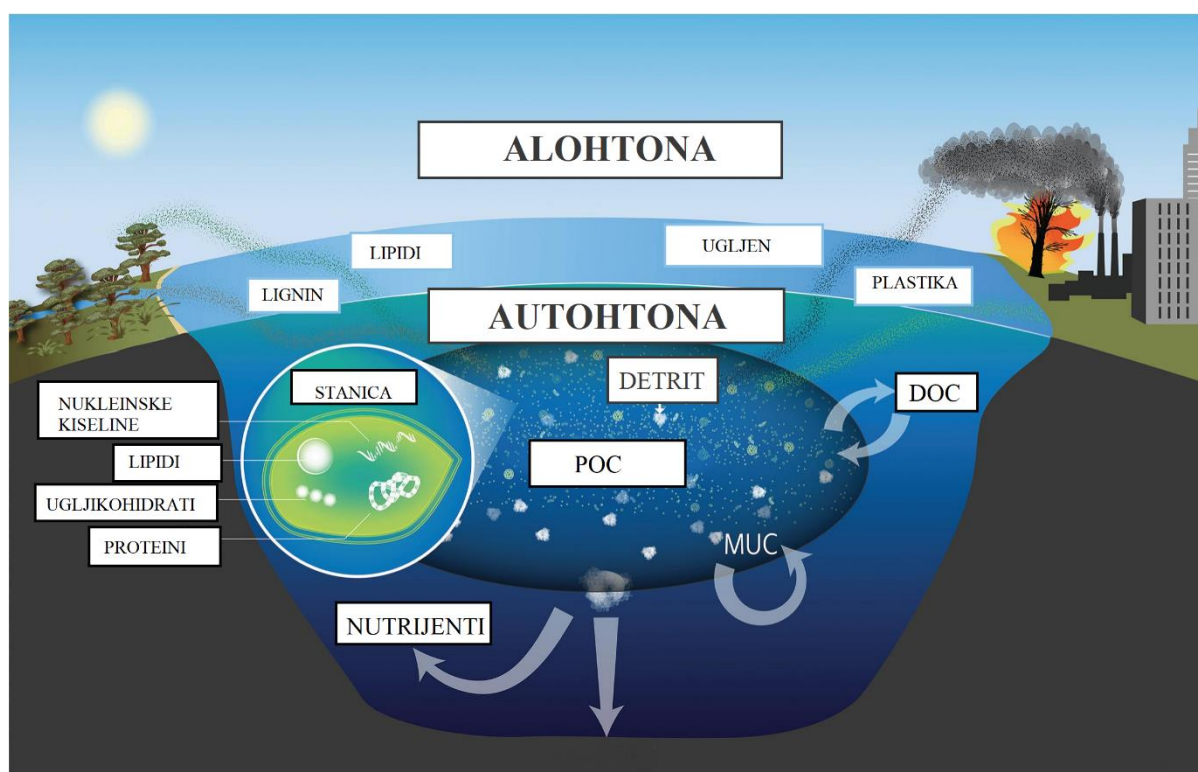
Zagreb, svibanj 2022.

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 2  |
| 2. UGLJIKOHIDRATI .....  | 3  |
| 2.1. MONOSAHARIDI .....  | 4  |
| 2.2. SLOŽENI UGLJIKOHIDRATI – OLIGOSAHARIDI I POLISAHARIDI .....   | 5  |
| 2.3. UGLJIKOHIDRATI U MORSKIM EKOSUSTAVIMA.....  | 7  |
| 3. PRIPREMA UZORKA .....   | 9  |
| 3.1. DESALINIZACIJA.....   | 9  |
| 3.2. HIDROLIZA.....  | 10 |
| 4. ANIJSKO-IZMJENJIVAČKA KROMATOGRFIJA VISOKE UČINKOVITOSTI SA PULSNOM AMPEROMETRIJSKOM DETEKCIJOM (HPAEC-PAD) ..... | 11 |
| 4.1. ANIJSKO-IZMJENJIVAČKA KROMATOGRFIJA VISOKE UČINKOVITOSTI (HPAEC) .....  | 11 |
| 4.2. PULSNA AMPEROMETRIJSKA DETEKCIJA – PAD.....   | 13 |
| 4.3. HPAEC-PAD ZA DETEKCIJU UGLJIKOHIDRATA U MORSKOM EKOSUSTAVU  | 14 |
| 5. ZAKLJUČAK.....  | 17 |
| 6. LITERATURA .....  | 18 |

## 1. UVOD

Široka rasprostranjenost u svim kopnenim te vodenim ekosustavima čini ugljikohidrate jednom od najabundantnijih organskih molekula na Zemlji (Panagiotopoulos i Sempéré 2005). Imaju važne uloge u metabolizmu stanice, staničnom prepoznavanju te su i važni strukturni polimeri (Dwek 1996). Također su sastavni dio kopnene i vodene složene smjese organskih molekula, organske tvari (1-30%) (Kaiser i Benner 2000). U vodenim okolišima ugljikohidrati dolaze ili u obliku monosaharida ili kao kombinirani ugljikohidrati (CCHO, eng. combined carbohydrates). Kombinirani ugljikohidrati predstavljaju linearne ili razgranate polisaharide koji u vodenim sustavima dolaze u dva oblika, partikularni (PCCHO) ili otopljeni (DCCHO), odnosno kao dio partikularne (POM, eng. particulate organic matter) ili otopljene (DOM, eng. dissolved organic matter) organske tvari, definirane kao frakcija manja od 0.2  $\mu\text{m}$  (Jiao i dr. 2010). Prema porijeklu organska tvar vodenih ekosustava može biti autohtona ili alohtona. Autohtona nastaje unutar vodenog okoliša primarnom proizvodnjom makrofita, algi i bakterija, a može se i otpuštati kroz razne mehanizme: ekstracelularno otpuštanje, otpuštanje od strane fitoplanktona, autoliza i viralna liza stanica algi i bakterija (Suttle 2007). Alohtona organska tvar nastaje izvan vodenog sustava. (Slika 1).



Slika 1. Porijeklo i sastav organske tvari (preuzeto iz Kharbush i dr. 2020)

Iako imaju vrlo važne uloge u biogeokemijskom ciklusu informacije o sastavu i dinamici ugljikohidrata u vodenim ekosustavima vrlo su oskudne. Ugljikohidrati analitički su vrlo izazovni za analizu. Naime, kombinirani ugljikohidrati su velike raznolikosti, nemaju jasne spektroskopske oznake, ali najveći problemi dolaze zbog poteškoća u izolaciji iz organske tvari. Kao dio partikularne otopljene tvari vezani su s drugim njenim frakcijama zbog čega ih je teško izolirati, a isto tako su i vrlo topljivi u vodi, pa se iz morske vode teško izoliraju od morskih soli. U idealnom slučaju, strukturne informacije o spomenutim ugljikohidratima bi uključivale identitet, položaj veze i orijentacije monomernih sastojaka, položaj grana i prisutnost dodatnih funkcionalnih skupina (npr. sulfatne, karboksilne ili amino skupine). Međutim, sastav ugljikohidrata iz vodenih ekosustava uglavnom je okarakteriziran na jedan od spomenutih načina, od kojih nijedan ne daje sve ove informacije.

