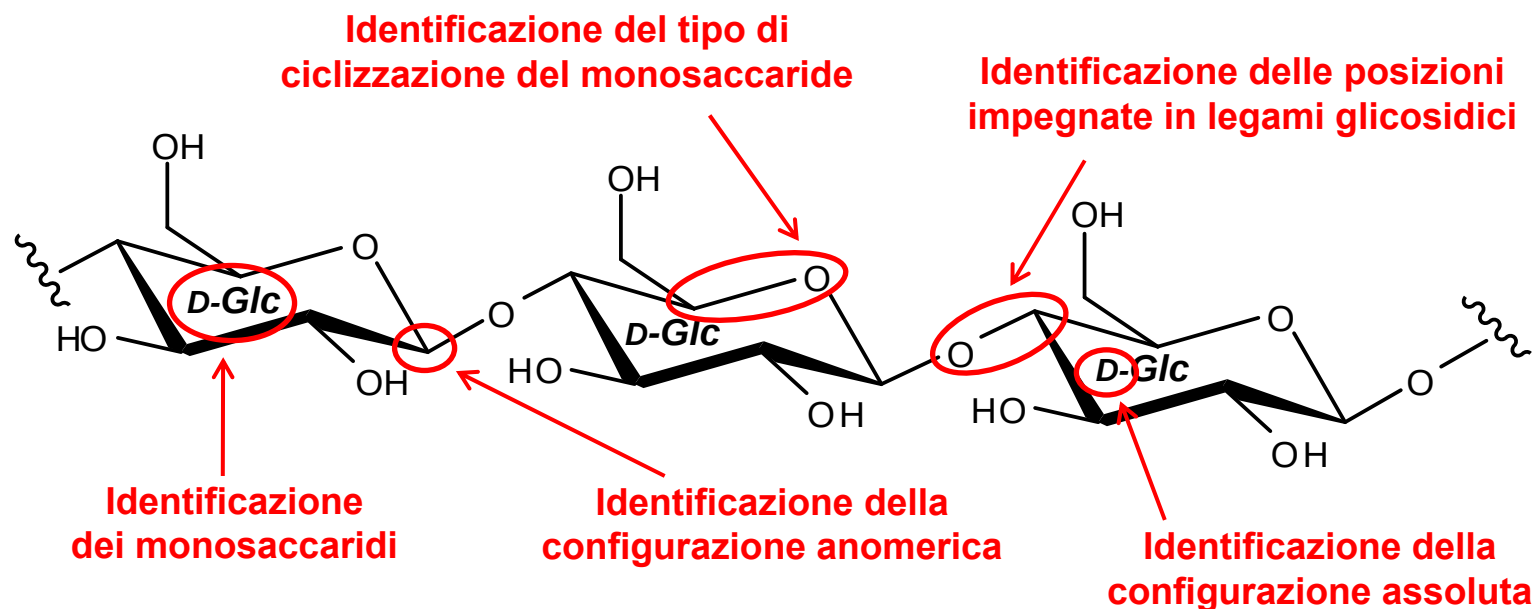


DETERMINAZIONE STRUTTURALE DI OLIGO- E POLISACCARIDI



e anche...

- ✓ Sequenza dei monosaccaridi
- ✓ Identificazione di decorazioni (*O*-acetile, *N*-acetile, *O*-lattile etc.) e della loro posizione

- metodi chimici + cromatografici
- metodi chimici + polarimetro
- elettrospray, MALDI
- 1D- & 2D-NMR

DETERMINAZIONE
STRUTTURALE
DEL POLISACCARIDE

??
e se non
basta
??

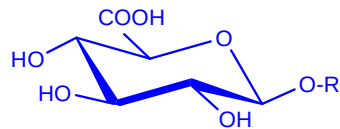
DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

- ❖ **Idrolisi parziale**
- ❖ **Acetolisi**
- ❖ **Degradazione di Smith**
- ❖ **Degradazione in ambiente basico: β -eliminazione**
- ❖ **Deamminazione**
- ❖ **Solvolisi con HF**
- ❖ **Idrolisi enzimatiche**

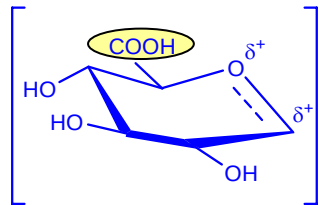
DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

IDROLISI PARZIALE

ACIDO URONICO (GlcA, GalA,...)



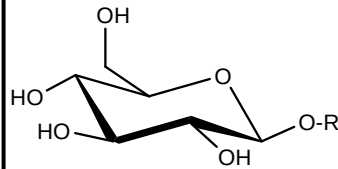
H^+ , H_2O



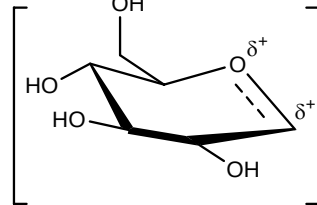
COOH destabilizza la formazione del glicosil catione (ione ossonio)

Legame glicosidico più stabile

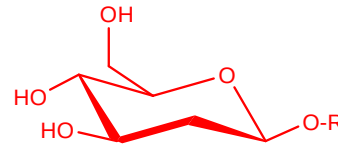
ALDOESOSO (Glc, Man, ...)



