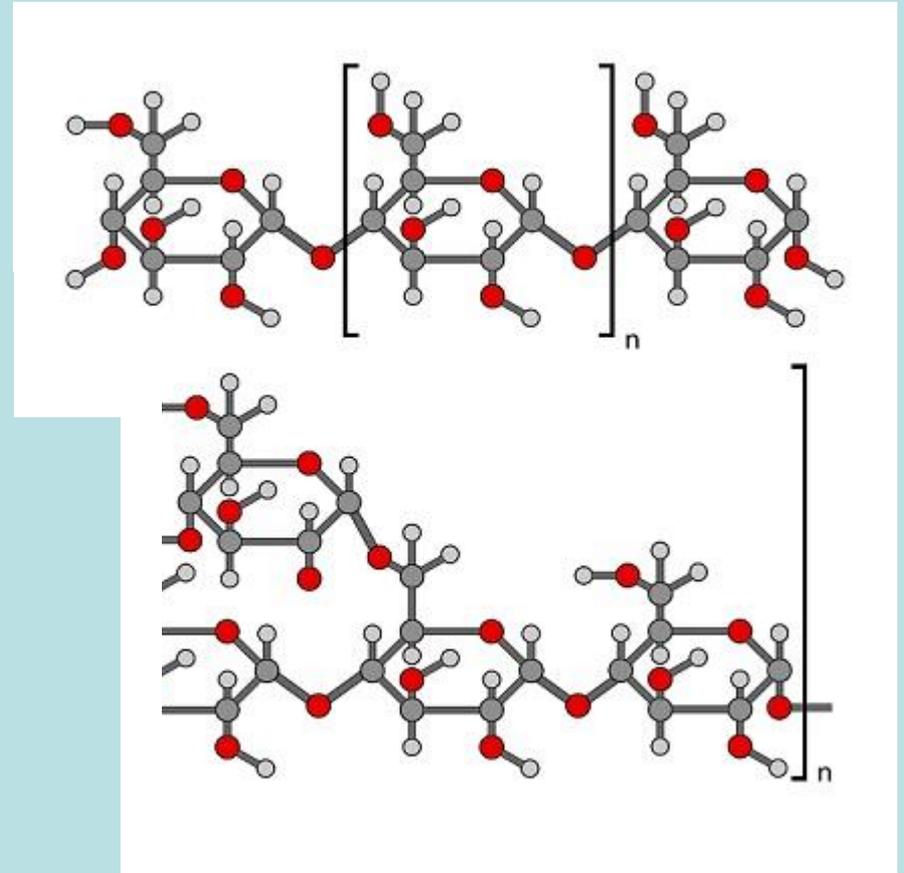


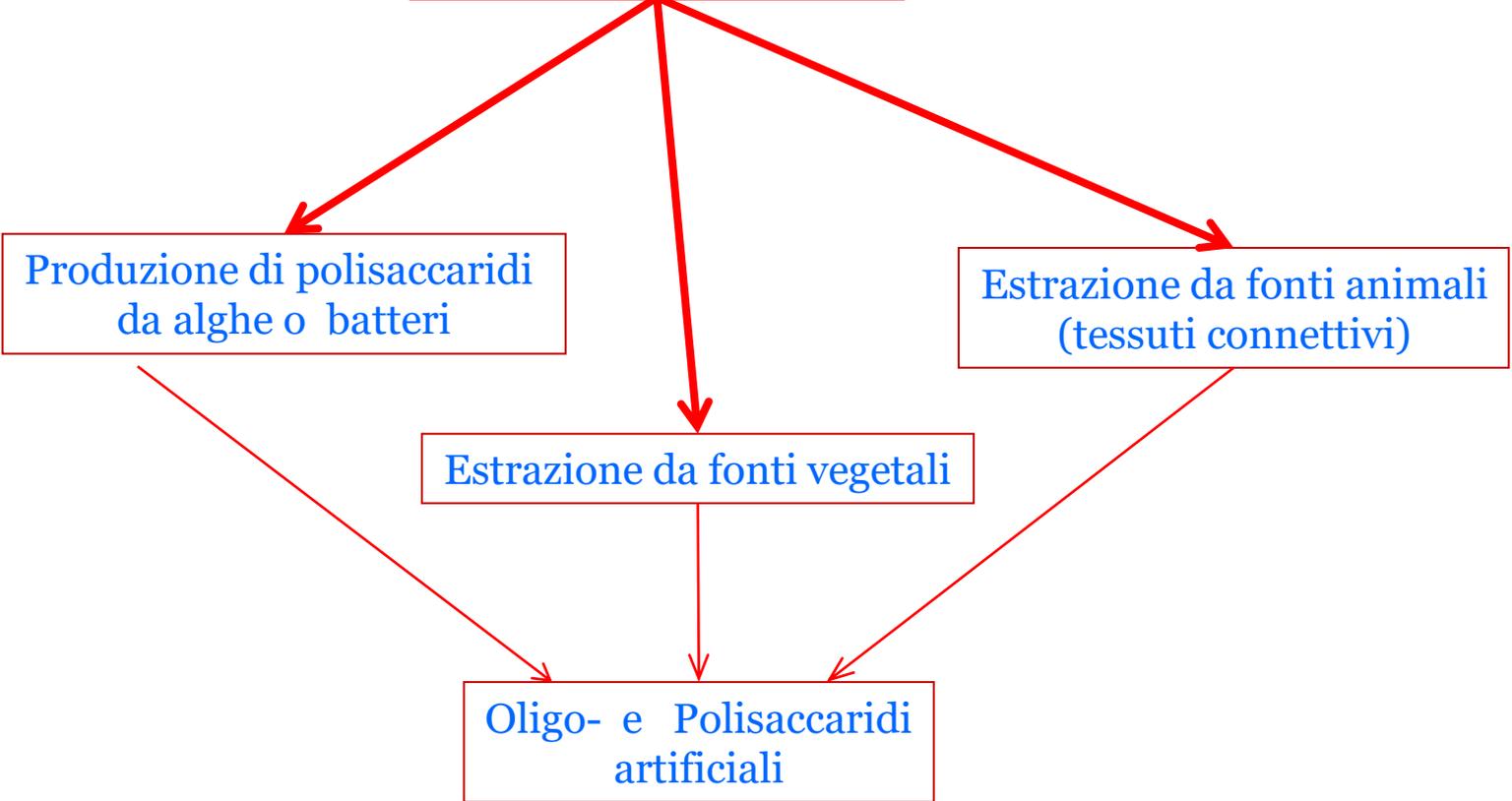
Proprietà di Biopolimeri

a.a. 2023-2024
Prof. Ranieri Urbani

***DETERMINAZIONE DELLA
STRUTTURA PRIMARIA DI
POLISACCARIDI***



ROW MATERIALS



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.



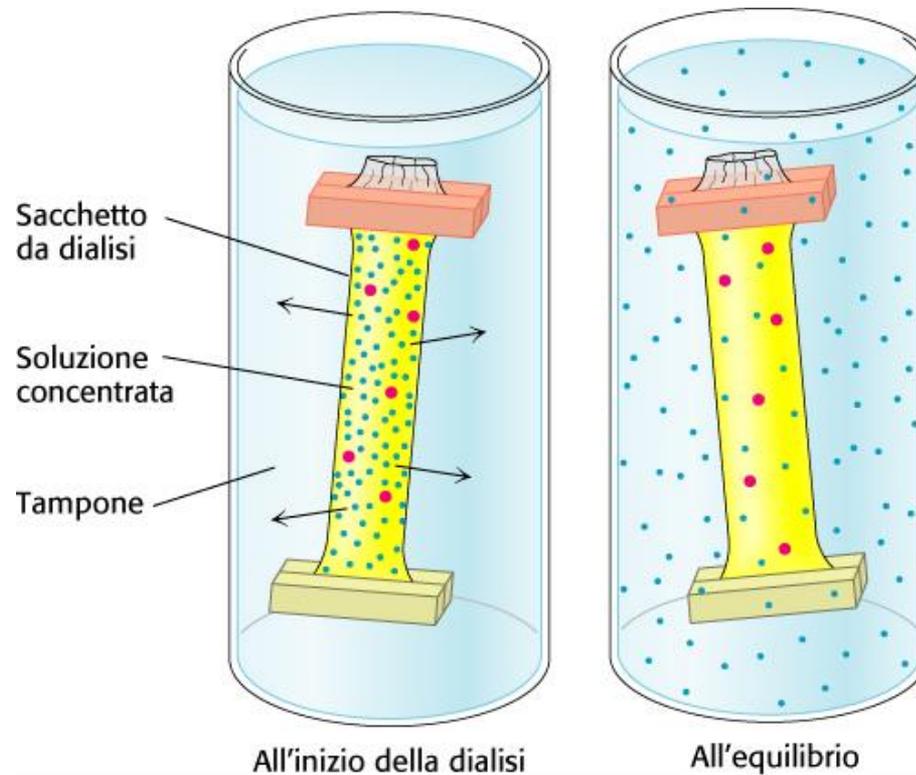
Man mano che le colonie batteriche/algali crescono e producono il polisaccaride la viscosità del mezzo cresce.

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



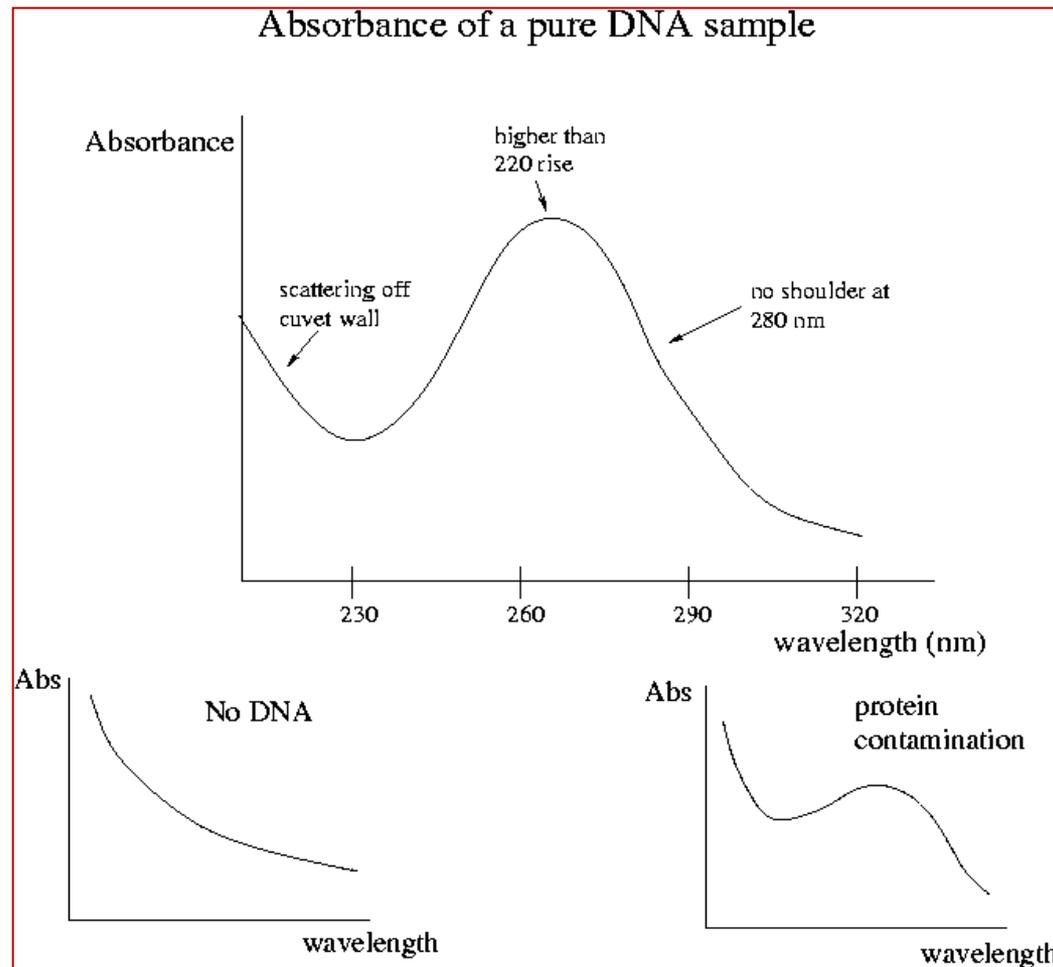
Generalmente la **purificazione** del prodotto si esegue mediante centrifugazione, precipitazione con 4-6 volumi di etanolo (o isopropanolo, o acetone), ri-dissoluzione in acqua e dialisi contro acqua.