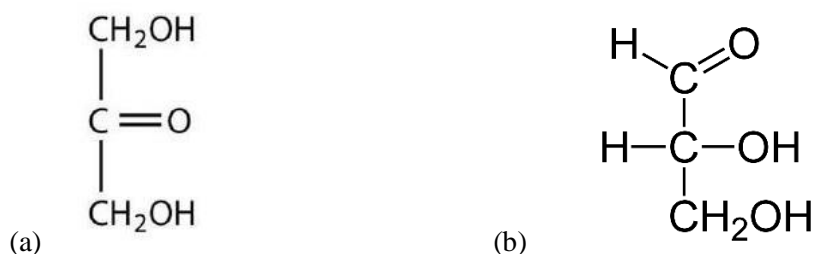
Za analizu ugljikohidrata u vodenim okolišima najčešće je korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) (Jørgensen i Jensen 1994, Borch i Kirchman 1997, Hayakawa 2004) te također i plinska kromatografija. Obje metode zahtijevaju prethodnu derivatizaciju ugljikohidrata kako bi se mogli odvojiti te detektirati (Panagiotopoulos i Sempéré, 2005). U novije vrijeme anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (engl. High Pressure Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAE-PAD) (Lee 1990) ustanovljena je kao pouzdana alternativa, budući da olakšava osjetljivu kvantifikaciju ugljikohidrata u vodi bez prethodne derivatizacije (Panagiotopoulos i Sempéré 2005).

## 2. UGLJIKOHIDRATI

Ugljikohidrati su organski spojevi koji se sastoje od atoma ugljika, vodika i kisika u omjeru od jednog atoma ugljika, dva atoma vodika i jednog atoma ugljika. Empirijska formula ugljikohidrata je  $C_m(H_2O)_n$ . Općenito se ugljikohidrati dijele na monosaharide, disaharide, oligosaharide i polisaharide. Monosaharidi i disaharidi su ugljikohidrati malih molekulskih masa. Monosaharidi su ugljikohidrati koji imaju tri do devet ugljikovih atoma. Disaharidi su građeni od dva monosaharida. Oligosaharidi nastaju povezivanjem tri ili više monosaharida kisikovim mostovima čime obično sadrže tri do deset monosaharidnih jedinica. Polisaharidi su ugljikohidrati složene građe sastavljeni od velikog broja monosaharidnih jedinica zbog čega imaju veću molekularnu masu. Oligosaharide i polisaharide općenito zajedno ubrajamo u složene ugljikohidrate.

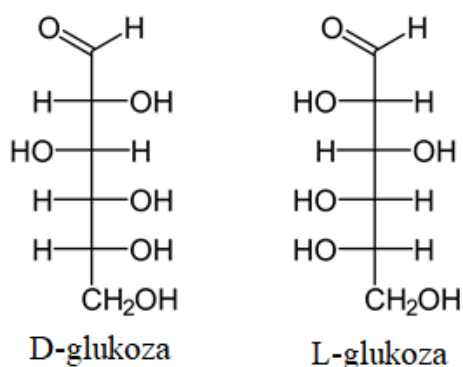
## 2.1. MONOSAHARIDI

Monosaharidi su najjednostavniji ugljikohidrati empirijske formule  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ . Općenito su to aldehidi ili ketoni koji imaju dvije ili više hidroksilnih skupina. Najjednostavniji primjeri monosaharida su dihidroksiacetone (ketoza, sadrži keto-skupinu) i gliceraldehid (aldoza, sadrži aldehydnu skupinu). Oba navedena primjera su trioze jer sadrže tri atoma ugljika, odnosno  $n=3$  (Slika 1).



Slika 1. Dihidroksiacetone (a) i D-gliceraldehid (b).

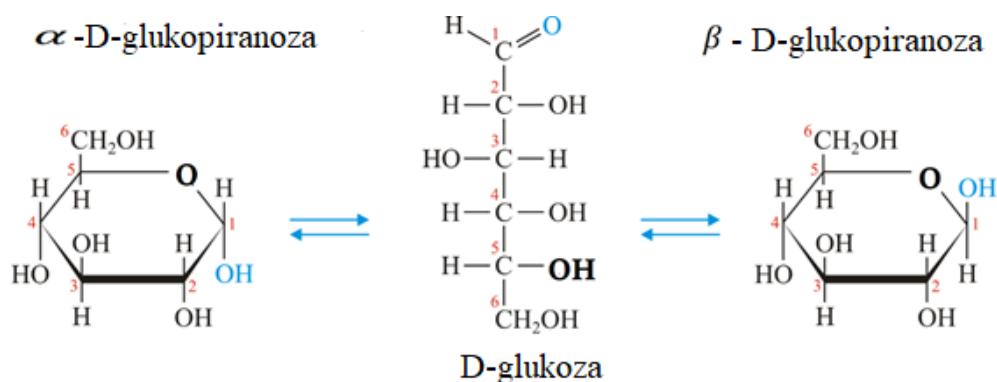
Jednostavni monosaharidi s četiri, pet, šest i sedam ugljikovih atoma nazivaju se tetroze, pentoze, heksoze i heptoze. Najčešći monosaharid je heksoza D-glukoza, šećer sa šest ugljikovih atoma (Slika 2). Monosaharidi koji u strukturi sadrže asimetrične ugljikove atome imaju više stereoisomera, L ili D, koja označuju njihovu relativnu konfiguraciju. Kod monosaharida sa više asimetričnih ugljikovih atoma relativna konfiguracija određuje se na ugljikovu atomu najudaljenijem od aldehydne odnosno keto-skupine.



Slika 2. D-glukoza i L-glukoza

Šećeri u otopinama nalaze se u cikličkom obliku, koji nastaju reakcijama aldehyda, odnosno ketona s alkoholom čime nastaju poluacetal i poluketal. Na primjeru glukoze vidi se kako aldehyd C-1 reagira s hidroksilnom skupinom na C-5 pri čemu nastaje šestoročlani prsten, piranoza. Dobivaju se dva

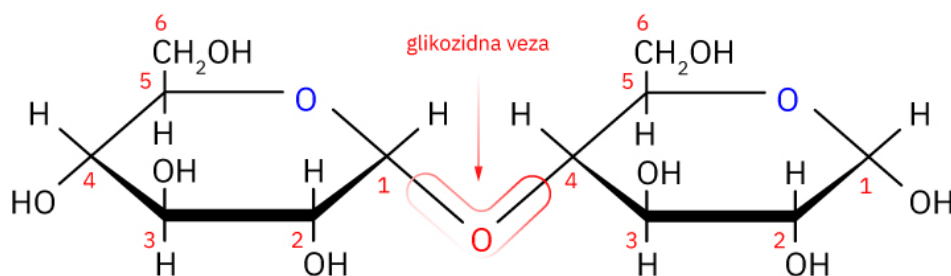
anomerna oblika,  $\alpha$  i  $\beta$ , jer C-1 postaje asimetrični centar (Slika 3). Oznaka  $\alpha$  znači da je C-1-hidroksila skupina na suprotnoj strani prstena od  $\text{CH}_2\text{OH}$  skupine na kiralnom centru, a  $\beta$  označava da je hidroksilna skupina s iste strane kao i  $\text{CH}_2\text{OH}$  na kiralnom centru.



Slika 3. Nastajanje glukopiranoze.

