

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION	5
MATERIAL OCH METODER	6
GASKROMATOGRAFI.....	7
UPPARBETNING AV LT-8 FRÅN BLODPROV	7
RESULTAT OCH DISKUSSION	7
UPPARBETNING AV BLODPROVER.....	11
NEDBRYTNINGSHASTIGHET FÖR LT-8 I BLOD.....	16
HUDPENETRATION AV LT-8.....	16
ANALYS AV LT-8 I VÄVNAD OCH BLOD FRÅN GRIS	17
REFERENSER.....	19

Introduktion

På uppdrag och med stöd av ÖCB har FOI i samarbete med DEMC vid Södersjukhuset studerat funktion och säkerhet av den saneringsanläggning, som finns vid detta sjukhus (1). Under cirka 90 minuter omhändertogs och sanerades 24 försökspersoner (16 bårburna och 8 gående). Samtliga hade kontaminerats med ett vattenlösligt och ett dåligt vattenlösligt similiämne. Halterna av dessa ämnen mättes genom regelbunden provtagning i saneringsanläggningens olika utrymmen samt i sjukhuset. Högre halter kunde mätas på plats med hjälp av direktvisande instrument. Lägre halter analyserades efter provtagning på FOI. Vi kunde visa att anläggningen fungerade väl och med god säkerhet, om man följer driftsinstruktionen.

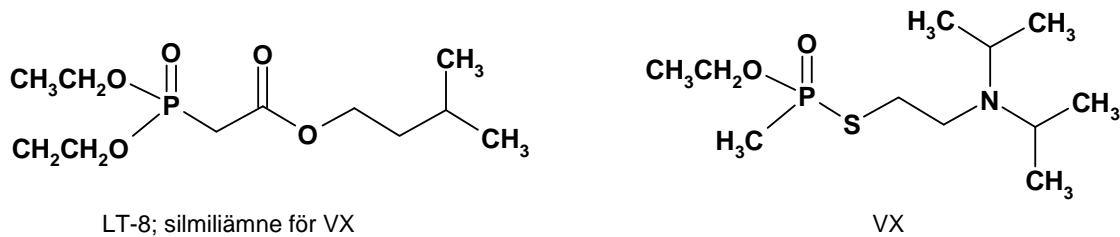
Vid kemiska olyckor eller vid terrorattacker med kemiska ämnen är det mycket sannolikt att man inte enbart får skadade som kontaminerats av kemiska ämnen, utan även skadade som förutom denna kontaminering fått någon form av traumatisk kroppsskada. Som exempel kan nämnas öppet benbrott, splitterskada, brännskada och/eller sprängskada. En person med kroppsskada kan dessutom kontamineras av kemiska ämnen i samband med transport från skadeplats till sjukvårdsanläggning. Förutom praktiska problem med sanering av ett öppet, kanske blödande sår samtidigt som man måste stoppa artärblödning genom kompression är kunskapen om hur dessa skador skall saneras mycket bristfällig. En del andra frågor måste också kunna besvaras. Hur riskfyllt är det för en kirurg att operera i ett område som kanske innehåller rester av ett giftigt ämne? Vi har därför planerat att göra en serie praktiska studier på sövd gris. Vid dessa åstadkommes ett standardiserat trauma på försöksdjuren, exempelvis en skottskada. Det skadade området kontamineras med ett lämpligt similiämne för en giftig kemikalie där ett stort saneringsbehov föreligger. Ett similiämne för den svårflyktiga och högttoxiska VX skulle vara mycket lämpligt. Man kan då undersöka hur stor kontamineringsrisken är, både före och efter sanering, för dem som kommer i kontakt med ämnet. Dessutom hur mycket av ämnet som tas upp i kroppen. Som kontroll användes friska sövda grisar, vilka kontaminerats av similiämnet.