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



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

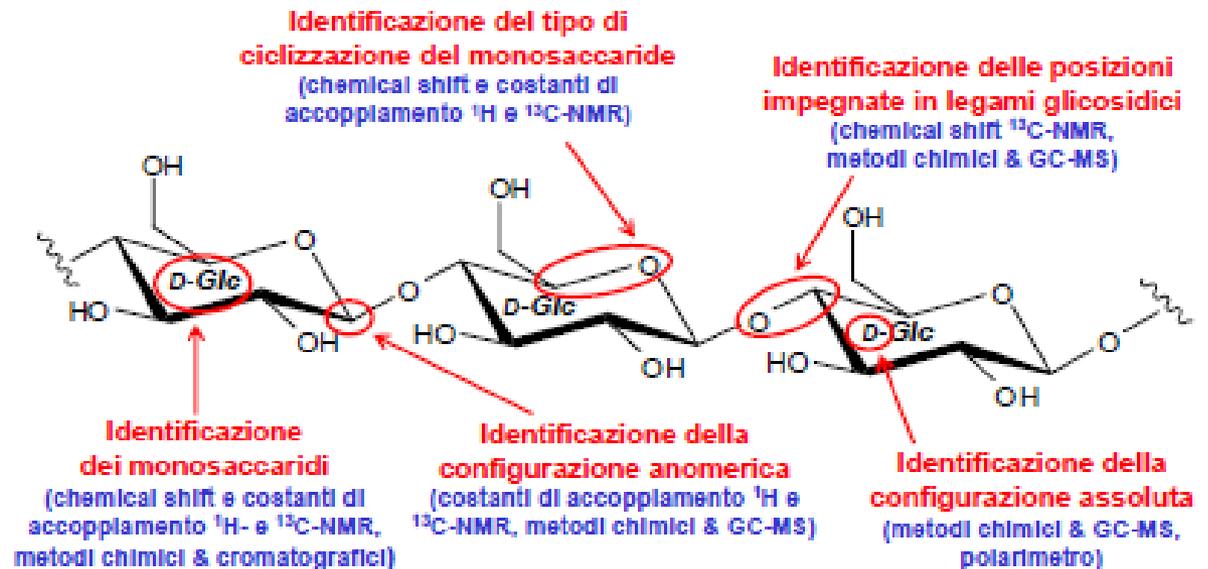
Si può utilizzare la spettroscopia UV o il CD



DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI UN POLISACCARIDE

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

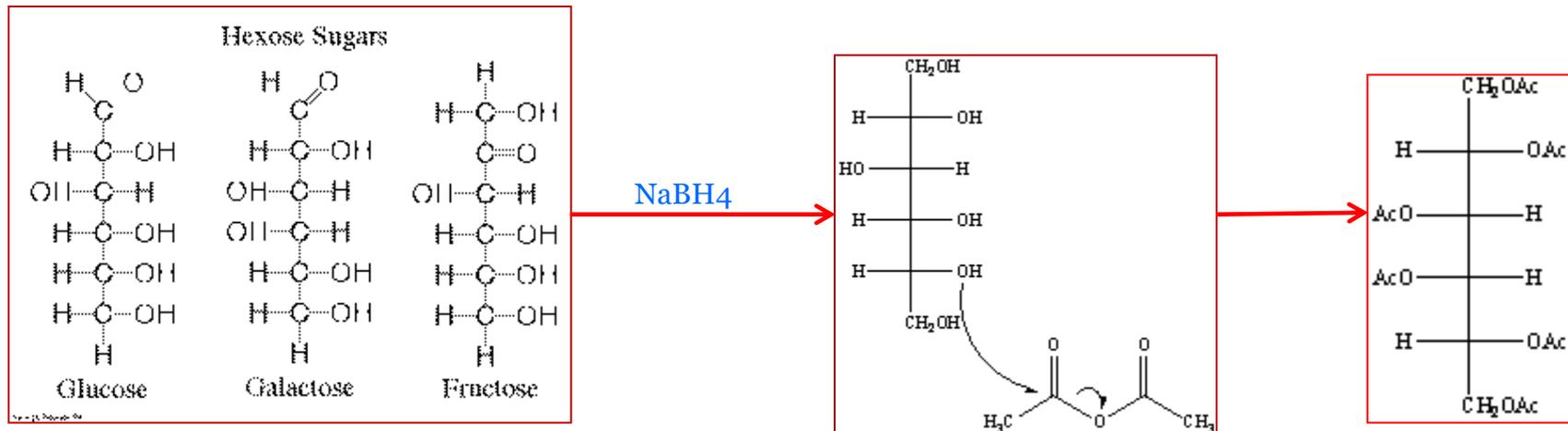
- **Composizione** monosaccaridica: natura e rapporti molari
- **Concatenazione** del legame glicosidico e delle eventuali ramificazioni
- **Conformazione** dell'anello: furanosio o piranosio
- **Configurazione anomeric**: configurazione α o β del legame glicosidico
- **Sequenza** di monosaccaridi nell'unità ripetitiva
- **Sostituzioni**: posizione e natura delle modificazioni sugli OH- (come la O-fosforilazione, l'acetilazione, la O-solfatazione, etc).



Analisi di composizione in zuccheri neutri

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

I monosaccaridi ottenuti sono ridotti ad **alditoli** con NaBH₄ e poi un'**acetilazione** dei prodotti.

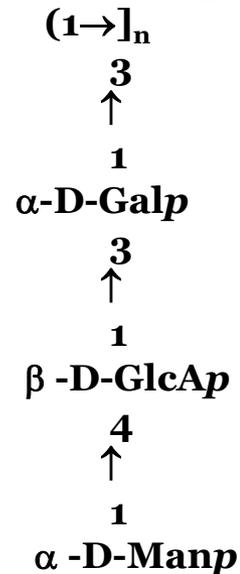


**Alditolo
acetilati**

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:

-[3)-β-D-Glcp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fuc-



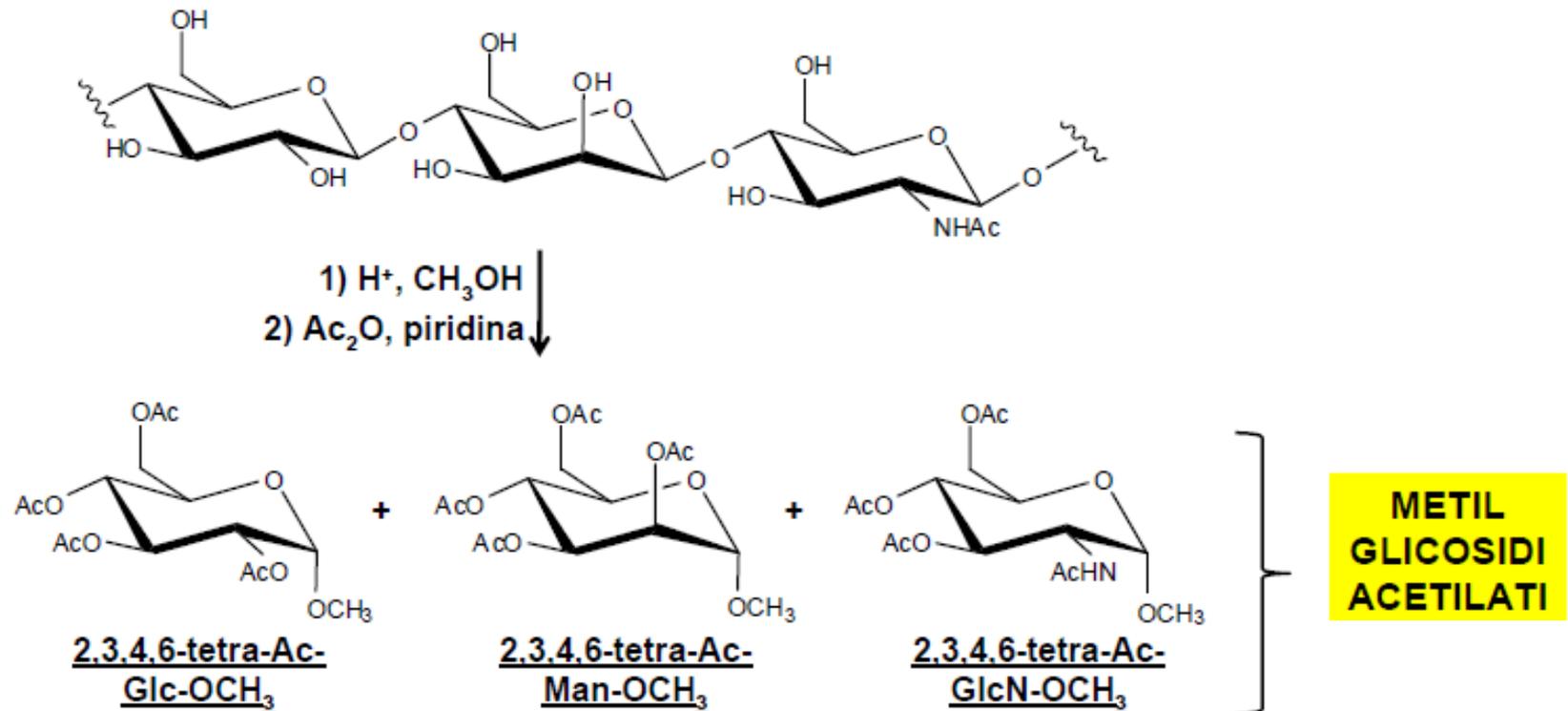
monosaccaride	Rapp mol rel
Fuc	1,5
Man	0,2
Gal	1,1
Glc	2.0

