

Racemizzazione degli amminoacidi

Gli amminoacidi hanno (quasi) tutti la chiralità L e sono otticamente attivi: la luce polarizzata che attraversa una soluzione otticamente attiva ruota la sua polarizzazione verso sinistra o verso destra. Questa è anche una proprietà degli zuccheri: c'è il Levulosio ed il Destrosio.

Se gli organismi vivi hanno scelto di produrre solo amminoacidi di tipo L, questo non significa che non possano esistere anche quelli D. C'è una piccola probabilità per unità di tempo che la chiralità si rovesci da D a L o da L a D.

Partendo dal 100% di L si va verso la concentrazione di equilibrio in cui le due forme sono al 50%-50% e si parla allora di una miscela racemica.

Non tutti gli amminoacidi sono di tipo L. La glicina è achirale (cioè simmetrica).

L'equilibrio tra le due forme (50:50) si raggiunge asintoticamente con un andamento esponenziale. Se è noto il tempo di vita media, si può quindi datare il materiale, per esempio la parte organica nelle ossa.

MISURE: non si usa l'attività ottica, ma piuttosto la cromatografia in fase gassosa (GC) o liquida (LC) in cui si usano tecniche di scambio ionico. Attualmente la tecnica migliore è la HPLC (high performance liquid chromatography) che ha una sensibilità altissima (parte per miliardo).

Un grammo d'osso è sufficiente, una frazione di grammo di dentina, nel caso della datazione di un dente, e pochi milligrammi di carbonato per una conchiglia.

L'analisi della racemizzazione degli amino-acidi consiste nella preparazione del campione, isolamento del amminoacido voluto e misura del suo rapporto D: L . La preparazione del campione comporta l'identificazione, l'estrazione grezza e la separazione delle proteine nei loro amminoacidi costituenti, tipicamente per macinazione seguita da idrolisi acida. Il prodotto di idrolisi amino-acidico può essere combinato con una molecola fluorescenza specifica chirale, separato mediante cromatografia o elettroforesi, ed il rapporto amminoacido D : L rapporto determinato mediante fluorescenza. In alternativa può essere separato mediante cromatografia o elettroforesi, combinato con un catione di metallo, ed il rapporto D : L determinato mediante spettrometria di massa. La separazione cromatografica o elettroforetica delle proteine e aminoacidi dipende dalla dimensione molecolare, che generalmente corrisponde al peso molecolare , e in misura minore sulla forma e carica .

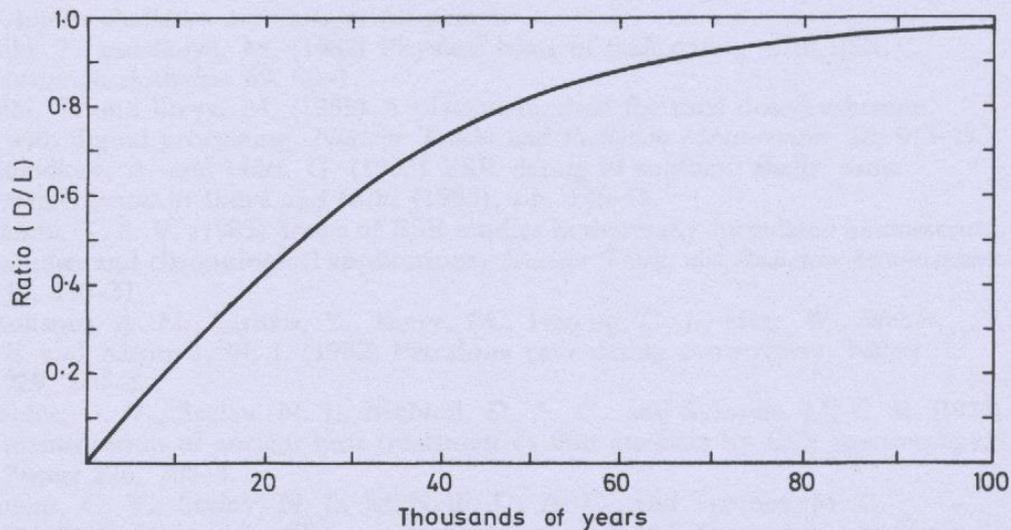


Fig. 8.1 Ratio of D-aspartic acid to L-aspartic acid versus age, for a sample in conditions such that the 'half-life' is 15,000 years. In practice the usable age range for bone is liable to be limited by contaminating intrusive amino acids; this is evidenced by ratios of less than unity for bones old enough for the equilibrium level to have been reached.

