

SAGGI COLORIMETRICI PER I CARBOIDRATI

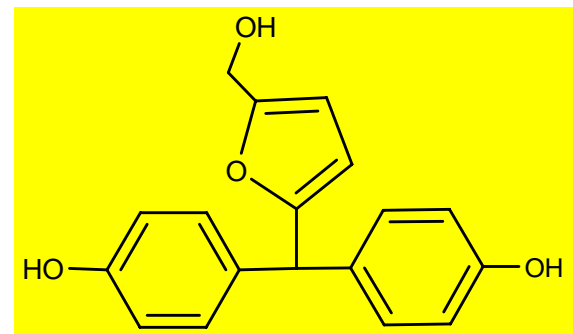
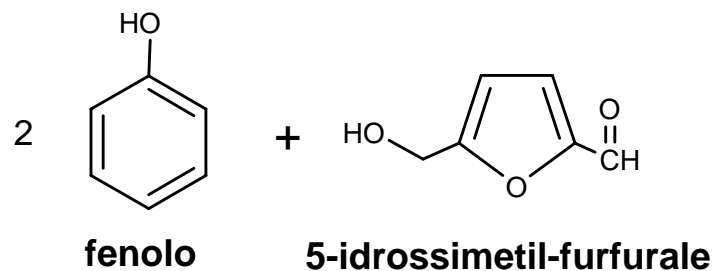
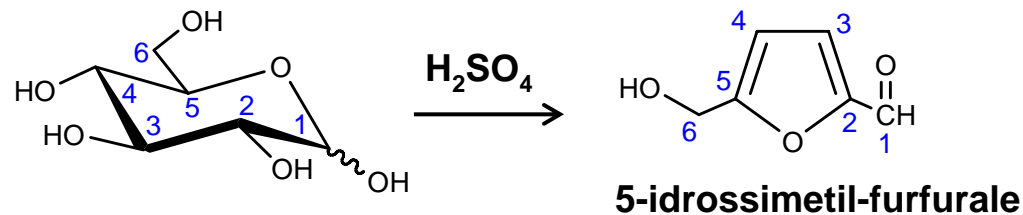
I saggi colorimetrici permettono di riconoscere la presenza di carboidrati (o di alcuni tipi di carboidrati) e valutarne la quantità

- ❖ Saggio del fenolo
- ❖ Saggio dell' α -naftolo
- ❖ Saggio della fenil-idrazina (selettivo per zuccheri riducenti)
- ❖ Saggio di Fehling (selettivo per zuccheri riducenti)
- ❖ Saggio del *m*-idrossidifenile (selettivo per acidi uronici)
- ❖ Saggio della 4-*N,N*-dimetilammino-benzaldeide (selettivo per esosammine)

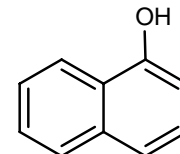
SAGGI COLORIMETRICI PER I CARBOIDRATI

Saggio del fenolo

- ❖ Funziona sia su monosaccaridi che su oligo- e polisaccaridi
- ❖ Rivela aldosi, chetosi e acidi uronici
- ❖ Procedura:
 - si aggiunge una soluzione al 5% di fenolo in acqua al campione
 - si aggiunge H_2SO_4 concentrato
 - dopo 10 min si legge l'assorbanza a 490 nm



