

# PRIMJENA ELEKTROKEMIJSKE METODE U ANALIZI POLISAHARIDA U MORSKOJ VODI

**dr. sc. Marta Plavšić**

Zavod za istraživanje mora i okoliša,  
Institut Ruđer Bošković  
(vanjski suradnik),  
Bijenička c. 54, 10 000 Zagreb  
marta.plavsic@irb.hr

**dr. sc. Slađana Strmečki Kos**

Zavod za istraživanje mora i okoliša,  
Institut Ruđer Bošković,  
Bijenička c. 54, 10 000 Zagreb

U ovom je radu opisana primjena brze i osjetljive elektrokemijske metode kronopotencimetrije s konstantnom pobudnom strujom (CPS) koja se do sada nije primjenjivala za analizu prirodnih voda i koja je omogućila detekciju polisaharida (PS) u morskoj vodi mjerenjem katalitičkog vala vodika. Elektroanaliza PS u moru bila je ograničena, jer su PS elektroinaktivne molekule. CPS metoda elektroanalize omogućuje određivanje i drugih polimernih organskih spojeva koji imaju katalitički aktivne grupe, a koje omogućuju razvijanje katalitičkog vala vodika iz kojeg se određuje količina tog polimernog organskog materijala. Ustanovljeno je da je povećana biološka aktivnost u moru povezana sa povećanom količinom PS i drugih katalitički aktivnih spojeva. Prilagodбом uvjeta elektroanalize, metoda se može primijeniti i na detekciju PS i drugih polimernih organskih spojeva u ekstraktima ljekovitih biljaka i izlučevinama morskih alga, te u nekim napitcima.

**Ključne riječi:** polisaharidi, polimerni materijal, morska voda, elektrokemijske metode

## 1. UVOD

Polisaharidi (PS) su vrlo zastupljeni i reaktivni organski spojevi u otopljenoj organskoj tvari u moru. Elektroanaliza PS u moru bila je ograničena, jer su PS elektroinaktivne molekule. Primjena brze i osjetljive elektrokemijske metode kronopotencimetrije s konstantnom pobudnom strujom (CPS), koja se do sada nije primjenjivala za analizu prirodnih voda, omogućuje detekciju katalitičkog «pika H» u morskoj vodi kao posljedicu redukcije vodikovih iona na katalizatoru adsorbiranom na živinoj elektrodi. Pokazalo se da ti katalizatori mogu biti i PS s prisutnim katalitički aktivnim grupama. Osim za određivanje PS u morskoj vodi ta se elektrokemijska metoda može primijeniti i za određivanje polimernog organskog materijala koji sadrži atome dušika (N-POM) (Plavšić i sur., 2010.).

Katalitički aktivan polimeran organski materijal koji sadrži dušik (N-POM) može se u morskoj vodi detektirati tehnikom *in situ* CPS, dok se katalitički aktivni PS (koji sadrže karboksilnu i/ili sulfatnu skupinu) mogu u morskoj vodi detektirati samo *ex situ* tehnikom adsorptivnog prijenosa (engl. *adsorptive transfer chronopotentiometric stripping*, AdT CPS). Koncentracije prisutnog N-POM i katalitički aktivnih PS u morskim uzorcima mogu se izraziti preko kalibracijskih pravaca u  $\text{mg dm}^{-3}$  ekv. modelnog N-POM - proteina albumina ljudskog seruma (HSA), odnosno modelnog PS, ksantana (Plavšić i sur. 2010.; Plavšić i Strmečki, 2016.).

Ugljikohidrati (engl. *carbohydrates*, CHO) kojih su dio i PS, su uz proteine i nukleinske kiseline osnovne makromolekule u živim bićima. Na staničnom nivou imaju ulogu strukturne komponente, pričuvne energije

te međustanične komunikacije. U moru su zastupljeni od površinskog mikrosloja (Hunter i sur., 1981.) do sedimenta (Keherve i sur., 2002.). Stvaraju se u reakcijama fotosinteze i u moru su najvećim dijelom prisutni kao produkt primarne produkcije. Imaju važnu ulogu u biogeokemijskom kruženju elemenata ugljika, vodika, kisika, te sumpora i dušika. Zbog negativnih funkcionalnih skupina mogu stvarati komplekse s kationima metala i utjecati na njihovu biodostupnost i toksičnost (Buffle, 1988.). PS s visokim udjelom negativno nabijenih skupina su u moru identificirani kao glavna komponenta prozirnih izvanstaničnih čestica (engl. *transparent exopolymeric particles*, TEP) (Passow, 2002.) i sluzavih makroagregata (Giani i sur., 2005.). Makroagregati mogu pri povećanom stvaranju prekriti veliku površinu mora i zauzeti veliki volumen vodenog stupca te nepovoljno utjecati na ribarstvo i turističke djelatnosti.

