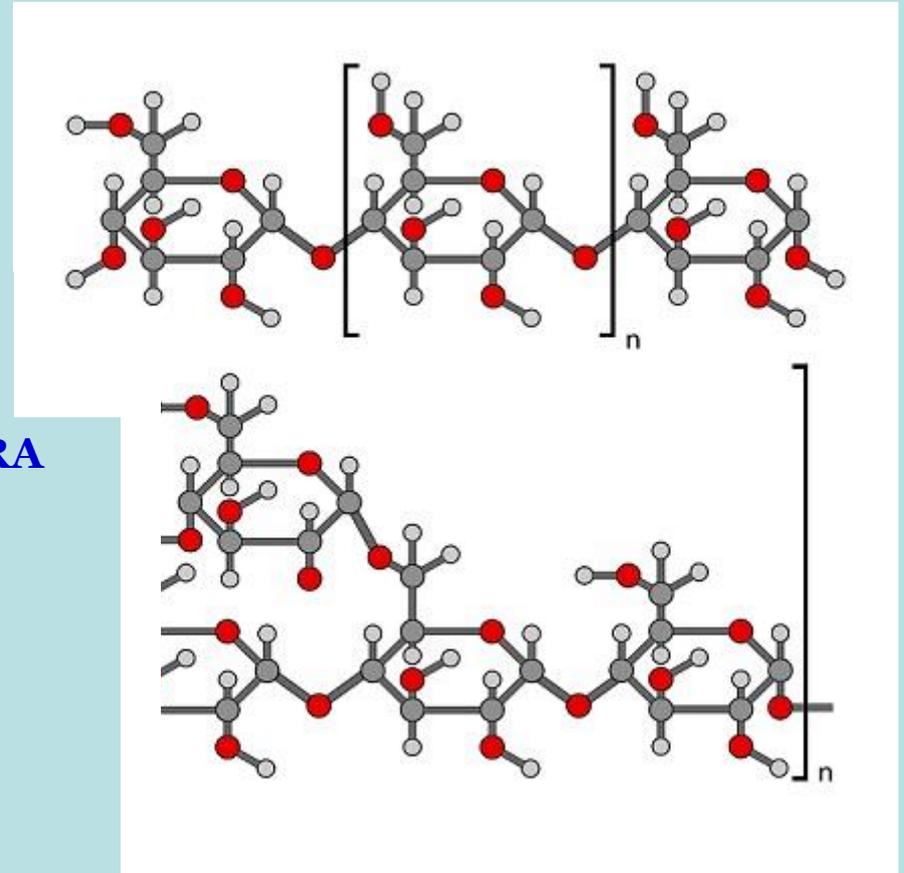


# Proprietà di Biopolimeri

a.a. 2020-2021  
Prof. Ranieri Urbani

**DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA  
PRIMARIA DI POLISACCARIDI**



# ROW MATERIALS

Produzione di polisaccaridi  
da alghe o batteri

Estrazione da fonti animali  
(tessuti connettivi)

Estrazione da fonti vegetali

Oligo- e Polisaccaridi  
artificiali

Nel caso di batteri o alghe, la prima cosa da fare è coltivare e crescere il batterio o un alga su un opportuno terreno di coltura.



Man mano che le colonie batteriche/algali crescono e producono il polisaccaride la viscosità del mezzo cresce.

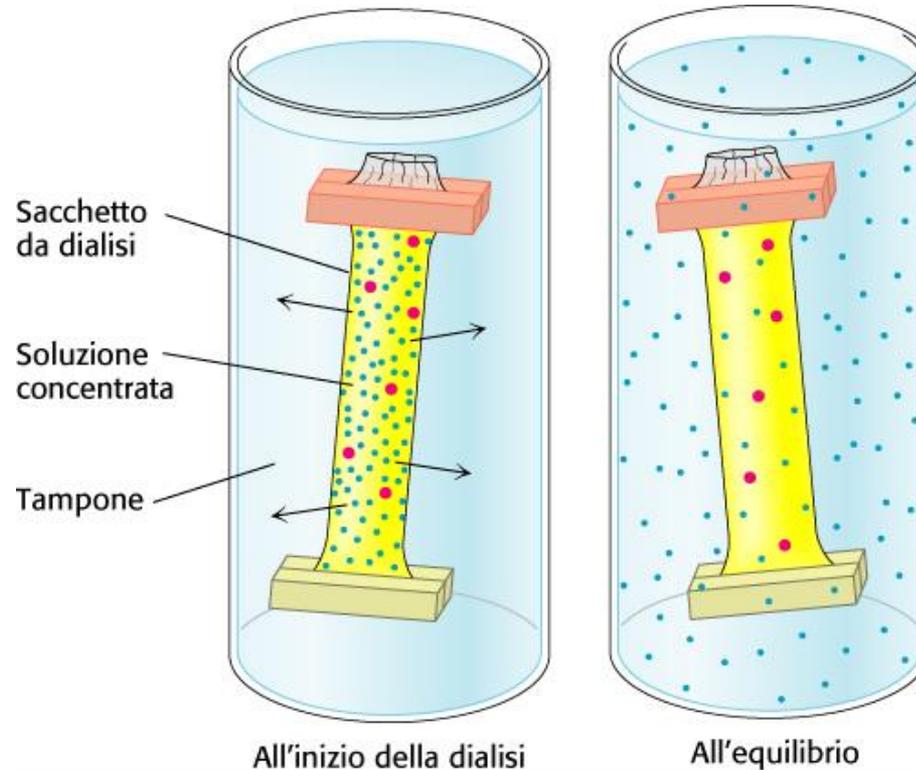
Misurando la viscosità si ha un'idea della produzione dell'esopolisaccaride.



Generalmente la **purificazione** del prodotto si esegue mediante centrifugazione, precipitazione con 4-6 volumi di etanolo (o isopropanolo, o acetone), ri-dissoluzione in acqua e dialisi contro acqua.

# Purificazione:

## Schema del funzionamento di una dialisi per separare grandi molecole dalle piccole molecole

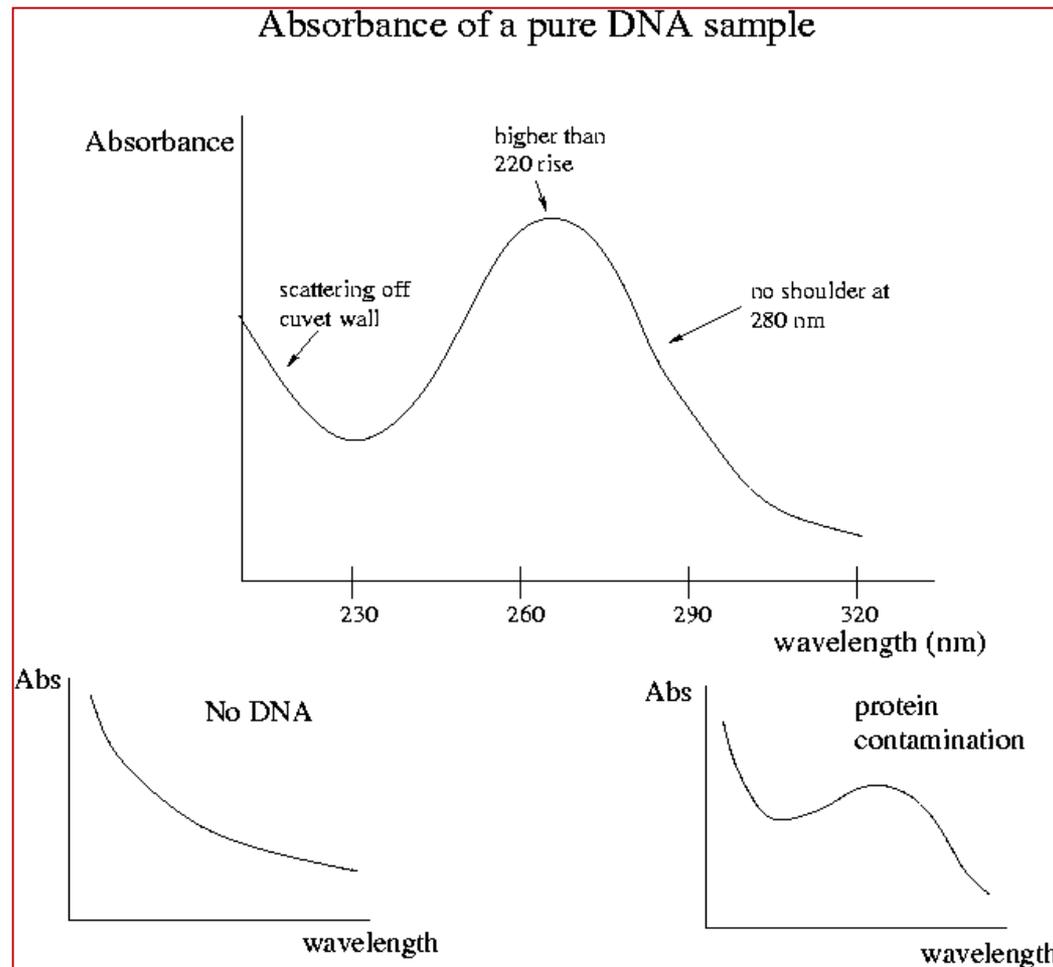


LEZIONE:  
Dialisi



E' necessario controllare se la purificazione ha eliminato anche la maggior parte di proteine e DNA provenienti da cellule lisate.

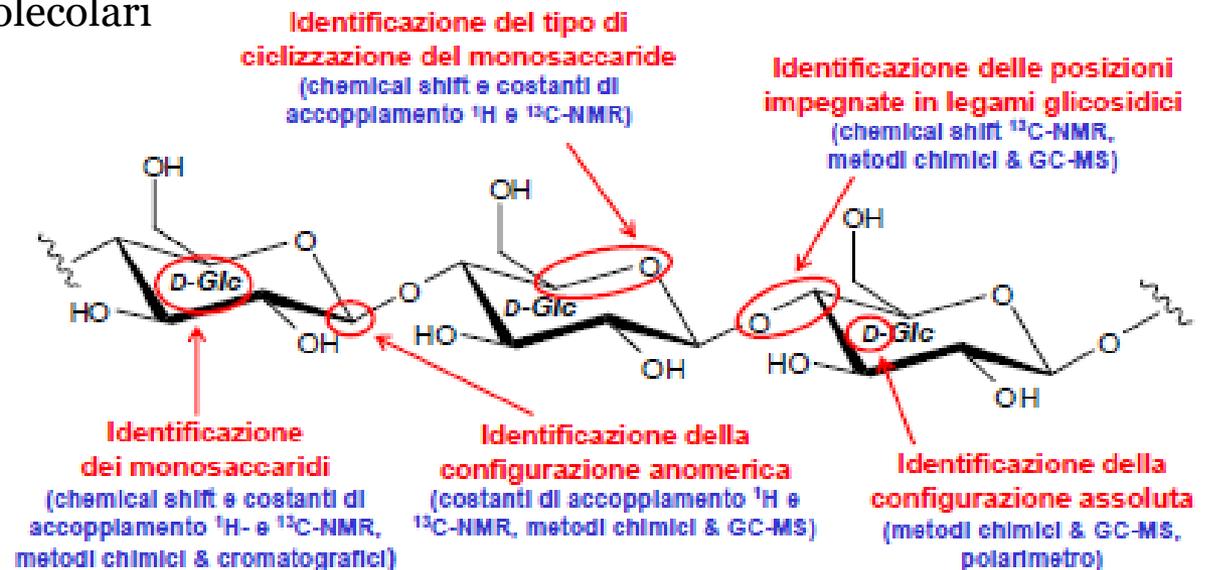
Si può utilizzare la spettroscopia UV o il CD



# DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI UN POLISACCARIDE

Per la determinazione della struttura primaria di un polisaccaride sono necessarie le seguenti informazioni:

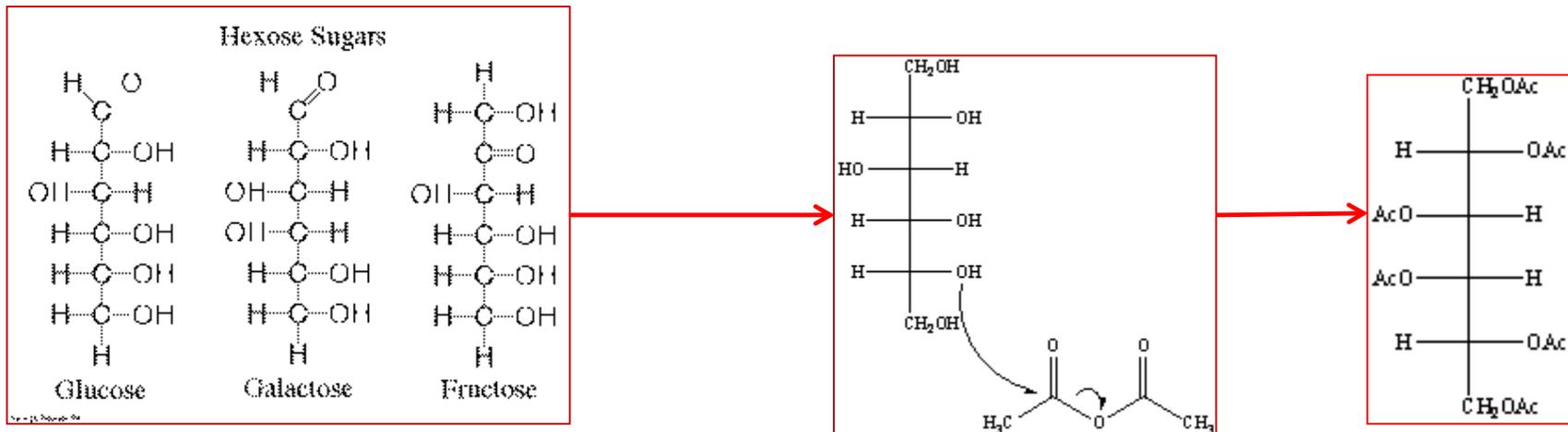
- **Composizione** monosaccaridica: natura e rapporti molari
- **Concatenazione** del legame glicosidico e delle eventuali ramificazioni
- **Conformazione** dell'anello: furanosio o piranosio
- **Configurazione** anomerica: configurazione  $\alpha$  o  $\beta$  del legame glicosidico
- **Sequenza** di monosaccaridi nell'unità ripetitiva
- **Sostituzioni**: posizione e natura delle modificazioni sugli OH- (come la O-fosforilazione, l'acetilazione, la O-solfatazione, etc.
- **Distribuzione** dei pesi molecolari



## Analisi di composizione in zuccheri neutri

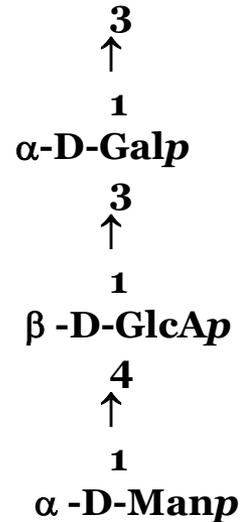
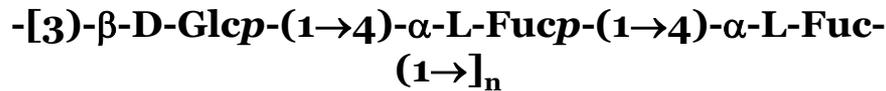
Si procede con un'idrolisi del polimero in TFA 2M a 125°C per 1 h.