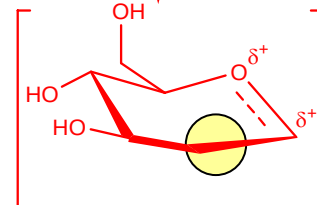
H^+ , H_2O



DEOSSIALDOESOSO (Rha, Fuc, Qui, ...)



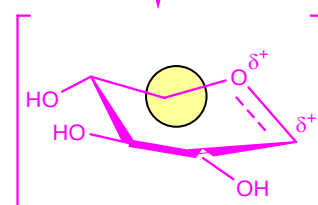
H^+ , H_2O



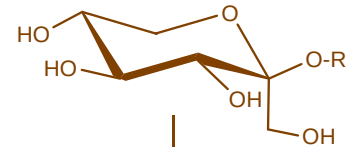
ALDOPENTOSO (Ara, Xyl, ...)



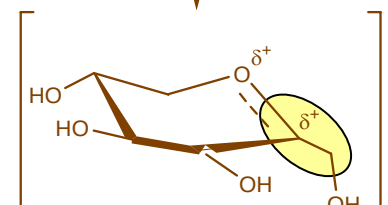
H^+ , H_2O



CHETOESOSO (Fru, sorbosio,...)



H^+ , H_2O



assenza OH stabilizza la formazione del glicosil catione (ione ossonio)

rilascio sterico è maggiore da C-sp3 a C-sp2 su C anomero IV

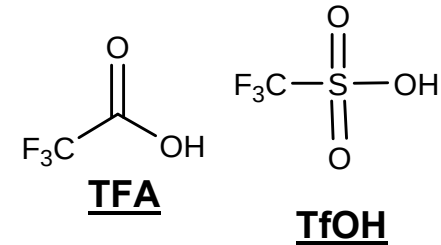
Legame glicosidico meno stabile

Idrolisi più probabile su questi zuccheri

DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

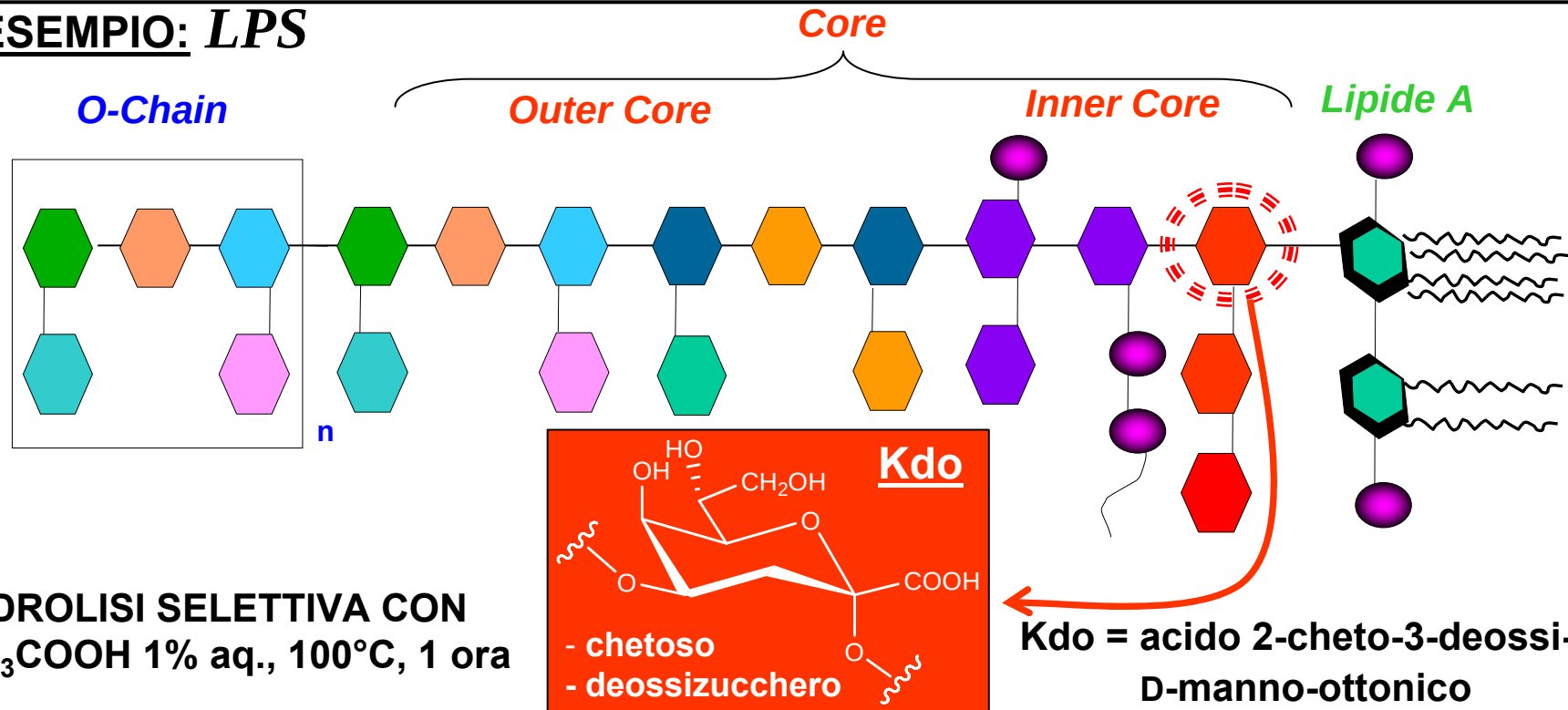
IDROLISI PARZIALE:

- 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

ESEMPIO: LPS

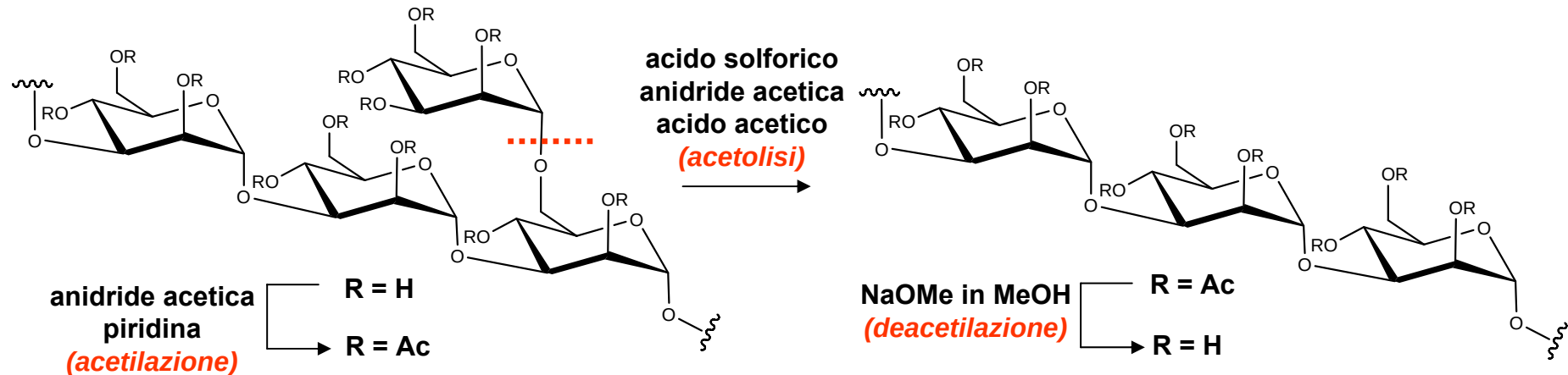


IDROLISI SELETTIVA CON
CH₃COOH 1% aq., 100°C, 1 ora

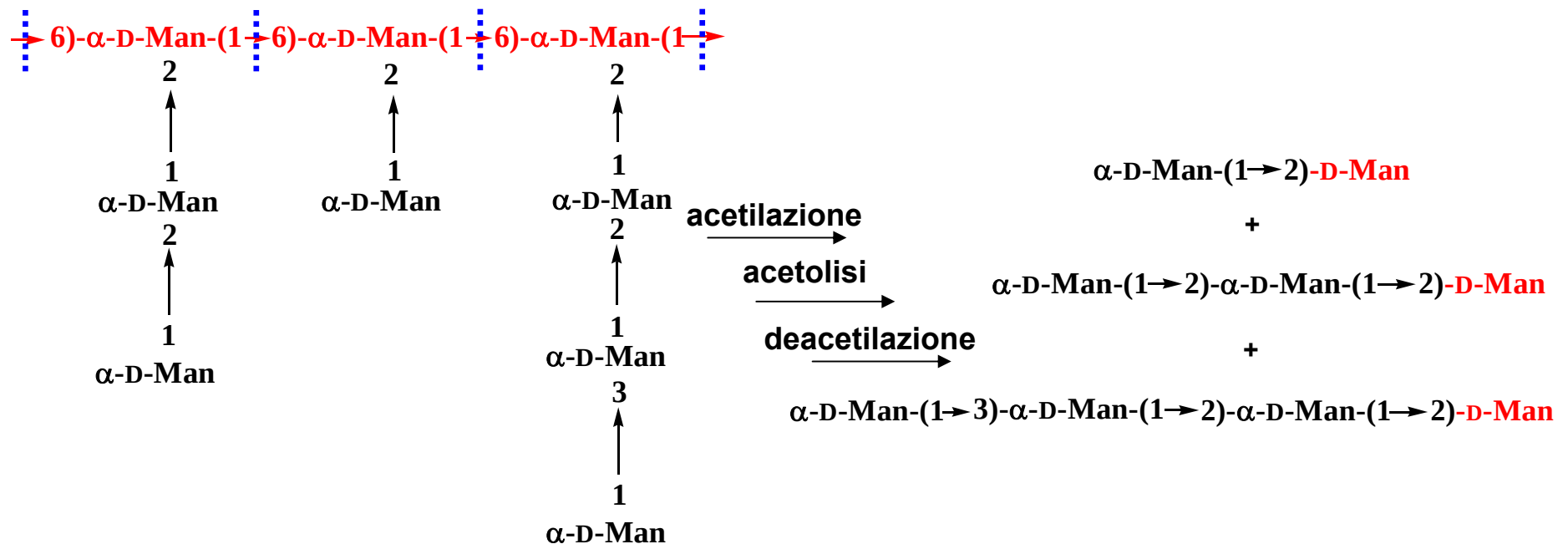
Kdo = acido 2-cheto-3-deossi-
D-manno-ottonico

DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

ACETOLISI: rottura selettiva legami 1→6 glicosidici



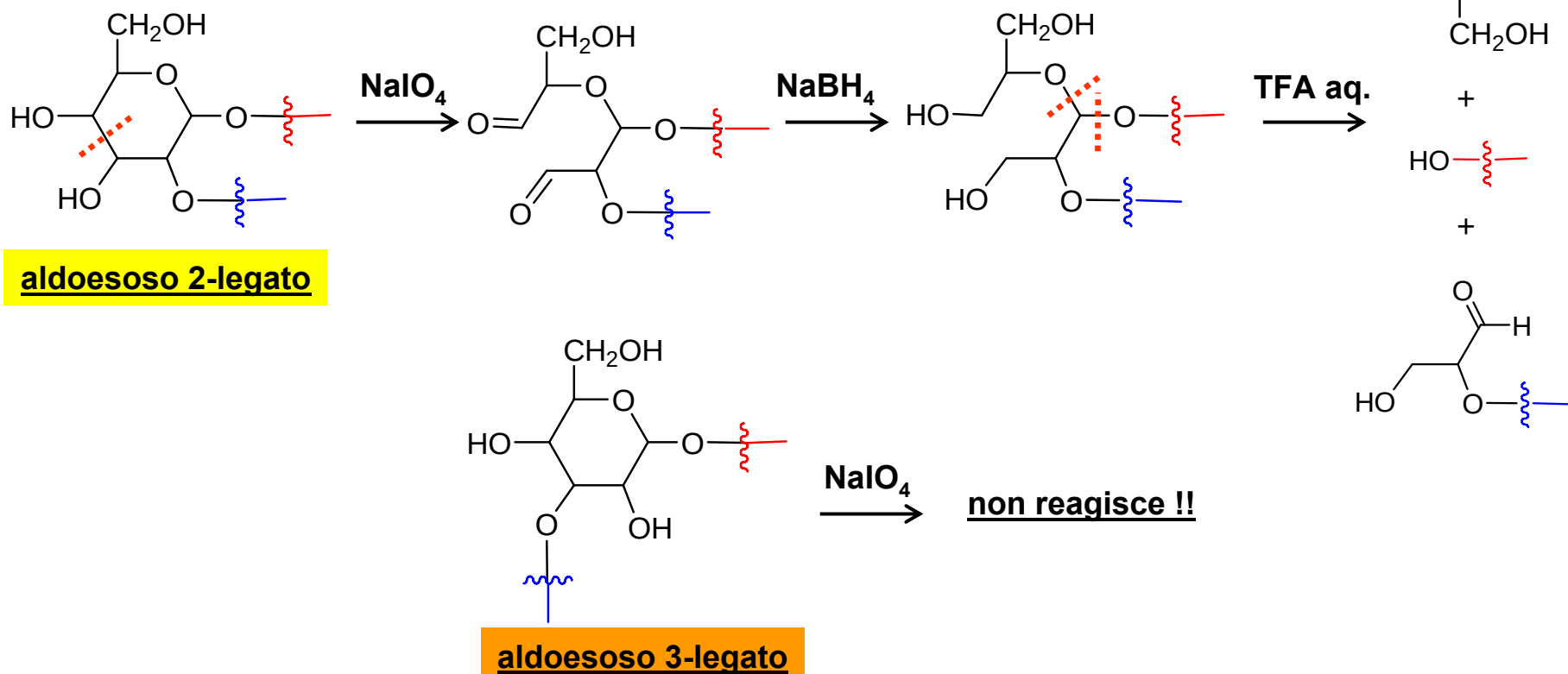
ESEMPIO: *mannano*



DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

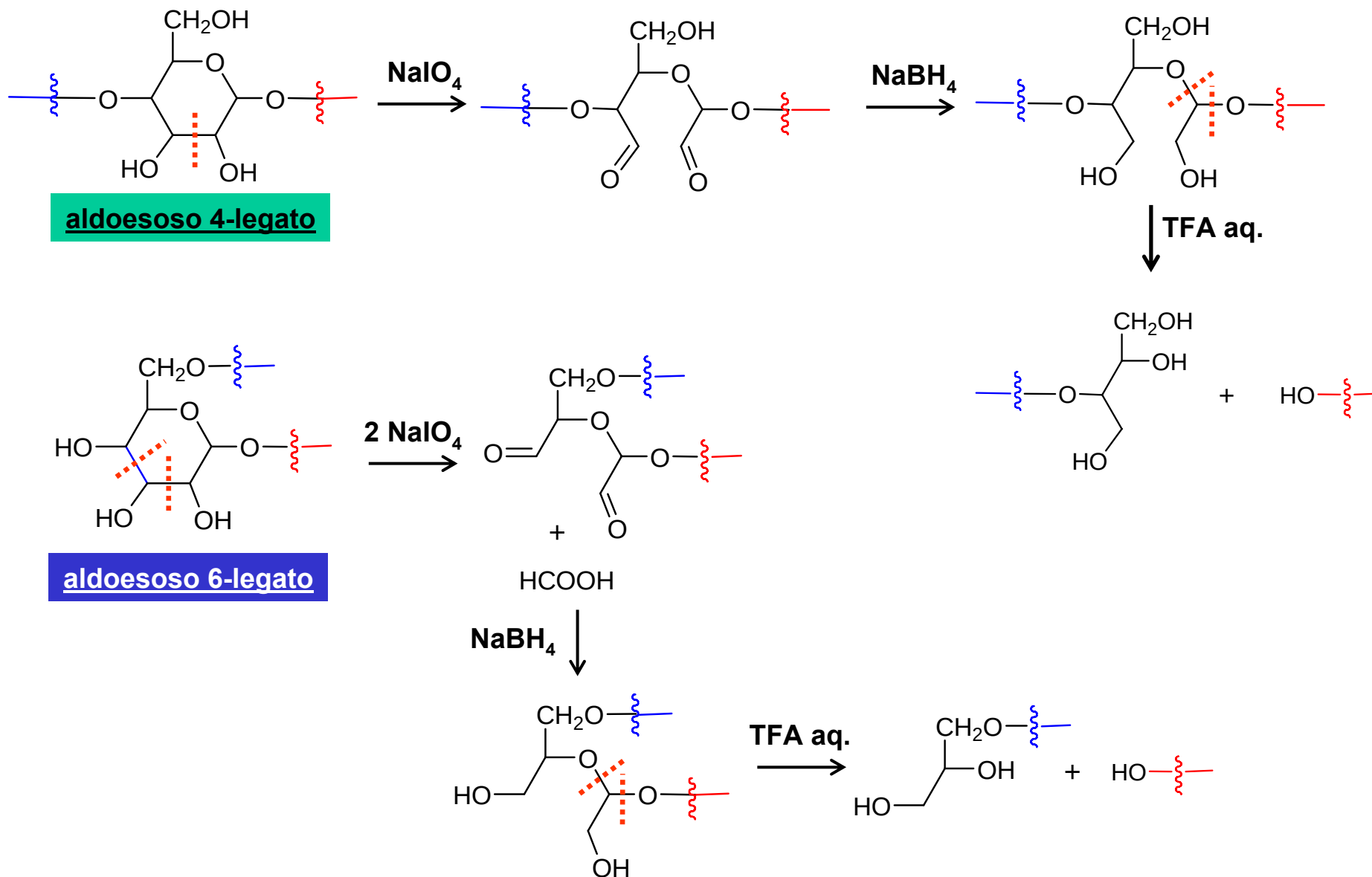
DEGRADAZIONE DI SMITH: rottura selettiva per ossidazione dioli vicinali

- ossidazione del diolo con periodato di sodio (NaIO_4)
- riduzione dei gruppi carbonilici (NaBH_4)
- idrolisi selettiva di acetali/ketali aciclici (TFA acquoso)