In linea di principio la tecnica sarebbe molto potente, ma...

la vita media dipende criticamente dalla temperatura.

E non solo la temperatura: il ritmo di racemizzazione è diverso per le diverse specie e poi per conchiglie, ossa, denti ...

Table 8.1 Racemization half-lives and rate constants

	Half-life ^a (thousands of years)		Rate constant ^b (per year)	
	0°C	25°C	0°C	25°C
Aspartic	430	3	0.8 × 10 ⁻⁶	120 × 10 ⁻⁶
Alanine	1400	12	0.25 × 10 ⁻⁶	30 × 10 ⁻⁶
Isoleucine	6000	50	0.07 × 10 ⁻⁶	8 × 10 ⁻⁶

^a The half-lives are for free amino acids in aqueous solution, pH 7.6, as quoted in Bada (1982). The values given are only a rough guide to order of magnitude and to dependence on temperature; actual half-lives found for amino acids in bone are in general appreciably longer. 'Half-life' does not have the same meaning¹ here as in radioactivity. Particularly in view of its dependence on environmental factors, etc. some authors question whether it is a useful concept in these studies.

^b The half-life is equal to $(0.693/2k)$, where k is the rate constant; $(0.693/1.75k)$ in the case of isoleucine.

Una proteina contiene una lunga catena di differenti amminoacidi legati tra loro da peptidi, con un peso molecolare maggiore di 10.000.

Nelle ossa il 90% delle proteine consiste in molecole di collagene che hanno tutte la stessa sequenza di amminoacidi e che quindi sono riconoscibili in base alla sequenza.

Precauzioni: evitare la contaminazione con materiali organici; evitare riscaldamenti prolungati.

Il fattore più critico è comunque la temperatura: bisognerebbe conoscere esattamente la storia termica del campione durante tutto il periodo trascorso a partire dalla morte al momento della misura. Critica anche l'umidità. La racemizzazione avviene a un ritmo maggiore in ambiente umido e acido.

Una forte acidità, ma anche una importante alcalinità aumentano i tassi di racemizzazione.

TEMPERATURA

L'acido aspartico ha un rate di conversione che cambia del 25% se la temperatura cambia di 1 grado. Bisogna quindi conoscere la temperatura della sepoltura con una precisione entro 1 grado se si vuole una datazione precisa al 25%.

La racemizzazione avviene molto più velocemente in caldo, in condizioni di bagnato, rispetto alle condizioni di asciutto freddo . Gli studi relativi a regioni fredde sono molto più comuni di quelli relativi a regioni tropicali. In particolare, il freddo costante del fondo dell'oceano o l'interno secco di ossa e conchiglie hanno contribuito maggiormente all'accumulo di dati di datazione colla racemizzazione . Come regola generale, i siti con una temperatura media annua di 30 ° C hanno una portata massima di 200 ka e risoluzione di circa 10 ka; siti a 10 ° C hanno una portata massima età di ~ 2 m.y. e risoluzione generalmente di circa il 20 %; a -10 ° C la reazione ha un'età massima di 10 ~ m.y., e una risoluzione corrispondentemente più grossolana.

PRIMO METODO:

a) si studia in laboratorio il rate di conversione in funzione della temperatura, a temperature medio alte per poi estrapolare i risultati alle temperature più basse di interesse

b) Si inseriscono nel terreno dei termometri e si misura inoltre la temperatura dell'aria al sito. Si cerca di ricostruire l'andamento della temperatura nel passato sulla base delle conoscenze delle variazioni climatiche, ottenute principalmente col metodo degli isotopi di ossigeno

SECONDO METODO (metodo calibrato)

Consiste nel confrontare la racemizzazione del campione con quella di un altro campione di cui sia nota l'età, ricavata con una tecnica diversa, e che abbia trascorso il tempo in condizioni uguali o simili.