I monosaccaridi ottenuti sono ridotti ad alditoli con NaBH<sub>4</sub> effettuando poi un'acetilazione dei prodotti.



L'analisi dei prodotti acetilati è effettuata con **GC** su colonna a polarità intermedia (tipo SP2330) con un programma di temperatura da 200° a 245°C a 4°/min con elio come gas di trasporto ed utilizzando un **rivelatore ad ionizzazione di fiamma (FID)**.

**ESEMPIO:**



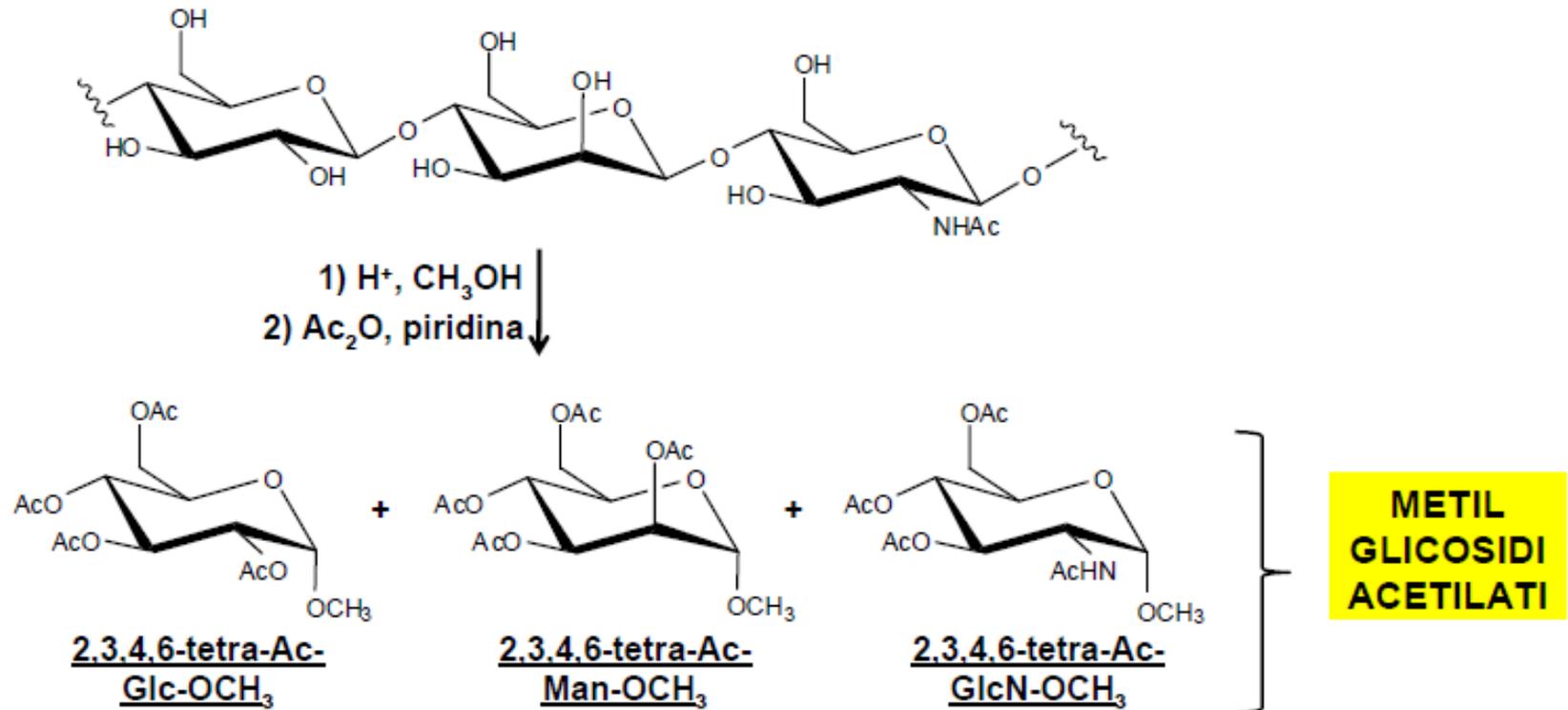
monosaccaride	Rapp mol rel
Fuc	1,5
Man	0,2
Gal	1,1
Glc	2.0

Il fucosio è piuttosto labile così come il mannosio quando è legato ad un acido uronico.

Altro metodo: METANOLISI

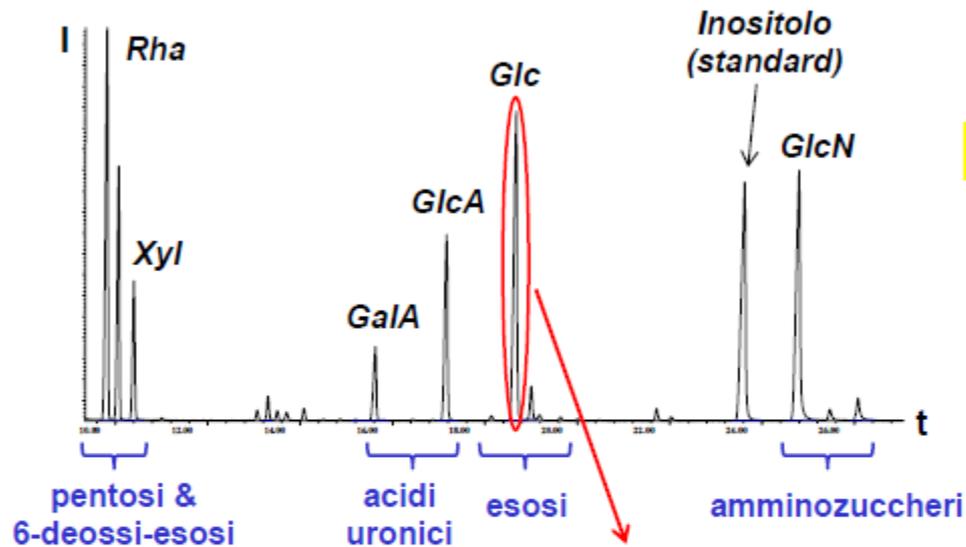
## IDENTIFICAZIONE DEI MONOSACCARIDI

Metodi chimici & cromatografici: metanolisi + acetilazione + GC-MS

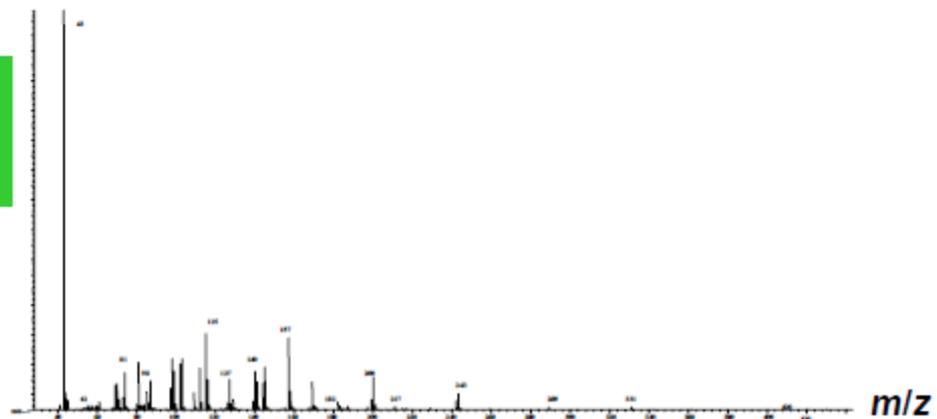


# IDENTIFICAZIONE DEI MONOSACCARIDI

Metodi chimici & cromatografici: metanolisi + acetilazione + GC-MS



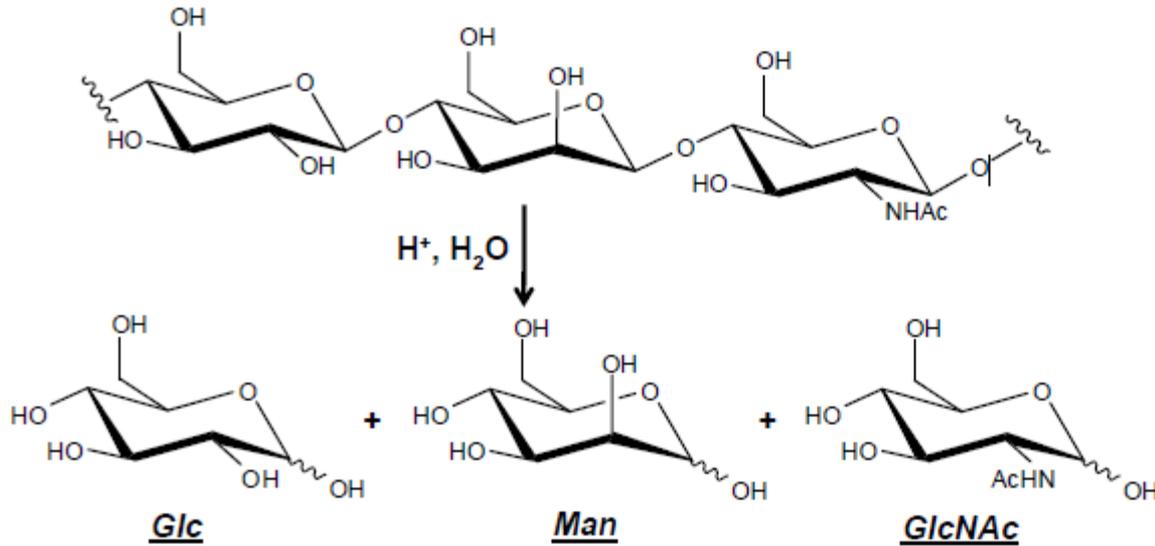
Spettro di massa  
(impatto elettronico)  
picco del gas-cromatogramma



# IDENTIFICAZIONE DEI MONOSACCARIDI

(Cromatografia liquida)

Metodi chimici & cromatografici: idrolisi + HPAEC



La HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography) utilizza la natura debolmente acida dei carboidrati per separarli con l'ausilio di fasi stazionarie a scambio anionico e fasi mobili ad elevato pH

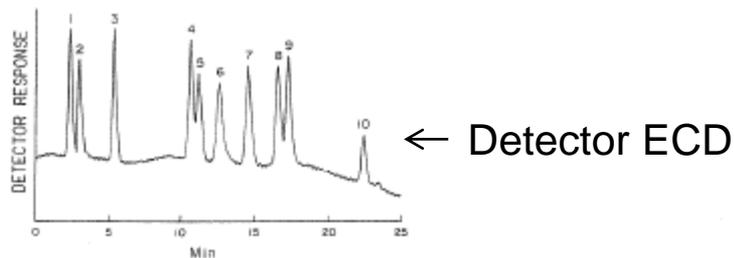


Fig. 2. Chromatogram of saccharides detected by HPAEC-PAD. Peaks: 1 = inositol; 2 = ribitol; 3 = fructose; 4 = arabinose; 5 = rhamnose; 6 = galactose; 7 = glucose; 8 = xylose; 9 = mannose; 10 = lactose (internal standard).