Dosadašnje metode analize CHO u morskoj vodi uključivale su prije same analize izolaciju CHO od ostalih organskih molekula u morskoj vodi, koncentriranje, te ako je analitička metoda to zahtijevala i odvajanje soli. Najefikasnija ekstrakcija CHO je kiselim ili enzimskom hidrolizom (Panagiotopoulos i Sempere, 2005.). Količina hidroliziranih monosaharida ovisi o vrsti i jakosti kiseline, trajanju i temperaturi hidrolize, ali i kemijskim svojstvima polisaharida. Primjenom slabijih kiselina određuje se koncentracija monosaharida, a s jakom kiselinom koncentracija ukupnih CHO (monosaharida i polisaharida). Koncentracija polisaharida se određuje indirektno iz njihove razlike. Detekcija monosaharida nije specifična, jer oni u strukturi nemaju kromoforne skupine koje apsorbiraju zračenje pa je prije detekcije potrebna derivatizacija molekula. Ukupna količina CHO u moru određuje se spektrofotometrijskim ili spektrofluorometrijskim metodama. Spektrometrijska detekcija CHO se temelji na apsorpciji VIS ili UV zračenja derivatiziranih molekula CHO s kromogenom, odnosno emisiji zračenja molekula CHO s fluorogenom grupom.

Elektrokemijska istraživanja polisaharida u moru su do sada bila fokusirana na istraživanja njihovih adsorpcijskih svojstava na modelnim granicama faza (Plavšić i sur., 1997.; Plavšić i Čosović, 1998.; Plavšić i Čosović, 2000.). Najveća prednost elektrokemijske analize u morskoj vodi pred ostalim analitičkim metodama je to što je morska voda prirodni elektrolit.

### 1.1. Ugljikohidrati u sjevernom dijelu Jadranskog mora

Koncentracija CHO u moru plitkog (< 35 m) sjevernog dijela Jadranskog mora duž transektu delta rijeke Po – grad Rovinj mijenja se ovisno o sezoni, dubini i postaji (Terzić i Ahel, 1998.; Ahel i sur., 2005.; Tepić i sur., 2009.). Koncentracija ukupnih CHO varira u rasponu od 70 do 1300  $\mu\text{g C dm}^{-3}$ , što čini oko (84 $\pm$ 10) % otopljenog organskog ugljika (engl.

*dissolved organic carbon*, DOC). Polisaharidi čine veći dio (do 92 %), dok monosaharidi samo manji dio CHO. U zapadnim postajama tog područja, koje su pod direktnim utjecajem hranjivih soli donešenih rijekom Po, koncentracija otopljenih CHO u površinskom sloju je za 20 % veća nego u istočnim postajama, dok u dubljim slojevima razlika nije značajna.

Povećana koncentracija izvanstaničnih polisaharida u moru jedan je od preduvjeta za stvaranje „morskog snijega“ te pojave sluzavih makroagregata. Makroagregati su najvećim dijelom građeni od organske komponente (srednja vrijednost je 54 %). Najveći dio organske komponente čine heteropolisaharidi na koje su esterskim i amidnim vezama vezani alifatski dijelovi, a manji udio čine proteini, lipidi i humusna tvar (Mecozzi i sur., 2002.). Ostatak makroagregata čini anorganska komponenta u kojoj najveći udio čini biogeni silicij (29 $\pm$ 18) % (Kovač i sur., 2004.; Degobbis i sur., 1999.). Općenito se smatra da makroagregati nastaju kao posljedica sinergističkog efekta biogeokemijskih, fizikalnih te meteoroloških procesa (Precali i sur., 2005.). Pojava makroagregata (Giani i sur., 2012.) bila je vrlo učestala posljednjih dvadesetak godina 20. stoljeća tijekom stratifikacije vodenog stupca u sezonama proljeće/ljeto u sjevernom dijelu Jadranskog mora (slike 1a i 1b). Najintenzivniji periodi stvaranja agregata u sjevernom dijelu Jadranskog mora bili su uočeni prije 2004. godine, dok je u periodu od 2005. do 2010. zbog smanjenja dotoka slatke vode rijekom Po i ostalih klimatskih čimbenika uočeno smanjenje frekvencije pojave makroagregata (Marić i sur., 2012. Urbani i sur., 2005.). Povećanje koncentracije hranjivih soli pogoduje intenzivnijoj primarnoj produkciji u fotičkoj zoni, a time i intenzivnom izlučivanju polisaharida (Radić i sur., 2011.). Kritična koncentracija CHO potrebna za formiranje sluzavih makroagregata procijenjena je na 40  $\mu\text{mol C dm}^{-3}$  (Ahel i sur., 2005.) Za unakrsno povezivanje polisaharida su, uz ione  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , važne i vodikove veze, jer omogućavaju nastajanje spiralnih