## 2.2. SLOŽENI UGLJIKOHIDRATI – OLIGOSAHARIDI I POLISAHARIDI

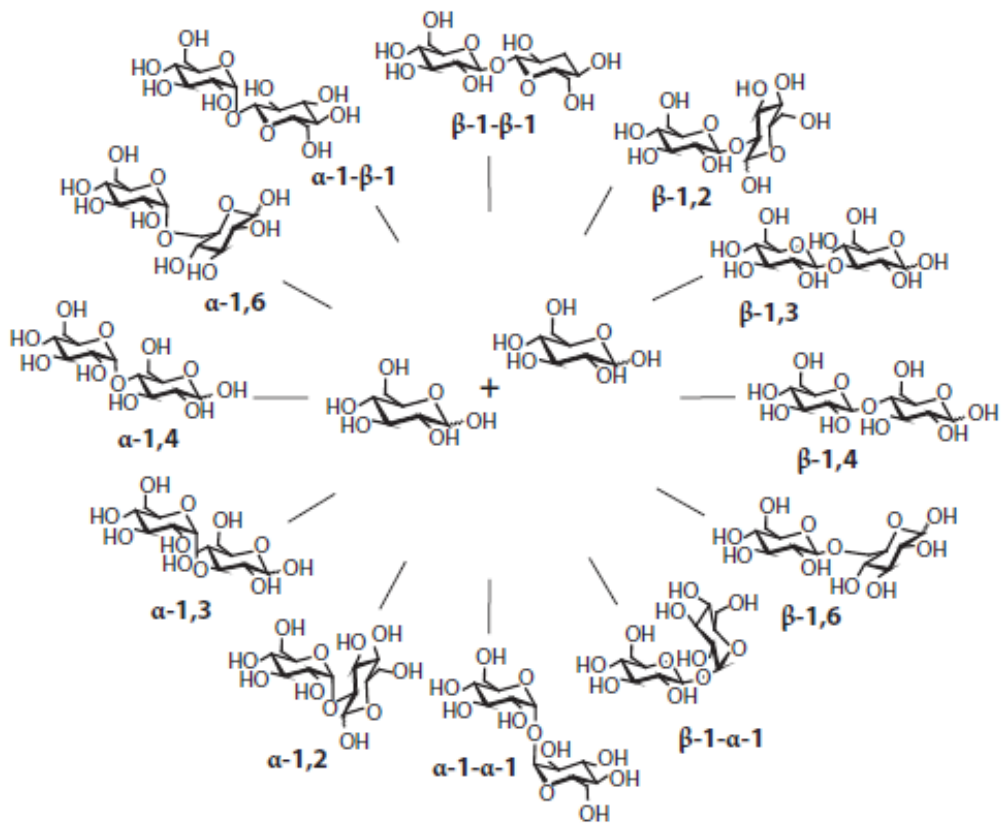
Povezivanjem dva ili više monosaharida nastaju složeni ugljikohidrati, oligosaharidi ili polisaharidi. Monosaharidne jedinice međusobno se spajaju glikozidnim vezama (Slika 4).



Slika 4. Glikozidna veza između dvije glukoze.

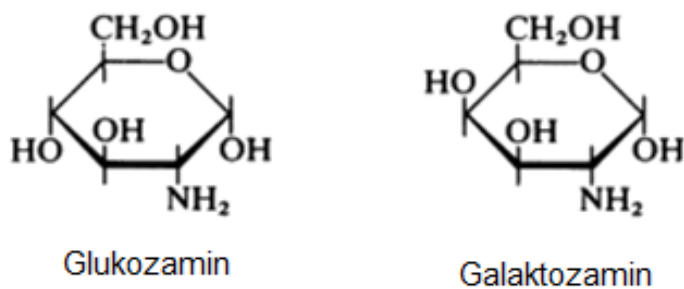
Na slici 4. prikazana je nastala glikozidna veza između dvije glukoze. Veza nastaje između C-1 ugljikova atoma jedne  $\alpha$ -D-glukoze i kisikova atoma hidroksilne skupine vezane na C-4 ugljikov atom susjedne  $\alpha$ -D-glukoze. Nastala glikozidna veza zove se  $\alpha$ -1,4-glikozidna veza. Ovo je samo jedan od primjera nastanka veze između dvije glukoze. Naime, dvije heksoze iste vrste mogu se povezati s pomoću dvije konfiguracije veze ( $\alpha$  ili  $\beta$ ) preko šest mogućih ugljikovih atoma ( $1 \rightarrow 1$ ,  $1 \rightarrow 2$ ,  $1 \rightarrow 3$ ...),

što može rezultirati s 12 različitim disaharida (Slika 5). S različitim monosaharidima i povećanjem duljine polimera, raznolikost se eksponencijalno povećava (Laine 1994). Također je moguća razgranatost na bilo kojoj hidroksilnoj skupini što još više doprinosi raznolikosti polisaharida.



Slika 5. Strukturalno povezivanje monosaharida.

Monosaharidi također mogu sadržavati dodatne funkcionalne skupine (sulfatne, amino, metilne ili acetatne skupine) na jednoj ili više pozicija na različitim monosaharidnim jedinicama (Slika 6).



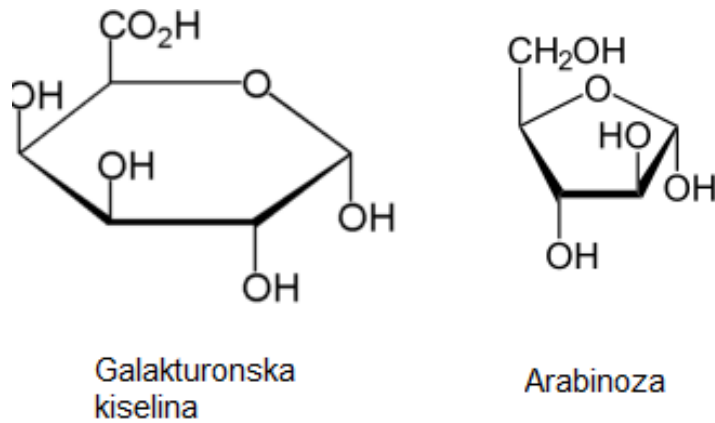
Slika 6. Struktura glukozamina i galaktozamina.

### 2.3. UGLJIKOHIDRATI U MORSKIM EKOSUSTAVIMA

U morskom okolišu većina ugljikohidrata postojeća je u obliku kombiniranih ugljikohidrata (CCHO). Kombinirani ugljikohidrati su linearni ili razgranati polisaharidi koji uključuju heksoze, pentoze, deoksi šećere, amino šećere. Kombinirani ugljikohidrati u morskom ekosustavu dolaze ili kao partikularni kombinirani ugljikohidrati (PCCHO) ili kao otopljeni kombinirani ugljikohidrati (DCCHO).

