

## Kítín og kítósanfásykrugreining

Soffía Sveinsdóttir<sup>1</sup>, Jón M. Einarsson<sup>2</sup>, Jóhannes Gíslason<sup>2</sup> og Ágúst Kvaran<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Menntaskólanum við Hamrahlíð, <sup>2</sup>Primex ehf og <sup>3</sup>Raunvísindastofnun Háskólans

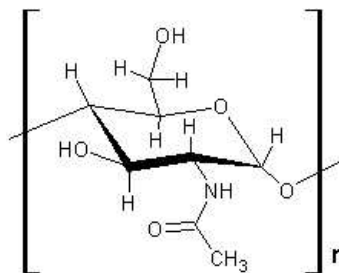
Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

**Ágrip** Hingað til hefur verið vandkvæðum bundið að aðgreina flóknar fásykrublöndur í þætti sína. Í þessu verkefni var prófað að nota tvívíða aðgreiningu á kítósanfásykrum. Annars vegar var blanda aðgreind eftir stærð fásykrukeðja með gelsíun og hins vegar voru einstöku þættir af gelsíunarsúlu aðgreindir eftir fjölda plúshleðsla á jónaskiptasúlu. Þessi tvívíða greining hefur ekki verið notuð áður við aðgreiningu á fásykrublöndum. MALDI-TOF greining var notuð til að greina innihald efnisþátta. Niðurstöður bentu til þess að hægt væri að nota tvívíða greiningu ásamt MALDI-TOF greiningum til að aðgreina fásykrublöndu eftir stærð og hleðslu fásykrupátta. Þá er ljóst að engin ein þessara aðferða getur magngreint efni í blöndu.

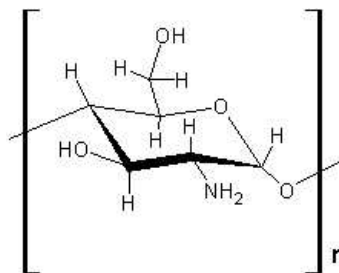
### 1. Inngangur

Í rannsóknarverkefni því sem hér um ræðir var markmiðið að greina samsetningu og byggingu kítósanfásykra í blöndu sem framleidd var af Primex ehf. Rannsóknir hafa sýnt að kítósanfásykrur hafa líffræðilega virkni og eru áhugaverðar meðal annars með tilliti til lyfjagerðar [1]. Verkefnið var tvískipt. Annars vegar voru IR og NMR róf tekin af fásykrustöðlum og hins vegar var kítósanfásykrublanda aðgreind í þætti sína með gelsíun (e. gel filtration chromatography, GFC), jónaskiptasúlu (e. ion exchange chromatography, IEC) og MALDI-TOF massagreiningu (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry). Verkefnið var unnið að frumkvæði Primex ehf og í samstarfi við Dr. Martin Peter, prófessor við Háskólann í Potsdam, Þýskalandi og var liður í meistaraþrófsverkefni eins af höfundum (S.S.). Verkefnið er liður í stærra verkefni. Þættirnir verða rannsakaðir frekar með tilliti til líffræðilegrar virkni. Í þessari grein verða einungis kynntar helstu niðurstöður MALDI-TOF greininganna en áhugasömum lesendum bent á meistaraþrófsritgerð Soffíu Sveinsdóttur varðandi ítarlegri umfjöllun [1].

Kítín er náttúruleg fjölliða sem finnst meðal annars í ytri stoðgrind skordýra og skeldýra. Grunneining kítíns er N-acetyl glúkósamín (tákn- að með bókstafnum A). Kítósan er afleiða kítíns og er skilgreint sem allar samfjölliður (copolymers) N-acetylglúkósamíns og glúkósamíns sem leysast í súrum vatnslausnum (pH < 6,5). Glúkósamín (tákn- að með bókstafnum D) myndast þegar asetýlhópur

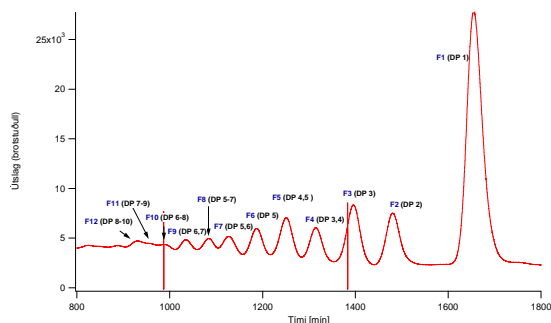


Mynd 1. N-acetyl glúkósamín fásykrustaðall, n = 1-6



Mynd 2. Glúkósamín fásykrustaðall, n = 1-6

er vatnsrofinn í basískri lausn. Kítósanefni geta innihaldið mismunandi hlutfall A og D eininga og endurspeglast það í misjöfnum efna- og eðliseiginleikum efnanna [2]. Kítósanfásykrur fást með ensímiðurbroti kítósanfjölliða. Í verkefninu var unnið með kítósanfásykrublöndu en einnig með staðla sem innihalda einungis A eða D einsykrur og keðjulengd 1-6. Sjá myndir 1 og 2.