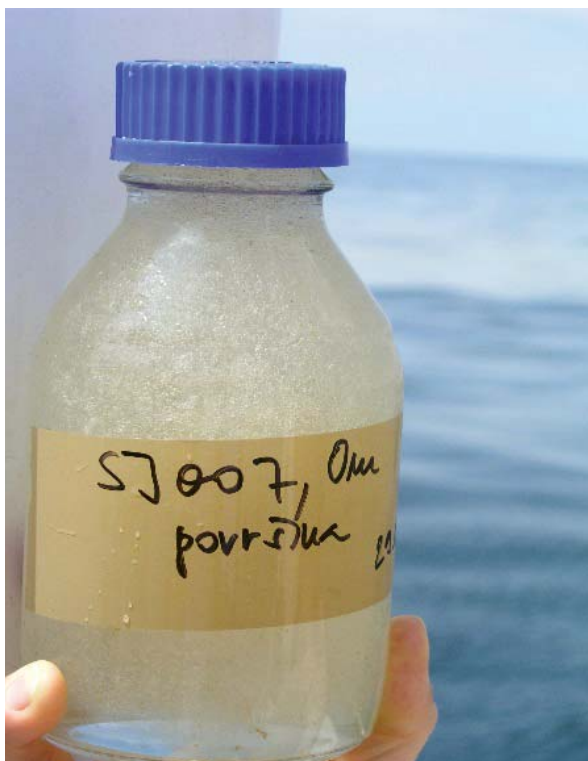


Slika 1a: Sluzavi makroagregati – «cvjetanje mora» u Sjevernom Jadranu

struktura što ima kao posljedicu stvaranje gela (Radić i sur., 2005.; Pletikapić i sur., 2014.).

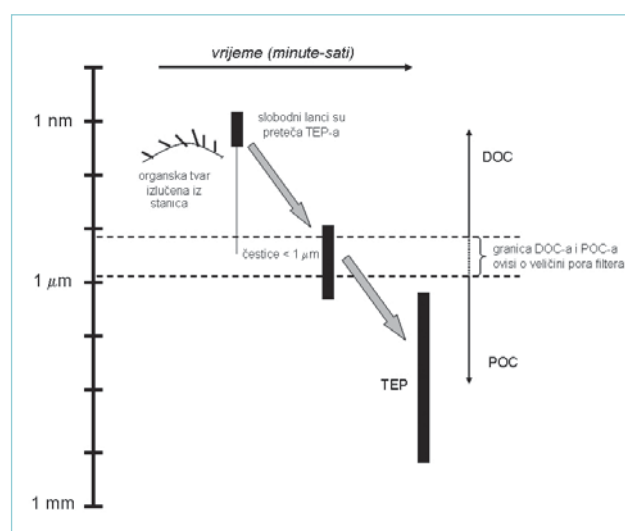
## 1.2. Prozirne izvanstanične čestice

Drugi, isto tako važan oblik pojave organske tvari u morskoj vodi u vidu makroagregata predstavljaju prozirne izvanstanične polimerne čestice (engl. *transparent exopolymeric particles, TEP*) koje su dio izvanstanične polimerne tvari (engl. *extracellular polymeric substance, EPS*). TEP postoje kao individualne čestice nevezane za stanice. Po kemijskom sastavu TEP su najvećim dijelom PS s negativno nabijenim skupinama kao što su sulfatna i karboksilna skupina (Passow, 2002.). Takav sastav omogućuje njihovu vizualizaciju bojanjem s Alcian plavom bojom, pri čemu nastaje talog koji je temelj kvantitativnog određivanja mikroskopijom ili spektrofotometrijom. Mikroskopsko određivanje TEP-a uključuje brojanje obojenih čestica da bi dobili njihovu brojčanu zastupljenost i veličinu iz kojih se može predvidjeti ukupna površina i/ili ukupan volumen (Passow, 2002.). Spektrofotometrijsko određivanje TEP-a se temelji na mjerenju apsorbancije taloga ili eluata nakon odvajanja obojenog taloga kiselih polisaharida (Thorton i sur., 2007.). Rezultati se izražavaju preko kalibracijskog pravca kao ekvivalenti koncentracije modelnog polisaharida ksantana ili alginske kiseline. Spektrofotometrijska metoda je preciznija od mikroskopije pa se primjenjuje u rutinskim mjerenjima da bi saznali zastupljenost i distribuciju TEP-a u vodenom okolišu.



Slika 1b: Uzorak morske vode s agregatima

TEP karakterizira visok C/N odnos te fizikalna svojstva polimernog gela – fleksibilnost i ljepljivost. Formiraju se abiotičkim spontanom procesom iz fitoplanktonskih izlučevina koje su dio DOC-a, a time su i jedan od međuprodukata u stvaranju POC-a (engl. *particulate organic matter*) (slika 2). Dimenzije TEP-a variraju od koloidnih do milimetarskih. Polimerna želatinozna organska tvar koja čini TEP veže zajedno različite stanice, anorganske čestice, fekalne grudice, dijelove zooplanktona, detritus i vodu. Zbog velikog afiniteta anorganske i druge organske tvari prema površinski aktivnim kiselim polisaharidima, TEP imaju važnu ulogu u hranidbenom lancu, biogeokemijskom kruženju elemenata, procesima agregacije i sedimentacije.



Slika 2: Abiotičko stvaranje TEP-a iz DOC-a te povezivanje DOC-a s POC-om (prema Passow, 2002.)