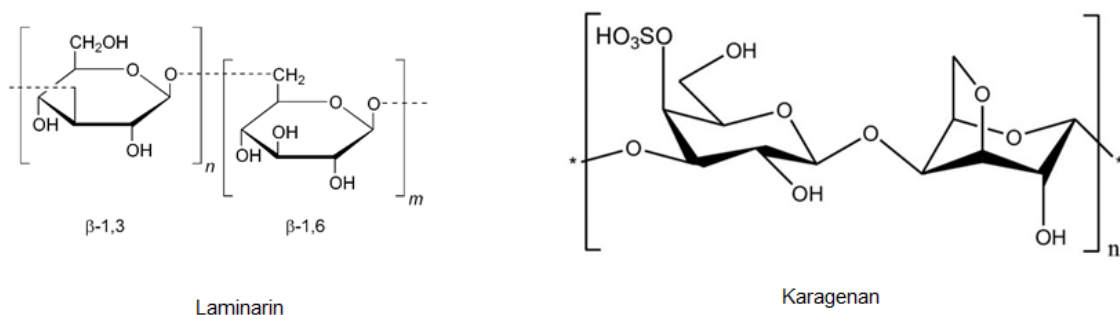
Porijeklo kombiniranih ugljikohidrata u morskom okolišu većinski se pripisuje fitoplanktonu. Fitoplankton se u najpovoljnijim uvjetima naveliko razmnožava i stvara tzv. „cvjetanje“ (engl. bloom) te u tim uvjetima izlučuje velike količine organske tvari (Thornton 2014). Tip organske tvari koji izlučuju fitoplanktoni definiran je kao DOM. Organska tvar sastavljena je od proteina, ugljikohidrata, lipida, pigmenata i nukleinskih kiselina. Čak 37% otopljenog organskog ugljika (DOC, eng. dissolved organic carbon) fitoplanktonskog porijekla sastavljeno je od komponenta velike molekulske mase (HMW), frakcije veće od 1 kDa (Aluwihare i Repeta 1999). HMW-DOC sastavni su dio DOM-a koji osim što planktonski organizmi proizvode oni ga sami i konzumiraju (Amon i Benner 1992). Većinu navedene frakcije (50-70%) čine CCHO koji zbog stalnog otpuštanja od strane fitoplanktona te sporijeg metabolizma od strane heterotrofnih bakterija čine najveći izvor ugljika u oceanima (Benner 2002). Ovaj tip ugljikohidrata definiran je kao DCCHO (Engel i Händel 2011), a osim što nastaju izlučivanjem od strane fitoplanktona nastaju i enzimatskom razgradnjom CCHO-a (Pakulski i Benner 1994). Polovicu izlučenih ugljikohidrata čine neutralni ugljikohidrati (Hama i Yanagi 2001). Rossi i De Philippis (2016) u DCCHO-u su definirali sastav ugljikohidrata od do 10 različitih monomera: glukoza, manoza, fukoza, arabinoza (Slika 7), ksiloza, ramnoza i galaktoza. Sastav ugljikohidrata ovisan je o fitoplanktonu prisutnom u okolišu te o sezoni uzorkovanja morske vode, odnosno DOM-a. Tako je u rano proljeće, s početkom fotosintetske aktivnosti, ili tijekom cvatnje fitoplanktona (Sperling i sur. 2017), najzastupljeniji monomer otkriven u DOM-u bio glukoza. Uz glukozu DOM također uključuje amino-šećere, kao što su galaktozamin i glukozamin, te kisele šećere, kao što su galakturonska kiselina (Slika 7), glukuronska kiselina i muraminska kiselina (Benner i Kaiser 2003, Engel i sur. 2012).





Slika 7. Struktura galakturonske kiseline i arabinoze.

U morskom ekosustavu CCHO sveukupno sastavljaju 20 do 40% suhe tvari planktona i 17% bakterija (Parsons et al. 1984) u kojima se pojavljuju i kao strukturne komponente (Benner and Kaiser 2003) te kao skladišni spojevi (Painter 1983). U makroalgama, polisaharidi kao što su laminarin, karagenan (Slika 8), alginat, fukoidan, agaroz, porfirin i ulvan služe kao strukturni i skladišni spojevi (Mabeau i Kloareg 1987). Strukturni ugljikohidrati najčešće su glukani, koji se uglavnom sastoje od glukoze, ili heteropolisahridi (galaktani) koji se sastoje od galaktoze, manoze i ramnoze (McCarthy i dr. 1996). Raspadom stanica planktonskih vrsta navedeni ugljikohidrati izlučuju se u morski okoliš i definiraju ili kao DCCHO ili kao PCCHO jer čine sastavni dio detritnog DOM-a ili POM-a. Koncentracije PCCHO u POM-u su različite te vrlo ovisne o porijeklu i transportu čestica, mogu činiti 8-10% (Panagiotopoulos i Sempere 2005). Većinu definiranih PCCHO čine neutralni monosaharidi, a uz njih definirani su i o-metil šećeri (monosaharid u kojem je proton hidroksilne skupine zamijenjen metilnom skupinom) te uronske kiseline (Bergamaschi i dr. 1999).



Slika 8. Struktura laminarina i karagenana.

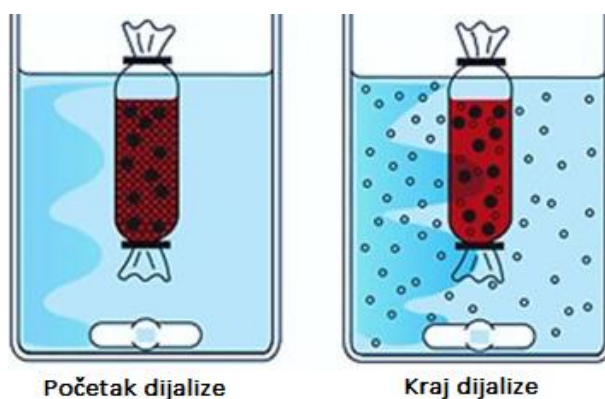
### 3. PRIPREMA UZORKA

Priprema morskog uzorka za kromatografsku analizu zahtjeva prvobitno pročišćavanje, odnosno desalinizaciju uzoraka kako bi se iz njega uklonili visoko koncentrirani ioni koji posreduju prilikom kromatografskog razdvajanja i detekcije (Zeppenfeld i dr. 2020). Za analizu ukupnih ugljikohidrata u uzorku prethodno je potrebno provesti kiselu hidrolizu. Zbog hidrolize omjer koncentracija mono- i polisaharida definira se količinom reducirajućih šećera (šećeri sa slobodnim ugljikom na poziciji 1).

#### 3.1. DESALINIZACIJA

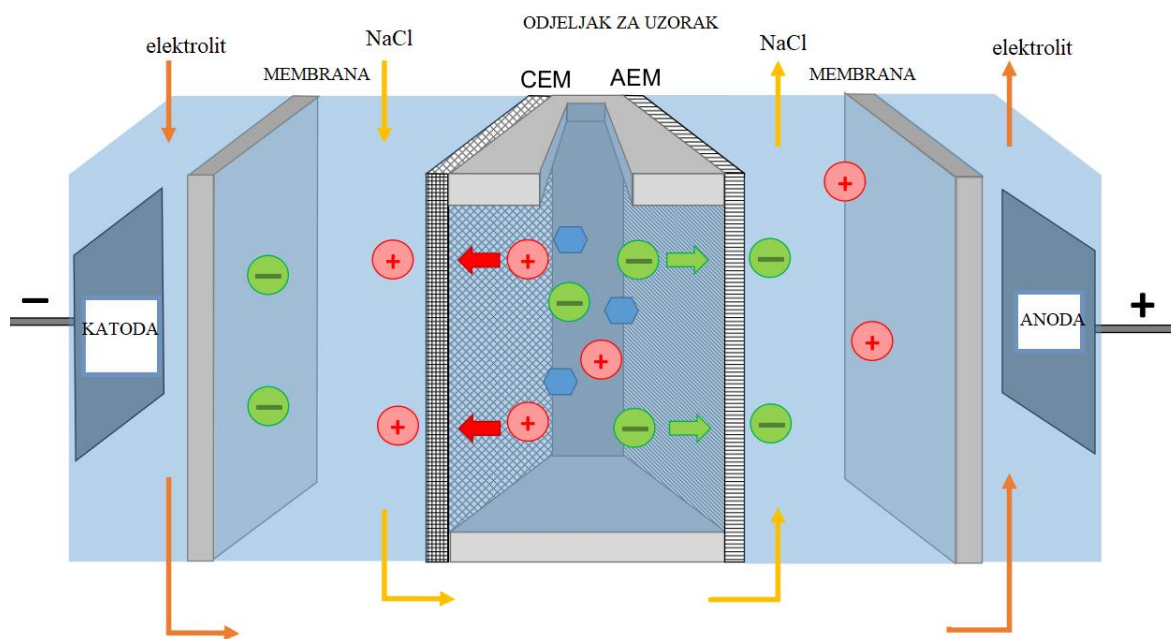
Za desalinizaciju uzoraka predloženi su različiti protokoli koji najčešće za posljedicu imaju gubitke nekih šećera iz morskih uzoraka. Tako se prilikom desalinizacije morske vode upotrebom kationske, odnosno anionske izmjenjivačke smole AG50W-X8, odnosno AG2-X8 u potpunosti iz uzorka uklone nabijeni šećeri, na primjer amino šećeri. Također, su koncentracije izoliranih neutralnih šećera prilično niske (Borch i Kirchman 1997).