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

Altro metodo: METANOLISI

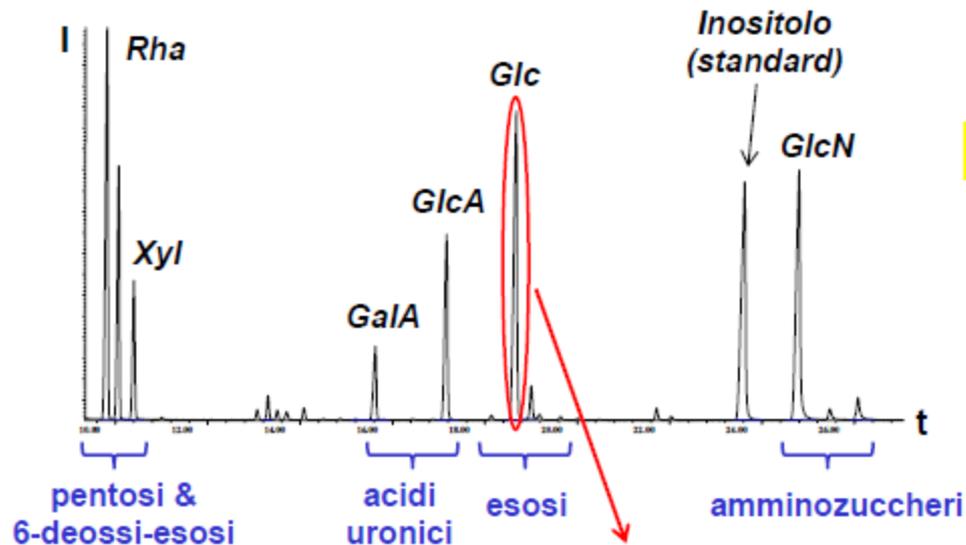
IDENTIFICAZIONE DEI MONOSACCARIDI

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

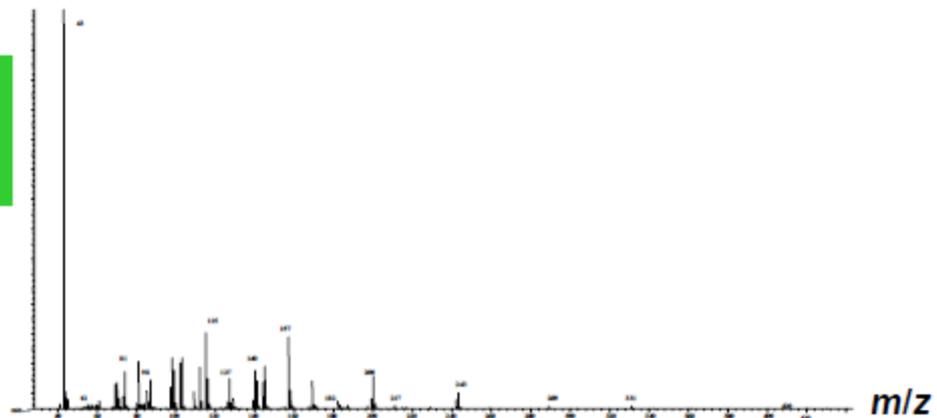


IDENTIFICAZIONE DEI MONOSACCARIDI

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

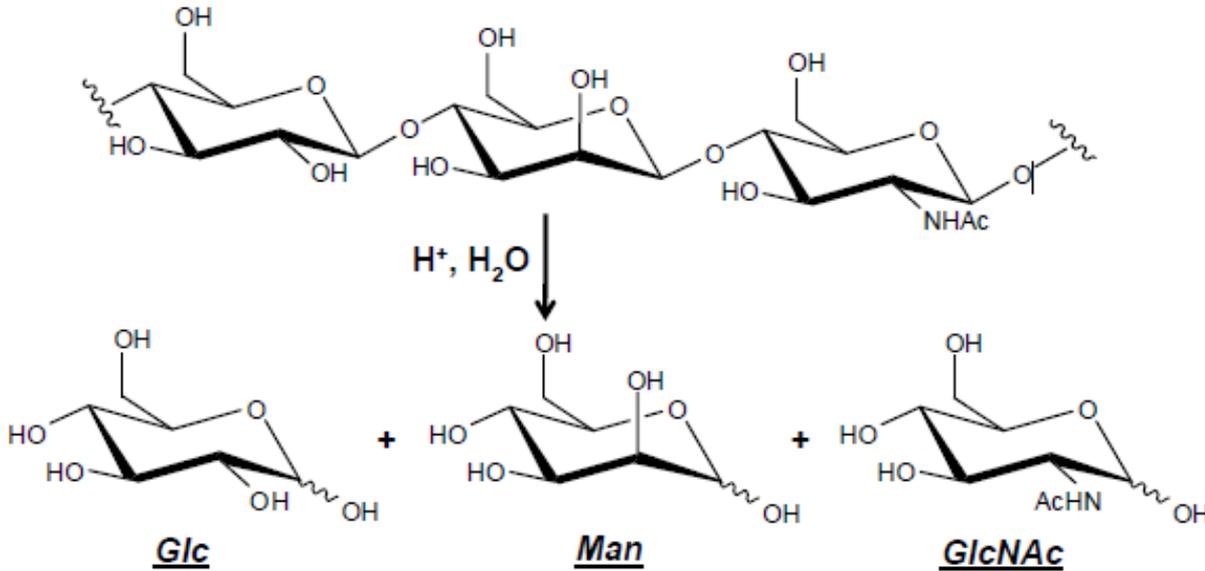


Spettro di massa
(impatto elettronico)
picco del gas-cromatogramma

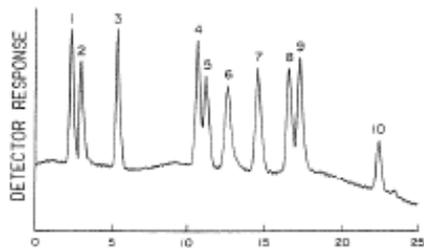


IDENTIFICAZIONE DEI MONOSACCARIDI (Cromatografia liquida)

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



← Detector -PAD
-ECD

using PAD with cleaning steps, the electrode remains clean and reproducible

Table 1. Dissociation constants of some common carbohydrates⁵ (in water at 25 °C)

Sugar	pK_a
Fructose	12.03
Mannose	12.08
Xylose	12.15
Glucose	12.28
Galactose	12.39
Dulcitol	13.43
Sorbitol	13.60
α -Methyl gluoside	13.71

Che cos'è il detector amperometrico pulsato (PAD)?

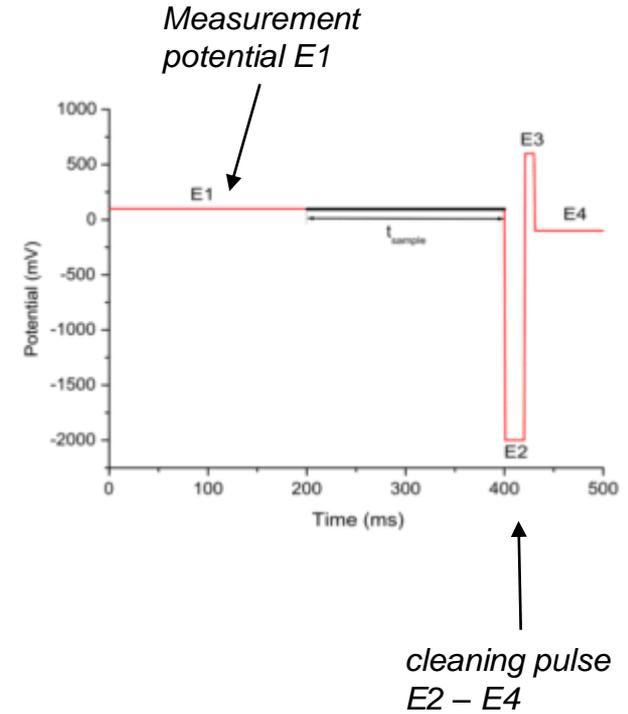
La rivelazione amperometrica pulsata (PAD) è utilizzata nell'analisi HPLC dei carboidrati e delle sostanze correlate.

A un pH elevato i carboidrati possono essere ossidati e analizzati con elevata sensibilità.

Utilizzando il PAD, le condizioni di misurazione rimangono stabili e riproducibili.

Nella rilevazione amperometrica pulsata (PAD), viene applicata una rapida sequenza di passaggi di potenziale. Durante una parte di questa "sequenza di impulsi", il segnale viene campionato.

L'altra parte della sequenza di passaggi è costituita da fasi di pulizia ossidativa e riduttiva. Durante questa pulizia, l'elettrodo di lavoro in oro viene rigenerato.



Il processo si ripete di solito **ogni mezzo secondo** circa. Ciò garantisce condizioni di rilevamento stabili e riproducibili.

L'uso del PAD è davvero necessario, perché la rilevazione elettrochimica (ossidazione) dei carboidrati genera prodotti di reazione che si attaccano alla superficie dell'elettrodo.

Questo contamina l'elettrodo e causa una cattiva riproducibilità.

Utilizzando il PAD con fasi di pulizia, l'elettrodo rimane pulito e riproducibile.

Un tipico impulso a tre fasi deve essere configurato in quattro fasi.

Ad esempio, una tipica forma d'onda per un elettrodo d'oro utilizzato per i carboidrati richiede i seguenti quattro passaggi:

STEP	POTENTIAL (mV)	DURATION (mSec)	FUNCTION
1	50	400	Equilibration
2	50	200	Data
3	800	200	Cleaning
4	-600	200	Regeneration

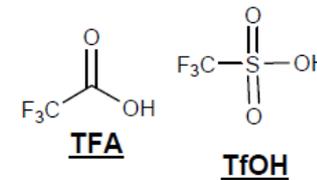
DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

- ❖ Idrolisi parziale
- ❖ Acetolisi
- ❖ Degradazione di Smith
- ❖ Degradazione in ambiente basico: β -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

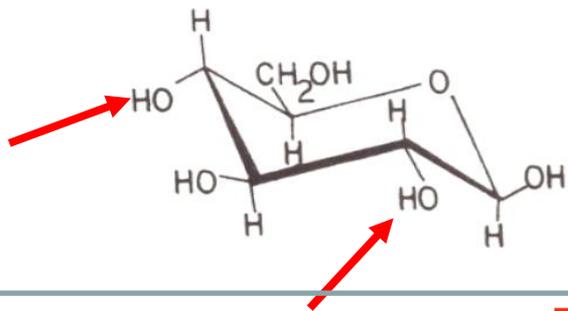


Ac. trifluorometan solfonico

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

Idrolisi completa

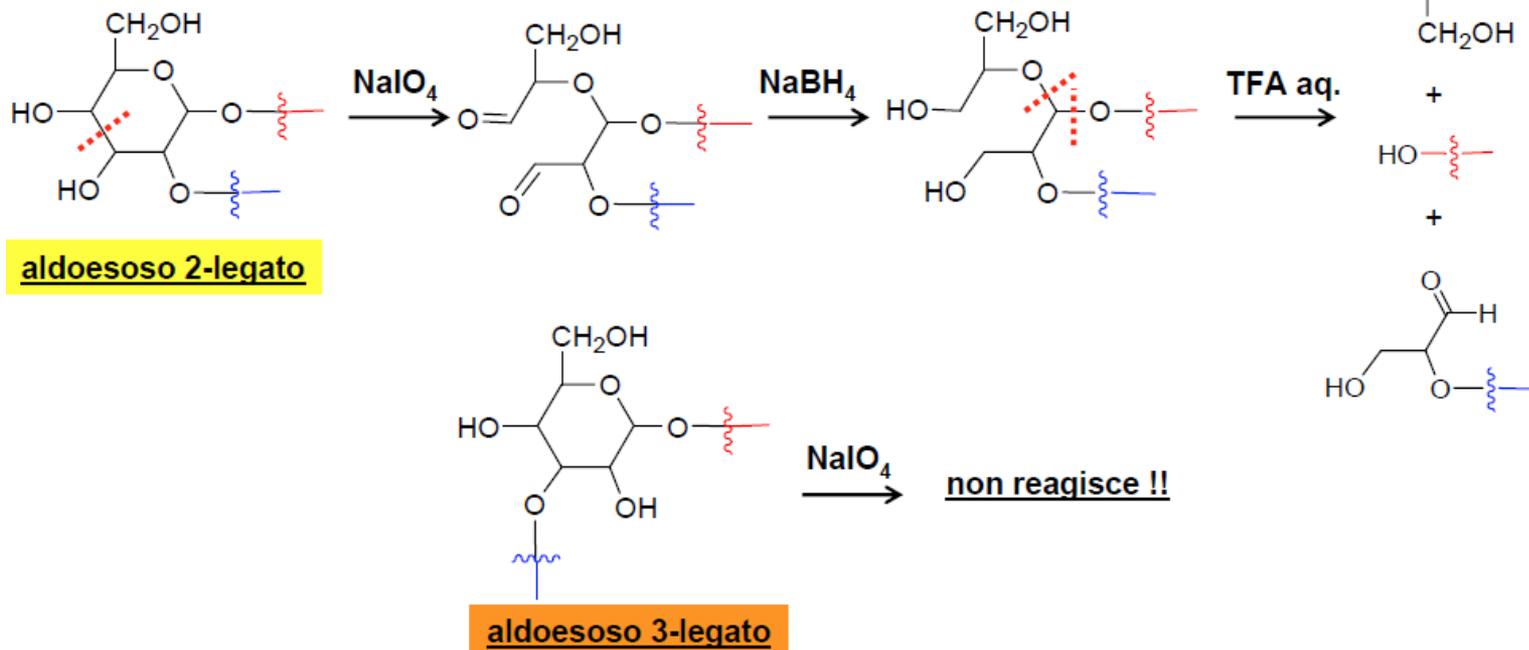
- TFA 2 M a 120°C per 1-2 h
- H₂SO₄ 0,5-1 M a 100°C per 4-6 h,
- HCl 4 M a 100°C per 6 h
- H₂SO₄/AcOH a 100°C per 9 h