Table 1. Dissociation constants of some common carbohydrates<sup>5</sup> (in water at 25 °C)

Sugar	$pK_s$
Frutose	12.03
Mannose	12.08
Xylose	12.15
Glucose	12.28
Galactose	12.39
Dulcitol	13.43
Sorbitol	13.60
$\alpha$ -Methyl glucoside	13.71

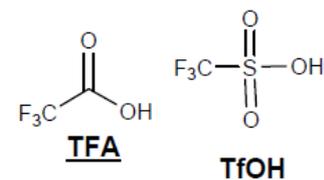
## DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

- ❖ Idrolisi parziale
- ❖ Acetolisi
- ❖ Degradazione di Smith
- ❖ Degradazione in ambiente basico:  $\beta$ -eliminazione
- ❖ Deamminazione
- ❖ Solvolisi con HF
- ⇒ ❖ Idrolisi enzimatiche

**Le condizioni di idrolisi** acida per degradare completamente o parzialmente una catena polisaccaridica sono molteplici:

### **Idrolisi parziale**

- condizioni blande: acidi diluiti (0.1-0.2M)  
temperature da basse ad alte (25-100°C)  
acidi organici: acido trifluoroacetico (TFA)  
acido triflico (TfOH)  
acido acetico



- condizioni di autoidrolisi: polisaccaride acido  
temperature elevate  
attivazione dei siti acidi con resina a scambio cationico
- 

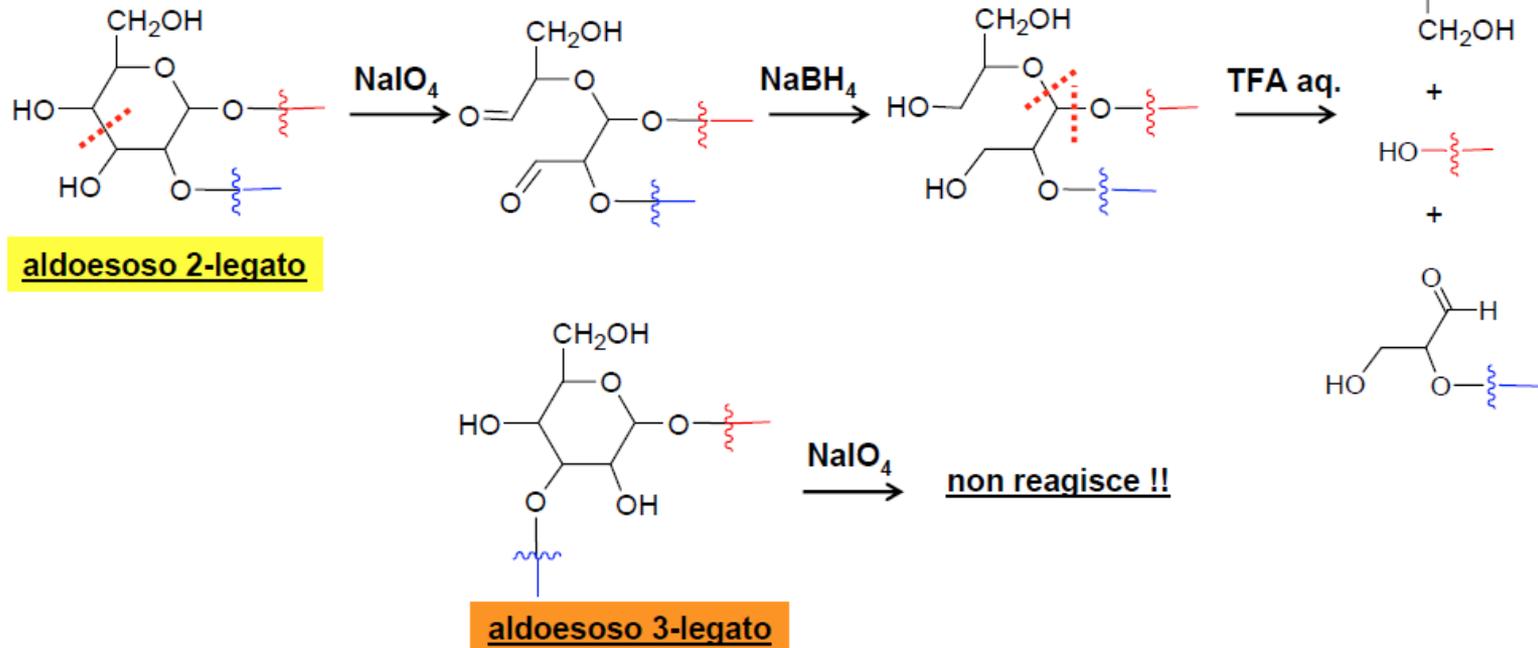
### **Idrolisi completa**

- TFA 2 M a 120°C per 1-2 h
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5-1 M a 100°C per 4-6 h,
- HCl 4 M a 100°C per 6 h
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/AcOH a 100°C per 9 h

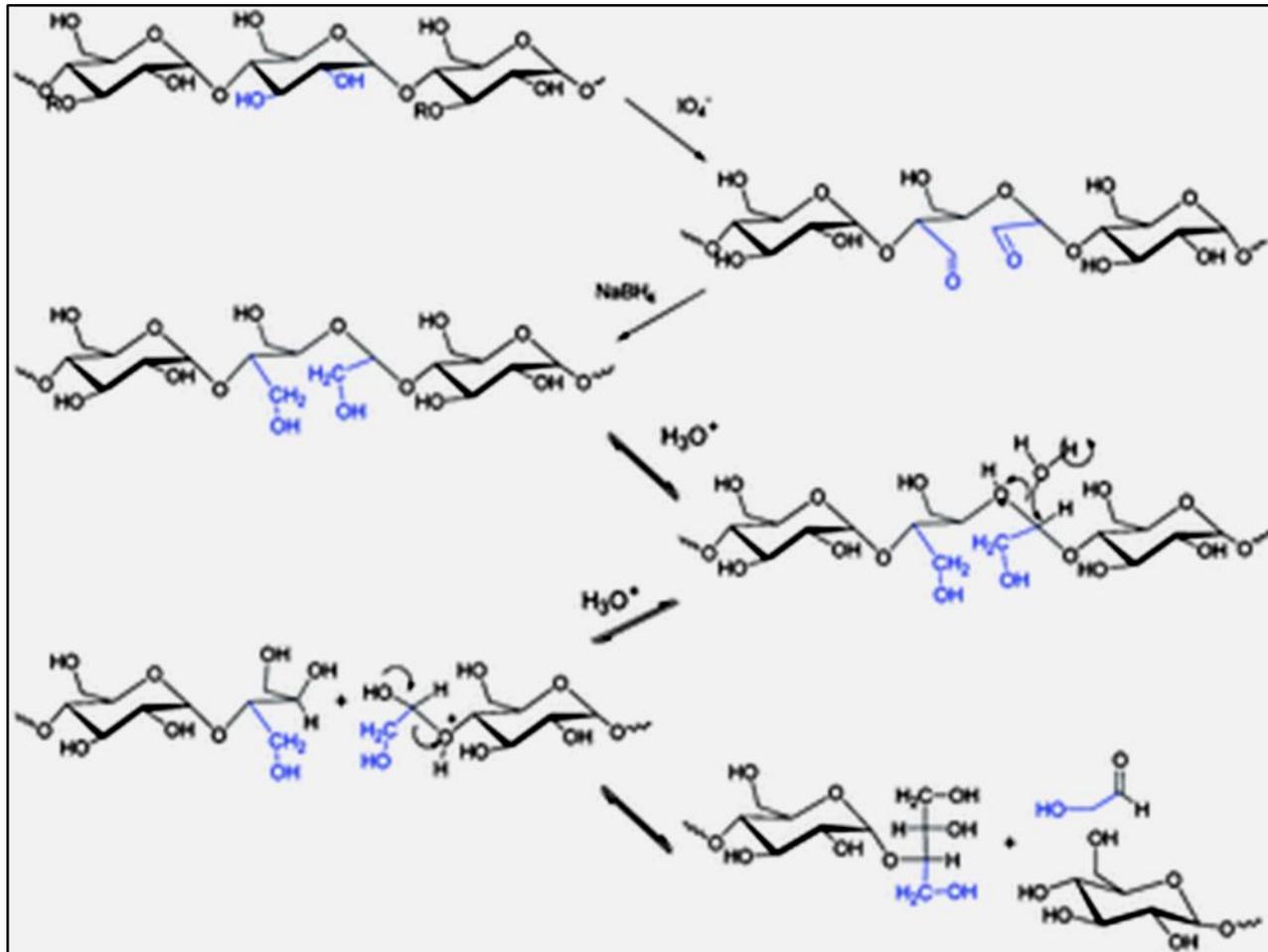
## DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

### DEGRADAZIONE DI SMITH: rottura selettiva per ossidazione dioli vicinali

- ossidazione del diolo con periodato di sodio ( $\text{NaIO}_4$ )
- riduzione dei gruppi carbonilici ( $\text{NaBH}_4$ )
- idrolisi selettiva di acetalii/ketali aciclici (TFA acquoso)



La **degradazione di Smith** consiste nel rompere il legame C-C in un gruppo diolico vicinale. Questo rende il legame glicosidico vicino più labile e **quindi si possono ottenere oligomeri che terminano dove c'era un monosaccaride legato 1→2 o 1→4**.

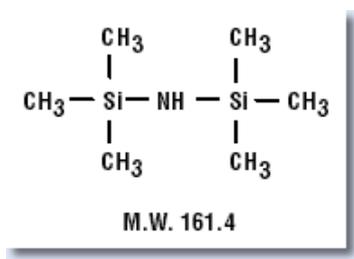


Una ulteriore analisi di composizione riguarda la determinazione degli

## acidi uronici.

Si effettua attraverso una **metanolisi** con HCl 1 M in MeOH a 85°C per 18 h.

Si preparano poi i **trimetil-silil derivati** (con esametildisilazano + trimetilclorosilano + piridina per 1h a T amb).



**La sililazione è il metodo di derivatizzazione più ampiamente adottato per analisi GC.**

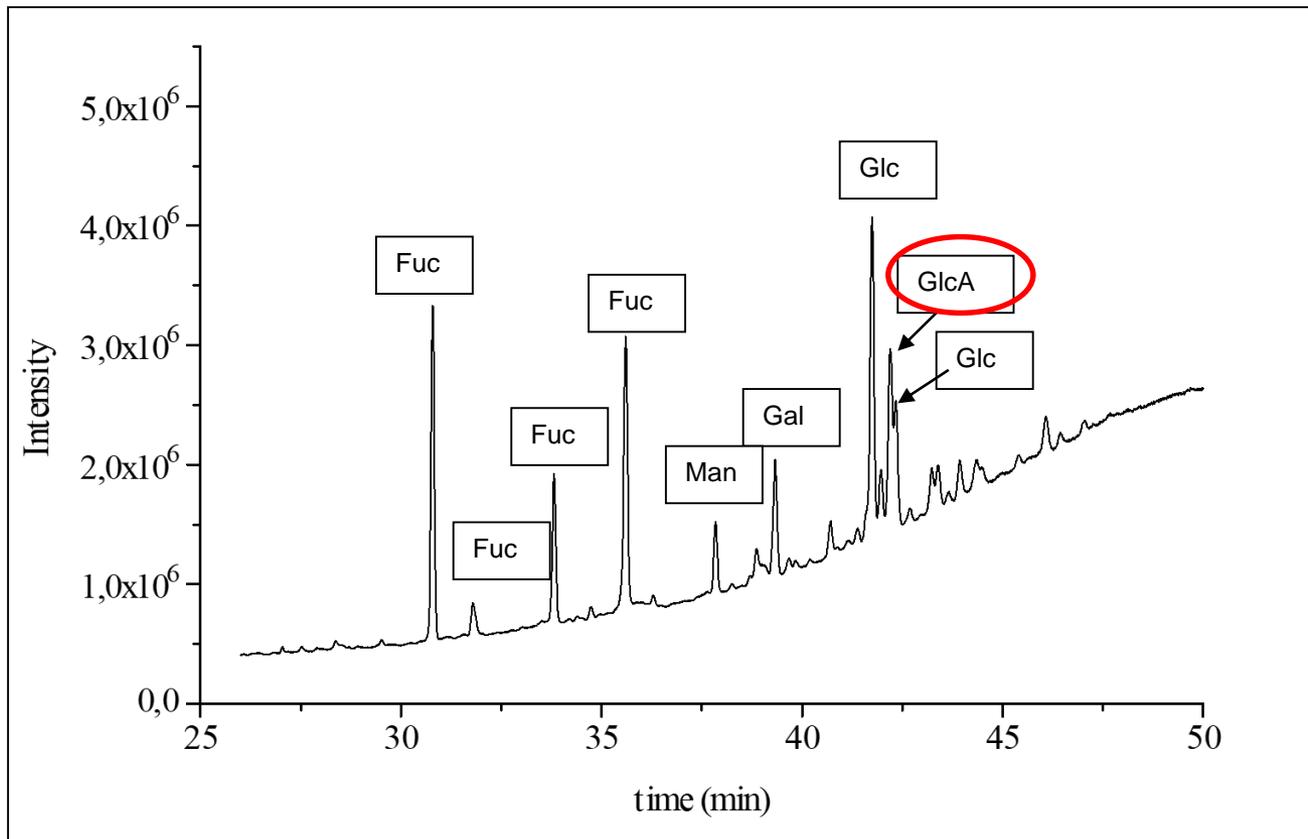
I derivati sililati si formano quando si ha sostituzione di un idrogeno attivo con un gruppo alchilsilile (ad es. in **gruppi -OH, -SH, -NH**).

I derivati trimetilsilil (**TMS**) sono i più adatti per la loro stabilità termica e chimica, l'alta volatilità e la facilità di preparazione.

Si esegue quindi una gas-cromatografia su colonna idrofobica, 50 m (es. HP1) a 150°C per 1 min e 150°C – 280°C a 3°C/min, infine 280°C per 20 min.