Denna rapport behandlar utveckling och utvärdering av en analysmetod för VX-similiämnet LT-8 i blod. Fastfas-extraktion och upparbetning av prov samt analys med gaskromatografi med fosforspecifik detektion (GC/NPD) beskrivs. Val av kolonn, betydelsen av detektorns kondition samt injektionsteknik kommenteras.

I likhet med VX kan egenskaperna hos LT-8, främst hög polaritet samt låg flyktighet, förorsaka stora fel vid analyserna om de inte uppmärksammas. Avsikten med rapporten är att sammanfatta de erfarenheter som gjorts på FOI vid liknande analyser, beskriva fenomenen samt föreslå åtgärder att komma runt problemen.

Similiämnen för kemiska stridsmedel har studerats vid FOI främst för att finna ämnen med låg toxicitet men i övrigt med egenskaper som liknar det skarpa ämnet, och därför gör similib substansen användbar för fältförsök och liknande studier. Likheter i fysikaliska egenskaper som flyktighet, viskositet och polaritet är av vikt, exempelvis för undersökning av saneringsmetoder och risker för förgiftning vid vätskeöverföring från ofullständigt sanerade ytor. Fosfonoacetatet LT-8 är en av en rad substanser som studerats vid FOI för att finna ett bra fysikaliskt similiämne för VX (2 a, b). Ursprungligen syntetiserades tio analoga fosfonoacetater betecknade LT-1 till LT-10. Flyktigheten för LT-8 ligger något lägre än den för VX. Lösligheten i vatten är också mindre. Den beräknade fördelningskonstanten i systemet oktanol/vatten ($\log P_{ow}$) är 2.28, mycket nära 2.23 som beräknats för VX ($\log P_{ow}$ beräknade med programmet ClogP for Windows, BioByte Corporation). Det är rimligt att anta att $\log P_{ow}$ -värdet kan ses som ett mått på hur ett kemiskt ämne passerar ett biologiskt membran (lipidmembran) och kan vara ett riktmärke för hur en kemisk substans tas upp i en levande organism, t. ex. genom hudpenetration. Vi känner inte till några undersökningar, där toxiciteten av ren LT-8 undersökts. Men vi har tidigare inför planerade och genomförda fältförsök gjort toxicitetsstudier av en

blandning (LT-8 F), där LT-8 var en huvudkomponent, cirka 64% (3,4,5). I denna blandning fanns flera andra kemiska ämnen som bland annat pentylchloracetat. De gjorda testerna visade att LT-8 F var en svag kemisk mutagen i Ames´ (3). Undersökning av akut hudirriterande effekt på kanin visade att LT-8 F inte var irriterande enligt EG:s bedömningsnormer, svagt irriterande enligt AFNOR och irriterande enligt svenska bedömningsnormer (4). Oral toxicitet undersöktes efter tillförsel av LT-8 F till råttor. LD₅₀ efter oral tillförsel bedömdes vara > 2000mg/kg råttor och LT-8 F klassades som måttligt farlig (5). Det kan sannolikt förväntas att ren LT-8 har en mycket lägre toxicitet än blandningen LT-8 F och att LT-8 har en mycket låg toxicitet.



Gaskromatografi med kväve-fosforspecifik detektor (GC-NPD) valdes som analysmetod. Detektorn har hög selektivitet för kväve och fosforinnehållande föreningar vilket förenklar analysen av komplexa prover. Känsligheten är mycket hög, substansmängder under 1 µg kan normalt detekteras. Tributylfosfat (TBP) valdes som intern standard på grund av jämförbart ångtryck och polaritet.

Fastfas-extraktion med oktadecylsilica (C18) bedömdes vara en lämplig uppberedningsmetod för blodproverna. Metoden har använts tidigare av oss för spåranalys av soman i blod vid toxikokinetiska försök (3). Salter och andra vattenlösliga substanser extraheras inte av C18-kolonnerna, medan blodfetter och övriga lipofila ämnen stannar kvar i extraktionskolonnen under de betingelser som används för att eluera de relativt polära föreningarna LT-8 och TBP.