Ovviamente, se i due campioni sono nello stesso strato del sito la tecnica è di scarso interesse a meno che non si sia interessati a rilevare materiali intrusivi.

Però possono essere confrontati campioni prelevati da siti vicini o dallo stesso sito a diversa profondità e quindi età.

Naturalmente, se si analizzano degli ossi di animali c'è il rischio che siano stati cotti. In questo caso, la cottura avrebbe prodotto una conversione importante degli amminoacidi L in D e la datazione risulterebbe molto più antica di quella reale. Comunque, la cottura agisce diversamente sui diversi amminoacidi e tende ad eliminarne alcuni (serina per esempio) e questo può aiutarci a sospettare di materiali di dubbio interesse per la datazione con questo metodo.

L'analisi delle ossa dell'imperatore tedesco Lotario I, morto nel 1137 a distanza di circa 500 km da dove è stato poi sepolto, ha mostrato che il corpo è stato bollito per circa 6 ore, probabilmente per ridurre la putrefazione durante il trasporto.

Durante la vita, l'acido aspartico si racemizza a sufficienza da permettere la misura D/L. Dato che a 37 °C il processo è molto più veloce (circa 100 volte) che non alla temperatura di sepoltura, è possibile usare il metodo per determinare, con una precisione tipica del 10%, l'età alla morte fino a circa 1000 anni fa o anche più nel caso di regioni fredde. Si deve usare lo smalto o la dentina dei denti che sono metabolicamente stabili.

Degrado

L'idrolisi, dopo la morte, rompe i legami peptidici producendo catene più corte o addirittura aminoacidi liberi. La racemizzazione procede sempre, ma gli aminoacidi liberi hanno una rate $L \rightarrow D$ più veloce. Quindi il rapporto D/L dipende, oltre che dalla temperatura, anche dalla struttura che cambia continuamente.

Per fortuna nelle ossa e nei denti gli aminoacidi liberi non vengono trattenuti, ma per far bene la datazione bisogna tener conto della lunghezza media e della distribuzione di lunghezze delle catene.

Altro problema è la possibile contaminazione da funghi e batteri.

L'acqua, oltre a favorire la rottura delle catene, favorisce, per fortuna debolmente, anche il processo di racemizzazione. La velocità del processo dipende, debolmente, anche dall'acidità del terreno.

Nonostante tutte queste difficoltà il metodo è usato largamente con successo.

L'intervallo di età databili dipende dalla temperatura e dal tipo di amminoacido.

Table 8.1 Racemization half-lives and rate constants

	Half-life ^a (thousands of years)		Rate constant ^b (per year)	
	0°C	25°C	0°C	25°C
Aspartic	430	3	0.8×10^{-6}	120×10^{-6}
Alanine	1400	12	0.25×10^{-6}	30×10^{-6}
Isoleucine	6000	50	0.07×10^{-6}	8×10^{-6}

^a The half-lives are for free amino acids in aqueous solution, pH 7.6, as quoted in Bada (1982). The values given are only a rough guide to order of magnitude and to dependence on temperature; actual half-lives found for amino acids in bone are in general appreciably longer. 'Half-life' does not have the same meaning¹ here as in radioactivity. Particularly in view of its dependence on environmental factors, etc. some authors question whether it is a useful concept in these studies.

^b The half-life is equal to $(0.693/2k)$, where k is the rate constant; $(0.693/1.75k)$ in the case of isoleucine.

L'isoleucina, che ha il rate più basso, ha permesso di datare dei denti vecchi di milioni di anni. Sono stati datati strati successivi con conchiglie nei depositi marini profondi dove la temperatura è stabile intorno ai 3 °C. Con l'acido aspartico sono state datati ossi vecchi di centomila anni.

Il rapporto L/D può essere misurato con buona precisione (qualche %), ma è l'errore sistematico legato alle tante incertezze che limita la precisione della datazione. Lo smalto dentale è il materiale che dà datazioni più precise perché è più stabile al degrado di ossa o dentina e meno sensibile alle contaminazioni.