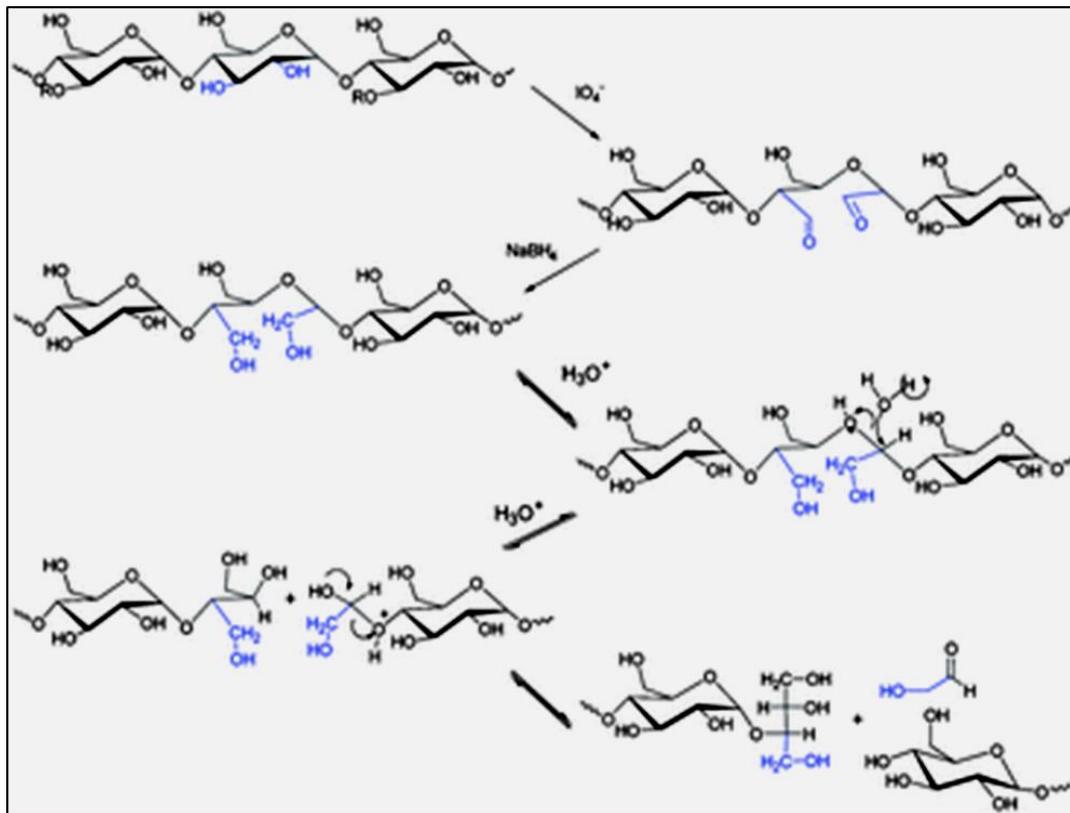
DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

DEGRADAZIONE DI SMITH: rottura selettiva per ossidazione dioli vicinali

- ossidazione del diolo con periodato di sodio (NaIO_4)
- riduzione dei gruppi carbonilici (NaBH_4)
- idrolisi selettiva di acetali/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**.

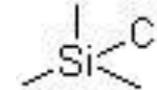
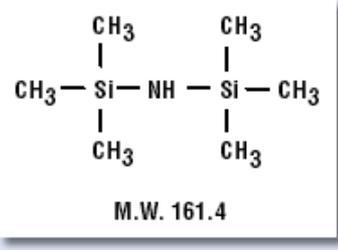


Una ulteriore analisi di composizione riguarda la determinazione degli:

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.

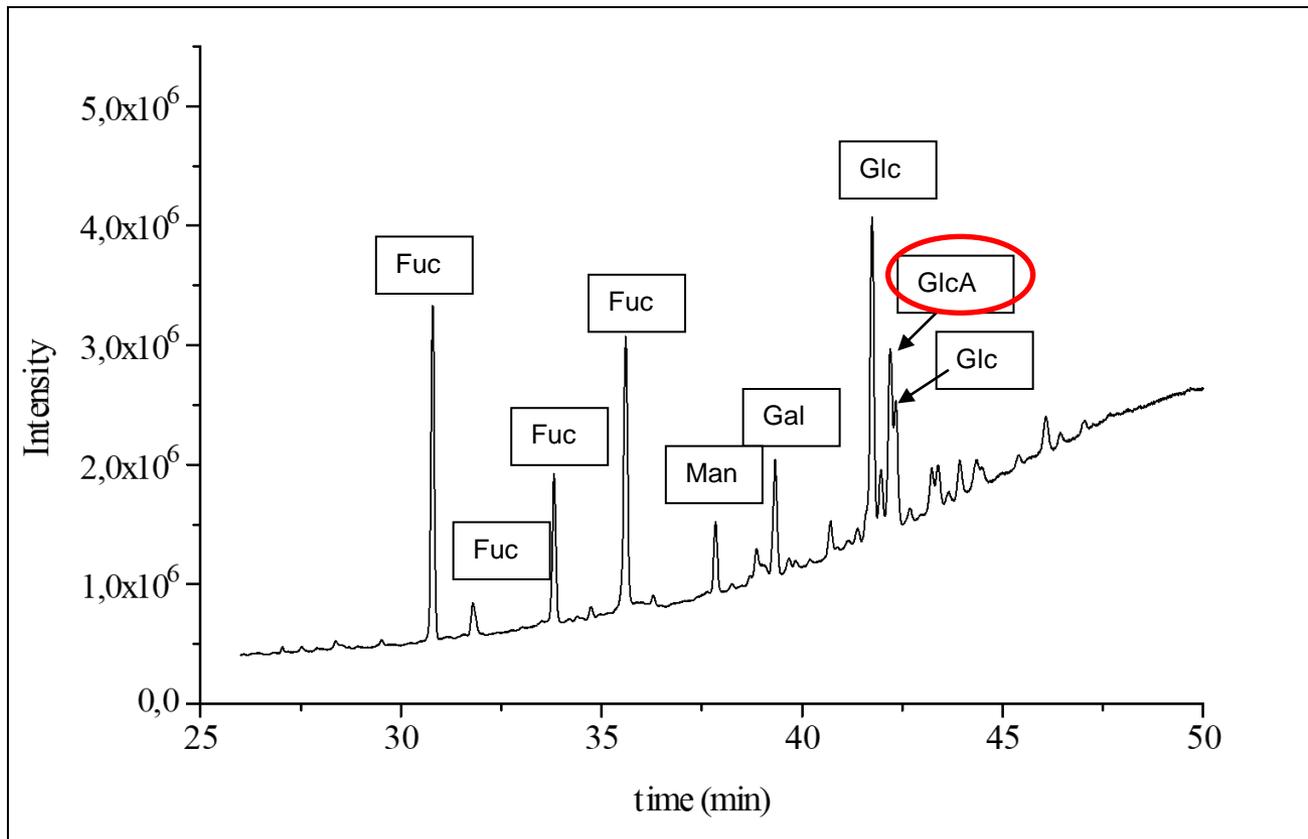
I derivati sililati si formano quando si ha sostituzione di un idrogeno attivo con un gruppo alchilsilile (ad es. in **gruppi -OH, -SH, -NH**).

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 dell'acido uronico



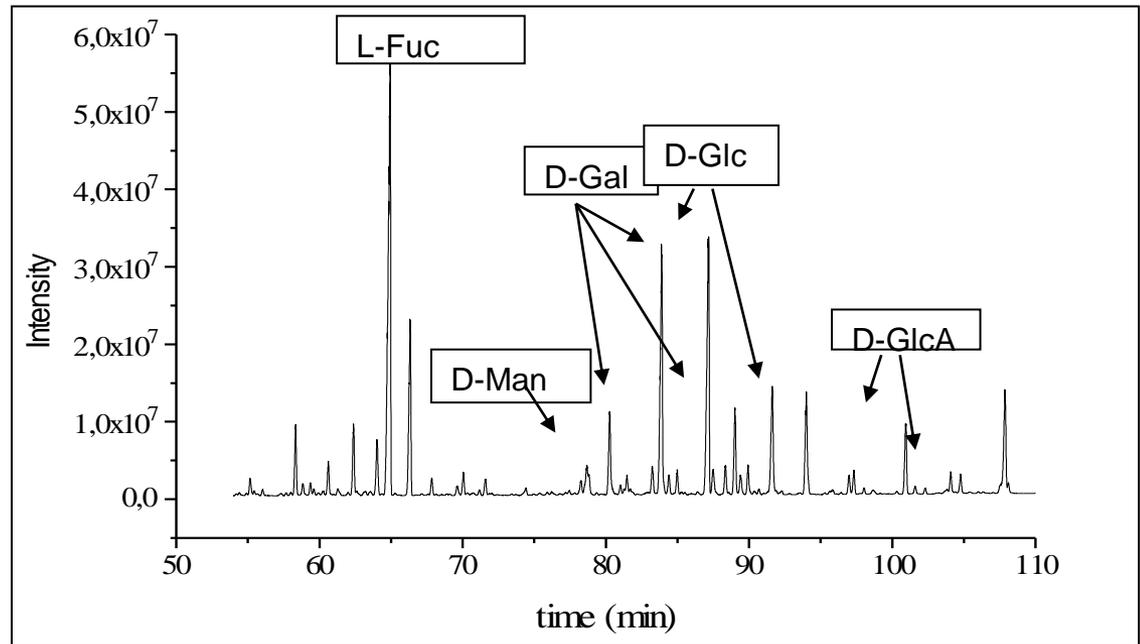
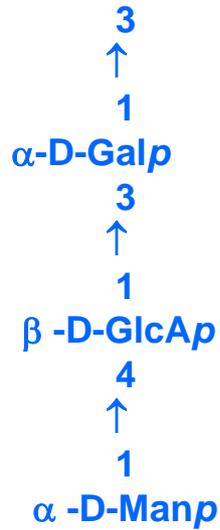
E' necessario verificare se **l'enantiomeria** dei saccaridi nel polimero è **L o D**:

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 confronto con composti standard permette di risolvere il problema.

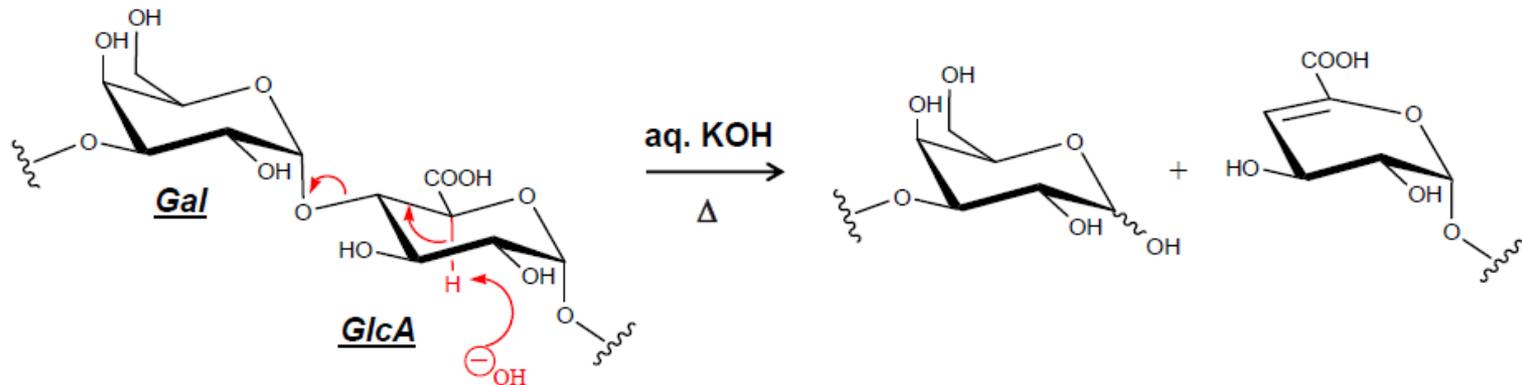
A seconda della configurazione D o L del residuo si ottengono due differenti derivati diastereoisomerici con un **diverso tempo di ritenzione** in colonna capillare