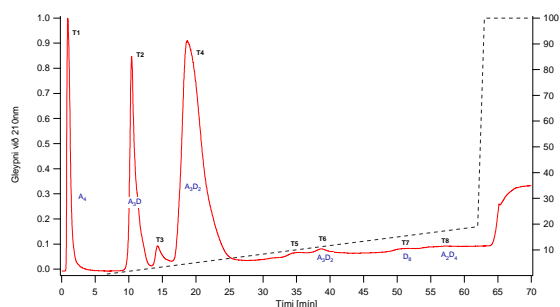
**Mynd 3.** Keysla fáskykrublöndu á gelsúnarsúlu (XK-50 súla, fyllt með polyacrylamíð geli, Biogel P4, Biorad). Þættir eru merktir inn á rófið ásamt helstu keðjulengdum (DP) innan hvers þáttar.

## 2. Niðurstöður

Fáskykrublanda var látin renna í gegnum gelsúnarsúlu (XK-50, fyllt með polyacrylgeli Biogel P4, Biorad) til að aðgreina blönduna eftir stærð fáskykra. Blandan aðgreindist í tólf þætti (F1 - F12 á mynd 3). Af mynd 3 er ljóst að eitthvert efni kom út af súlunni á undan þætti F12 en upplausnin var ekki nægilega góð til að unnt væri að safna því. Hver þáttur (F1 - F12) var frostþurrkaður og síðan greindur í MALDI-TOF tæki til að fá hugmynd um hvaða fáskykrur væru í hverjum þætti. Fáskykrublandan var einnig mæld með MALDI-TOF áður en hún var aðgreind á gelsúnarsúlunni. Í töflu 1 má sjá samanburð á þessum mælingum. Í ljós kom að mun fleiri þættir komu fram eftir aðgreiningu á gelsúnarsúlunni. Hins vegar töpuðust lengri fáskykrur við síunina.

Eftir aðskiljun á gelsúnarsúlu voru fáskykrupættirnir F5 - F9 aðgreindir eftir fjölda plúshleðsla með jónaskiptasúlu (Resource S súla, fyllt með polystyrene, krosstengdu með dívínýlbenzene og með methýlsúlfónat gríphópum). Hver F-þáttur aðgreindist í 7-10 undirþætti á jónaskiptasúlunni og eru viðeigandi toppar merktir með bókstafnum T og númeri eftir rennslistíma á súlunni (sjá mynd 4). Á mynd 4 sést hvernig F6 greindist í undirþætti sína og í töflu 2 má sjá niðurstöður MALDI-TOF mælinga og greininga á þáttum F6. Við MALDI-TOF greiningu á undirþáttum komu enn fleiri fáskykrur í ljós.

Einnig kom í ljós að aðgreining háð fjölda jákvæðra hleðsla var þökkaleg. Ljóst er þó að aðrir þættir hafa áhrif á aðgreininguna, eins og til dæmis hlutfallslegur fjöldi hleðsla miðað við lengd keðjanna og innbyrðis röð einsykranna A og D. Helstu niðurstöður verkefnisins voru þær að hægt er að nota tvívíða súlureiningu til að aðgreina fáskykrublöndu í fáskykrupætti. Fyrst er fáskykrublandan aðgreind eftir stærð og síðan eftir fjölda plús-



**Mynd 4.** Aðgreining F6 þáttarins á jónaskiptasúlu (Resource S súla, fyllt með polystyrene, krosstengdu með dívínýlbenzene og með methýlsúlfónat gríphópum). Á myndinni má sjá saltstígulinn sem var notaður (svört strikalína). Toppar eru merktir inn á rófið auk helstu fáskykra í hverjum toppi samkvæmt massagreiningu.

**Tafla 2.** Niðurstöður massagreininga á toppum F6-T1 til F6-T8. Sú fáskykra sem mest var af í hverjum toppi er feitletruð.

Toppur	Fáskykur	(+) <sup>1</sup>	DP <sup>2</sup>
T1	A <sub>3</sub>	0	3
	<b>A<sub>4</sub></b>	0	4
	A <sub>5</sub>	0	5
T2	A <sub>4</sub>	0	4
	<b>A<sub>3</sub>D</b>	1	4
T3	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	2	6
	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	3	6
	A <sub>4</sub> D <sub>3</sub>	3	7
	A <sub>3</sub> D <sub>4</sub>	4	7
T4	A <sub>3</sub> D <sub>2</sub>	2	5
T5	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	2	6
	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	3	6
	A <sub>3</sub> D <sub>2</sub>	2	5
T6	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	2	6
	<b>A<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	3	5
	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	3	6
T7	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	2	6
	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	3	6
	<b>A<sub>3</sub>D<sub>4</sub></b>	4	7
T8	D <sub>8</sub>	8	8
	A <sub>4</sub>	0	4
	A <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	3	5
	<b>A<sub>2</sub>D<sub>4</sub></b>	4	6
	A <sub>3</sub> D <sub>4</sub>	4	7

<sup>1</sup> (+) er fjöldi plúshleðsla miðað við fjölda D einsykra og að þær séu allar prótóneraðar (á D<sup>+</sup> formi).