Separationskolonnen är en kritisk komponent vid spåranalys av LT-8 och kvantitativ analys med hög precision. Den höga polariteten hos LT-8 medför, i likhet med VX, svårigheter vid analys av låga substansmängder. Vid GC ses ofta adsorption av subnanogram-mängder LT-8 och försämrad separation på grund av "svansning" och toppbreddning på kolonner av otillräcklig kvalitet.

Separationskolonnen bör därför utvärderas vid de nivåer som kan förekomma i proverna. För dessa mätningar utvärderades ett antal kolonner med avseende på separationsförmåga och framför allt på förmåga att presentera pikogram-mängder av LT-8 i en smal väldefinierad, kromatografiskt ideal signal (gaussisk toppform). Vikten av detektorns kondition för toppformen belyses också av dessa försök.

Material och metoder

Buffert: 0.2 M natriumacetat, pH 4.0. Extraktionskolonner: 100 mg C18, BondElut LRC (Varian AB). Separationskolonn: OV-1701 (J&W) 30 m. 0.25 mm i. d. med 0.25 µm filmtjocklek. Lösningsmedel: metanol (Baker, HPLC-grade) och etylacetat (Merck p. a.), avjoniserat vatten, Milli Q (millipore). En SpeedVac (Savant) användes för koncentrerat av extrakt. Humant blod erhöles från en frisk, frivillig försöksperson. Prover av blod och vävnad från svin erhöles från Norrlands Universitetssjukhus (NUS), Umeå. Blodprover uppsamlades i hepariniserade glasrör. Provtagning och användning av blod och vävnadsprover från svin hade före försöken genomgått lagstadgad granskning och godkänts av Umeå Djurförsöksetiska Nämnd.

Gaskromatografi

En Hewlett-Packard 5890 gaskromatograf med flamjonisationsdetektor (FID) och kvävefosforspecifik detektor (NPD) användes vid analyserna. Proverna injicerades med en 5973A autosampler. Instrumentet var anslutet till ett Perkin-Elmer Turbochrom-4 datasystem för kontroll och styrning samt insamling och behandling av detektorsignalerna. Data importerades till Microsoft Excel för beräkningar och kvantifiering. Helium användes som bärgas vid 100 kPa, som gav en bärgashastighet på ca 30 cm/s. Kolonntemperaturen programmerades efter 1 min vid 60°C med 20°C /min till 200°C, därefter med 10°C /min till 260°C som hölls i 2 min. Injektortemperaturen var 200°C, detektortemperaturen var 280°C. Proverna injicerades med splitless-injektion och injektionsvolymen var normalt 1 µl. För separationen utvärderades främst stationärfaserna DB-5 och OV-1701 (J&W). Kolonndimensionerna var, längd 30 m, 0.25 mm i. d. och 0.25 µm filmtjocklek.