Zastupljenost TEP-a varira u rasponu (1 – 8 000) čestica  $\text{cm}^{-3}$  ( $> 5 \mu\text{m}$ ) i (3 000 – 40 000) čestica  $\text{cm}^{-3}$  ( $> 2 \mu\text{m}$ ) (Passow, 2002). Najviše koncentracije TEP-a povezane su s cvatom fitoplanktona (11 000  $\mu\text{g dm}^{-3}$  ekv. ksantana) i makroalgama. Više koncentracije su nađene u fotičkoj zoni te u priobalnom području. Tako su vrlo visoke koncentracije TEP-a (više od 1 000  $\mu\text{g dm}^{-3}$  ekv. ksantana) zabilježene za vrijeme proljetne produkcije organske tvari i u sjevernom dijelu Jadranskog mora (Radić i sur., 2005.).

## 2. METODA KRONOPOTENCIOMETRIJE S KONSTANTNOM STRUJOM (CPS) U ANALIZI ORGANSKE TVARI U MORSKOJ VODI

Tomschik i suradnici su 1998. godine u analizi peptida prvi puta primijenili metodu derivacijske kronopotencijometrije s konstantnom strujom kao pobudnim signalom (engl. *constant current derivative stripping chronopotentiometry* ili *chronopotentiometric*

*stripping*, CPS). Dobiven je dobro definiran prednatrijev katalitički pik vodika nazvan „pik H“ koji je tako nazvan zbog povijesnih razloga (J. Heyrovsky – dobitnik Nobelove nagrade 1959. g. za otkriće i primjenu elektrokemijske – polarografske metode, *Hydrogen evolution* i *High sensitivity*). U odnosu na polarografiju i kasnije korištene voltametrijske pulsne metode, CPS se pokazala znatno osjetljivijom i bržom metodom, omogućujući određivanje nanomolarnih (Tomschik i sur., 1998.) i femtomolarnih (Kizek i sur., 2001.) koncentracija peptida. Molekula prednatrijevog katalizatora za katalitički val vodika je organska molekula koja ima katalitički aktivan atom dušika, kisika, sumpora ili fosfora koji nosi proton labilan u elektrodnom procesu (Heyrovsky, 2006.). Sudjelovanje tih atoma u katalizi ovisi o njihovoj ionizaciji i orijentaciji na površini elektrode.

## 2.2. *In situ* CPS u morskoj vodi

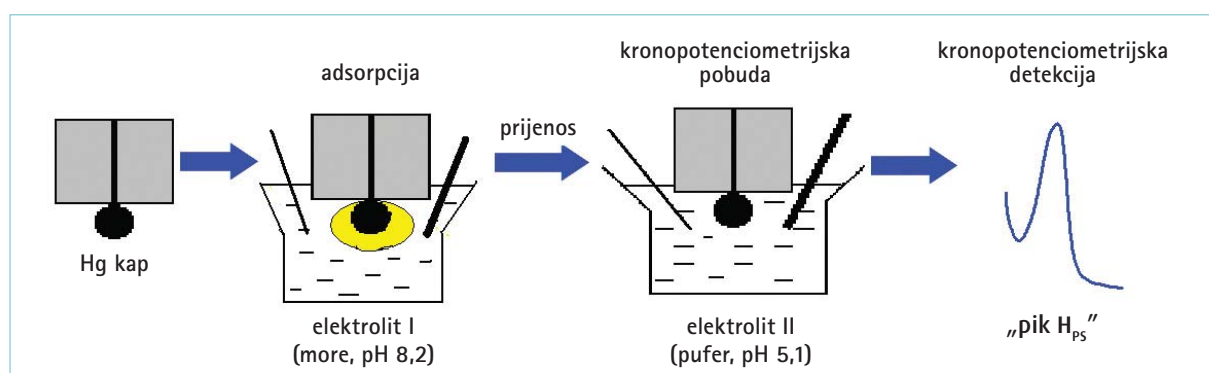
U analizi organske tvari u morskoj vodi moguće je primijeniti *in situ* analizu CPS. Ustanovljeno je da se tom tehnikom kod pH=8.2 određuje polimerni organski materijal koji sadrži atome dušika (N-POM). Zbog veće površinske aktivnosti polimera nego monomera na živinoj elektrodi (Čosović, 1985.), što je uvjet za katalitičku aktivnost, smatra se da uočena katalitička aktivnost potječe od polimernog materijala. U fitoplanktonskoj kulturi *Skeletonema costatum* dobiven je katalitički val koji je analogan katalitičkom piku H puferskih otopina peptida i proteina (Mader i sur., 2001.). U uzorcima morske vode metodom CPS, također je detektiran katalitički pik, pa je cilj bio odrediti koncentraciju te organske tvari s katalitičkim skupinama. Zbog toga je bilo potrebno naći modelni organski polimer, za čiju detekciju bi u navedenim uvjetima metoda CPS bila dovoljno osjetljiva. Kako su tijekom cvjetanja fitoplanktona *Skeletonema costatum* identificirani ligandi slični proteinima (Lorenzo i sur., 2007.), kao modelni katalizator je odabran protein ljudski serum albumin (HSA) s visokim udjelom dušika (15,7 %). Dobiven katalitički pik je posljedica prisutnosti N atoma smještenih u aminokiselinskom ostatku u HSA.