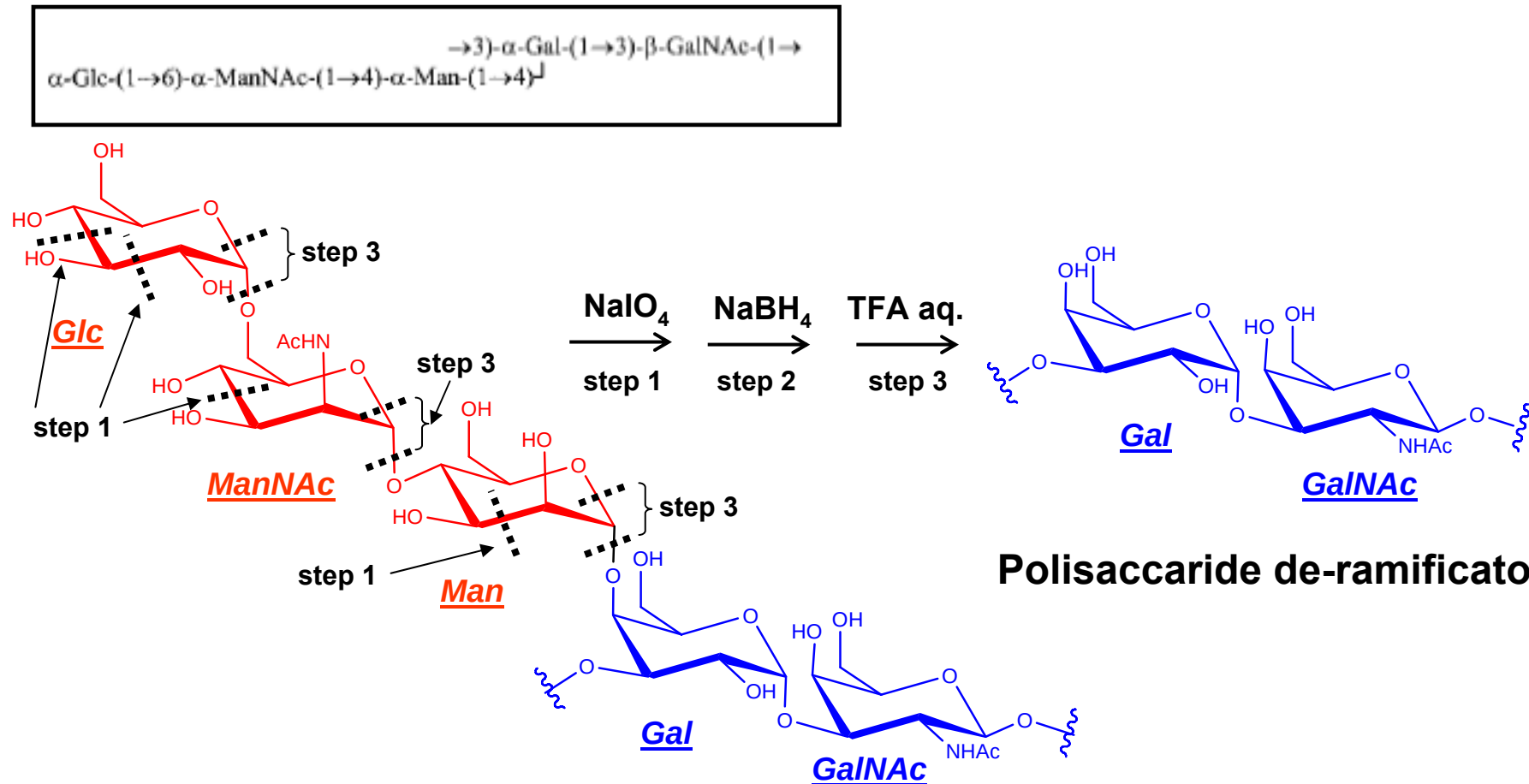
DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