- ❖ Stesso tipo di reazione per il saggio dell' α -naftolo

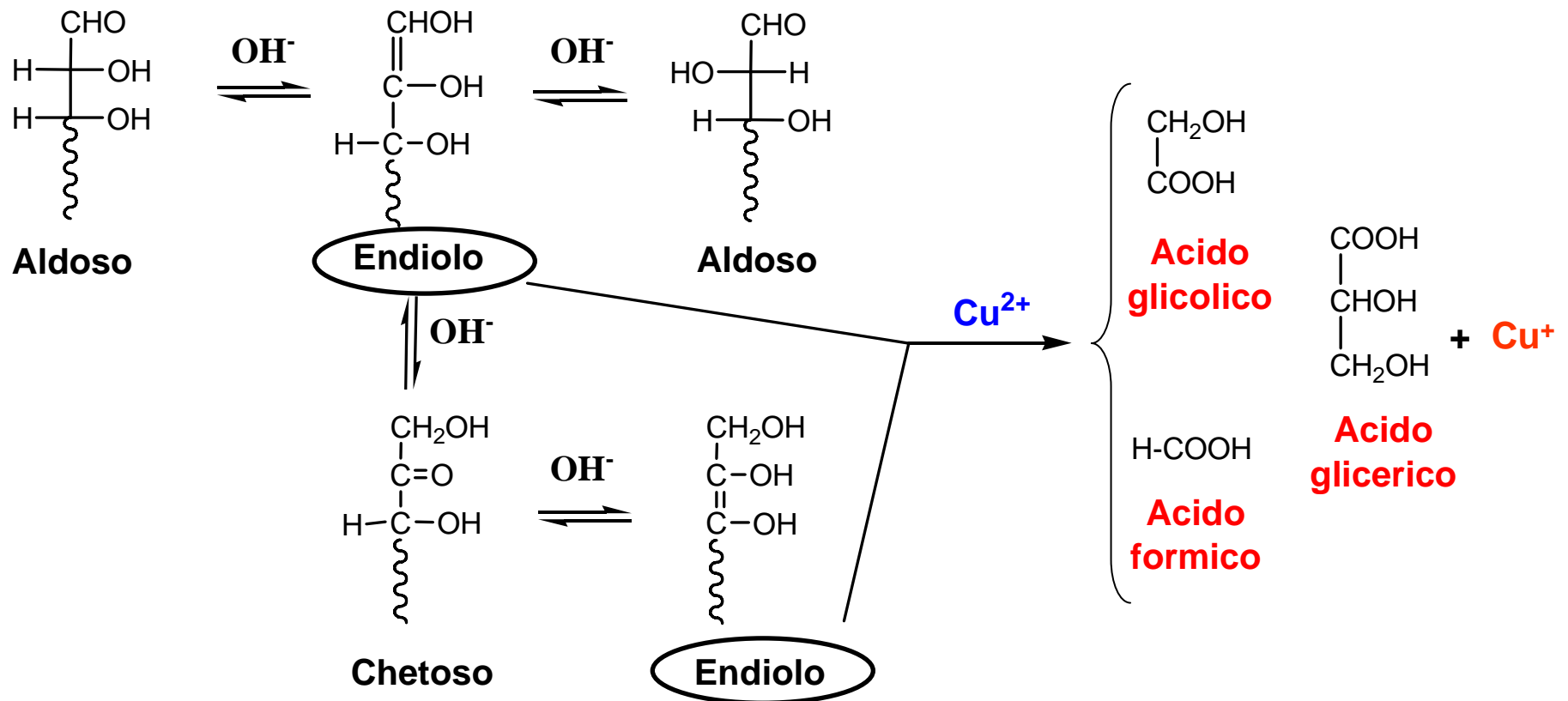


addotto viola

SAGGI COLORIMETRICI PER I CARBOIDRATI

Saggio di Fehling

- ❖ Reagenti: KOH, CuSO₄ e tartrato di Na e K
- ❖ Ossidazione dell'endiolo (equilibrio di isomerizzazione di zuccheri riducenti in soluzione alcalina) da parte di ioni Cu(II), che si riduce a Cu(I)
- ❖ La soluzione **blu scuro** (complesso Cu(II)-bis-tartrato) produce un **precipitato rosso** (Cu₂O)



PURIFICAZIONE DI CARBOIDRATI

❖ Cromatografia:

- in fase diretta (SiO_2)
- in fase inversa (SiO_2 -C-6, SiO_2 -C-8, SiO_2 -C-18)
- a scambio ionico
- ad esclusione molecolare
- per affinità

TLC

cromatografia
su colonna,
HPLC,

❖ Precipitazione con solventi

❖ Ultracentrifugazione

N.B.: Nell'isolamento di carboidrati da fonti naturali è quasi sempre necessaria una combinazione di più tecniche di purificazione, eventualmente integrata anche con passaggi di trasformazione chimica (dei carboidrati e/o delle impurezze)