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

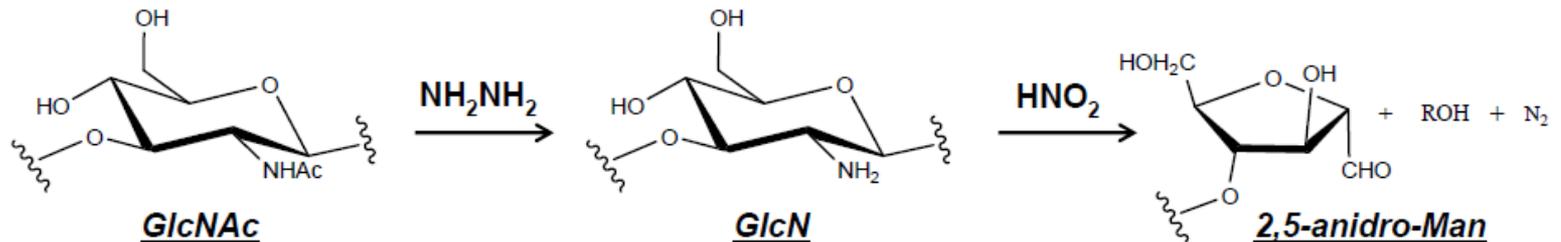


DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

β -ELIMINAZIONE: scissione selettiva su acidi uronici 4-legati

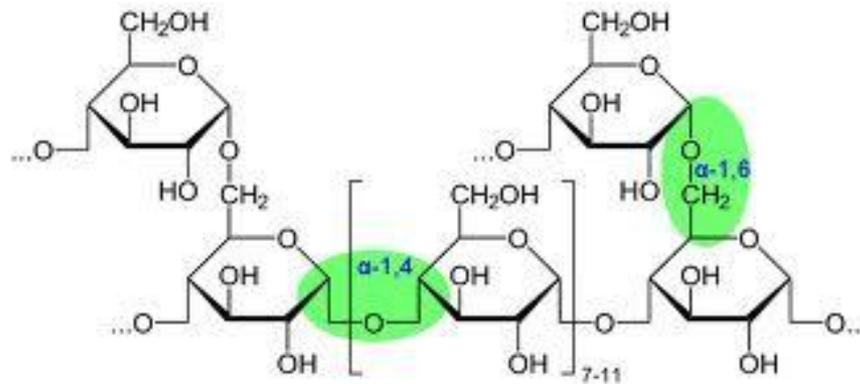


DEAMMINAZIONE: scissione selettiva per amminozuccheri con N equatoriale



Determinazione dei legami glicosidici

per determinare come i vari monosaccaridi sono connessi tra loro
(α , β , 1-2, 1-3, 1-4, 1-6)

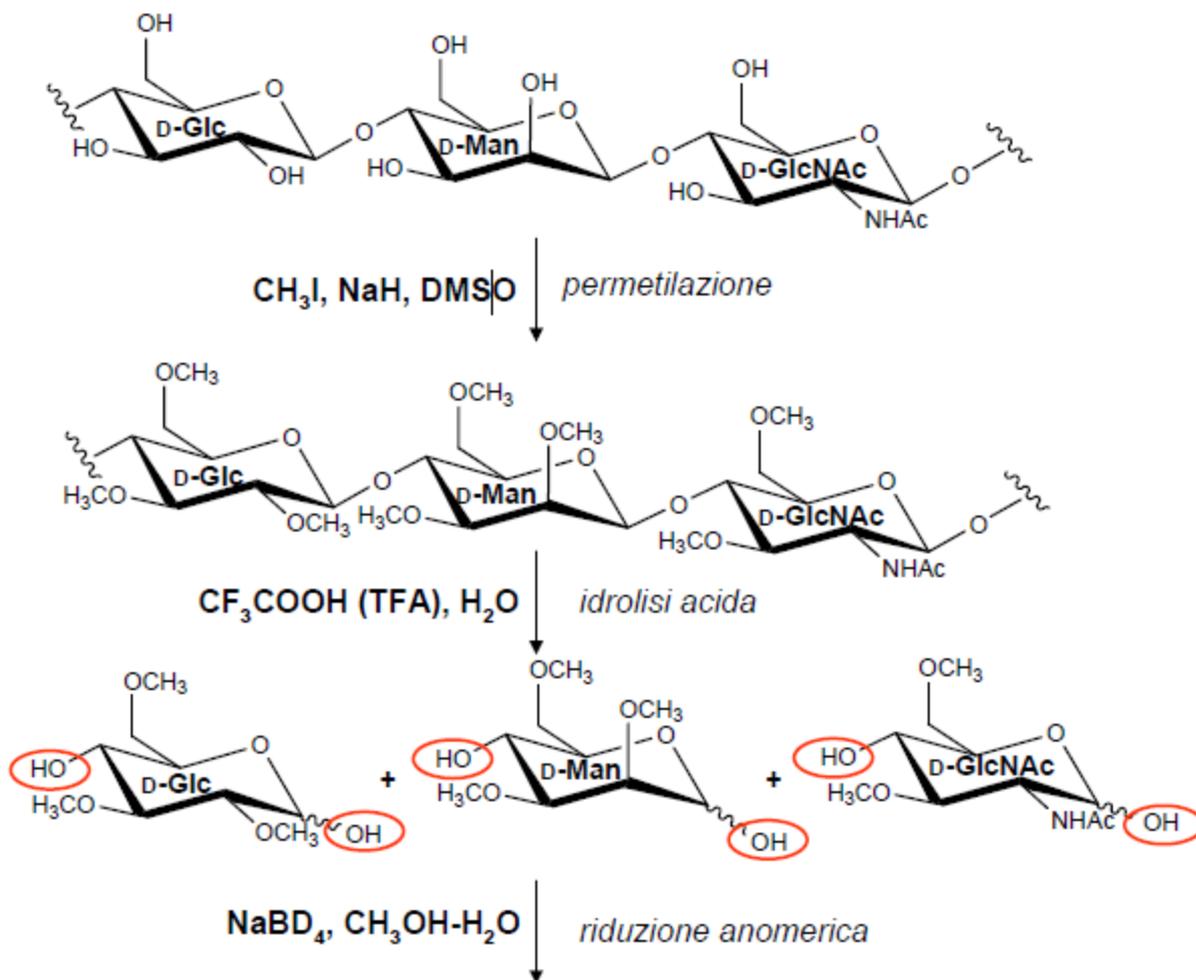


METILAZIONE ESAUSTIVA (**permetilazione**)

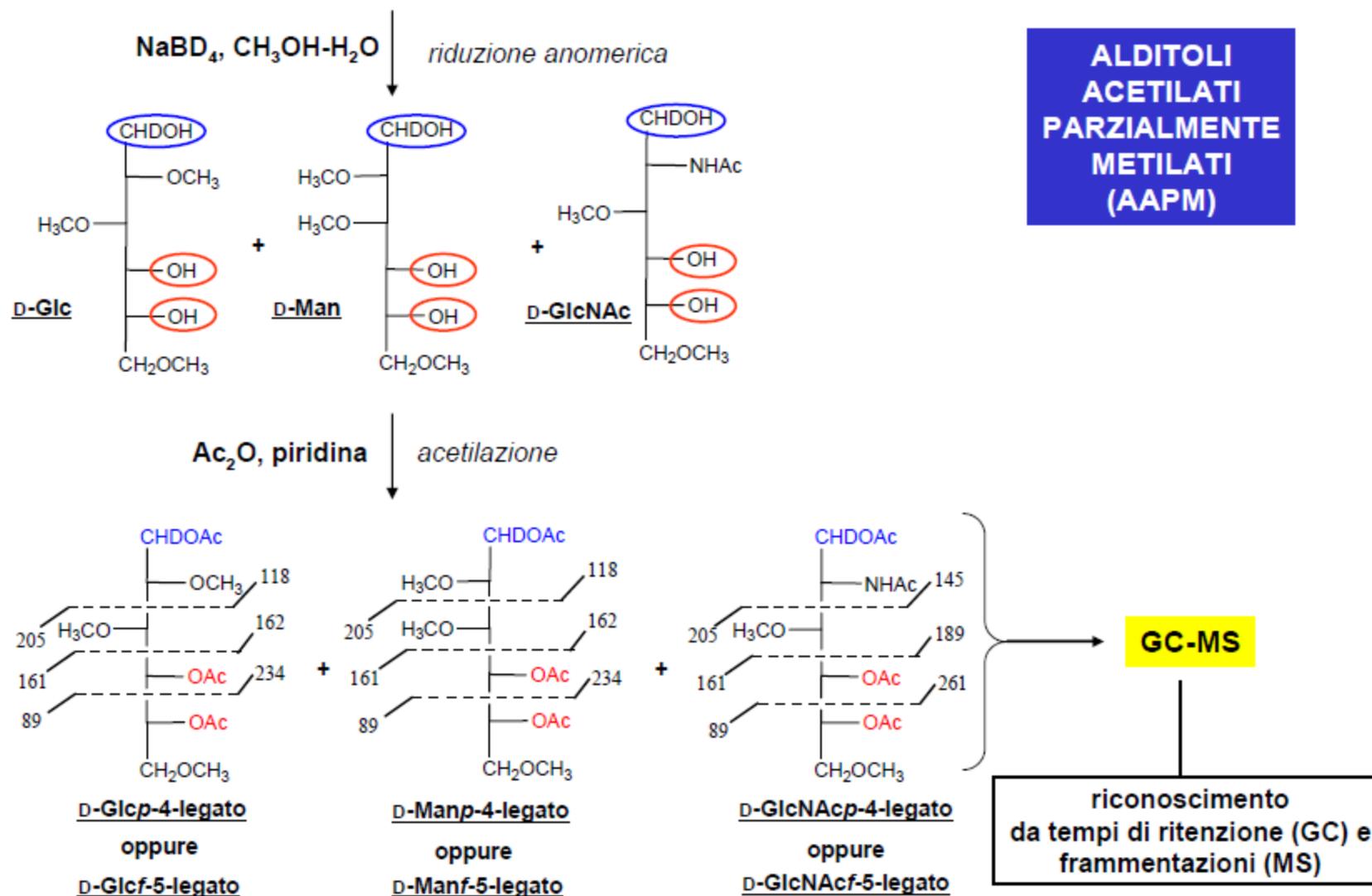
- La metilazione è basata sulla **conversione completa** ad eteri metilici di tutti gli ossidrili liberi del poli/oligosaccaride (CH_3I)
- Le condizioni di reazione molto **basiche**, richieste per la metilazione, non sono dannose per i legami glicosidici, poiché, questi risultano essere stabili in tali 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 NaBD_4

IDENTIFICAZIONE DELLE POSIZIONI IMPEGNATE NEI LEGAMI GLICOSIDICI

**ALDITOLI
ACETILATI
PARZIALMENTE
METILATI
(AAPM)**



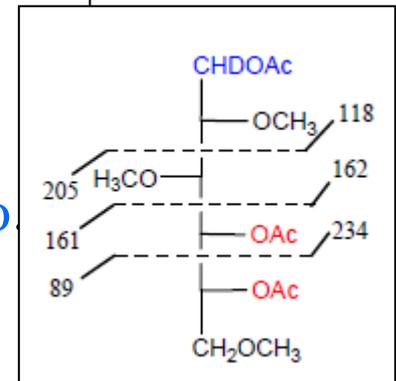
IDENTIFICAZIONE DELLE POSIZIONI IMPEGNATE NEI LEGAMI GLICOSIDICI



Spettrometria di Massa

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

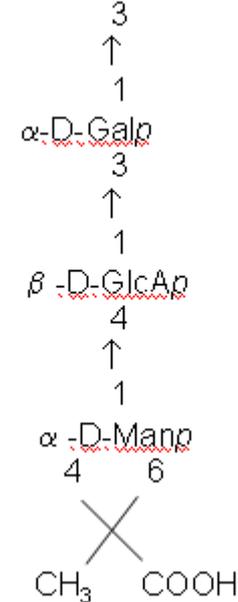
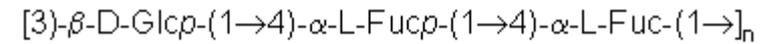
- i **frammenti primari** si formano dalla rottura dello scheletro carbonioso dell' alditolo.
- la **carica** risiede sempre sul frammento che ha l'atomo di carbonio legato ad un metossile ed adiacente al punto in cui si frammenta lo scheletro
- la frammentazione tra due atomi di carbonio che legano 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.



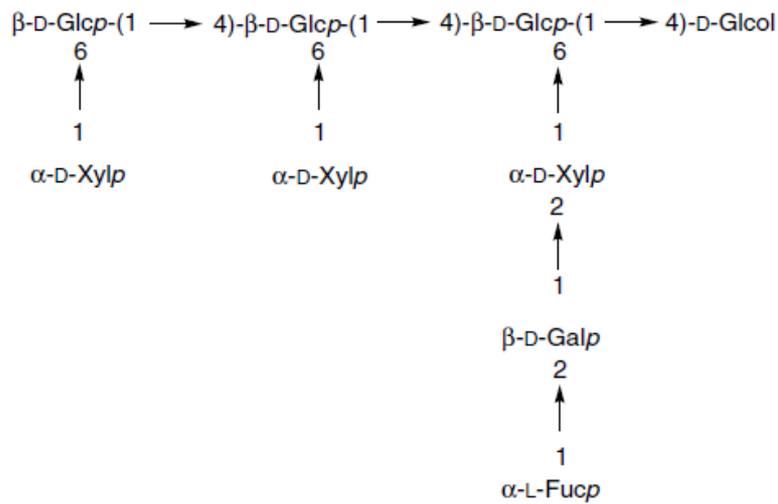
Dai risultati GC-MS è possibile distinguere le posizioni acetilate da quelle metilate ed identificare così quelle coinvolte nei **legami glicosidici** del monosaccaride da cui deriva.