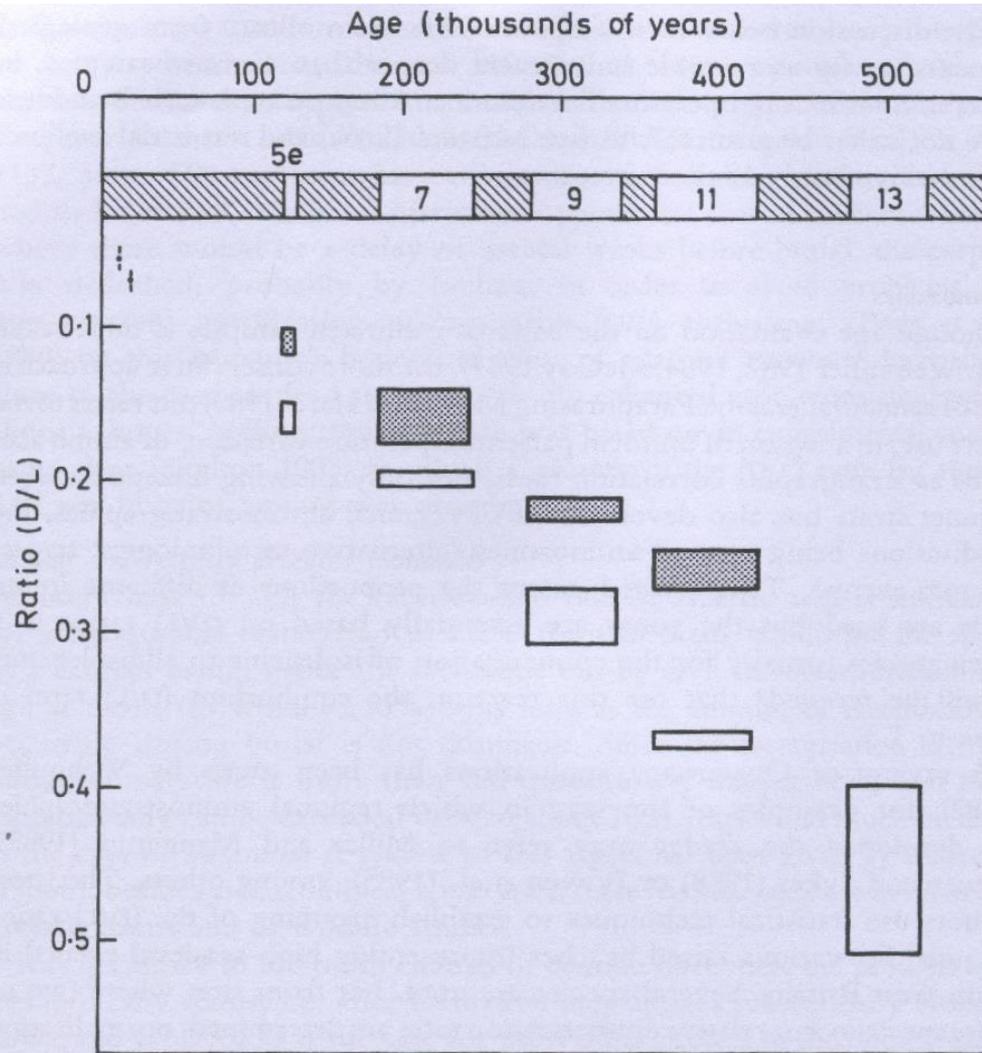


Fig. 8.2 Aminozones derived from shells associated with high-sea-level events on the north-east Atlantic margin plotted on the basis that each zone correlates with an interglacial – as indicated by odd-numbered oxygen-isotope stages (shown below the age scale at the top); hence an age is obtained for each zone. The (D/L) ratios are for the isoleucine–alloisoleucine conversion (epimerization) and the height of each rectangle indicates \pm one standard deviation in the scatter of results about the average for the zone; shaded rectangles are date for *Littorina Littorea* and unshaded for *Macoma-Artica*. (From Bowen and Sykes 1988.)

In questo esempio si è fatto una stratigrafia nelle zone raggiunte dal mare durante i periodi più caldi.