**Ogni saccaride dà più di un segnale perché non si riduce l'aldeide e quindi si ha un equilibrio tra tutti gli isomeri, ciclici e no.**

Oltre a confermare la presenza dei monosaccaridi già trovati, viene determinata la presenza di acido glucuronico



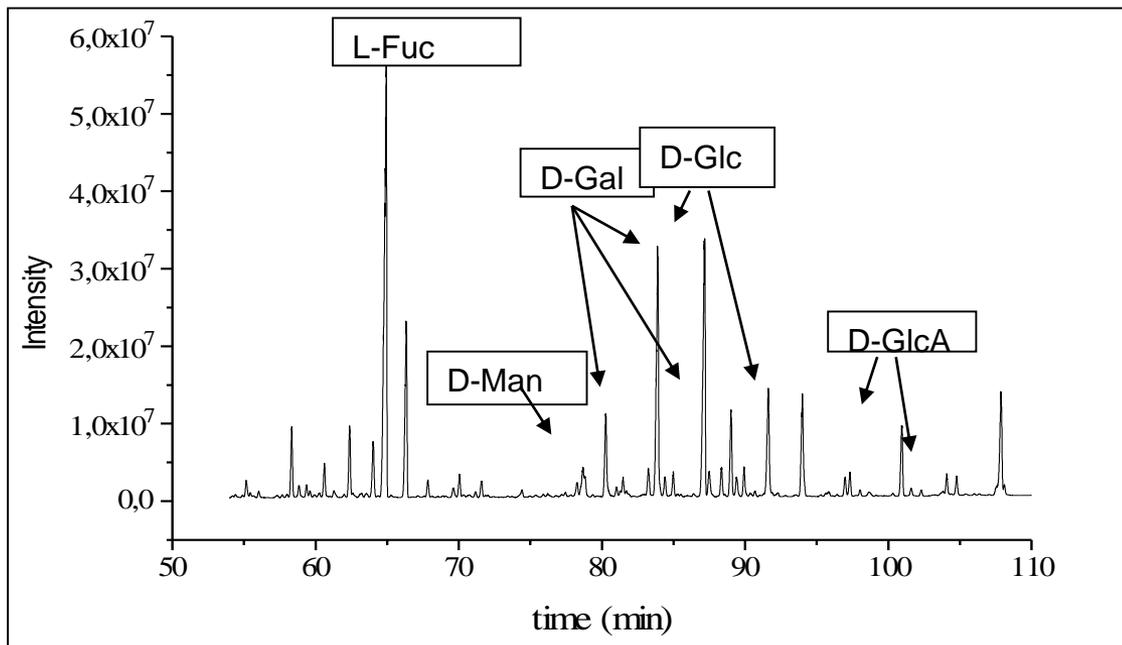
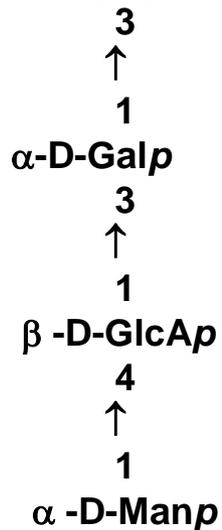
E' necessario verificare se **l'enantiomeria** dei saccaridi nel polimero è **L o D**:

Si effettua una **metanolisi + butanolisi con un alcol chirale**: R/S 2-ottanolo o 2-butanolo, in forma enantiomericamente pura in ambiente acido e successivamente acetilati

Poi si procede come per l'analisi degli uronici: trimetilsililazione e GC su HP1. Il paragone con composti standard permette di risolvere il problema.

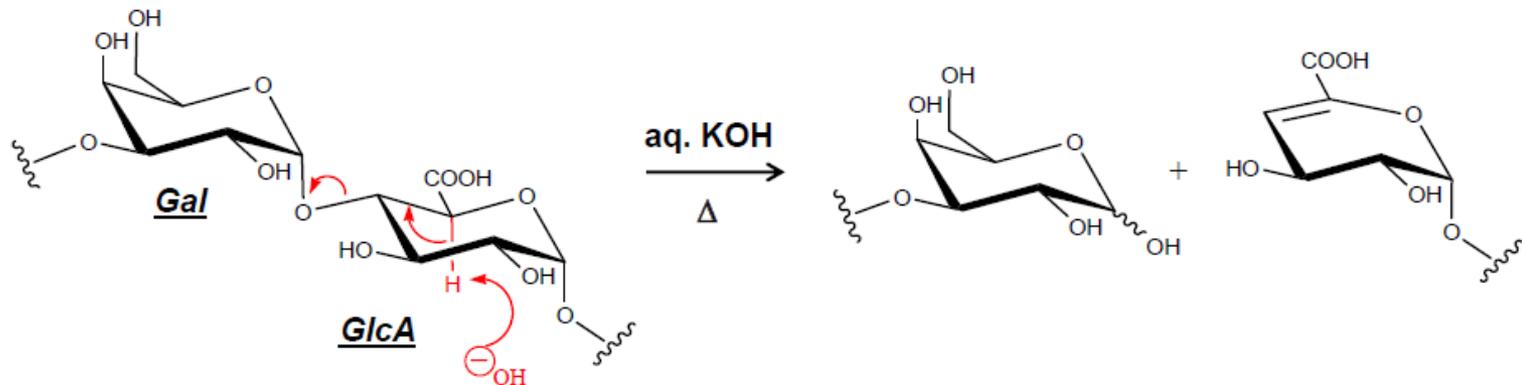
**A seconda della configurazione D o L del residuo si ottengono due differenti derivati diastereoisomerici con un diverso tempo di ritenzione in colonna capillare**

Nell'esempio precedente sono tutti D meno il fucosio che è L

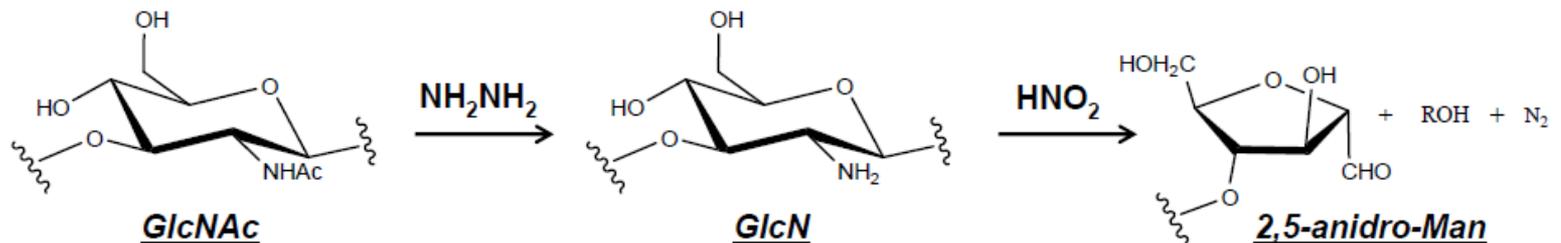


## DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

### $\beta$ -ELIMINAZIONE: scissione selettiva su acidi uronici 4-legati

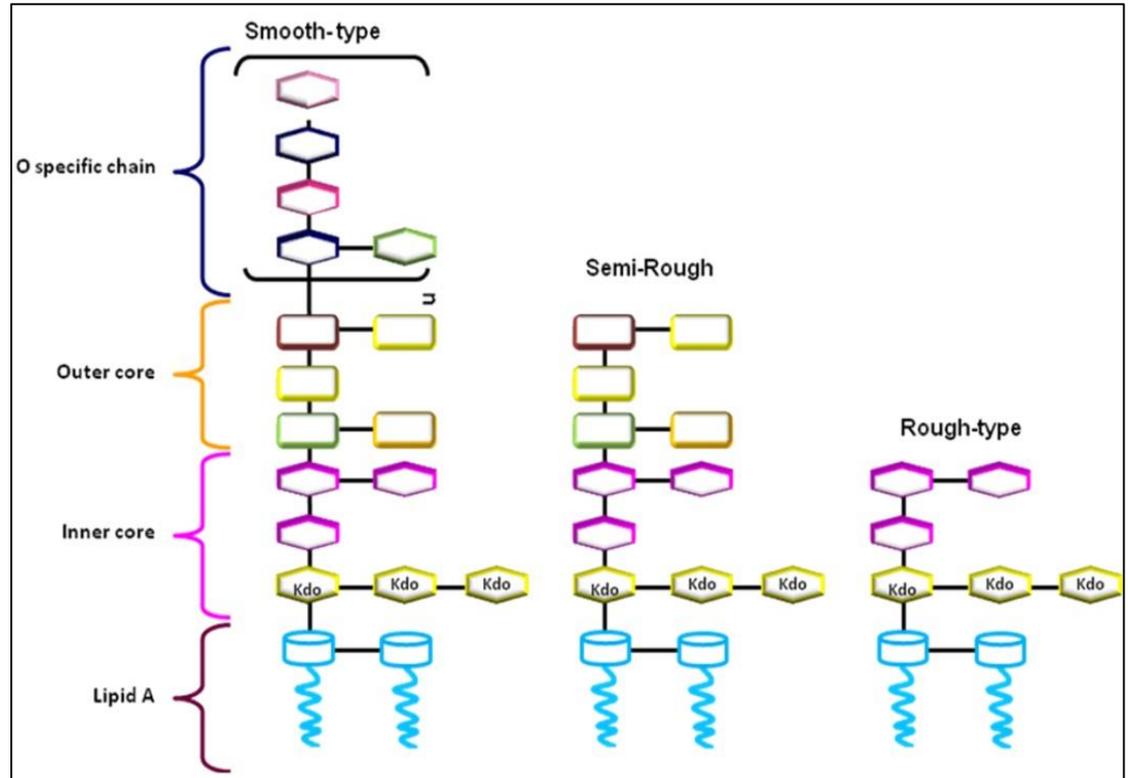
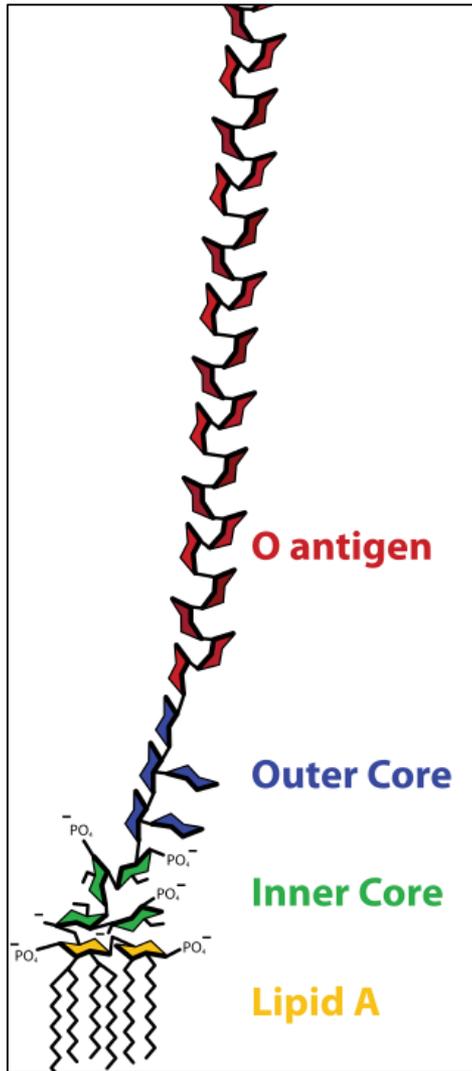


### DEAMMINAZIONE: scissione selettiva per amminozuccheri con N equatoriale



# ESEMPIO: LPS

LPS is an amphipathic glycoconjugate that constitutes **10% to 15%** of the total molecules in the external membrane and represents **75%** of the total of bacterial surface



# RIMOZIONE SELETTIVA DI GRUPPI LEGATI A POLISACCARIDI

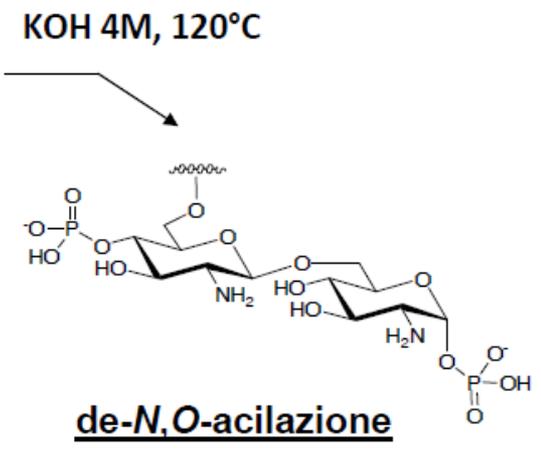
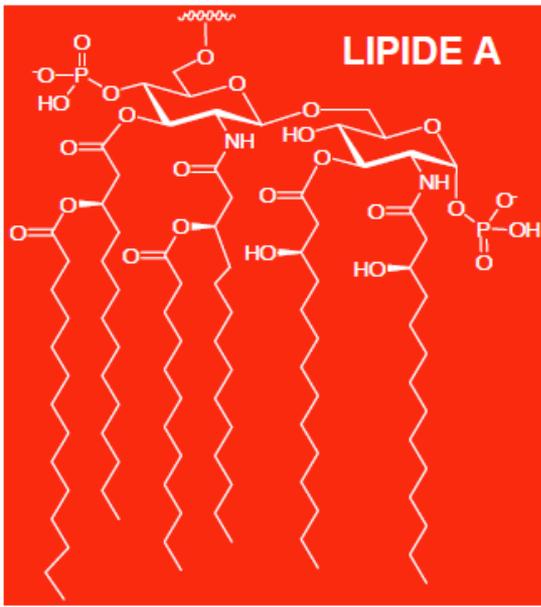
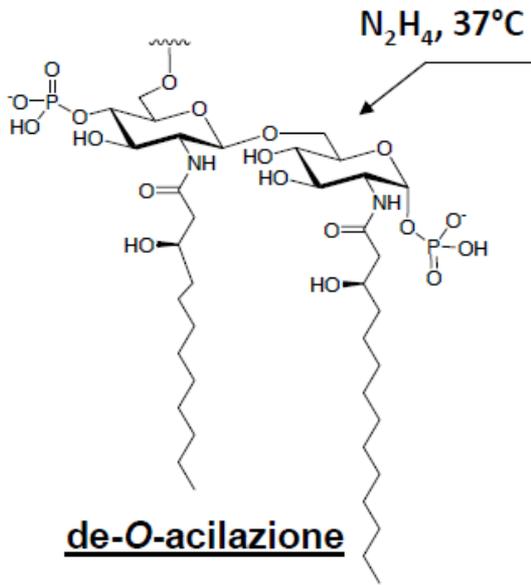
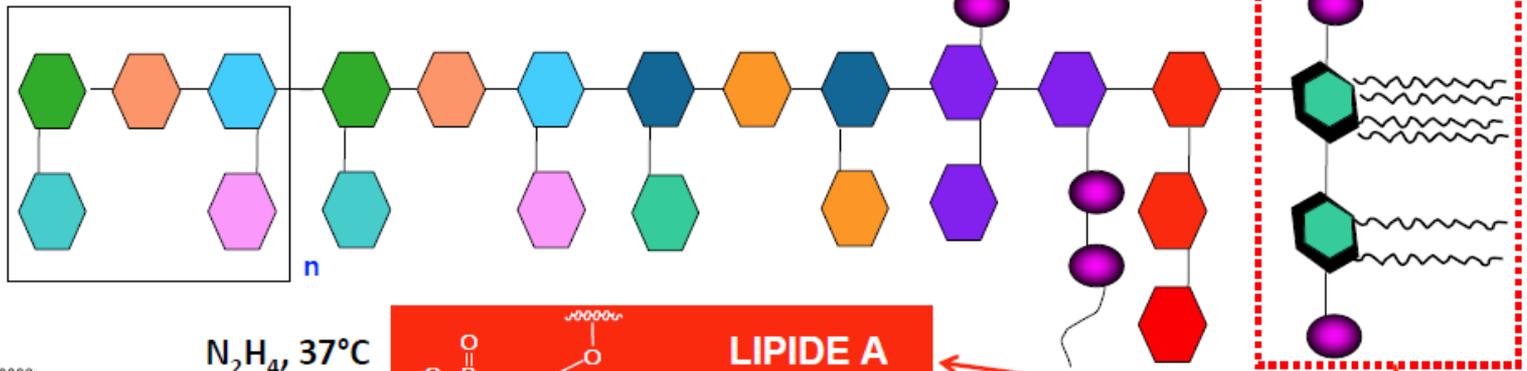
Gruppi acilici (esteri e/o ammidi):