<sup>2</sup> DP er fjöldi einsykra (e. degree of polymerization).

hleðsla. Ljóst er að MALDI-TOF greining á fáskykrublöndu gefur ekki rétta mynd af samsetningu fáskykrublöndunnar, bæði hvað varðar þætti og hlut-

**Tafla 1.** Niðurstöður massagreininga á fásykrublöndu annars vegar og allra F-þátta af gelsúnarsúlu hins vegar. Þeir þættir sem ekki finnast á báðum rófum eru feitletraðir.

Keðjulengd (DP)	Fásykrublanda	F-þættir af GFC
1		<b>A1</b>
2	A2	A2, <b>D2</b>
3	A2D, A3	A2D, A3*
4	A2D2, A3D	<b>A4*</b> , A2D2, A3D#,
5	A2D3, A3D2, A4D	A2D3, A3D2*, A4D*, <b>A5*</b>
6	A3D3, A4D2	<b>AD5</b> , <b>A2D4*</b> , A3D3#, A4D2#, <b>A5D*</b>
7	A3D4, A4D3, A5D2	<b>A2D5*</b> , A3D4#, A4D3#, A5D2#
8	A3D5, A4D4, A5D3	<b>A2D6</b> , A3D5#, A4D4#, A5D3#, <b>A6D2</b>
9	A4D5, A5D4, A6D3	<b>A3D6*</b> , A4D5*, A5D4*, A6D3
10	A4D6, A5D5, A6D4	<b>A2D8*</b> , <b>A3D7</b> , A4D6, A5D5, A6D4
11	<b>A5D6</b> , <b>A6D5</b>	
12	<b>A5D7</b> , <b>A6D6</b>	
13	<b>A5D8</b> , <b>A6D7</b> , <b>A7D6</b>	

\* = kemur fyrir í tveimur þáttum

# = kemur fyrir í þremur þáttum

fallslegs magns fásykra. Til að fá upplýsingar um gerð og hlutfallslegt magn fásykra í blöndu verður að skoða MALDI-TOF greiningu og aðgreiningu á jónaskiptasúlu saman. Þannig virðist, í ofangreindu dæmi, að mest sé af sexsykrinni A4D2 í viðkomandi blöndu, en að næst mest sé af sjösykrinni A4D3. Síðan koma A3D3, A3D2 og A3D. Næsta skref er að kanna byggingu fásykranna nánar með raðgreiningu. Það er framkvæmt með afleiðusmíðum og MALDI-TOF greiningum á afleiðunum [3].

**Summary:** The aim of this project was to characterise chitosan oligosaccharides produced by Primex ehf in terms of chemical composition (DP and ratio of the monosugars). The project was planned and executed in cooperation with Primex ehf. and Professor Martin G. Peter at the University of Potsdam, Germany. The project was divided into two parts, spectroscopic methods including IR and NMR, and chromatographic methods including GFC and IEC in combination with MALDI-TOF mass spectrometry. The oligosaccharide mixture was separated in terms of size with gel filtration chromatography (GFC) and then separated further by number of positive charges on ion exchange column (IEC). The chromatographic results were confirmed using state of the art MALDI-TOF mass spectrometry. This method has not been used in this field before. The separation process was successful and can be used to separate complicated mixture of chitosan oligosaccharides in terms of size and number of positive charges. None of these three techniques is quantitative but if the results are combined it is possible to get information about the composition of the mixture.

## Heimildir

- [1] Soffía Sveinsdóttir, *Kítín og kítósanfásykrugreining* Ritgerð vegna meistaraþrófsverkefnis við efnafræðiskor H.Í., 2003.
- [2] Yoshio Inoue. NMR Determination of the degree of acetylation. *Chitin Handbook*, R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds., European Chitin Society (1997).
- [3] S. Bahrke, J.M. Einarsson, J. Gíslason, S. Haebel, M.C. Letzel, J. Peter-Katalinicacute, and M.P. Peter, Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsorce decay mass spectrometry *Biomacromolecules*. **3**(4), 696-704 (2002).

**Um höfundana:** Soffía Sveinsdóttir lauk meistaraþrófi í efnafræði við Háskóla Íslands í júní 2003 og starfar við kennslu í Menntaskólanum við Hamrahlíð.

Jón M. Einarsson er rannsókn- og þróunarstjóri Primex ehf.

Jóhannes Gíslason er framkvæmdastjóri rannsókn- og þróunarviðs Primex ehf og

Ágúst Kvaran er prófessor í efnafræði við Háskóla Íslands.

Menntaskólaninn við Hamrahlíð  
105 Reykjavík  
soffiasv@hi.is

Móttekin: 3. desember 2003