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 ^a	RRT ^b	Rapporto Molare Relativo ^c
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.)³⁷

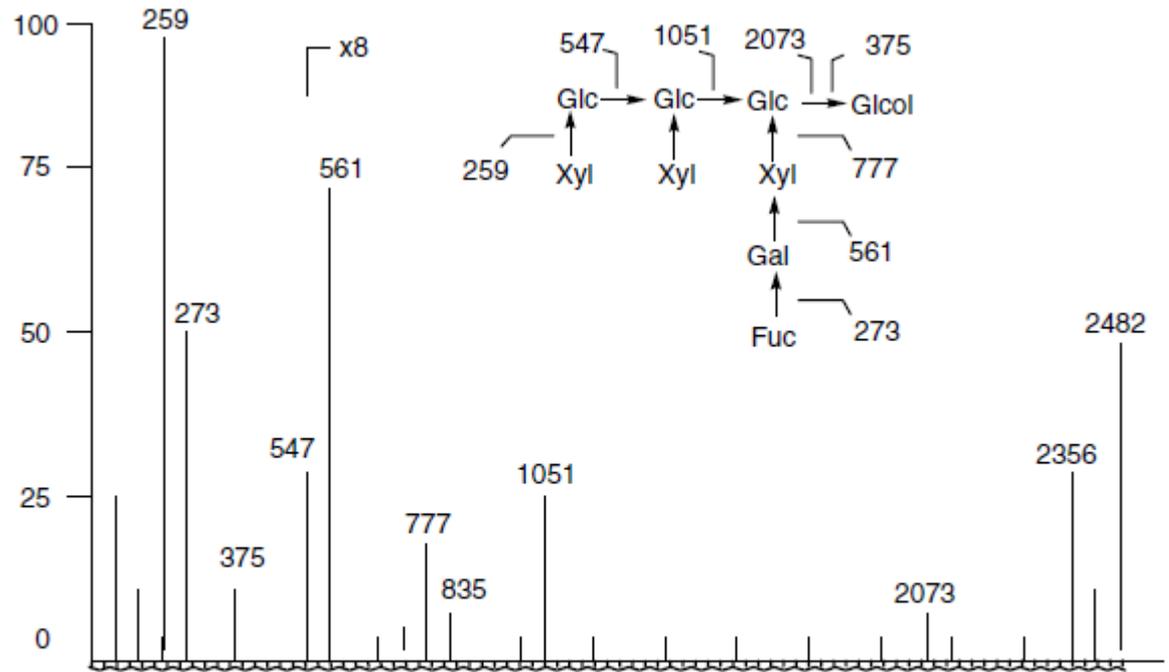
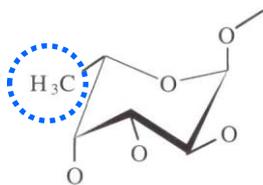
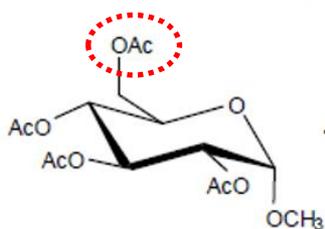
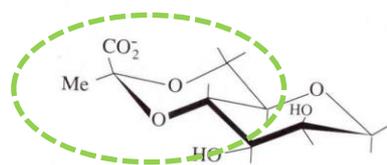


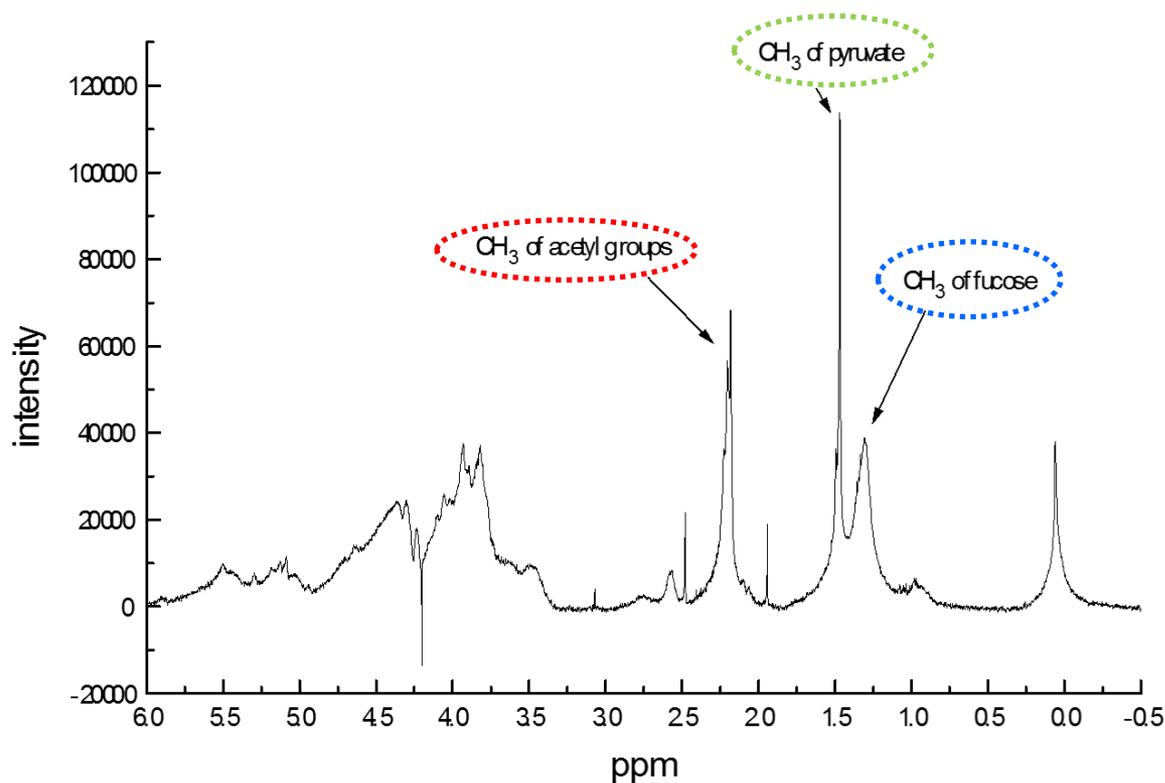
FIGURE 3.24
Positive ion FAB mass spectrum of an acetylated xyloglucan alditol. (Adapted from York, et al., 1990.)³⁷

DETERMINAZIONE DI SOSTITUENTI NON-SACCARIDICI: gruppo piruvile, gruppo O-acetile

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

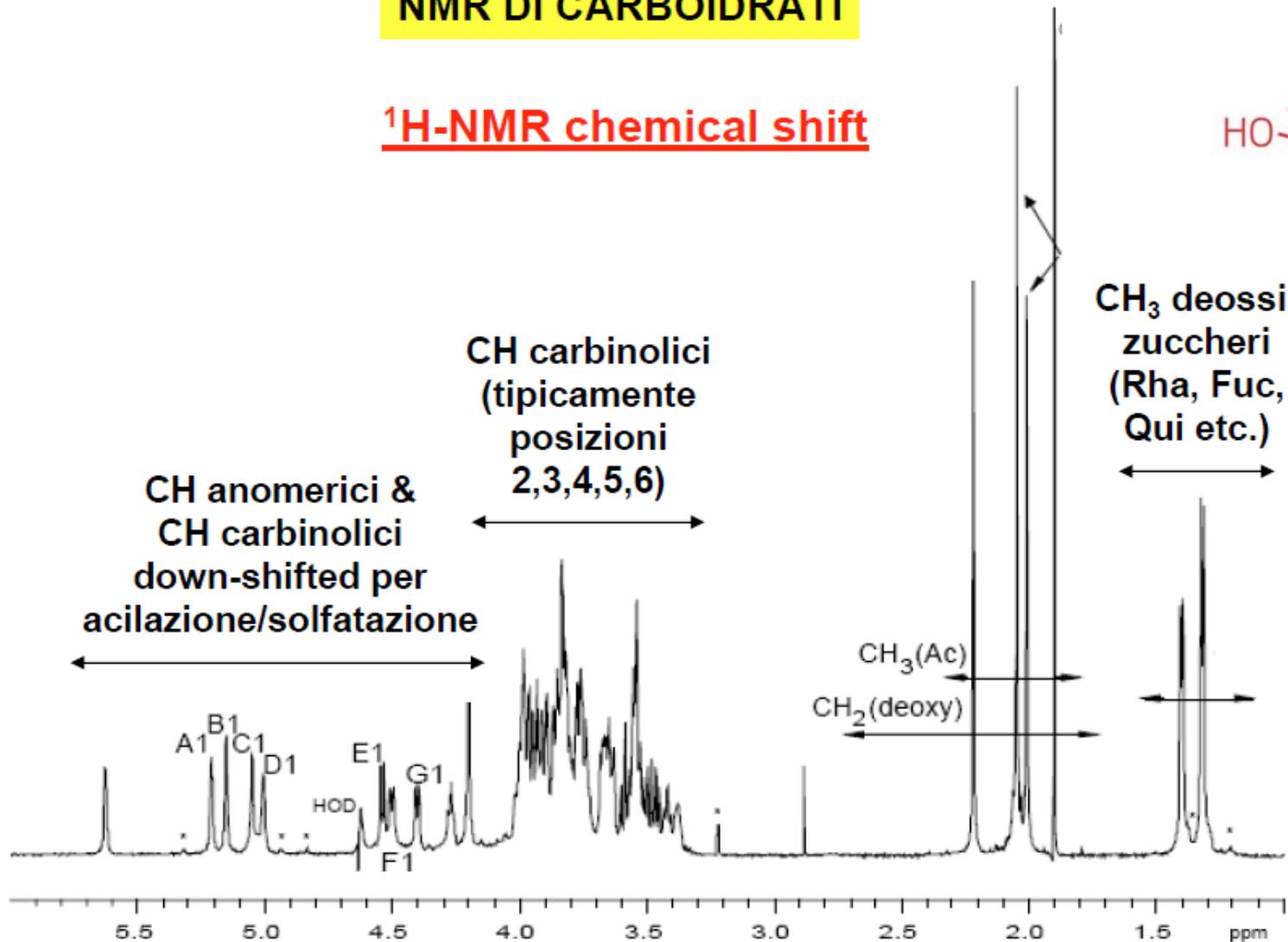
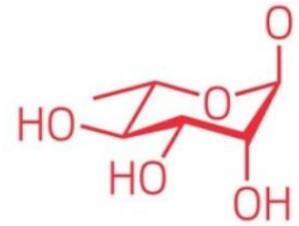