TLC (in fase diretta)

PURIFICAZIONE DI CARBOIDRATI

Eluenti utilizzati per separare monosaccaridi e piccoli oligosaccaridi

- ❑ 2-propanolo – acqua 4:1 v/v
- ❑ 1-butanolo – acetone – acqua 4:5:1 v/v/v
- ❑ 1-butanolo – acido acetico – acqua 5:4:1 v/v/v
- ❑ cloroformio – metanolo – acqua 14:6:1 v/v/v

Eluenti utilizzati per separare monosaccaridi e piccoli oligosaccaridi in forma (parzialmente) protetta

- ❑ miscele di *n*-esano e acetato di etile (o acetone)
- ❑ miscele di diclorometano e metanolo
- ❑ miscele di toluene e acetato di etile (o acetone)

Reagenti per la visualizzazione degli spot

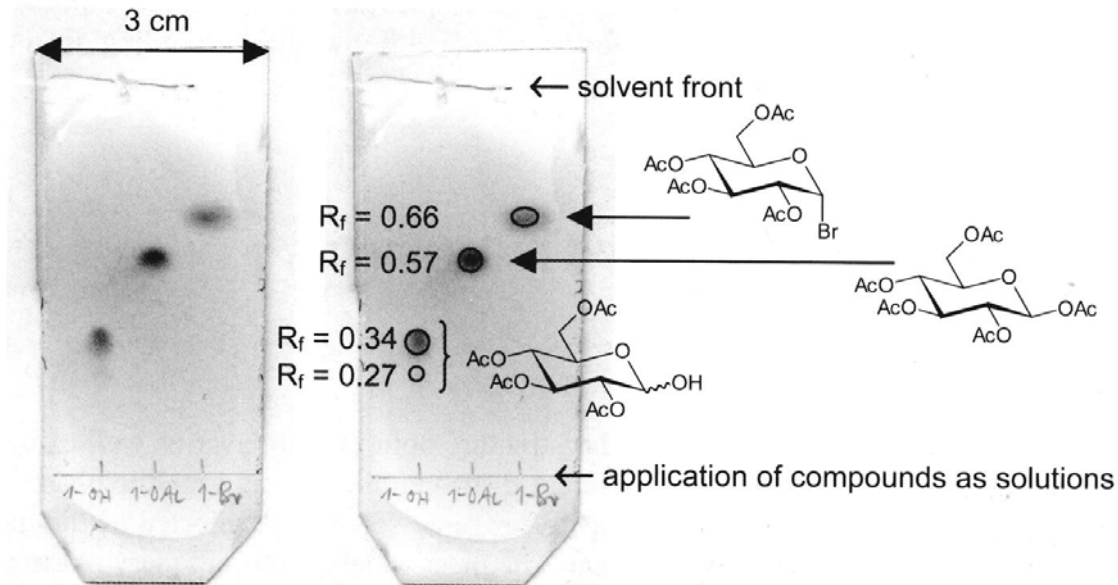
- ❑ acido solforico in etanolo
- ❑ *p*-anisaldeide – acido acetico – acido solforico
- ❑ anilina – difenilammina – acido fosforico
- ❑ α -naftolo – etanolo – acido solforico

SERIE ELUOTROPA

Pentano	0,00
Etere	0,01
Esano	0,01
Cicloesano	0,04
Tetracloruro di carbonio	0,18
Xilene	0,26
Toluene	0,29
Clorobenzene	0,30
Benzene	0,32
Etere etilico	0,38
Cloroformio	0,40
Cloruro di metilene	0,42
Tetraidrofurano	0,45
Dicloroetilene	0,49
Metiletilchetone	0,51
Diossano	0,56
Acetone	0,56
Acetato di etile	0,58
Dimetilsolfossido	0,62
Acetonitrile	0,65
Piridina	0,71
<i>iso</i> -propanolo	0,82
<i>n</i> -propanolo	0,82
Metanolo	0,95
Acido acetico	1,0
Acqua	Alta

PURIFICAZIONE DI CARBOIDRATI

TLC (in fase diretta)