**LPS**

O-Chain

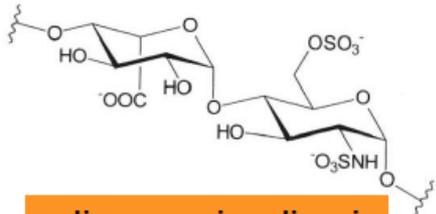
Core  
Outer Core  
Inner Core

Lipide A



## RIMOZIONE SELETTIVA DI DECORAZIONI DI POLISACCARIDI

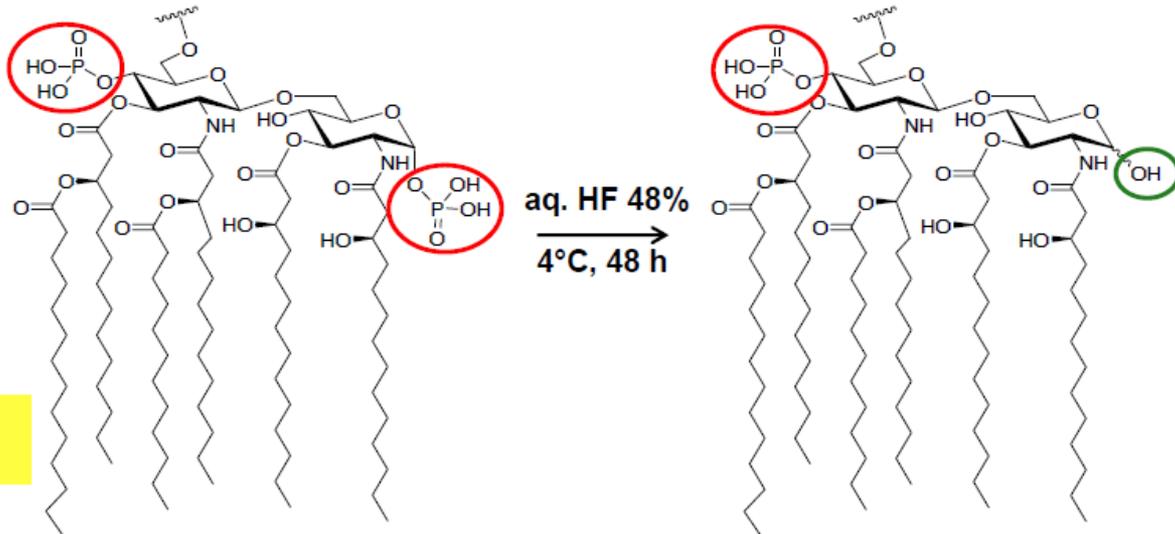
### Gruppi solfato:



glicosamminoglicani  
(GAG)

- solvolisi in DMF, DMSO o H<sub>2</sub>O(CH<sub>3</sub>OH)/DMSO → degradativa, non selettiva
- BTSA o MTSTFA in DMF → non degradativa, selettiva su posizioni primarie
  - C[Si](C)(C)OC(=O)N[Si](C)(C)C  
**N,O-bis(trimetilsilil)acetammide (BTSA)**
  - C[Si](C)(C)N(C)C(=O)C(F)(F)F  
**N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetammide (MSTFA)**
- endosolfatasi → altamente selettiva, non degradativa

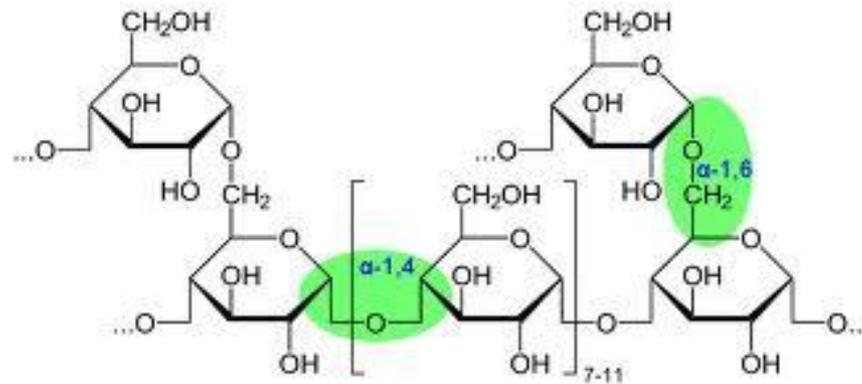
### Gruppi fosfato:



porzione lipide A  
del LPS

## Determinazione dei legami glicosidici

per determinare come i vari monosaccaridi sono connessi tra loro  
( $\alpha$ ,  $\beta$ , 1-2, 1-3, 1-4, 1-6)

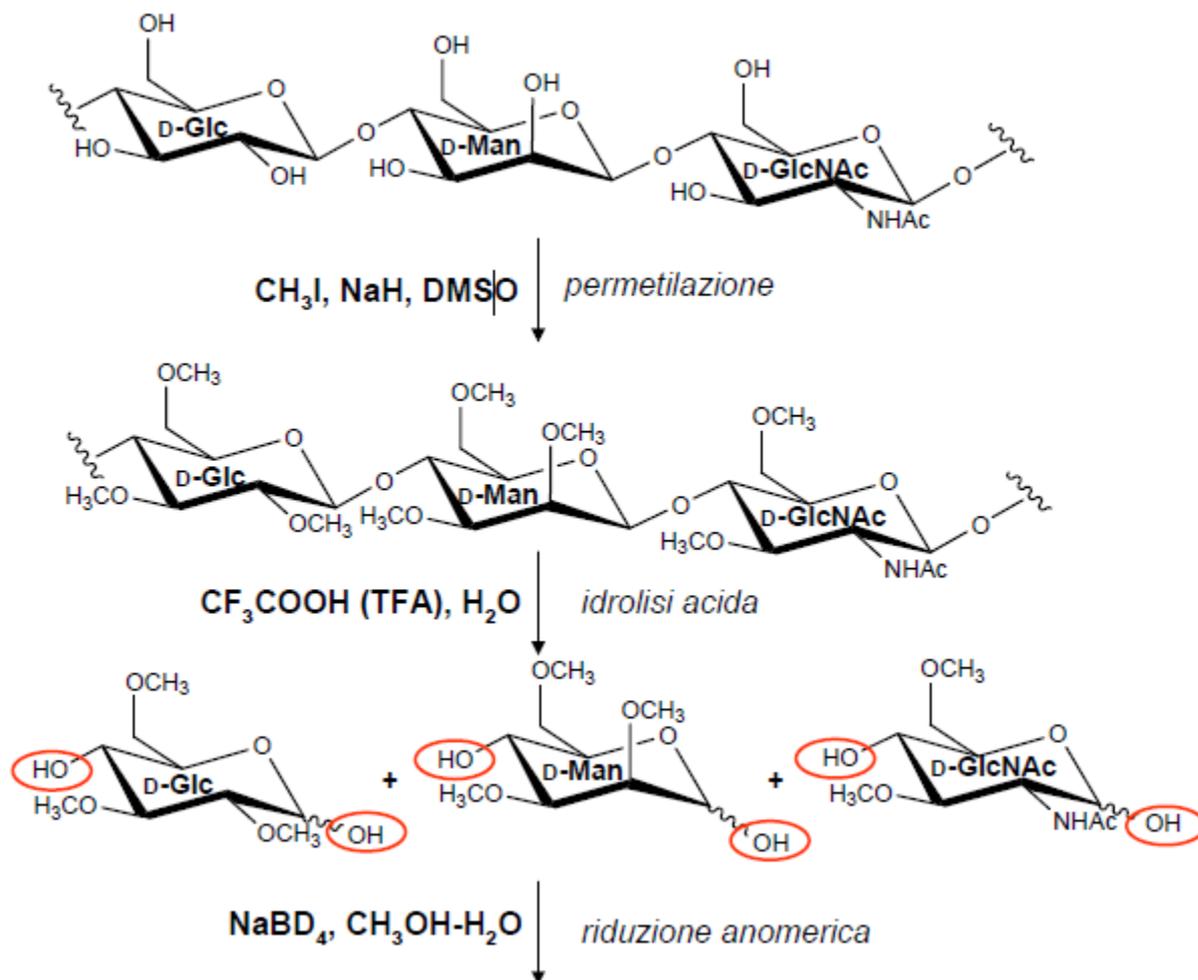


## **METILAZIONE ESAUSTIVA (permetilazione)**

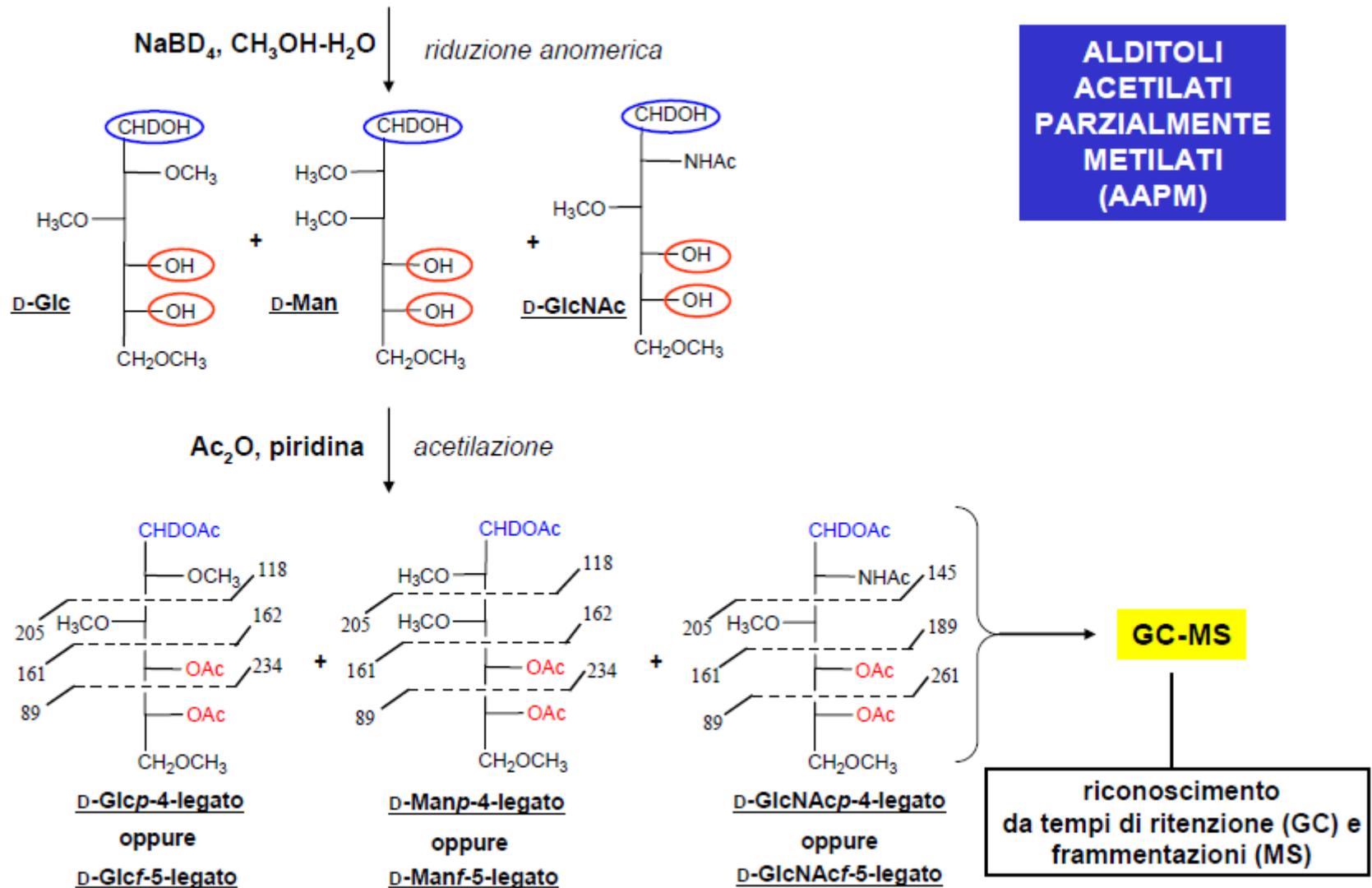
- La metilazione è basata sulla conversione completa ad eteri metilici di tutti gli ossidrili liberi del poli/oligosaccaride ( $\text{CH}_3\text{I}$ )
- Le condizioni di reazione molto basiche, richieste per la metilazione, non sono dannose per i legami glicosidici, poiché, questi risultano essere stabili in tali condizioni.
- La successiva idrolisi acida lascia intatti gli eteri metilici, liberando le posizioni impegnate nei legami inter-residuo.
- La posizione 1 degli O-metil derivati, così ottenuti, è ridotta con  $\text{NaBD}_4$