Desalinizacija morske vode za analizu HMW ugljikohidrata postiže se membranskom dijalizom koristeći membranu 1kDa MWCO (engl. Molecular weight cut off). Membrana se napuni uzorkom morske vode i čvrsto zatvori na oba kraja. Tako pripremljena membrana stavlja se u MiliQ vodu u čašu i magnetsku miješalicu (Slika 9). Kako bi se spriječio gubitak ugljikohidrata zbog adsorpcije na membrani tokom dijalize, membranska tuba se sonificirana nakon dijalize. Dijaliza se provodi na temperaturi manjoj od 5 °C kako bi se spriječile enzimatske razgradnje ugljikohidrata. Ovo metodom nije moguće detektirati LMW ugljikohidrate koji prolaze kroz membranu tokom dijalize. Ovom metodom izolira se preko 90% HMW ugljikohidrata.



Slika 9. Skica membranske dijalize

Jedan noviji protokol pokazao je elektrodijalizu kao dobar način desalinizacije soli s minimalnim gubitkom čak i otopljenih ugljikohidrata (DCCHO) (Zeppenfeld i dr. 2020). Elektrodijaliza je dijaliza ubrzana električnim djelovanjem. Sastoji se od 3 različita odjeljka, u sredini je odjeljak za uzorak, koji je sa svake strane od drugih odjeljaka odvojen membranom (Slika 10). S jedne strane anionsko izmjenjivačka membrana (od ), s druge strane kationsko izmjenjivačka membrana (od aromatskog polietera sa sulfatnom skupinom). Anionsko izmjenjivačka membrana orijentirana je prema anodi (pozitivnoj elektrodi), a kationsko izmjenjivačka prema katodi (negativnoj anodi). Pod utjecajem električnog polja pozitivni ioni putovat će prema katodi (negativnoj elektrodi), a negativni ioni prema anodi (pozitivnoj elektrodi) čime se ubrzava putovanje iona kroz membranu. Elektrode su odvojene membranama, a kroz odjeljke cirkulira NaCl u koji ulaze ioni iz vode. Te membrane su kationsko izmjenjivačke. Kako bi se izbjegle redoks reakcije elektrode su stavljene u otopinu Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Jakost struje održavana je na 0.6A, a protok soli kroz membranu je proporcionalan s njom.



Slika 10. Skica ED ćelije. Plavi heksagoni predstavljaju ugljikohidrate. CEM i AEM označuju katonsku odnosno anionsku izmjenjivačku membranu (preuzeto iz Zeppenfeld i dr. 2020).

### 3.2. HIDROLIZA

Hidroliza je kemijska reakcija u kojoj dodatkom vode molekuli polisaharida glikozidna veza puca i nastaju oligo- i monosaharidi. Do hidrolize glikozidne veze dolazi i u prisutnosti kiseline i lužine. Prilikom reakcije hidroksidni ion ( $\text{OH}^-$ ) iz vode napada atom ugljika iz glikozidne veze i spaja se s

jednim produktom raspada, a vodikov ion ( $H^+$ ) iz vode spaja s drugim. Pri kiselim hidrolizama hidroksidni ion veže se na atom kisika iz glikozidne veze i tako razdvaja monomerne jedinice. U vodenim ekosustavima, točnije svim živim sustavima, hidrolizu polisaharida potiču enzimi hidrolaze koji kataliziraju hidrolizu (CAZyms).

Za cijepanje polisaharida i kombiniranih ugljikohidrata na monomerne komponente provodi se kiselna hidroliza. Hidroliza se provodi u zatvorenim staklenim ampulama dodatkom klorovodične kiseline u dijalizirane uzorke morske vode na 100 °C. Uglavnom se provodi pri nekoliko različitih koncentracija HCl (0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.8 M, 2 M, 4 M i 8 M) zbog različitog prinosa određenih šećera. Nakon hidrolize provodi se neutralizacija uzorka evaporacijom s  $N_2$  na 50 °C. Izolirani suhi uzorak se resuspendira MiliQ vodom i homogenizira prije unosa u automatski uzorkivač.

#### 4. ANIONSKO-IZMJENJIVAČKA KROMATOGRAFIJA VISOKE UČINKOVITOSTI SA PULSNOM AMPEROMETRIJSKOM DETEKCIJOM (HPAEC-PAD)

HPAEC (anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti) pri visokom pH u kombinaciji s PAD-om (pulsno amperometrijska detekcija) jedna je od novijih najčešće korištenih tehnika za analizu sastava ugljikohidrata za rutinsko praćenje ili istraživačke aplikacije. Kompatibilnost elektrokemijske detekcije s gradijentnim eluiranjem omogućuje odvajanje smjesa jednostavnih šećera i oligo- i polisaharida u visokoj razlučivosti u jednom ciklusu. Ova tehnika ima veliki utjecaj na analizu različitih ugljikohidrata u rasponu od mono-, di- i polisaharida. Analiza izravne detekcije ugljikohidrata prilično je izazovna zbog njihove inherentne visokopolarne strukture i odsutnosti prikladnog kromofora. Ova poboljšana kromatografska tehnika iskorištava slabu kiselu prirodu ugljikohidrata te na visokom pH, pri kojem se djelomično ioniziraju, pomoću jake stacionarne faze s anionskom izmjenom selektivno ih odvaja. U kombinaciji s pulsno amperometrijskom detekcijom (PAD), omogućuje izravnu kvantifikaciju nederivatiziranih ugljikohidrata uz minimalnu pripremu uzorka i čišćenje.