## 2.3. *Ex situ* (AdT) CPS u morskoj vodi

Uspješna primjena metode CPS u detekciji pika H modelnih polisaharida sa sulfatnim skupinama u acetatom puferiranoj otopini natrijevog klorida (NaCl) pri pH 5,4 bila je preduvjet za razvoj postupka za analizu polisaharida u morskoj vodi (Strmečki i Plavšić, 2012.). U morskoj je vodi njihov pik H moguće detektirati samo uz upotrebu *ex situ* tehnike adsorptivnog prijenosa (AdT) prije primjene CPS pobudnog signala (AdT CPS). AdT CPS obuhvaća minimalno tri koraka: adsorpciju analita iz morske vode na površinu elektrode, prijenos adsorpcijom modificirane elektrode u pufersku otopinu, te CPS pobudu i detekciju u puferskoj otopini (slika 3). Od modelnih polisaharida koji pokazuju AdT CPS katalitičku aktivnost, ksantan se pokazao kao najprikladniji modelni, kalibracijski polisaharid. Ksantan ima najnižu granicu detekcije (engl. limit of detection, LOD) ( $LOD = 3,2 \text{ mg dm}^{-3}$ ), a njegov pik H visinom i potencijalom vrha pika ( $E_p \sim -1,7 \text{ V}$ ) odgovara piku H u mjenjenim uzorcima iz sjevernog Jadrana.

## 3. REZULTATI I DISKUSIJA

Koncentracija N-polimernog organskog materijala (N-POM) (mjerena s CPS *in situ*) tijekom sezona u uzorcima morske vode iz postaja ST101 u sjevernom Jadranu (geografska dužina: 12.830°I; geografska širina: 44.997°S) izražena je u  $\mu\text{g dm}^{-3}$  ekv. modelnog polimera proteina HSA (tablica 1). Maksimalna koncentracija N-POM ( $71 \mu\text{g dm}^{-3}$  eq. HSA) izmjerena je u sezoni 2008./2009. i to u proljeće/ljeto 2009. g. u površinskim uzorcima. U pridnenom sloju pik H nije detektiran niti nakon dužih vremena akumulacije ( $t_a$  300 s). Razlog tome je što se primarnom produkcijom proizvedena i izlučena organska tvar zadržava neko vrijeme u površinskom sloju. Naime, u proljeće dolazi do unosa hranjivih soli rijekom Po nakon otapanja snijega u Alpama i proljetnih kiša, površinski sloj mora se zagrijava, a vodeni stupac stratificira, što dovodi do intenzivnije primarne produkcije u fotičkoj zoni. U sezoni 2011./2012. najviše vrijednosti N-POM-a su



Slika 3: Grafički prikaz tehnike adsorptivnog prijenosa za određivanje PS u morskoj vodi

Tablica 1: Koncentracije katalitički aktivnih spojeva (N-POM i PS) u uzorcima iz Sjevernog Jadrana

DATUM UZORKOVANJA	DUBINA/ m	N-POM $\mu\text{g dm}^{-3}$ eq. HSA LOD $2,8 \mu\text{g dm}^{-3}$	CAC $\text{mg dm}^{-3}$ eq. ksantan LOD $5,4 \text{ mg dm}^{-3}$
19.05.2011.	0,5	10,2±0,9	>50,0
	~31	<LOD	12,6±2,4
13.06.2011.	0,5	27,7±0,9	0
	~31	13,5±0,9	5,9±1,9
12.07.2011.	0,5	<LOD	12,9±2,4
	~31	<LOD	6,8±1,9
18.08.2011.	0,5	<LOD	18,4±1,4
	~31	<LOD	5,2±1,6
17.10.2011.	0,5	<LOD	8,4±1,5
	~31	<LOD	5,1±1,9
18.01.2012.	0,5	0	<LOD
	~31	0	---

LOD= limit of detection; granica određivanja; N-POM= polimerni materijal koji sadrži atome dušika; HSA=albumin ljudskog seruma; CAC=katalitički aktivni spojevi kod pH~5.

izmjerene na površini u lipnju 2011. ( $27,7 \mu\text{g dm}^{-3}$  ekv. HSA), dok u siječnju 2012. g. N-POM nije detektiran. U uzorcima iz postaje ST101 N-POM čini do 4% DOC-a.