DEGRADAZIONE DI SMITH: rottura selettiva per ossidazione dioli vicinali



DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

ESEMPIO: *polisaccaride ramificato da Thermus thermophilus*

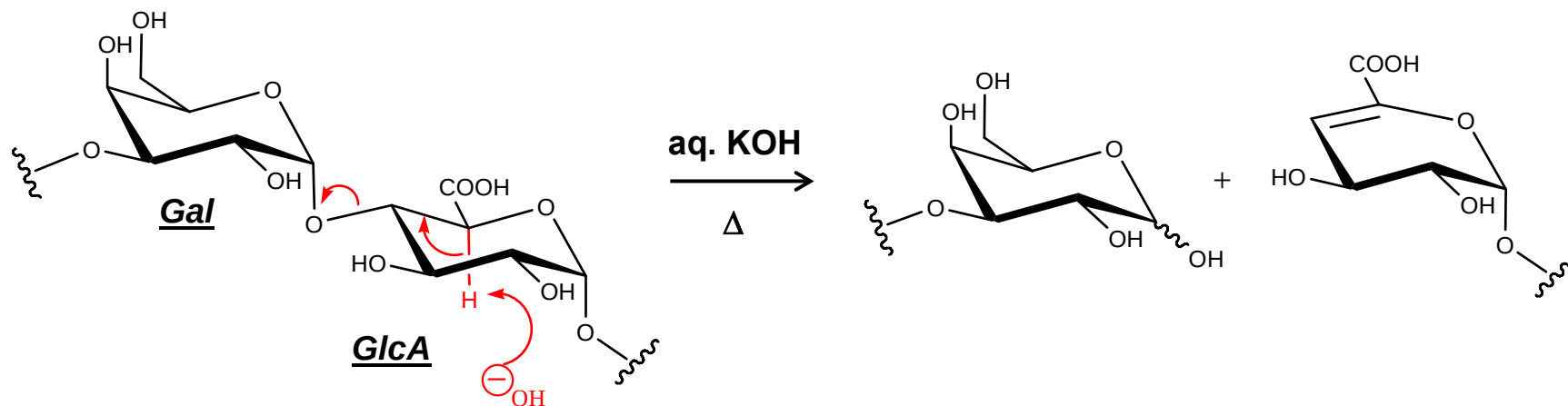


Problemi connessi alla degradazione di Smith:

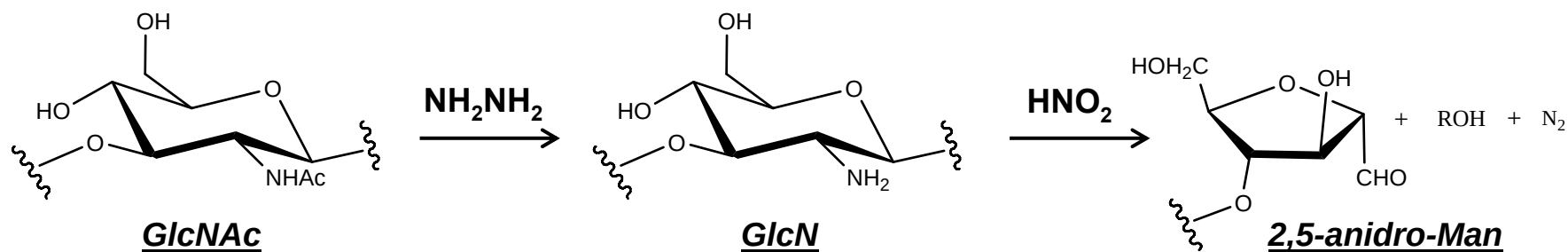
- reazioni non quantitative
- sottoprodotti di reazione intramolecolare (aldeide + alcool)

DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

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



DEAMMINAZIONE: scissione selettiva per amminozuccheri con N equatoriale

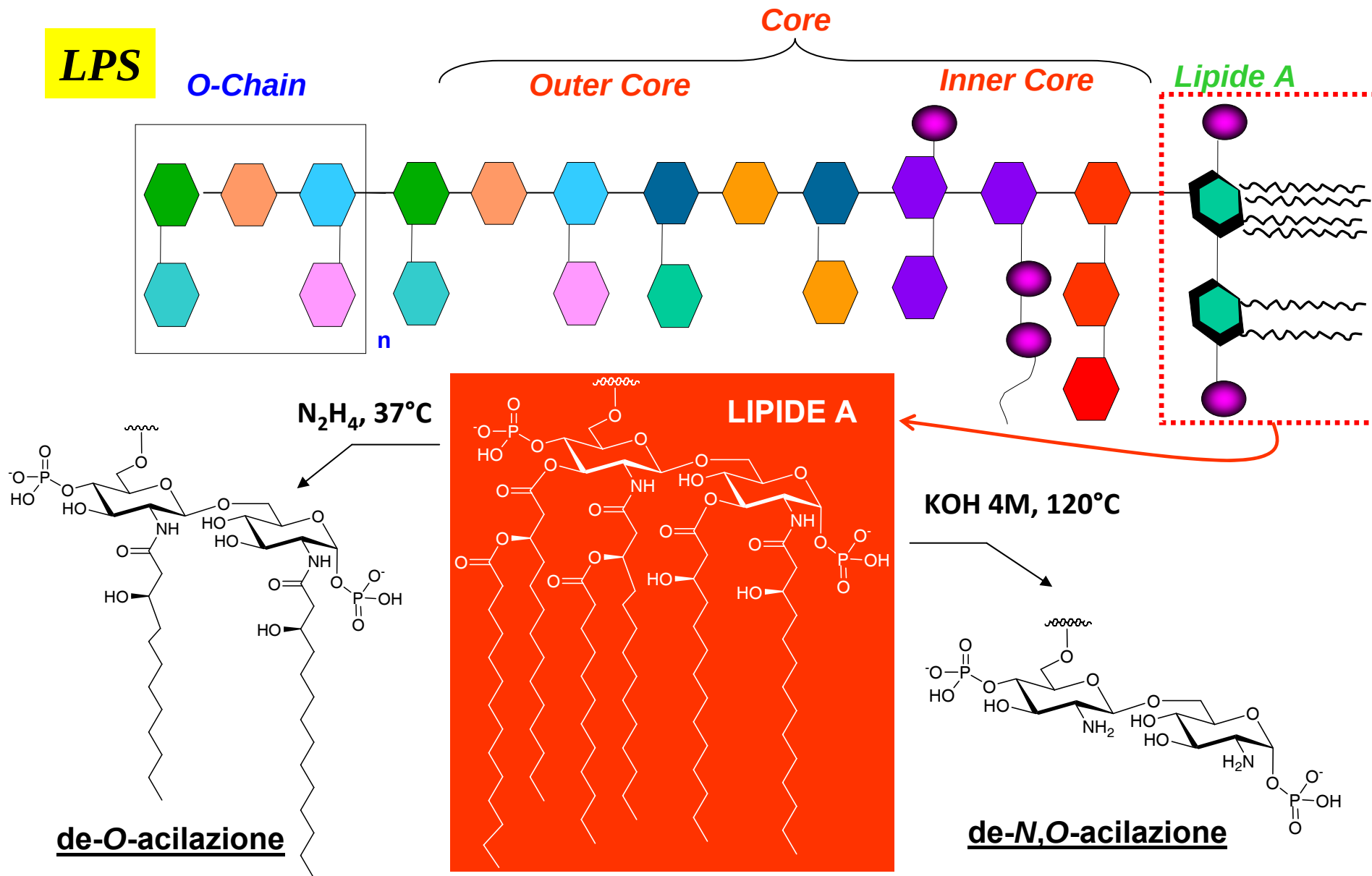


DEGRADAZIONE SELETTIVA DI POLISACCARIDI

- ✓ ❖ **Idrolisi parziale**
- ✓ ❖ **Acetolisi**
- ✓ ❖ **Degradazione di Smith**
- ✓ ❖ **Degradazione in ambiente basico: β -eliminazione**
- ✓ ❖ **Deamminazione**
 - ❖ **Solvolisi con HF → scissione di legami glicosidici di amminozuccheri**
 - ❖ **Idrolisi enzimatiche → elevata regioselettività di scissione**

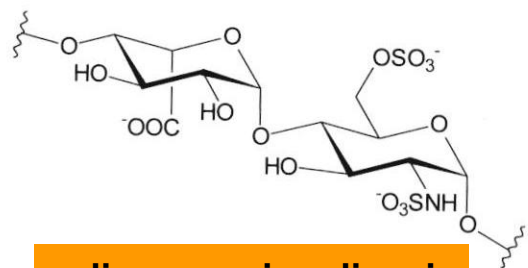
RIMOZIONE SELETTIVA DI DECORAZIONI DI POLISACCARIDI

Gruppi acilici (esteri e/o ammidi):



RIMOZIONE SELETTIVA DI DECORAZIONI DI POLISACCARIDI

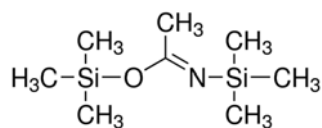
Gruppi solfato:



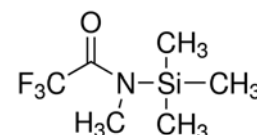
glicosamminoglicani
(GAG)

- solvolisi in DMF, DMSO o $\text{H}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{OH})/\text{DMSO}$ → degradativa, non selettiva

- BTSA o MTSTFA in DMF → non degradativa, selettiva su posizioni primarie



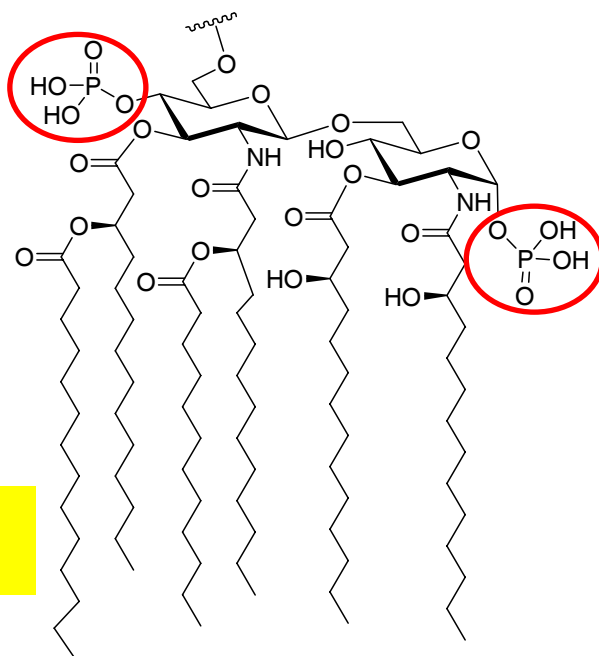
N,O-bis(trimetilsilil)
acetammide
(BTSA)



N-trimetilsilil-
N-metil trifluoroacetammide
(MSTFA)

- endosolfatasi → altamente selettiva, non degradativa

Gruppi fosfato:



porzione lipide A
del LPS

aq. HF 48%
→
4°C, 48 h