##### 4.1. ANIONSKO-IZMJENJIVAČKA KROMATOGRAFIJA VISOKE UČINKOVITOSTI (HPAEC)

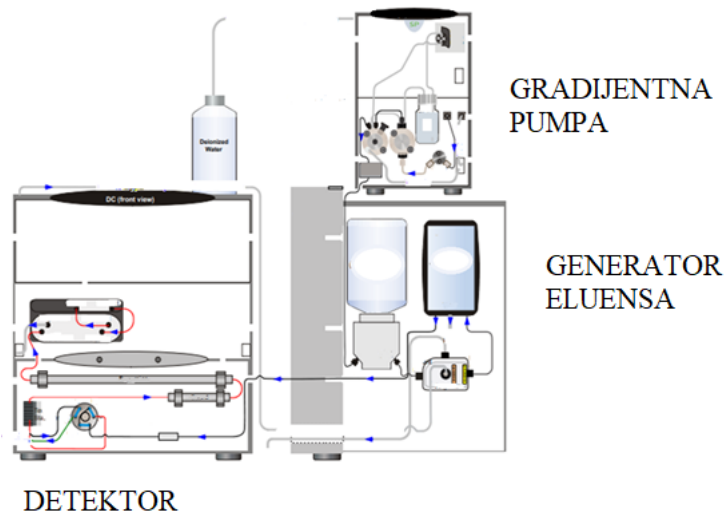
HPAE (Slika 12) metoda je tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti. U tekućim kromatografijama odvajanje se odvija između stacionarne i mobilne faze, odnosno na stupcu sastavljenom od čvrstih čestica kroz koji prolazi otopina s analitičkim uzorcima. Anioni ili kationi u uzorcima prolaze kroz kromatografsku kolonu različitim brzinom zbog različitih interakcija iona između stacionarne faze (kolone) i mobilne faze. Sustavi za ionsku izmjenu kromatografije visoke

učinkovitosti koriste se za odvajanje ioniziranih analita u uvjetima visokog pH, koji putuju različitim brzinama i međusobno se odvajaju.



Slika 12. Anionsko-izmjenjivački kromatograf visoke učinkovitosti (HPAEC).

Sustav HPAEC opremljen je gradijentnom pumpom, generatorom eluensa, termalnim odjeljkom koji kontrolira temperaturu koluna (5-85°C), temperaturno kontroliranim automatskim uzorkivačem, detektorom s kolumnama i elektrokemijskim detektorom (ED) za PAD (Slika 13).



Slika 13. Dijelovi HPAEC.

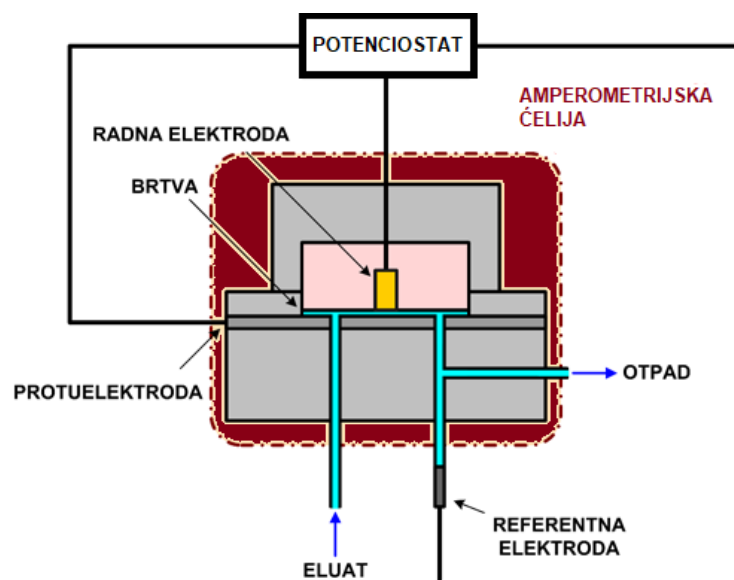
Pripremljene otopine uzoraka prenose se automatskim uzorkivačem. Uzorci, u kojima se nalaze negativno nabijene ionske vrste, pumpaju se kroz kolonu u kojoj se nalaze pozitivno nabijene čestice. Te čestice zadržavaju sve anione u uzorcima. Negativno nabijeni eluat se pumpa kroz kolonu i ioni u eluatu zamjenjuju negativne ione koji su prethodno zadržani. Slaba snaga veze između aniona i smole

u koloni uzrokuje različita vremena zadržavanja za svaki ion; prema tome različiti ioni u jednom uzorku mogu se detektirati redom. Ioni i eluat prolaze kroz set koji neutralizira naboj eluensa. Ioni se detektiraju amperometrijskim detektorom. Signali se snimaju i obrađuju te šalju na računalo.

#### 4.2. PULSNA AMPEROMETRIJSKA DETEKCIJA – PAD

Amperometrija je elektrokemijska metoda pri kojoj je jakost struje proporcionalna koncentraciji određivane tvari koja generira struju.

Amperometrijski detektor je elektrokemijski detektor koji detektira spojeve koji disociraju u otopini, odnosno mobilnoj fazi nakon separacije na ionsko-izmjenjivačkoj koloni. U detektorskoj ćeliji su smještene tri elektrode: radna, referentna i protuelektroda. Između radne i referentne elektrode uspostavi se razlika potencijala zbog čega na površini radne elektrode dolazi do redoks reakcije iona analita. Kao posljedica redoks reakcije nastaje struja elektrona koja se uravnotežuje sa strujom koja u suprotnom smjeru teče na poluektrodi. Jakost struje elektrokemijske reakcije ( $I$ , A) čini signal na detektoru, a potencijal izmjeren na referentnoj elektrodi služi za korekciju uspostavljene razlike potencijala.



Slika 11. Shematski prikaz amperometrijskom detektora (PAD)

Kod pulsne ameprometrijske detekcije primjenjuje se niz od četiri različita potencijala  $E_1, E_2, E_3$  i  $E_4$  u četiri različita vremena  $t_1, t_2, t_3$  i  $t_4$  na radnoj elektrodi u ćeliji detektora. Jakost struje mjeri se samo u određenom vremenskom periodu, odnosno detektiraju se samo oni spojevi koji sadrže funkcionalne

skupine koje se oksidiraju pri korištenom detekcijskom naponu. Prilikom prolaska iona kroz komoricu detektora na površini radne elektrode dolazi do redoks reakcije, a njen produkt zaostaje na elektrodi i tako je onečišćuje. Prvi potencijal E1 primjenjuje se za detekciju jakosti struje nastale oksidacijom ugljikohidrata. Primjenom drugog visoko negativnog potencijala E2 oksidativno se ukloni produkt redoks reakcije, nakon kojeg se primjenjuje pozitivniji potencijal E3 kojim se održava aktivacijski potencijal i na kraju četvrti negativniji potencijal E4 zbog kojeg dolazi do redukcije radne elektrode, odnosno oksida nastalog primjenom E3, što je čini pripremnom za ponovnu upotrebu (Rocklin et al. 1998). Detekcija je osjetljiva i visokoselektivna za elektroaktivne analite jer se puno potencijalno ometajućih analita ne oksidira, odnosno reducira, zbog čega njihova detekcija nije moguća.