Uspoređujući rezultate iz sezona 2008./2009. i one iz 2011./2012. uočljivo je smanjenje koncentracije N-POM. Takvo smanjenje se uklapa u promjene u sjevernom dijelu Jadranskog mora u posljednjih desetak godina. Značajne oceanografske promjene su uzrokovale promjene u sastavu, zastupljenosti i sezonskoj varijaciji fitoplanktona (Marić i sur., 2012.) kao i u količini i sastavu hranjivih soli (Giani i sur., 2012.). Postaja ST101 je smještena u zapadnom dijelu sjevernog Jadrana i pod direktnim je utjecajem slatke vode iz rijeke Po. Glavna promjena u tom području je osim smanjenja dotoka količine vode rijekom Po zbog smanjenja količine padalina i snijega u Alpama, smanjenje anticiklonalne struje karakteristične za to područje te smanjena stratifikacija vodenog stupca u periodu od proljeća do jeseni. Svi ti faktori imaju za posljedicu smanjenje količine hranjivih soli (50 - 70 %) (Cozzi i Giani, 2011.), a time i smanjenje primarne produkcije. Što se tiče organske tvari na postaji ST101, uočeno je smanjenje koncentracije površinski aktivne organske tvari (PAT) u istom periodu (Gašparović, 2012.), a i koncentracije otopljenog organskog ugljika (DOC). PAT i DOC na postaji ST101 su u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji (Plavšić i sur., 2009.).

U sezoni 2011./2012. je metodom AdT CPS po prvi puta karakterizirana organska tvar u morskim uzorcima iz postaje ST101 (tablica 1). Visina AdT CPS pika H se mijenja sezonski i po dubini, pri čemu je najveća

koncentracija katalitički aktivnih polisaharida (izražena kao  $\text{mg dm}^{-3}$  ekv. ksantana) zabilježena u svibnju 2011. godine, i to na površini ( $> 50 \text{ mg dm}^{-3}$  ekv. ksantana). Koncentracija katalitički aktivnih polisaharida visoka je i u kolovozu 2011. na površini mora ( $18,5 \text{ mg dm}^{-3}$  ekv. ksantana). Katalitički aktivni polisaharidi nisu detektirani u lipnju 2011. na površini mora, ali je tada bila izmjerena najviša koncentracija N-POM ( $27,7 \mu\text{g dm}^{-3}$  ekv. HSA) (tablica 1).

Metoda za mjerenje katalitički aktivnih spojeva primjenjena je i u modelnim otopinama polisaharida (Plavšić i Strmečki, 2016.) kao i u istraživanju ekstrakata biljaka (Karavoltos i sur., 2014.), te u istraživanjima organske tvari u napitcima (pivo, kava) (Sakellari i sur.2017; Grigoriu i sur., 2018). Ta mjerenja su pokazala da je metoda pogodna i za analizu katalitički aktivnih organskih spojeva u različitim uzorcima nakon adekvatne obrade samog uzorka i prilagodbe elektrokemijskih uvjeta analize. U tim uzorcima koncentracije katalitički aktivnih organskih spojeva su puno više nego u prirodnim vodama.

#### 4. ZAKLJUČCI

- Metoda CPS se upotrijebila za kvantitativnu analizu polimerne organske tvari koja sadrži skupine s katalitičkim dušikovim atomima u morskoj vodi. Pri tome nije potrebna nikakva pretpriprema uzoraka. Količina N-POM određuje

se na temelju kalibracijskog pravca modelnog katalitički aktivnog polimera proteina HSA i izražava se u  $\mu\text{g dm}^{-3}$  ekv. HSA.

- Koncentracija N-POM u uzorcima iz sjev. Jadrana je iznosila do  $71 \mu\text{g dm}^{-3}$  ekv. HSA, s višim vrijednostima detektiranim u sezoni proljeće/ljeto 2008./2009. na površini mora zbog povećane biološke produkcije. N-POM nije detektiran u uzorcima u zimskom periodu.
- Detekcija polisaharida sa sulfatnom i/ili karboksilnom skupinom u morskoj vodi moguća je samo uz primjenu *ex situ* tehnike adsorptivnog prijenosa (AdT CPS).
- Kod AdT CPS linearan dio pravca za kalibracijski modelni polisaharid ksantan omogućuje

kvantitativnu analizu katalitički aktivnih polisaharida u morskim uzorcima.

- Opisane, novo primijenjene, elektrokemijske metode omogućuju analizu polimernog materijala u morskoj vodi koji je sastavni dio prisutnih makroagregata. Time je otvoreno jedno novo područje primjene elektrokemijskih metoda u analizi morske vode.
- Mjerenja su potvrdila ovisnost izmjerenih vrijednosti za PS i N-POM o količini DOC i PAT, a sve te vrijednosti povezane su s biološkom produkcijom. Biološka produkcija je ovisna o količini hranjivih soli i okolišnim uvjetima (temperatura, vjetar, struje, dotok rijeka, padavine). ■