## IDENTIFICAZIONE DELLE POSIZIONI IMPEGNATE NEI LEGAMI GLICOSIDICI

ALDITOLI  
ACETILATI  
PARZIALMENTE  
METILATI  
(AAPM)

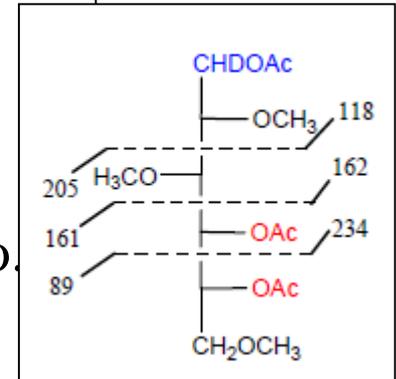


# IDENTIFICAZIONE DELLE POSIZIONI IMPEGNATE NEI LEGAMI GLICOSIDICI



Le frammentazioni sono diagnostiche per individuare dove c'è metilazione e dove c'è acetilazione in quanto

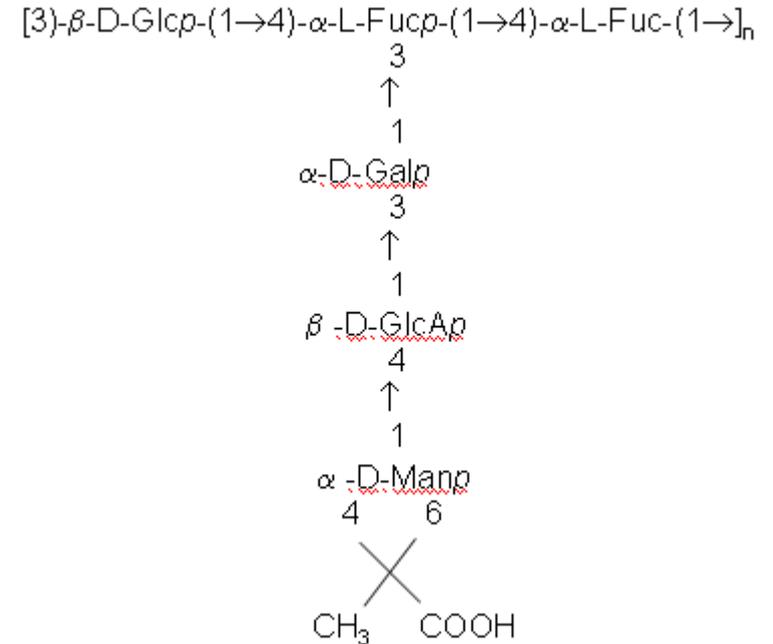
- i **frammenti primari** si formano dalla rottura dello scheletro carbonioso dell' alditolo.
- la **carica** risiede sempre sul frammento che ha l'atomo di carbonio legato ad un metossile ed adiacente al punto in cui si frammenta lo scheletro.
- la frammentazione tra due atomi di carbonio che legano metossili è favorita rispetto a quella tra due carboni recanti l'uno un metossile e l'altro un acetile, a sua volta favorita rispetto a quella tra due carboni leganti due gruppi acetilici.
- ioni dovuti ad una frammentazione secondaria sono prodotti dalla perdita di metanolo o acido acetico.



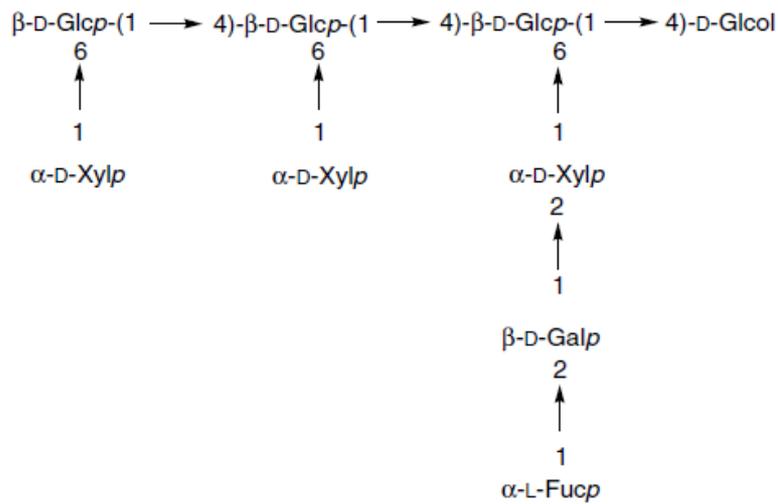
Dai risultati GC (MS) è possibile distinguere le posizioni acetilate da quelle metilate ed identificare così quelle coinvolte nei **legami glicosidici** del monosaccaride da cui deriva.

La GC-MS ha un duplice vantaggio poiché risolvendo la miscela di alditoli acetati parzialmente metilati nei picchi del cromatogramma e fornendo lo spettro di massa di ciascuno di essi, ne permette l'identificazione

Residuo saccaridico <sup>a</sup>	RRT <sup>b</sup>	Rapporto Molare Relativo <sup>c</sup>
4-Fuc	1.00	0.83
3,4-Fuc	1.10	1.00
3-Glc	1.15	0.96
3-Gal	1.19	0.63
4,6-Man	1.50	0.45

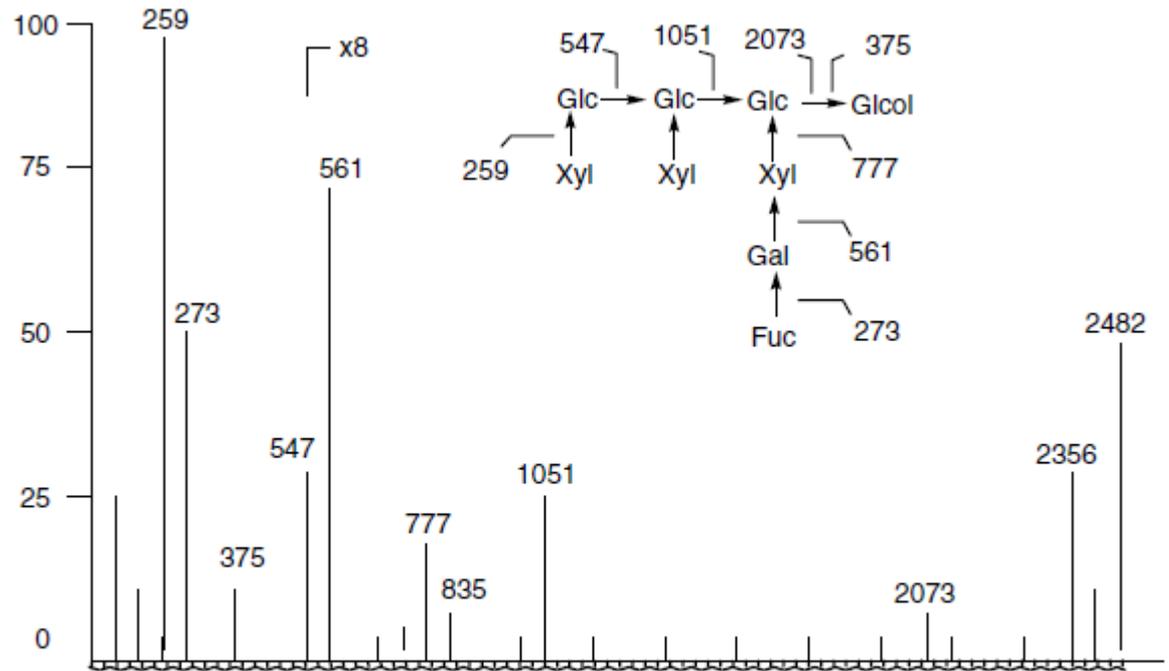


- a) I numeri indicano la posizione dei legami glicosidici;
- b) RRT = tempo di ritenzione relativo a quello del 4-Fuc;
- c) Rapporti molari relativi al 3,4-Fuc.



# ESEMPIO

**FIGURE 3.22**  
Structure of a xyloglucan alditol. (Adapted from York, et al., 1990.)<sup>37</sup>

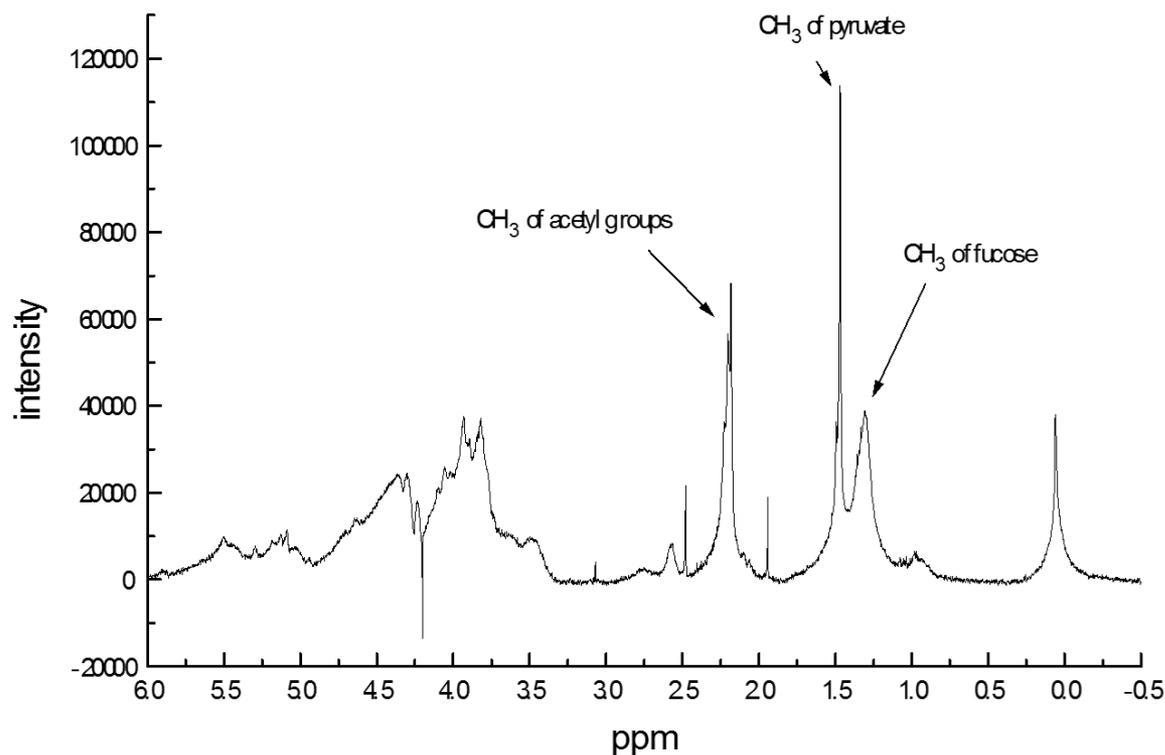


**FIGURE 3.24**  
Positive ion FAB mass spectrum of an acetylated xyloglucan alditol. (Adapted from York, et al., 1990.)<sup>37</sup>