Upparbetning av LT-8 från blodprov

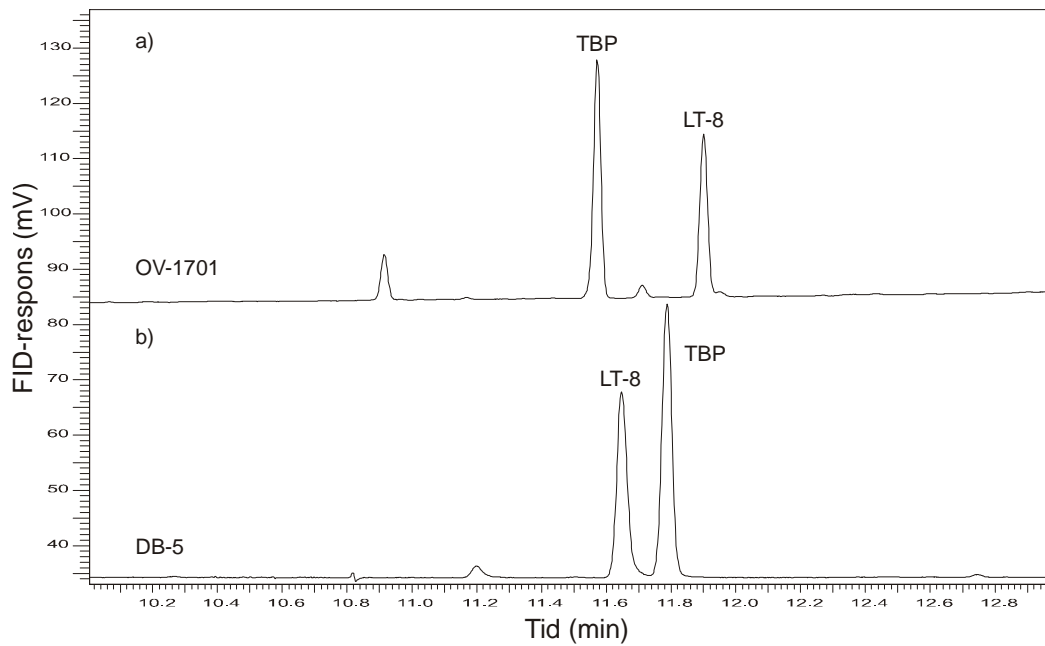
Proverna extraherades med C-18 fast-fas extraktionskolonn med hjälp av en vacuumstation (Supelco). Innan appliceringen av prov konditionerades kolonnerna med 4 ml metanol följt av 4 ml avjoniserat vatten.

Blodproverna späddes omedelbart efter provtagning med 3 volymer buffert, 0.2 M natriumacetat, pH 4.0, 200 ng TBP tillsattes. Bufferten hölls kyld på isbad. Efter centrifugering (5 min på standard bordcentrifug) överfördes supernatanten till C18-patronen. Efter det att provet passerat tvättades kolonnen med ca 2 ml avjoniserat vatten. Så mycket vatten som möjligt avlägsnades med vacuum i ca 1 min innan elueringen. TBP och LT-8 eluerades med 1 ml metanol.

Extrakten koncentrerades med Speedvac till ca 100 µl (vilket tog ca 30 min) och späddes därefter med 900 µl etylacetat/metanol 8/2. Utbytet och blankvärdet utvärderades genom att upparbeta motsvarande volym serum-buffertblandning med och utan LT-8 tillsatt. Vid utvärderingen av extraktionsutbytet tillsattes den interna standarden efter extraktionen. En serie standardlösningar 10 - 500 ng/ml preparerades i etylacetat/metanol/vatten 7/2/1. Proverna kvantifierades mot en standardkurva framtagen med hjälp av data från standardlösningarna (areaförhållandet LT-8/TBP).