## LITERATURA

- Ahel, M.; Tepić, N. i Terzić, S. (2005.): Spatial and temporal variability of carbohydrates in the northern Adriatic - a possible link to mucilage events. *Science of the Total Environment*, 353(1-3), 139-150.
- Buffle, J. (1988.): Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach. John Wiley&Sons, New York, 673 str.
- Cozzi, S. i Giani, M. (2011.): River water and nutrient discharges in the Northern Adriatic Sea: Current importance and long term changes. *Continental Shelf Research*, 31(18), 1881-1893.
- Ćosović, B. (1985.): Aqueous surface chemistry. Adsorption characteristics of organic solutes. Electrochemical evaluation. U: *Chemical processes in lakes*. W. Stumm, (ur.), J. Wiley&Sons, New York, 55-85
- Degobbis, D.; Malej, A. i Umani, S. F. (1999.): The mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. A critical review of the present scientific hypotheses. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanita*, 35(3), 373-381.
- Gašparović, B. (2012.): Decreased production of surface-active organic substances as a consequence of the oligotrophication in the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 33-39.
- Giani, M.; Berto, D.; Zangrando, V.; Castelli, S.; Sist, P. i Urbani, R. (2005.): Chemical characterization of different typologies of mucilaginous aggregates in the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353(1-3), 232-246.
- Giani, M.; Đakovac, T.; Degobbis, D.; Cozzi, S.; Solidoro, C. i Umani, S. F. (2012.): Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 1-13.
- Grigoriou, C.; Karavoltos, S.; Kaliora, C.A.; Sakellari, A.; Plavšić, M.; Dassenakis, M.; Kalogeropoulos, N. (2018.): Electrochemical, photometric, and chromatographic methods for the evaluation of organic matter and bioactive compounds in coffee brews. *European food research and technology*, 244(11), 1953-1961.
- Heyrovsky, M. (2006.): Research topic - Catalysis of hydrogen evolution on mercury electrodes. *Croatia Chemica Acta*, 79(1), 1-4.
- Hunter, K. A. i Liss, P. S. (1981.): *Organic sea surface films*. U: *Marine Organic Chemistry*. E. K. Duursma i R. Dawson, (ur.), Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, 31, 259-298.
- Karavoltos, S.; Plavšić, M.; Kalogeropoulos, N.; Kogiannou, A.A.D. ; Strmečki, S.; Sakellari, A.; Dassenakis, M.; Scoullou M. (2014.): Copper complexing properties and physico-chemical characterisation of the organic matter in Greek herbal infusions. *Food Chemistry*, 163;53-60.
- Kerherve, P.; Buscail, R.; Gadel, F. i Serve, L. (2002.): Neutral monosaccharides in surface sediments of the northwestern Mediterranean Sea. *Organic Geochemistry*, 33(4), 421-435.
- Kizek, R.; Trnkova, L. i Paleček, E. (2001.): Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Analytical Chemistry*, 73(20), 4801-4807.
- Kovač, N.; Faganeli, J.; Bajt, O.; Sket, B.; Orel, B. i Penna, N. (2004.): Chemical composition of macroaggregates in the northern Adriatic sea. *Organic Geochemistry*, 35(10), 1095-1104.
- Lorenzo, J. I.; Nieto-Cid, M.; Alvarez-Salgado, X. A.; Perez, P. i Beiras, R. (2007.): Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Marine Chemistry*, 103(1-2), 61-75.
- Mader, P.; Vesela, V.; Dorčak, V. i Heyrovsky, M. (2001.): The "presodium" hydrogen evolution at the dropping mercury electrode catalysed by simple cysteine peptides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 66(3), 397-410.
- Marić, D.; Kraus, R.; Godrijan, J.; Supić, N.; Đakovac, T. i Precali, R. (2012.): Phytoplankton response to climatic