# DETERMINAZIONE DI SOSTITUENTI NON-SACCARIDICI

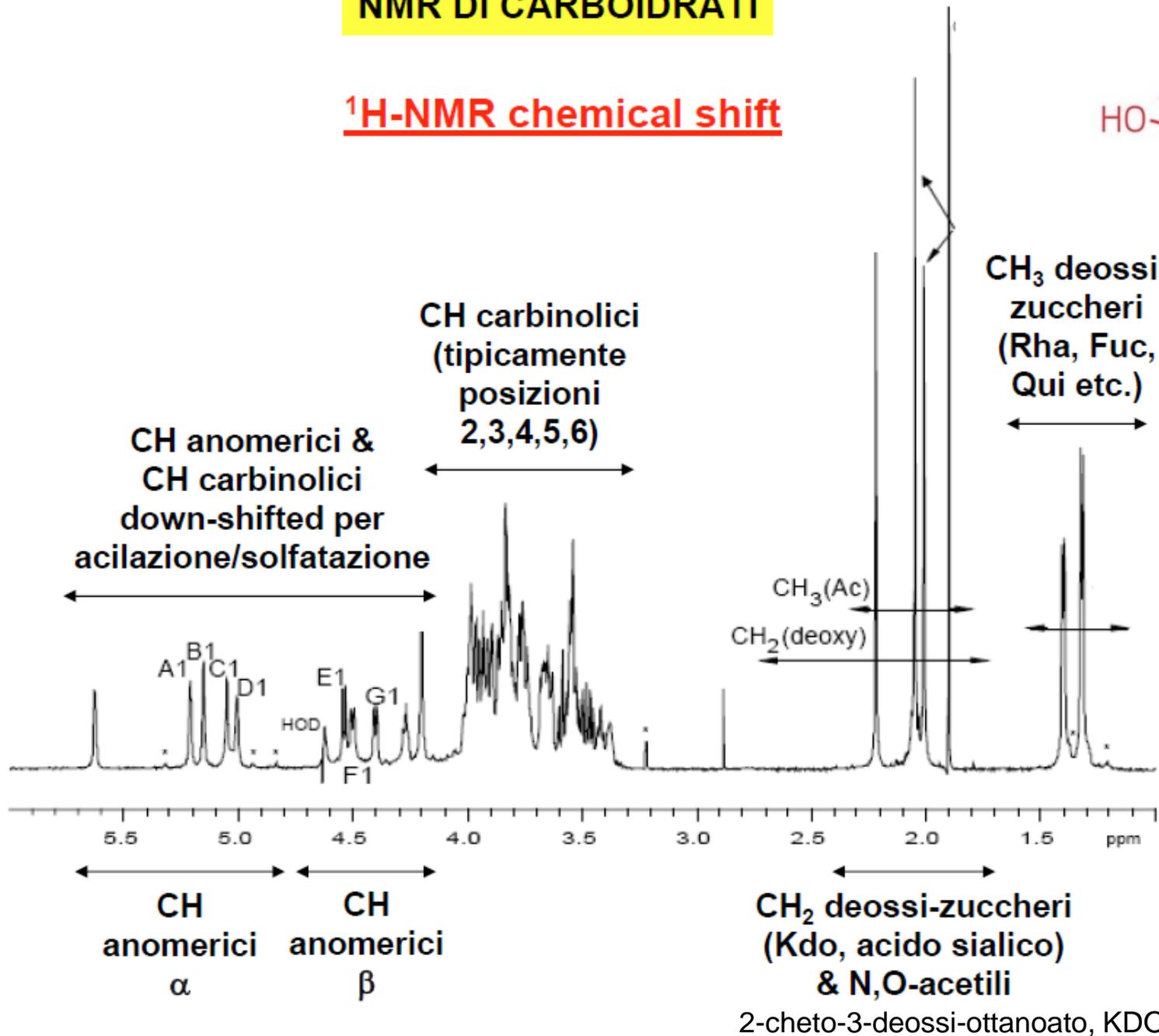
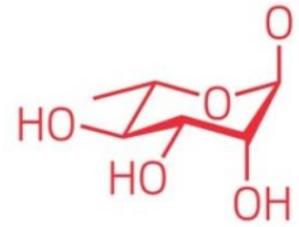
es. gruppo piruvile, gruppo *O*-acetile

Si ottiene attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$  poichè le bande di molti di questi sostituenti sono fuori della regione di ppm tipica dei protoni saccaridici.



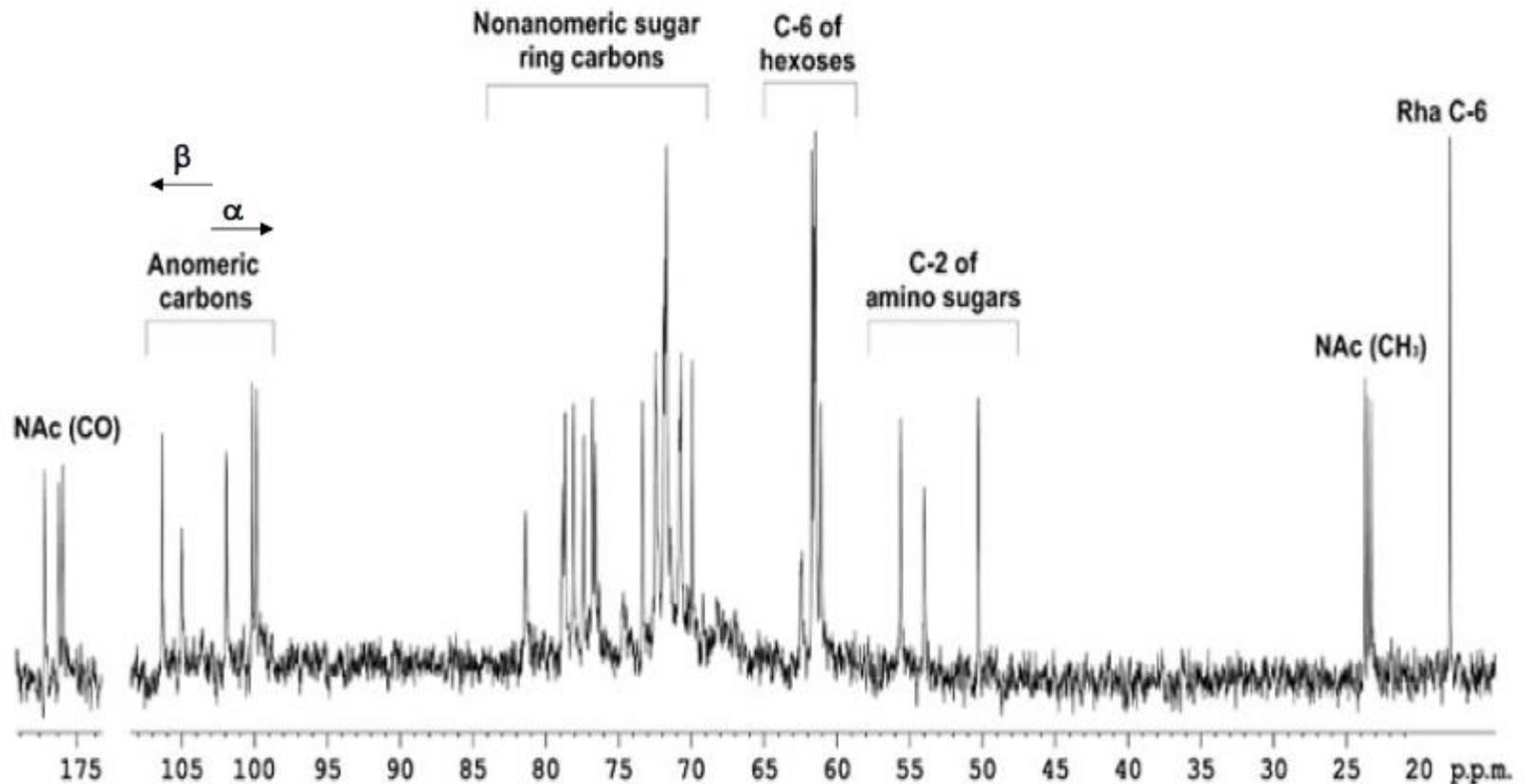
# NMR DI CARBOIDRATI

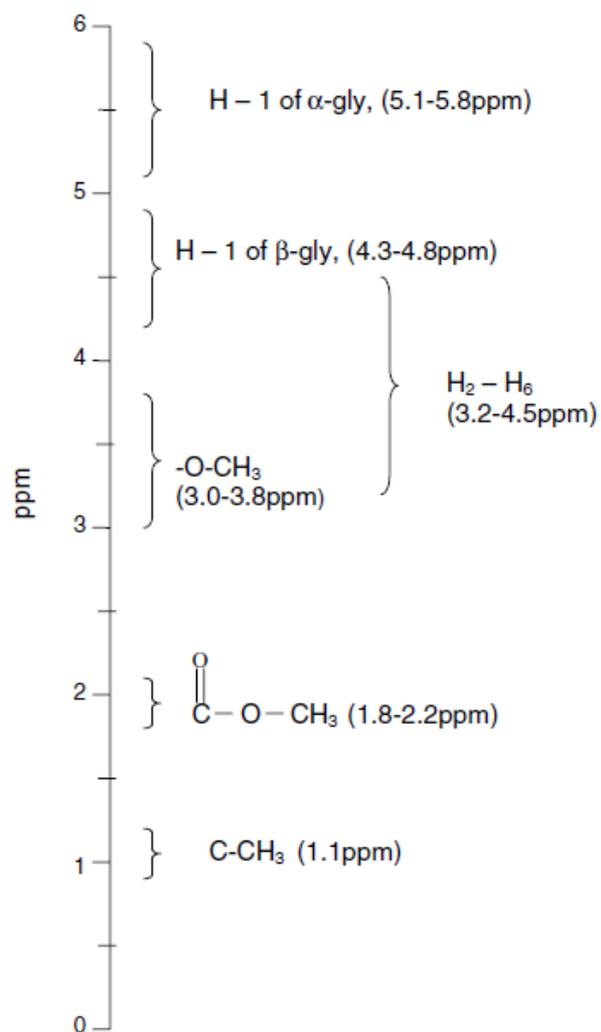
## $^1\text{H-NMR}$ chemical shift



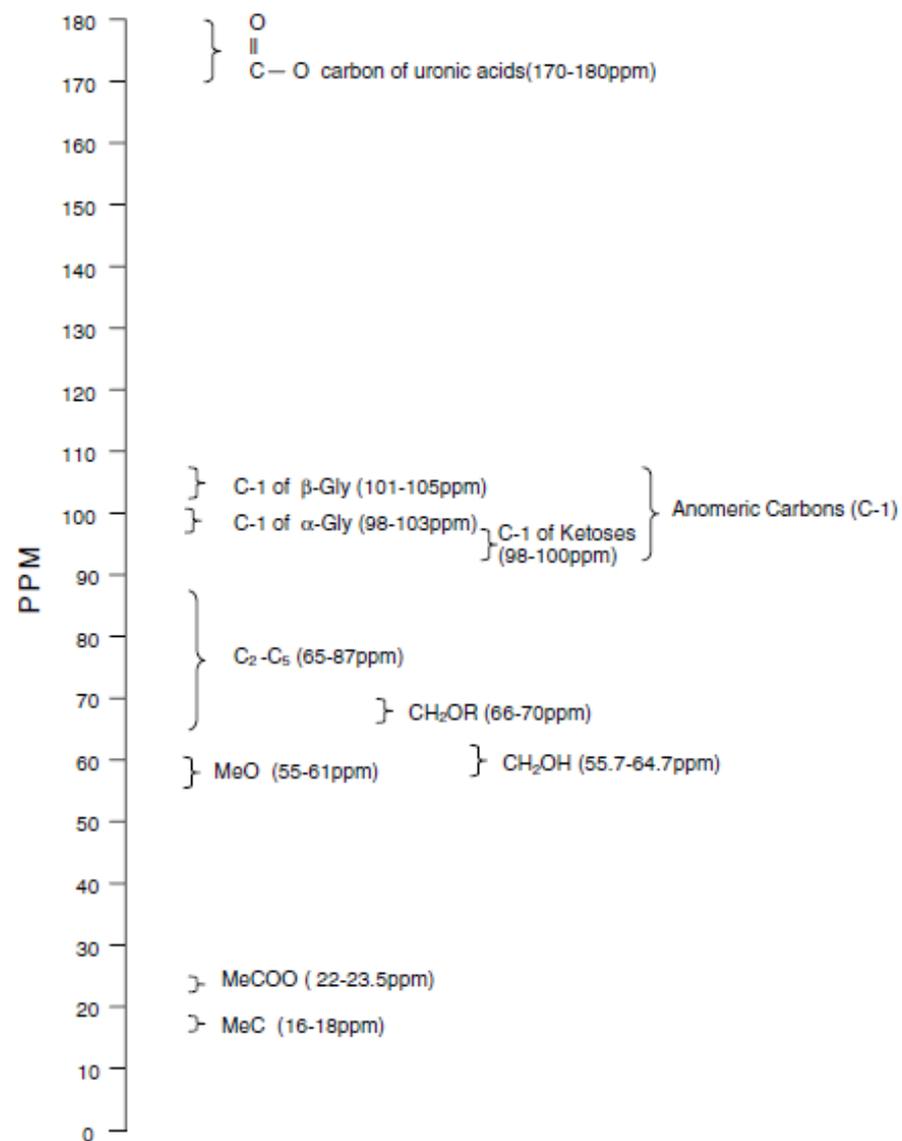
# NMR DI CARBOIDRATI

## $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift





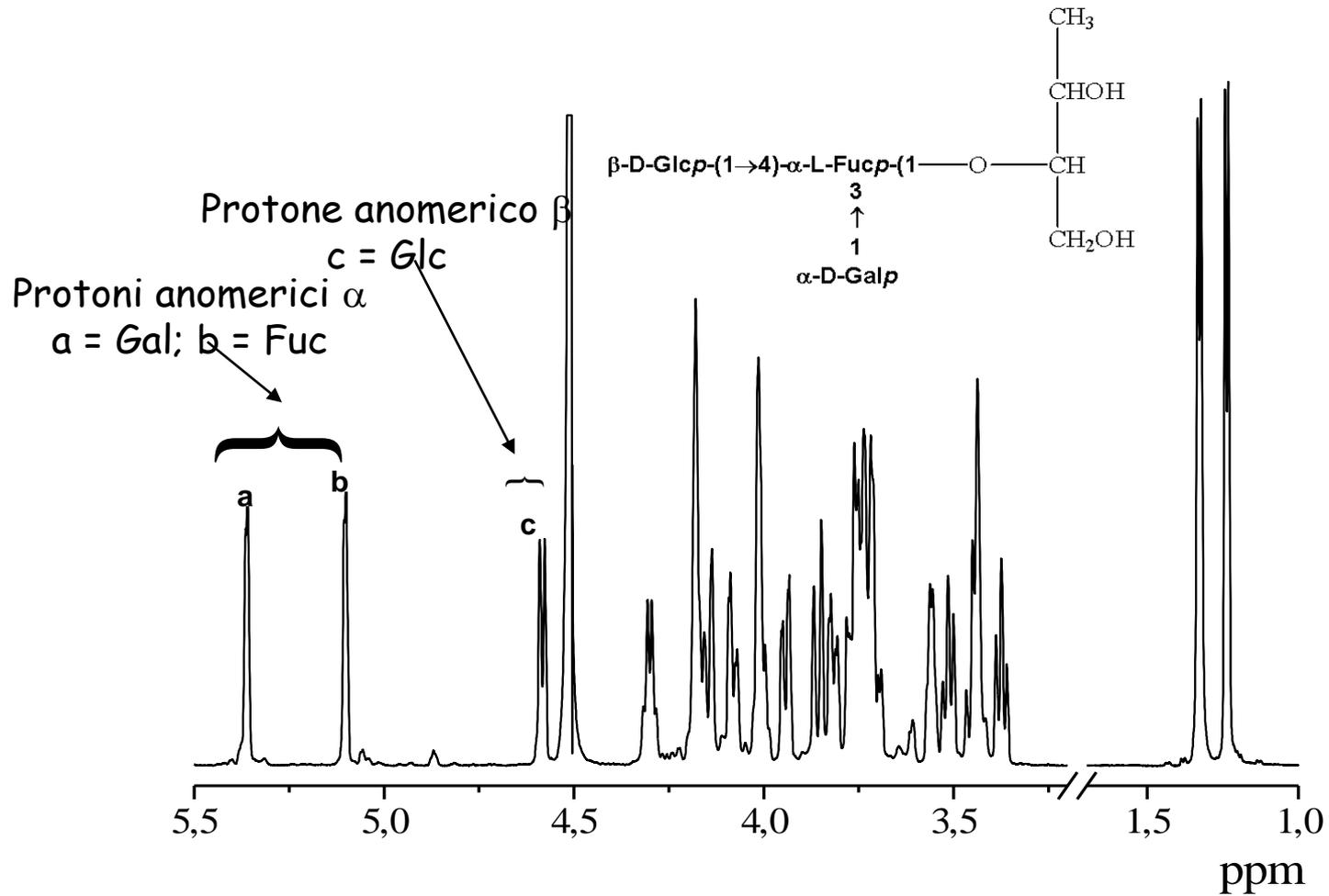
**FIGURE 3.29**  
Illustration of chemical shifts of carbohydrates in <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.