#### 4.3. HPAEC-PAD ZA DETEKCIJU UGLJIKOHIDRATA U MORSKOM EKOSUSTAVU

HPAEC-PAD odvaja anione u uvjetima visokog pH. Ugljikohidrati, pri neutralnom pH nenabijeni, obično imaju pKa u rasponu od 12-13, zbog čega se ubrajaju u skupinu slabih kiselina. Kako svaki od ovih spojeva ima različitu pKa vrijednost, tako će imati i različita retencijska vremena i moći će se izdvojiti iz smjese. Povećanjem pH otopine u kojoj su otopljeni ovi spojevi iznad odgovarajućih pripadajućih pKa vrijednosti, ugljikohidrati se ioniziraju u oksianione odnosno imaju ukupni negativan naboj i zbog toga se mogu iz otopine izdvojiti na anionskom izmjenjivaču, koji ima funkcionalne skupine s pozitivnim nabojem (Corradini i sur., 2012). Odvajanje analita, u ovom slučaju ugljikohidrata događa se na spojenim kolonama CarboPac PA10 analitička kolumna (2 x 250 mm) i CarboPac PA10 guard kolonom (2 x 50 mm) građenim od 10 µm polistiren/divinil benzen umreženog pelikularnog substrata aglomeriranog sa 460 nm MicroBead lateksom. Kolone imaju široku pH stabilnost u rasponu 0-14 što omogućuje odvajanje u uvjetima visokog pH. Pomoću toplinskog odjeljka temperatura na kolumnama održava se na 25 °C, pri kojoj se dobiva najbolja rezolucija retencijskih vremena ugljikohidrata na kolumnama (Engel i dr. 2011). Odvajanje ugljikohidrata postiže se u dva koraka, izokratnim eluiranjem mobilne faze kroz kolone nakon koje slijedi gradijentna elucija mobilnih faza. Elucija analita vezanih na funkcionalne skupine kolona postiže se promjenom pH mobilne faze, odnosno dodatkom jake lužine. Tako se za izokratno eluiranje koristi 18 mM NaOH. Za složene ugljikohidrate (kao što su kiseli šećeri), odvajanje se ubrzava i poboljšava korištenjem gradijentnog tijekom dviju mobilnih eluenta, 18 – 100 mM NaOH i 200 mM CH<sub>3</sub>COONa. Na početku elucije koncentracija NaOH u mobilnoj fazi je niska te se s kolone eluiraju slabije vezani spojevi. Daljnjim povećanjem koncentracije NaOH postiže se elucija i spojeva jače vezanih na funkcionalne skupine u koloni. Ovaj princip je osobito važan kod eluiranja monosaharida, koji imaju slične pKa vrijednosti, a čime se postiže veća selektivnost metode odnosno bolje razdvajanje sličnih monosaharida (Corradini i

sur., 2012). Natrijev acetat ima veći afinitet za funkcionalne skupine na stacionarnoj fazi u koloni, koje imaju pozitivan naboj. Kolone se nalaze u detektoru zajedno sa elektrokemijskim detektorom (ED40) za pulsnu amperometrijsku detekciju. ED40 uz poluelektrodu uključuje dvije elektrode, radnu zlatnu i pH referentnu Ag/AgCl. Na radnu elektrodu primjenjuje se serija potencijala valnog oblika 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)) pri visokom pH, što rezultira oksidacijom analita vezanih za površinu radne elektrode. Potencijal E1 smatra se najvažnijim pošto se kod tog potencijala mjeri jakost struje nastale oksidacijom ugljikohidrata koja je izravno povezana koncentracijom analita. Elektroni iz ovog oksidacijskog toka teku do radne elektrode i taj tok (tj. struja) se integriraju tijekom određenog vremenskog razdoblja kako bi se stvorio naboj. Ovaj naboj je prikazan u zavisnosti od vremena da bi se dobio kromatogram. Niz potencijala, svaki primijenjen na diskretno vremensko razdoblje, je valni oblik, a korištenje valnog oblika čini PAD za detekciju. PAD otkriva samo spojeve koji sadrže funkcionalne skupine koje se mogu oksidirati na naponu detekcije. Detekcija je osjetljiva i visoko selektivna za elektroaktivne vrste, budući da se mnoge potencijalno ometajuće vrste ne mogu oksidirati ili reducirati, pa se stoga ne detektiraju.

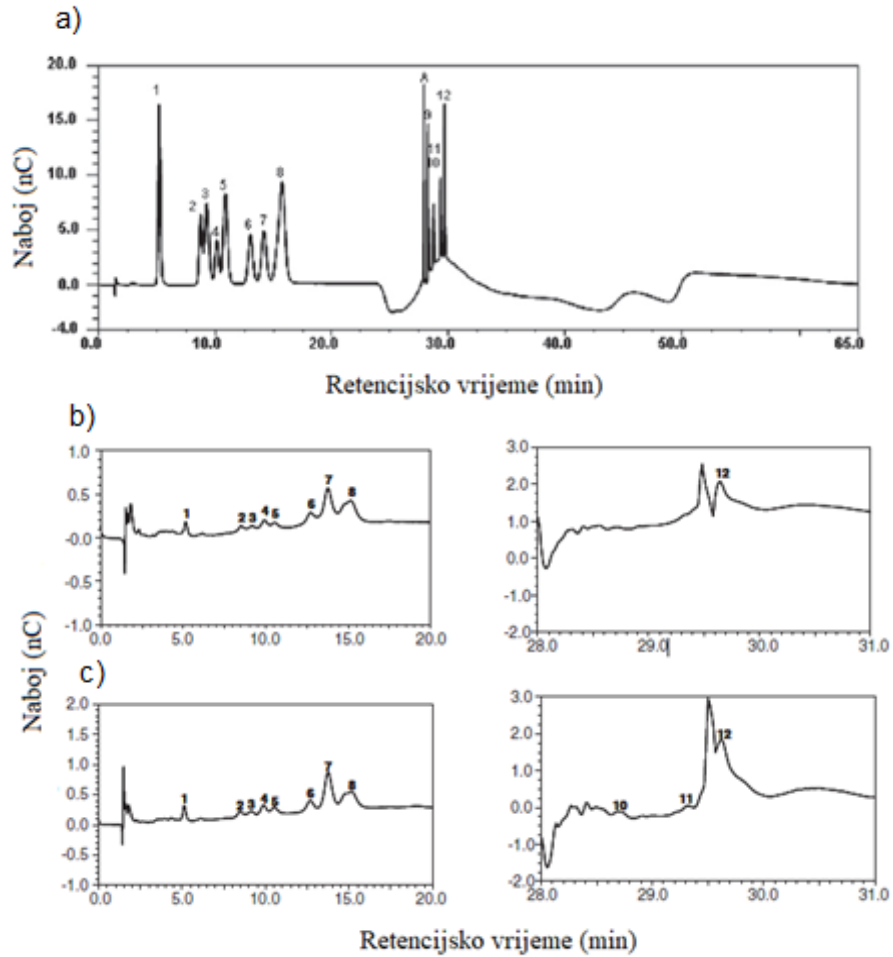
Kroz sustav se u svrhu kalibracije prvo propušta otopina standardnih šećera. Otopina u sebi sadrži prethodno određene monosaharide u okolišu: fukoza, ramnoza, galaktozamin, arabinosa, glukozamin, galaktoza, glukoza, ksiloza/manoza, glukonska kiselina, muraminska kiselina, galakturonska kiselina i glukouronska kiselina. Nakon čega se u sustav stavljaju uzorci iz okoliša. Sama izvedba kromatografskog razdvajanja između dva monosaharida može se opisati rezolucijskim faktorom ( $R_s$ ):

$$R_s = 2 \frac{t_{Ri-1} - t_{Ri}}{w_{i-1} - w_i}$$

Gdje su  $t_{Ri-1}$  i  $t_{Ri}$  retencijska vremena šećera (i) i prethodnog šećera (i-1), a  $w_{i-1}$  i  $w_i$  širine pikova. Primjer kromatograma dobivenog razdvajanjem otopine standardnih šećera, te PCCHO i DCCHO iz uzoraka morske vode prikazani su na slici 14.