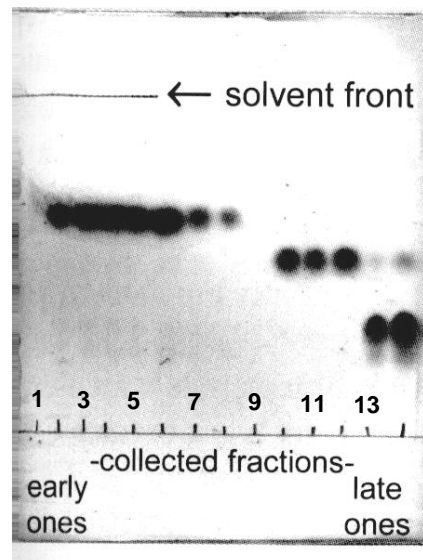


eluente:

TOLUENE-ACETATO D'ETILE 1:1

reagente per la visualizzazione:

10% H₂SO₄ in ETANOLO



TLC come sistema di analisi di una purificazione via colonna cromatografica

PURIFICAZIONE DI CARBOIDRATI

TLC (in fase inversa)

Stationary phase	Compound	Mobile phase	R _f value
Silica gel Polar Si-OH	Non-polar (hydrophobic) compounds have higher R _f values than more polar compounds.	Solvent mixtures of higher polarity increase R _f values.	Higher for non-polar compounds than for polar compounds; higher with more polar solvent mixtures.
Reversed phase silica gel Non-polar Si-OR	Polar (hydrophilic) compounds have higher R _f values than non-polar compounds.	Solvent mixtures of lower polarity are used and increase R _f values.	Higher for more polar than for non-polar compounds; higher with non-polar solvent mixtures.

ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI POLISACCARIDI

Estrazione:

Piante (radici, steli)  Acqua, soluzioni saline, soluzioni basiche

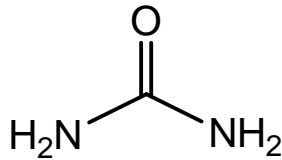
Purificazione:

- Precipitazione con solventi organici
- Cromatografia ad esclusione molecolare
- Cromatografia a scambio ionico
- Ultra-centrifugazione

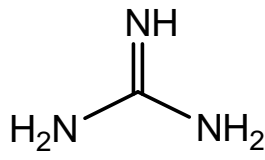
ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI PROTEOGLICANI

Estrazione:

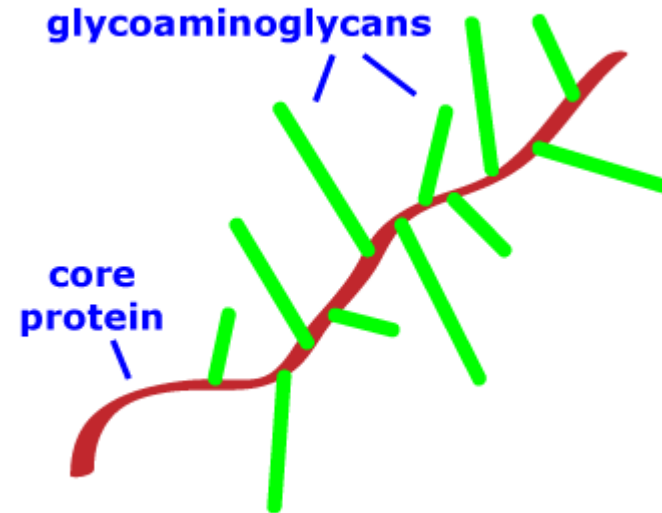
- ❖ Estrazione da tessuti animali mediante agenti denaturanti caotropici, in grado di rompere i legami non covalenti (soprattutto legami idrogeno)



urea



guanidina



- ❖ Centrifugazione in gradiente di densità, dialisi

Purificazione: Digestione con papaina (proteasi)