$\alpha\text{-L-Fucp}$



NMR DI CARBOIDRATI

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



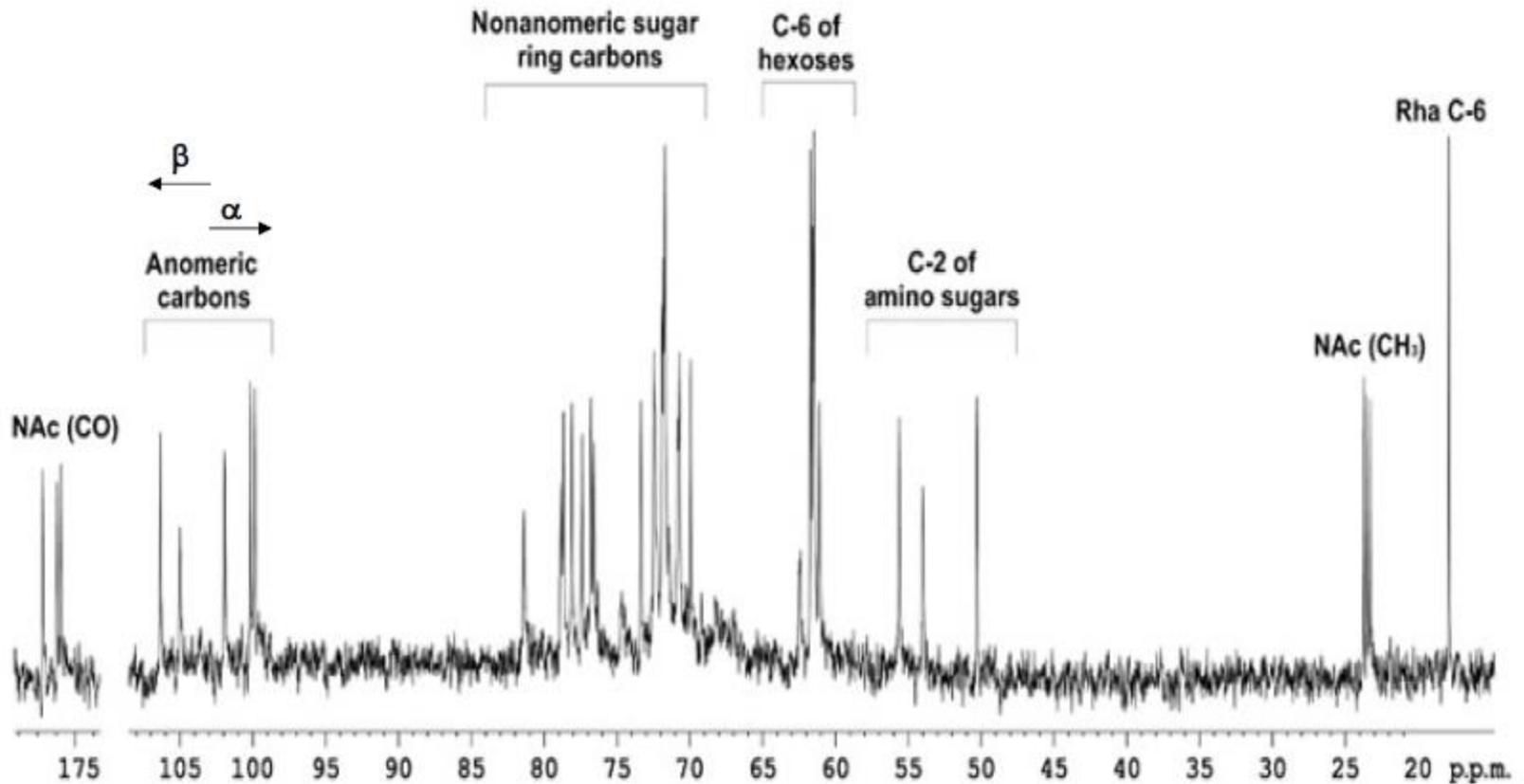
CH anomerici α

CH anomerici β

CH₂ deossi-zuccheri (Kdo, acido sialico) & N,O-acetili (2-cheto-3-deossi-ottanoato, KDO)

NMR DI CARBOIDRATI

^{13}C -NMR chemical shift



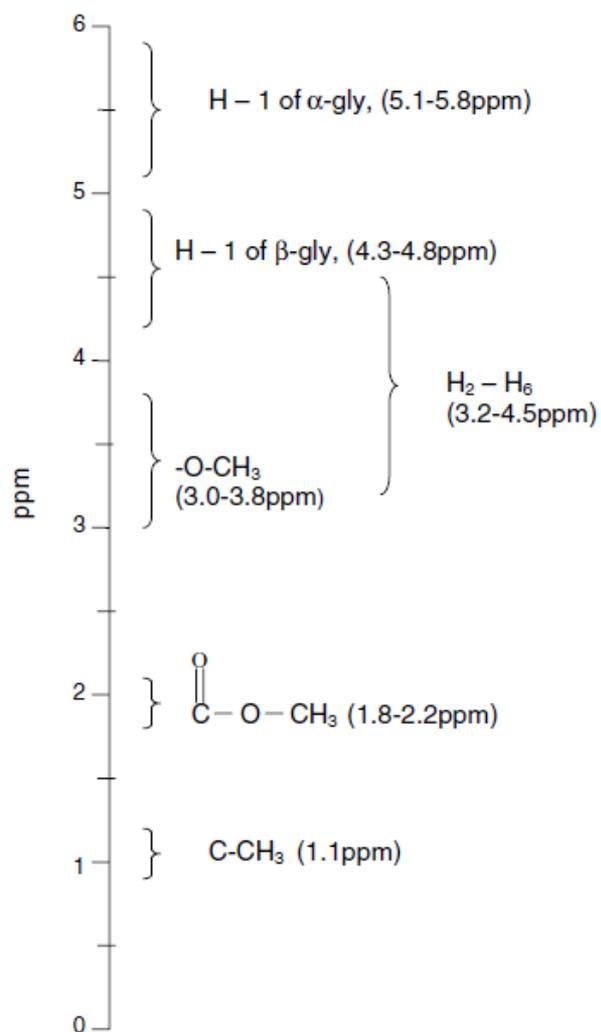


FIGURE 3.29
Illustration of chemical shifts of carbohydrates in ¹H NMR spectroscopy.

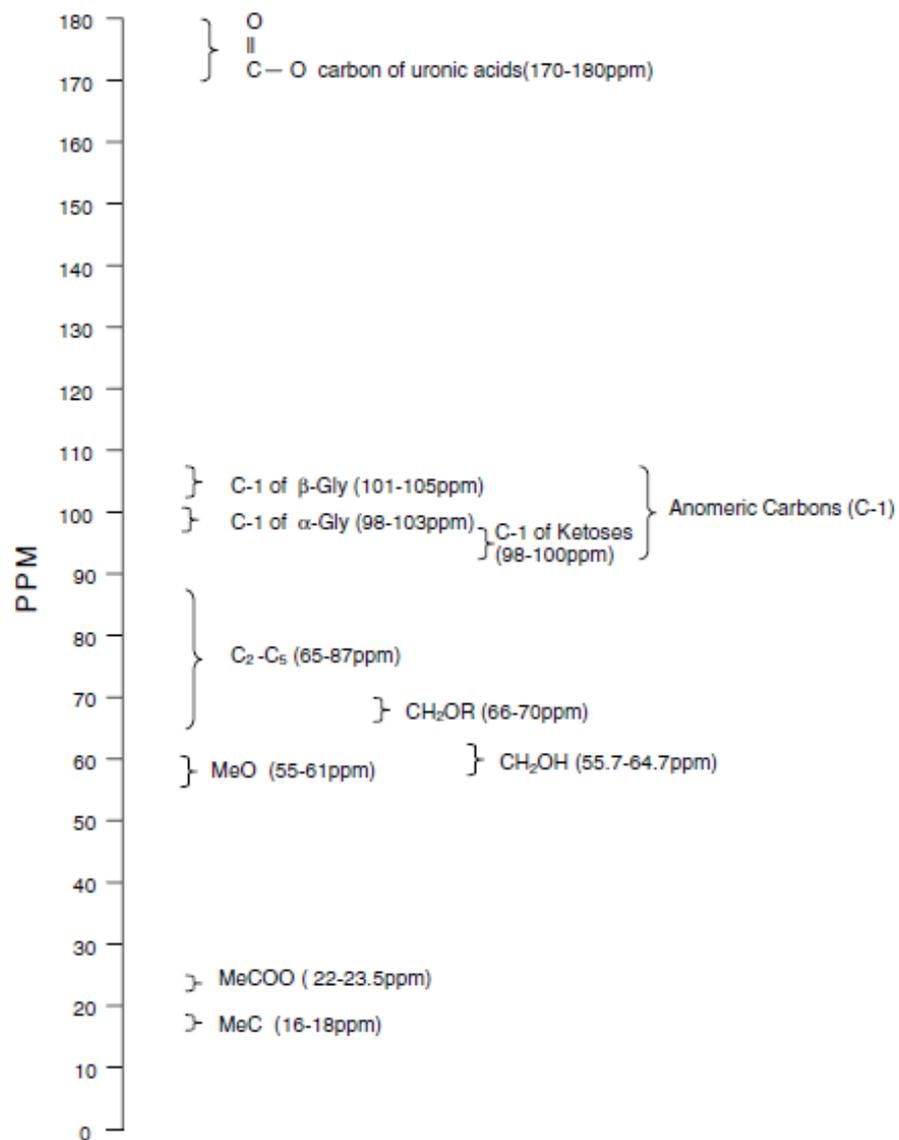
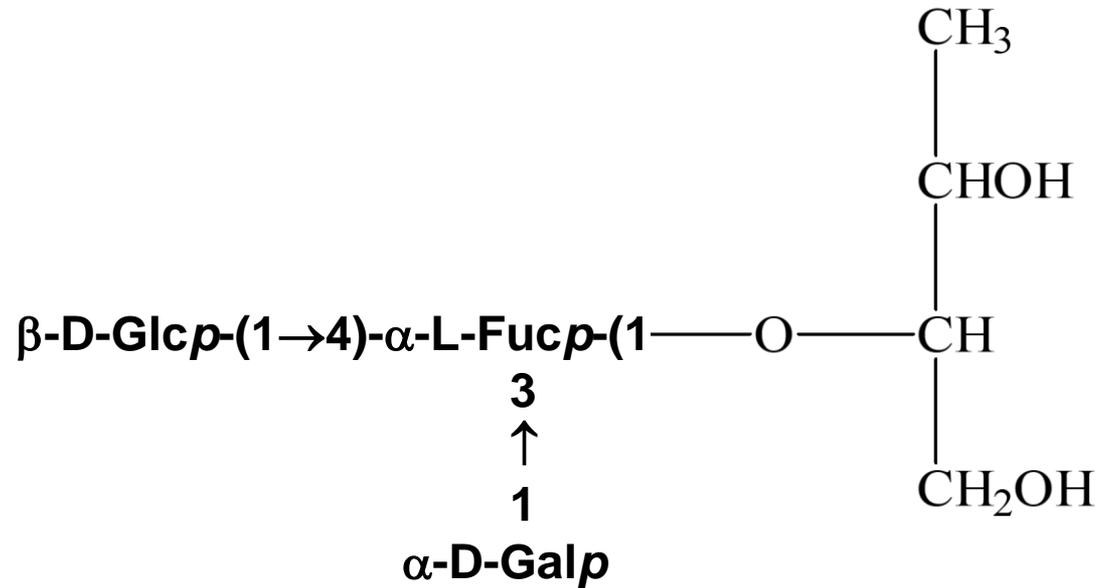


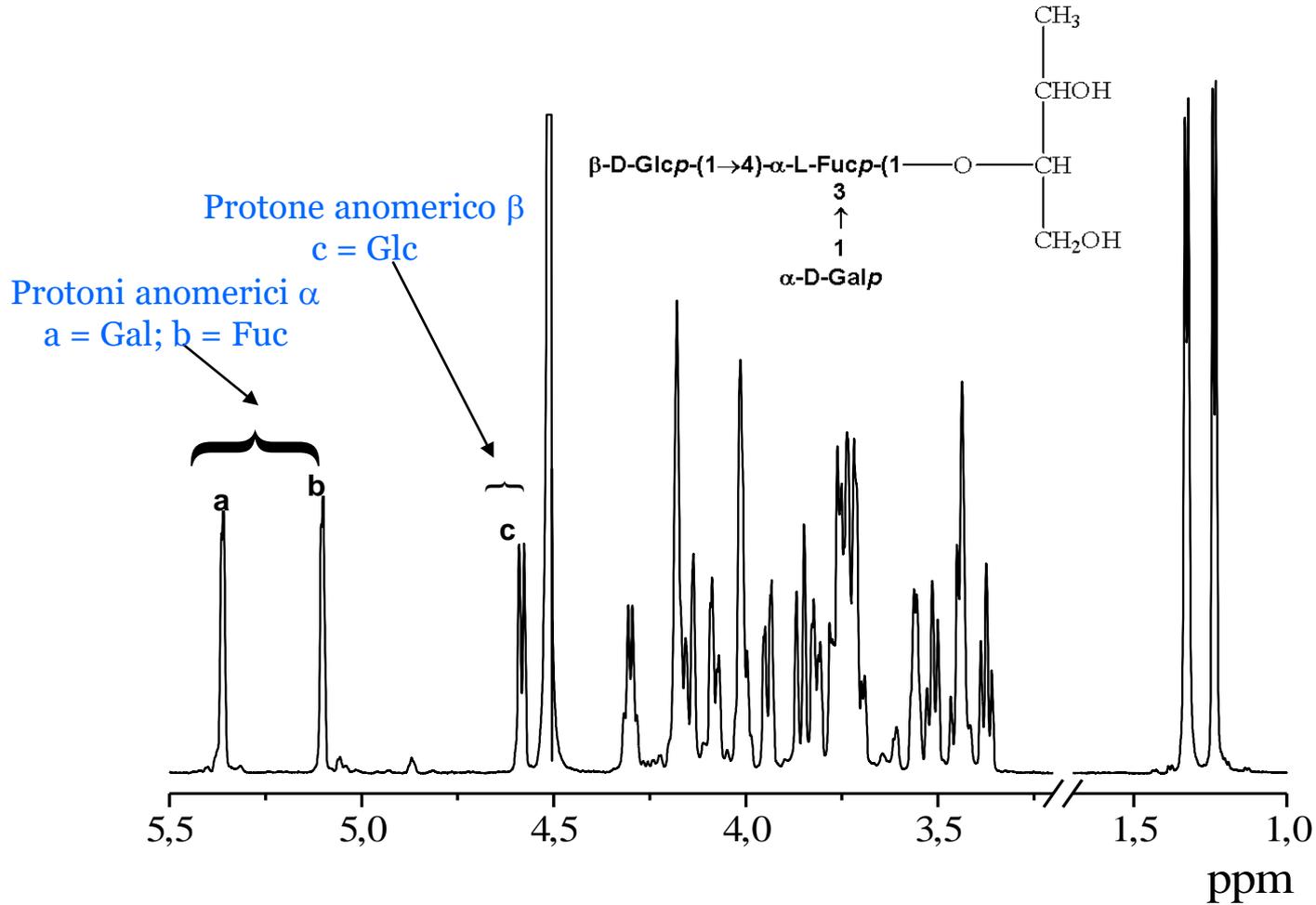
FIGURE 3.30
Illustration of chemical shifts of carbohydrates in ¹³C NMR spectroscopy.