**FIGURE 3.30**  
Illustration of chemical shifts of carbohydrates in <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.



Il polimero viene sonicato per diminuire il peso molecolare, e quindi la viscosità della soluzione, che è causa di bande NMR troppo allargate.

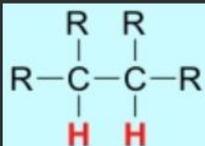


Spettro  $^1\text{H-NMR}$

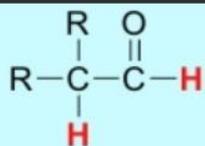
**Chemical shifts  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .** I chemical shifts sono dati relativamente al segnale dell'acetone (ref. interno) (2.225 ppm per  $^1\text{H}$  e 31.07 ppm per  $^{13}\text{C}$ ).

Residue	Nucl	Chemical shift (ppm)	
			2
Gal( $\alpha$ 1- (a)	$^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$	3.82 69.4	
3,4)Fuc( $\alpha$ 1- (b)	$^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$	4.08 69.6	
Glc( $\beta$ 1- (c)	$^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$	3.38 74.0	
4-d-Thr-ol (d)	$^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$	3.56 83.9	

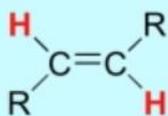
# Costanti di Accoppiamento



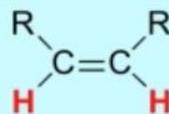
6-8 Hz



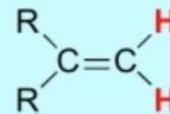
2-3 Hz



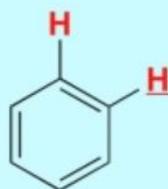
12-18 Hz



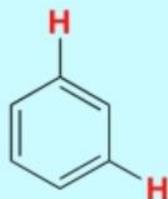
6-12 Hz



0-2 Hz



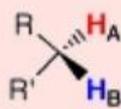
6-10 Hz



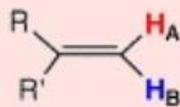
1-3 Hz

(4-bond coupling)

**geminal**

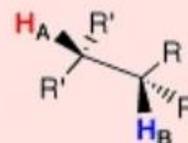


12-15 Hz

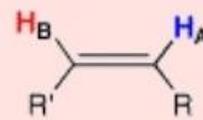


0-3 Hz

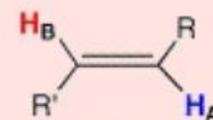
**vicinal**



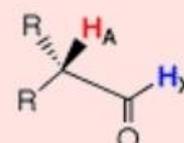
6-8 Hz



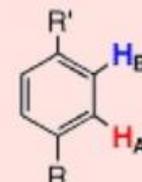
7-12 Hz



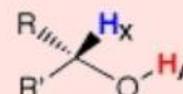
13-18 Hz



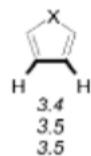
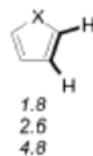
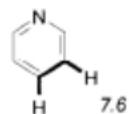
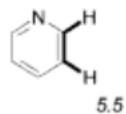
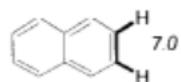
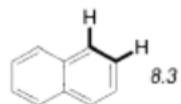
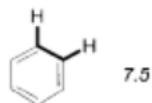
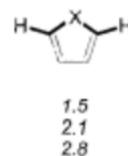
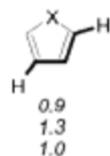
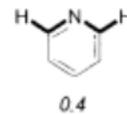
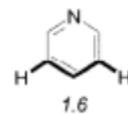
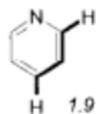
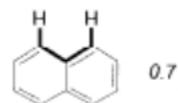
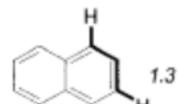
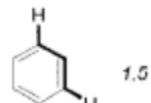
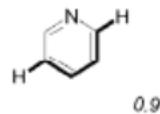
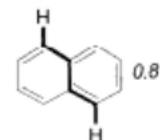
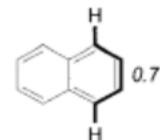
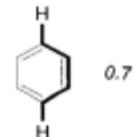
1-3 Hz



6-9 Hz

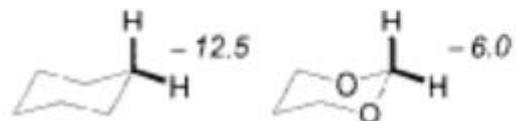


0-7 Hz

$^3J_{HH}$  $^4J_{HH}$  $^5J_{HH}$ 

X = O  
X = NH  
X = S

$^2J_{HH}$   
geminal protons

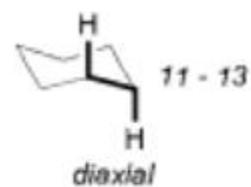
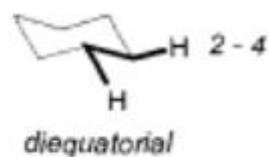
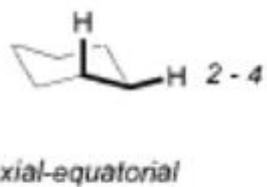


$^4J_{HH}$   
protons with w-relationships

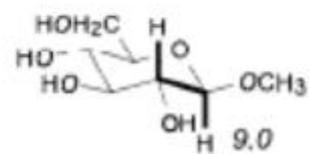
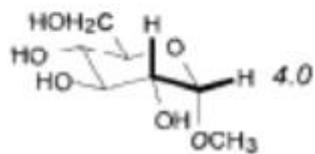


$^3J$  [Hz]

Cyclohexanes



Pyranoses



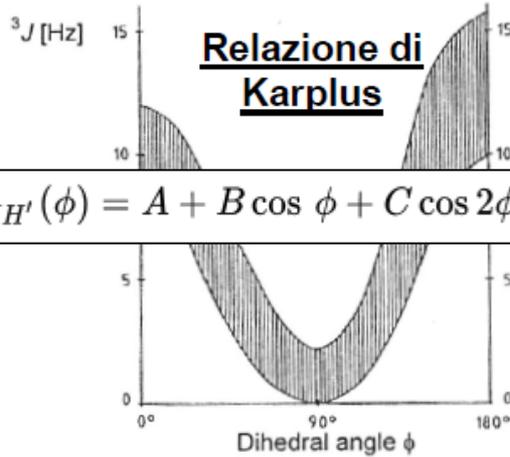
# NMR DI CARBOIDRATI

## Costanti di accoppiamento vicinali

$${}^3J_{H,H}$$

**Relazione di Karplus**

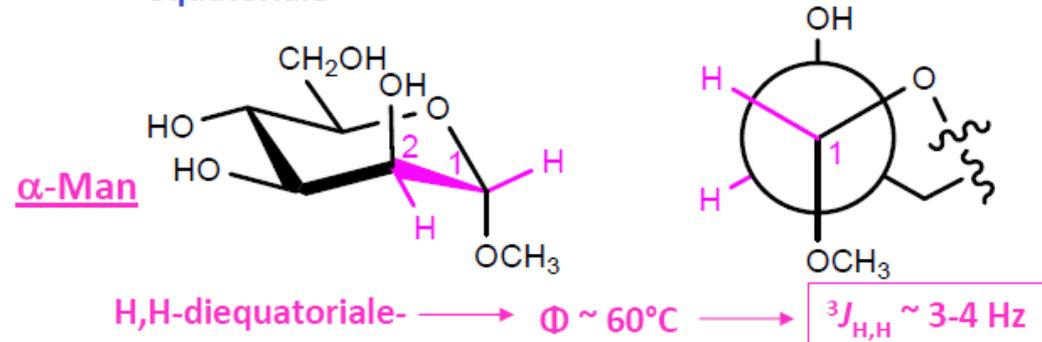
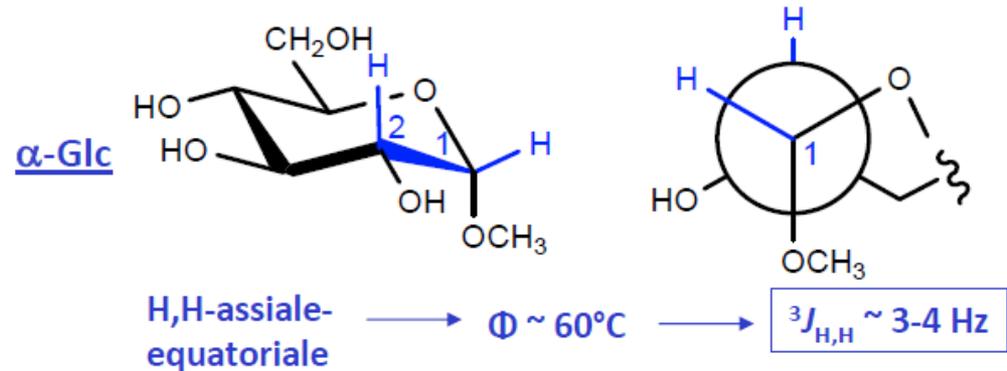
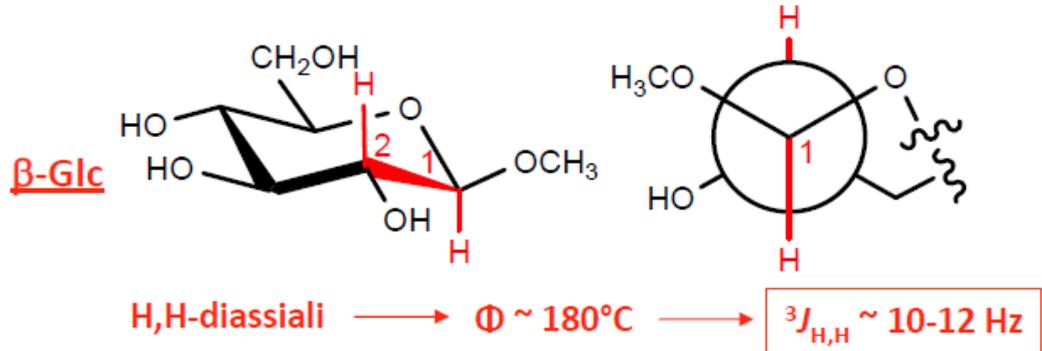
$$J_{HH'}(\phi) = A + B \cos \phi + C \cos 2\phi$$



Identificazione dei monosaccaridi

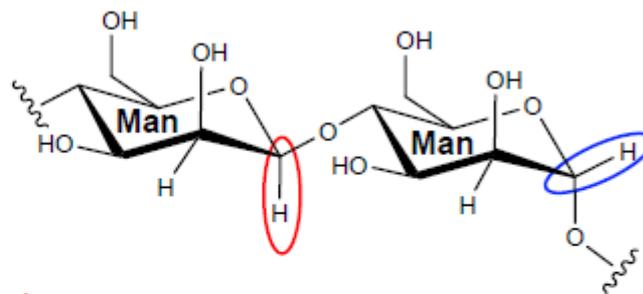
Identificazione della configurazione anomerica

Identificazione del tipo di ciclizzazione



costanti di accoppiamento  $^1J_{C,H}$

.....



- H anomerico assiale** → configurazione  $\beta$  →  $^1J_{C,H} \leq 160$  Hz
- H anomerico equatoriale** → configurazione  $\alpha$  →  $^1J_{C,H} \geq 170$  Hz

**Identificazione della configurazione anomerica**

# Structural parameters of carbohydrates

The following is a list of structural features that can be elucidated by **NMR**:

- Chemical structure of each carbohydrate residue in a molecule, including
  - I. carbon skeleton size and sugar type (aldose/ketose)
  - II. cycle size (pyranose/furanose/linear)
  - III. stereo configuration of all carbons (monosaccharide identification)
  - IV. stereo configuration of anomeric carbon ( $\alpha/\beta$ )
  - V. absolute configuration (D/L)
  - VI. location of amino-, carboxy-, deoxy- and other functions
- Chemical structure of non-carbohydrate residues in molecule (amino acids, fatty acids, alcohols, organic aglycons etc.)
- Substitution positions in residues
- Location of phosphate and sulfate diester bonds