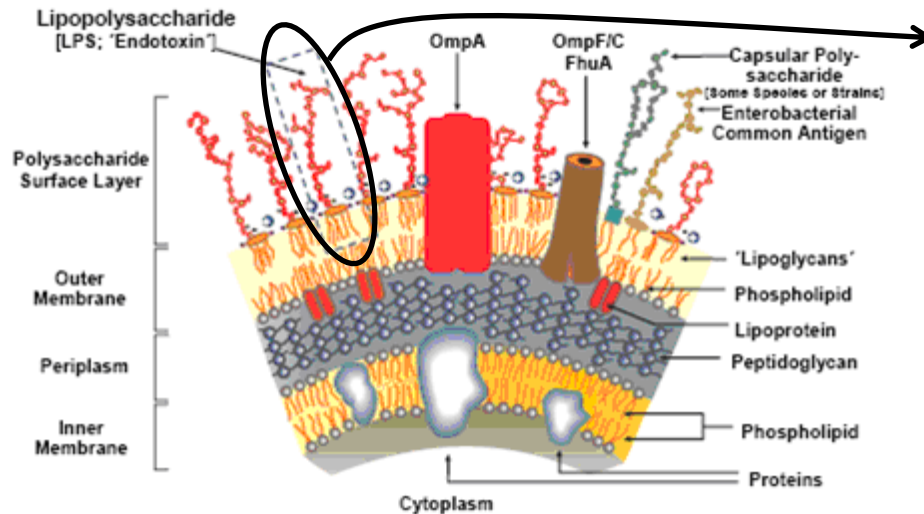
Cromatografia a scambio anionico
(fase stazionaria: dietilamminoetil-cellulosa: DEAE-cellulosa)

spesso fatta
in presenza
di agenti caotropici ←

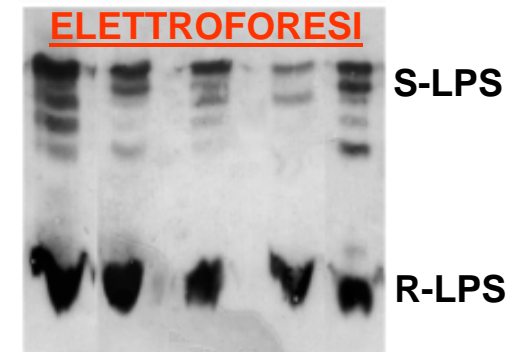
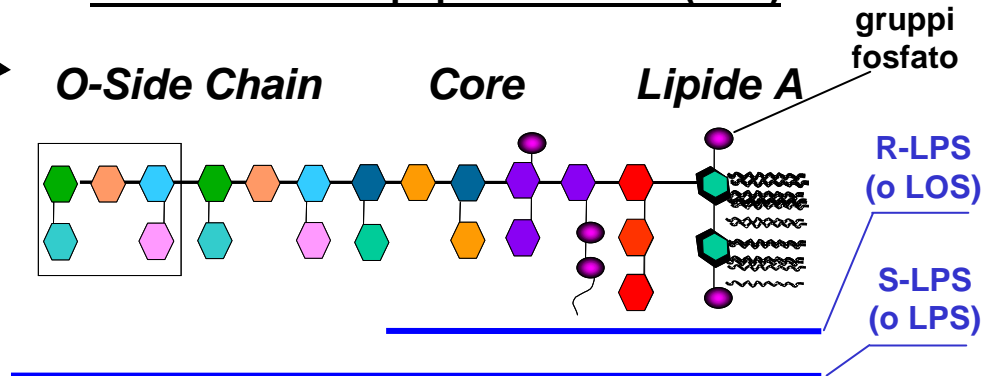
Cromatografia di esclusione molecolare
(fase stazionaria: gel di agarosio)

ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI LIPOPOLISACCARIDI

Parete cellulare di batterio Gram-negativo



Struttura di un Lipopolisaccaride (LPS)



Estrazione (su cellule liofilizzate):

❖ 1:1 v/v acqua – fenolo, 68°C → S-LPS (o LPS)

❖ 8:5:2 v/v/v etere di petrolio – cloroformio – fenolo 90% (PCP) → R-LPS (o LOS)

Purificazione:

- ❖ dialisi
- ❖ proteasi e nucleasi
- ❖ cromatografia ad esclusione molecolare
- ❖ cromatografia a scambio ionico
- ❖ ultracentrifugazione