ESEMPIO



La struttura di questo composto è stata studiata mediante NMR mono- e bi-dimensionale

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

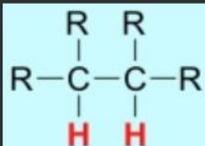


Spettro $^1\text{H-NMR}$

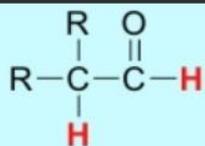
Chemical shifts ^1H e ^{13}C . I chemical shifts sono dati relativamente al segnale dell'acetone (ref. interno) (2.225 ppm per ^1H e 31.07 ppm per ^{13}C).

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

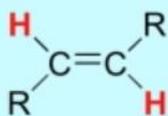
Costanti di Accoppiamento



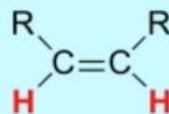
6-8 Hz



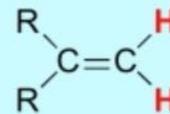
2-3 Hz



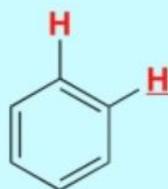
12-18 Hz



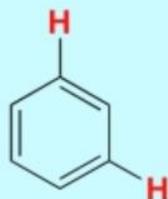
6-12 Hz



0-2 Hz



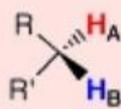
6-10 Hz



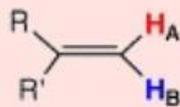
1-3 Hz

(4-bond coupling)

geminal

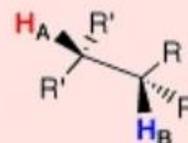


12-15 Hz

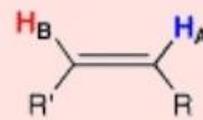


0-3 Hz

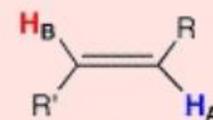
vicinal



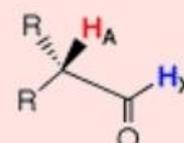
6-8 Hz



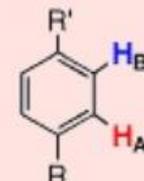
7-12 Hz



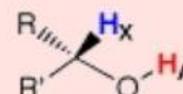
13-18 Hz



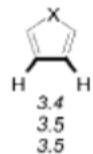
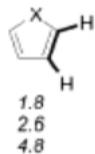
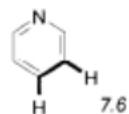
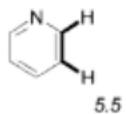
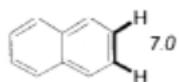
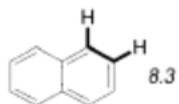
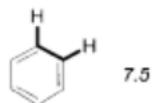
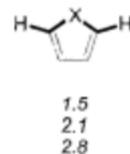
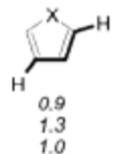
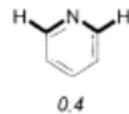
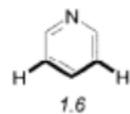
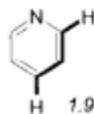
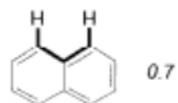
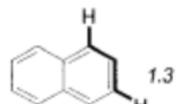
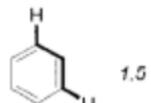
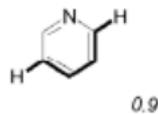
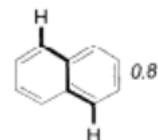
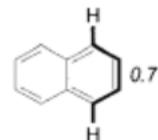
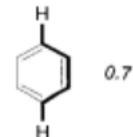
1-3 Hz



6-9 Hz

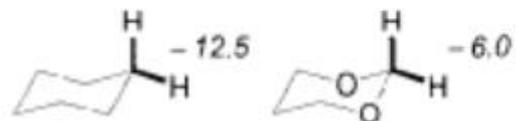


0-7 Hz

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

X = O
X = NH
X = S

$^2J_{HH}$
geminal protons

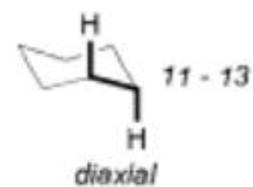
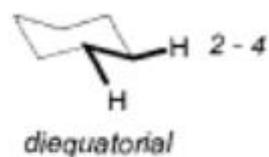
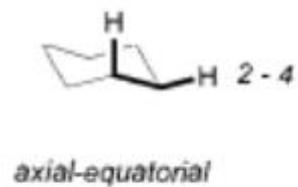


$^4J_{HH}$
protons with w-relationships

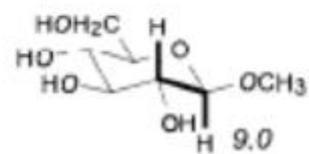
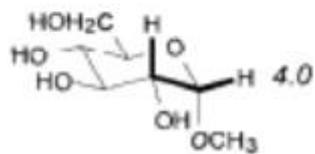


3J [Hz]

Cyclohexanes



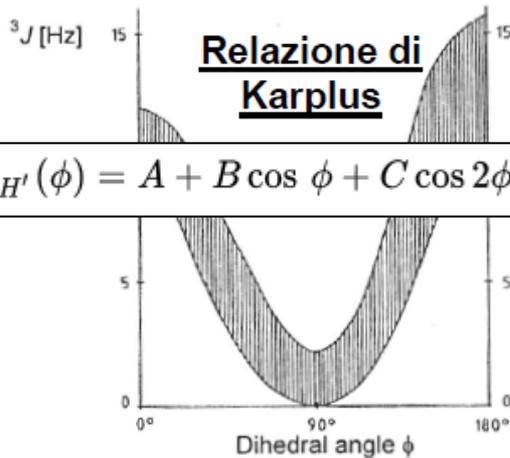
Pyranoses



NMR DI CARBOIDRATI

Costanti di accoppiamento vicinali accoppiamento

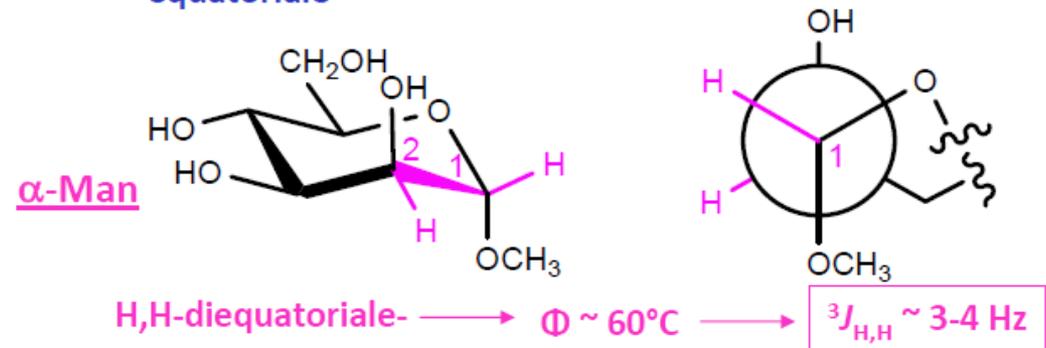
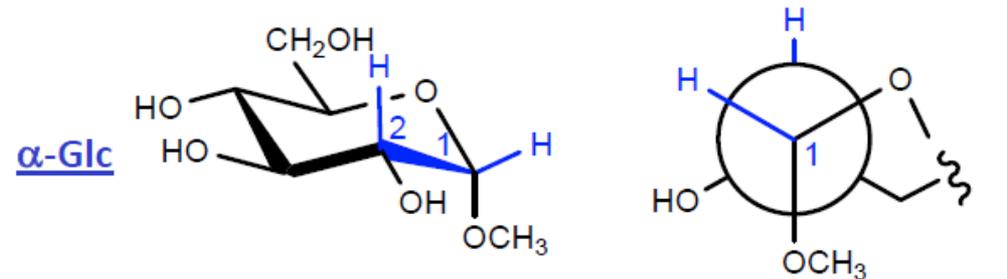
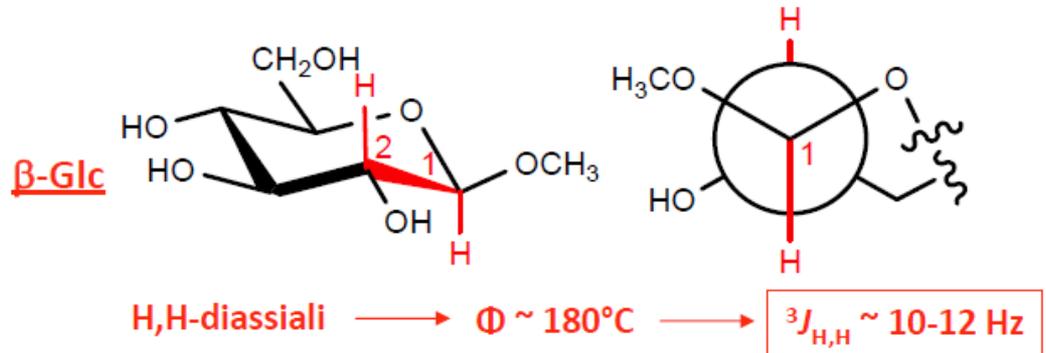
$${}^3J_{H,H}$$



Identificazione dei monosaccaridi

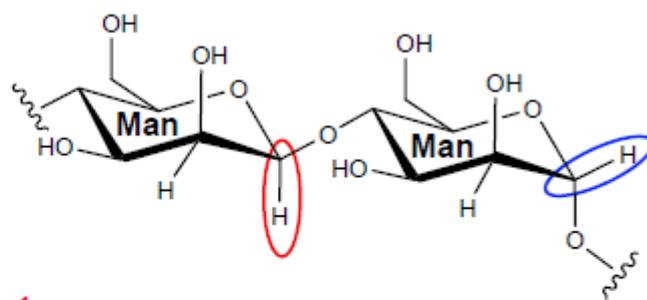
Identificazione della configurazione anomerica

Identificazione del tipo di ciclizzazione



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

.....



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

Identificazione della configurazione anomerica

riassumendo....

Parametri strutturali dei carboidrati

che possono essere determinati mediante NMR:

- **Struttura chimica di ciascun residuo di carboidrato in una molecola, tra cui:**
 - dimensione dello scheletro carbonioso e tipo di zucchero (aldoso/chetoso)
 - dimensione del ciclo (piranosio/furanosio/lineare)
 - configurazione stereo di tutti i carboni (identificazione dei monosaccaridi)
 - configurazione stereo del carbonio anomero (α/β)
 - configurazione assoluta (D/L)
 - posizione di ammino-, carbossi-, deossi- e altre funzioni
- **Struttura chimica dei residui non saccaridici nella molecola (aminoacidi, acidi grassi, alcoli, agliconi organici ecc.)**
 - Posizione delle sostituzioni nei residui
 - Posizione dei legami fosfato e solfato diesterici