Iz nehidroliziranih uzoraka odredi se količina monosaharida, a koncentracija DCCHO odredi se oduzimanje dobivene količine monosaharida oduzimanjem od koncentracije tCCHO. Ostatak se pridružuje koncentraciji PCCHO.





Slika 14. Primjer kromatograma ugljikohidrata detektiranih HPAEC-PAD. a) cijeli kromatogram otopine standardnih različitih šećera. b) kromatogram DCCHO iz uzorka mora. c) kromatogram tCCHO. Identifikacija: 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 Ksilaza/Manoza, 9 Glukonska kiselina, 10 Muraminska kiselina, 11 Galakturonska kiselina, 12 Glukouronska kiselina.

## 5. ZAKLJUČAK

HPAEC-PAD metoda pokazala se kao najbolja metoda za detekciju ugljikohidrata u morskim sustavima. Zbog visoke razlučivosti odvajanja HPAE metodom moguće je odvojiti ugljikohidrate koje se drugim metodama ne mogu odvojiti. PAD zbog osjetljive metode detekcije lako kvantificira vrlo malo koncentracije ugljikohidrata (pmol), a istovremeno ne detektira spojeve s neutralnim ili pozitivnim nabojem. Visoka razlučivost i osjetljivost postiže se bez prethodne derivatizacije ugljikohidrata zbog čega se metoda HPAE-PAD primjenjuje na različite vrste ugljikohidrata u raznolikim vrstama uzoraka. Tako se osim za analizu iz okolišnih uzoraka koristi i za analizu ugljikohidrata u biljkama i prehrambenim proizvodima. Iako nije potrebna derivatizacija svejedno je potrebno uzorke desalinizirati te hidrolizirati na monosaharide. Oba koraka čine ključni dio analize ugljikohidrata stoga se vrlo oprezno treba odrediti protokol pripreme uzorka. Membranska dijaliza pokazala se kao jednostavna i brza metoda za desalinizaciju HMW-ugljikohidrata i iz uzorka se ne gube kiseli šećeri. Metoda analize šećera u morskom ekosustavu koja uključuje membransku dijalizu i HPAEC-PAD omogućuje 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.

## 6. LITERATURA

1. Amon, R.M.W., Benner, R. (1992): Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature* 369, 549–552.
2. Aluwihare L.I., Repeta D.J. (1999): A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produced by marine algae, *Marine Ecology Progress Series*, 186: 105-117
3. Benner, R. (2002): Chemical composition and reactivity. In: Hansell, D., Carlson, C.A. (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press.
4. Benner, R., and Kaiser, K. (2003): Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr.* 48: 118– 128.
5. Borch N.H., Kirchman, D.L. (1997): Concentration and composition of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in seawater determined by HPLC-PAD, *Marine Chemistry*, Volume 57, Issues 1–2, 85-95, [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00002-9).
6. Corradini C., Cavazza A., Bignardi C. (2012) High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*: 1-13.
7. Dwek R.A. (1996): Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars *Chemical Reviews* 96 (2): 683-720, DOI: 10.1021/cr940283b
8. Engel, A., Harlay, J., Piontek, J., and Chou, L. (2012): Contribution of combined carbohydrates to dissolved and particulate organic carbon after the spring bloom in the northern Bay of Biscay (north-eastern Atlantic Ocean). *Cont Shelf Res.* 45: 42– 53.
9. Hayakawa, K. (2004): Seasonal variations and dynamics of dissolved carbohydrates in Lake Biwa, *Organic Geochemistry*, Volume 35, Issue 2, 169-179, <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2003.09.002>.
10. Jiao, N., Herndl, G., Hansell, D. et al. (2010): Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Microbiol* 8: 593–599 <https://doi.org/10.1038/nrmicro2386>
11. Jørgensen N.O.G., Jensen R.E. (1994): Microbial fluxes of free monosaccharides and total carbohydrates in freshwater determined by PAD-HPLC, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 14, Issue 1, Pages 79–93, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00093.x>
12. Hama T., Yanagi K. (2001): Production and neutral aldose composition of dissolved carbohydrates excreted by natural marine phytoplankton populations, *Limnol. Oceanogr.*,46(8), 1945–1955
13. Kaiser, K., Benner, R. (2000): Determination of Amino Sugars in Environmental Samples with High Salt Content by High-Performance Anion-Exchange Chromatography and Pulsed Amperometric Detection, *Analytical Chemistry* 72 (11): 2566-2572, DOI: 10.1021/ac991407t
14. Kharbush J.J., Close H.G., Van Mooy B.A. S., Arnosti C., Smittenberg Rienk H., Le Moigne (2020): Particulate Organic Carbon Deconstructed: Molecular and Chemical Composition of Particulate Organic Carbon in the Ocean, *Frontiers in Marine Science*, 7: 2296-7745, 10.3389/fmars.2020.00518.
15. Kirchman, D. L., Meon, B., Ducklow, H. W., Carlson, C. A., Hansell, D. A., and Steward, G. F. (2001): Glucose fluxes and concentrations of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in the Ross Sea and polar front zone, Antarctica. *Deep Res Part II Top Stud Oceanogr.* 48: 4179– 4197.
16. Lee, Y. C. (1990) *Anal. Biochem.* 189, 151–162.
17. Mabeau S., Kloareg B. (1987): Isolation and Analysis of the Cell Walls of Brown Algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*, *Journal of Experimental Botany*, Volume 38, Issue 9, Pages 1573–1580, <https://doi.org/10.1093/jxb/38.9.1573>

18. McCarthy, M., Hedges, J., and Benner, R. (1996): Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater, *Mar. Chem.*, 55, 281–297, [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(96\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(96)00041-2).
19. Pakulski, J. D. and Benner, R. (1994): Abundance and distribution of carbohydrates in the ocean, *Limnol. Oceanogr.*, 39, 930–940.
20. Painter T.J. (1983): Algal Polysaccharides in Aspinall G.O. (ed.): *The Polysaccharides*, Academic Press, Pages 195-285, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-065602-8.50009-1>.
21. Panagiotopoulos, C. and Sempéré, R. (2005): Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions, *Limnol. Oceanogr. Meth.*, 3, 419–454, <https://doi.org/10.4319/lom.2005.3.419>.
22. Parsons, T. R., Malta, Y. & Lalli, C. M. (1984): *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press, London.
23. Rocklin R.D., Clarke A.P., Weitzhandler M. (1998): Improved Long-Term Reproducibility for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates via a New Quadruple-Potential Waveform, *Anal. Chem.* 70, 8, 1496–1501, <https://doi.org/10.1021/ac970906w>
24. Rossi, F., and De Philippis, R. (2016): Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis . In *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology 6*, M. Borowitzka, J. Beardall, and J. Raven (eds). New York, NY: Springer.
25. Sperling, M., Piontek, J., Engel, A., Wiltshire, K. H., Niggemann, J., Gerds, G., *et al.* (2017): Combined carbohydrates support rich communities of particle-associated marine Bacterioplankton. *Front Microbiol.* 8: 65.
26. Suttle, C. (2007): Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol* 5, 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
27. Thornton, D. C. O. (2014) Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean. *Eur J Phycol.* 49: 20– 46.
28. Zeppenfeld, S., van Oinxteren M, Engel, A., Herrmann, H. (2020) A protocol for quantifying mono- and polysaccharides in seawater and related saline matrices by electro-dialysis (ED) – combined with HPAEC-PAD. *Ocean Sci.* 16, 817-830.