- and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 98-112.
- Mecozzi, M.; Amici, M.; Romanelli, G.; Pietrantonio, E. i Deluca, A. (2002.): Ultrasound extraction and thin layer chromatography-flame ionization detection analysis of the lipid fraction in marine mucilage samples. *Journal of Chromatography A*, 963(1-2), 363-373.
- Panagiotopoulos, C. i Sempere, R. (2005.): Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnology and Oceanography-Methods*, 3, 419-454.
- Passow, U. (2002.): Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography*, 55(3-4), 287-333.
- Plavšić, M.; Ćosović, B. i Škudar, J. (1997.): Adsorption of sulfated polysaccharides on mercury and gamma-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles in sodium chloride solution and seawater. *Croatica Chemica Acta*, 70(1), 111-123.
- Plavšić, M. i Ćosović, B. (1998.): Adsorption of carrageenans on mercury surface in sodium chloride solution and seawater. *Croatica Chemica Acta*, 71(2), 233-243.
- Plavšić, M. i Ćosović, B. (2000.): Adsorption properties of different polysaccharides on mercury in sodium chloride solutions. *Electroanalysis*, 12(12), 895-900.
- Plavšić, M.; Gašparović, B.; Strmečki, S.; Vojvodić, V. i Tepić, N. (2009.): Copper complexing ligands and organic matter characterization in the northern Adriatic Sea. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 85(2), 299-306.
- Plavšić, M.; Strmečki, S. i Ćosović, B. (2010.): Constant current chronopotentiometric stripping analysis of "N-catalyst" in sodium chloride solution and seawater. *Electroanalysis*, 22, 91-98.
- Plavšić, M.; Strmečki, S. (2016.): Carbohydrate polymers as constituents of exopolymer substances in seawater, their complexing properties towards copper ions, surface and catalytic activity determined by electrochemical methods. *Carbohydrate Polymers*, 135, 48-56.
- Pletikapić, Galja; Lannon, H.; Murvai, U.; Kellermayer, M.; Svetličić, V.; Brujić, J. (2014.): Self-assembly of polysaccharides gives rise to distinct mechanical signatures in marine gels *Biophysical Journal*, 107 ( 2); 355-364.
- Precali, R.; Giani, M.; Marini, M.; Grilli, F.; Ferrari, C. R.; Pečar, O. i Paschini, E. (2005.): Mucilaginous aggregates in the northern Adriatic in the period 1999-2002: Typology and distribution. *Science of the Total Environment*, 353(1-3), 10-23.
- Radić, T. M.; Svetličić, V.; Žutić, V. i Boulgaropoulos, B. (2011.): Seawater at the nanoscale: marine gel imaged by atomic force microscopy. *Journal of Molecular Recognition*, 24(3), 397-405.
- Radić, T.; Kraus, R.; Fuks, D.; Radić, J. i Pečar, O. (2005.): Transparent exopolymeric particles' distribution in the northern Adriatic and their relation to microphytoplankton biomass and composition. *Science of the Total Environment*, 353(1-3), 151-161.
- Strmečki, S.; Plavšić, M. (2012.): Adsorptive transfer chronopotentiometric stripping of sulphated polysaccharides. *Electrochemistry Communications*. 18 ; 100-103.
- Sakellari, A.; Karavoltos, S.; Plavšić, M.; Bempi, E.; Papantonopoulou, G.; Dassenakis, M.; Kalogeropoulos, N. (2017.): Copper complexing properties, trace metal content and organic matter physico-chemical characterization of Greek beers. *Microchemical journal*, 135, 66-73.
- Tepić, N.; Gašparović, B. i Ahel, M. (2009.): Multivariate statistical analysis of the distribution patterns of carbohydrates and surface-active substances in the northern Adriatic Sea. *Marine Chemistry*, 114(1-2), 37-46.
- Terzić, S. i Ahel, M. (1998.): Distribution of carbohydrates during a diatom bloom in the northern Adriatic. *Croatica Chemica Acta*, 71(2), 245-262.
- Thornton, D. C. O.; Fejes, E. M.; DiMarco, S. F. i Clancy, K. M. (2007.): Measurement of acid polysaccharides in marine and freshwater samples using alcian blue. *Limnology and Oceanography-Methods*, 5, 73-87.
- Tomschik, M.; Havran, L.; Fojta, M. i Paleček, E. (1998.): Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes. *Electroanalysis*, 10(6), 403-409.
- Urbani, R.; Magaletti, E.; Sist, P. i Cicero, A. M. (2005.): Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: Effect of P-depletion and growth status. *Science of the Total Environment*, 353(1-3), 300-306.

### Applying electrochemical method in the analysis of polysaccharides in seawater

**Abstract.** The paper describes the application of a quick, sensitive electrochemical method called chronopotentiometry with constant current chronopotentiometric stripping (CPS), which has not yet been implemented in analysing natural water and which has enabled the detection of polysaccharides (PSs) in seawater by measuring the catalytic wave of hydrogen. The electrolytic analysis of PSs in the sea was limited since PSs are electro-inactive molecules. The CPS method of electrolytic analysis also enables the determination of other polymeric organic compounds that have catalytically active groups because they enable the development of a catalytic wave of hydrogen, based on which the quantity of this polymeric organic material is determined. It was established that increased biological activity in the sea is related to increased quantity of PSs and other catalytically active compounds. By adapting the conditions of electrolytic analysis, the method can be also applied to the detection of PSs and other polymeric organic compounds in medicinal plant extracts, seaweed secretions and some beverages.

**Key words:** polysaccharides, polymeric material, seawater, electrochemical methods

### Anwendung der elektrochemischen Methode in der Analyse der Polysaccharide im Meerwasser

**Zusammenfassung.** In diesem Beitrag wird die Anwendung der schnellen und empfindlichen elektrochemischen Methode der Chronopotentiometrie mit konstantem Strom (CPS) beschrieben, die bis jetzt zur Analyse von natürlichen Gewässern nicht verwendet wurde. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der Polysaccharide im Meerwasser durch die Messung der katalytischen Wasserstoffwelle. Die Elektrolyse der Polysaccharide im Meer war beschränkt, weil die Polysaccharide elektroinaktive Stoffe sind. Die CPS-Elektrolyse-Methode ermöglicht die Bestimmung anderer polymerer organischer Stoffe, die katalytisch aktive Gruppen haben und die Entwicklung der katalytischen Wasserstoffwelle ermöglichen, die dazu dient, die Menge dieses polymeren organischen Stoffes zu bestimmen. Es konnte festgestellt werden, dass die erhöhte biologische Tätigkeit im Meer mit der erhöhten Anzahl der Polysacchariden und anderer katalytisch aktiver Stoffen verbunden ist. Durch Anpassung der Bedingungen der Elektrolyse kann die Methode auch auf die Bestimmung der Polysaccharide und anderer polymerer organischer Stoffe in Heilpflanzenextrakten und Sekreten von Meeresalgen sowie in einigen Getränken angewandt werden.

**Schlüsselwörter:** Polysaccharide, polymerer Stoff, Meerwasser, elektrochemische Methoden