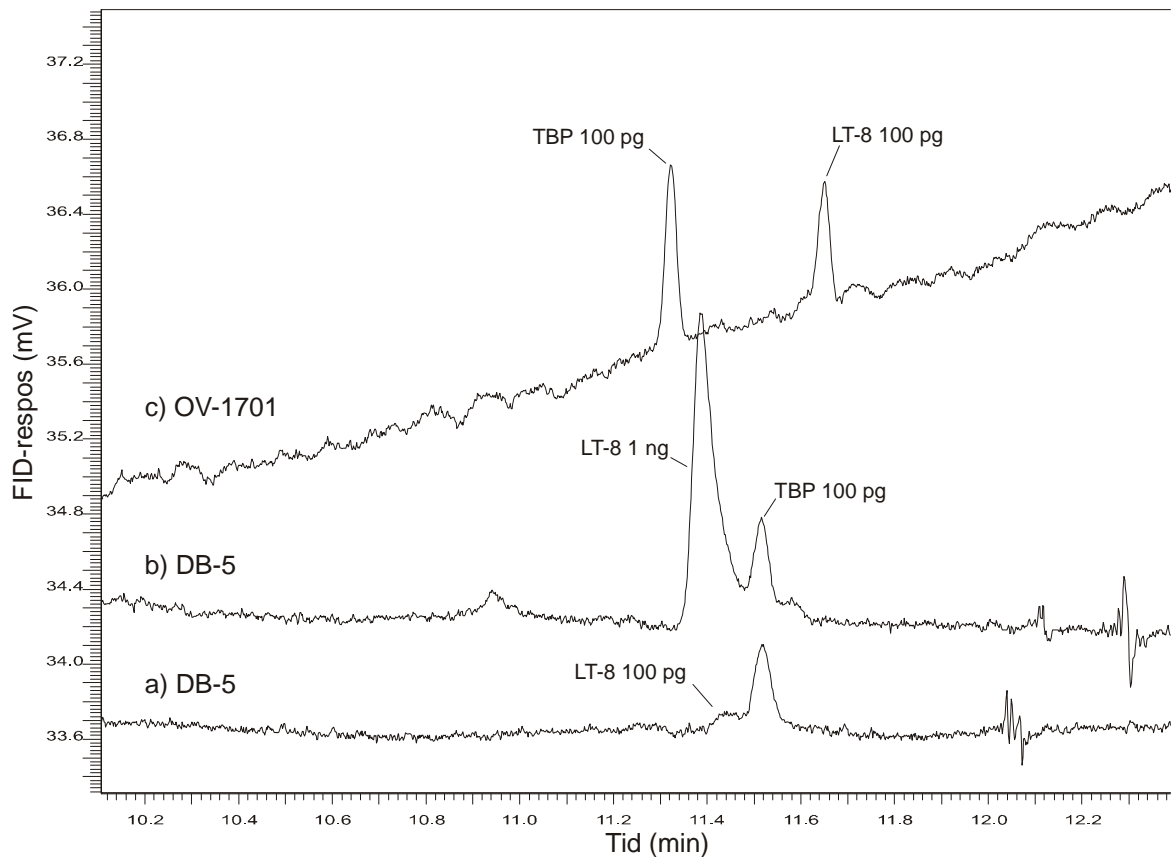
Resultat och diskussion

Vid utvärdering av separationskolonnerna erhöles bättre separation med den mera polära OV-1701 (cyanopropyl-, fenyl-dimetylpolysiloxan) än med DB-5 (5 % fenylmetylpolysiloxan). I Figur 1 jämförs kromatogrammen av en standardlösning innehållande 10 ng/µl av vardera LT-8 och TBP. På OV-1701-kolonnen elueras LT-8 efter TBP, medan ordningen är omvänd på den mindre polära DB-5. Det indikerar att polariteten hos LT-8 är högre än hos TBP. DB-5 kolonnen hade använts för andra analyser, men den bedömdes fullt användbar efter den allmänna kolonntest, som används vid den ackrediterade verksamheten på vårt laboratorium. Med DB-5 syns en tydlig tendens till svansning på LT-8-signalen, medan TBP ger en symmetrisk topp. På OV-1701 elueras båda föreningarna med närmast ideala symmetriska toppar, toppbredden är också något lägre, omkring 3 s vid basen. Den injicerade mängden var 10 ng i båda fallen.



Figur 1. GC-FID av standardlösning innehållande 10 ng/ μ l av LT-8 respektive TBP. a) Stationär fas DB-5, b) Stationär fas OV-1701. Båda kolonnerna hade 0.25 μ m filmtjocklek, längd 30 m, i. d. 0.25 mm.

Kolonnernas kondition visade sig vara av avgörande betydelse för analysen av LT-8 i subnanogram-nivå. I Figur 2 jämförs kolonnerna vid nivåerna 1 ng resp. 100 pg LT-8. TBP var i båda fallen 100 pg. DB-5-kolonnen uppvisar kraftig svansning vid 1 ng. Vid 100 pg adsorberas så stor andel att signalen nästan helt försvinner i bruset. På OV-1701-kolonnen är topparna fortfarande symmetriska. (Vid detta försök var OV-1701-kolonnen fortfarande inte fullt konditionerad, vilket ger upphov till den sluttande baslinjen samt något högre brus.)

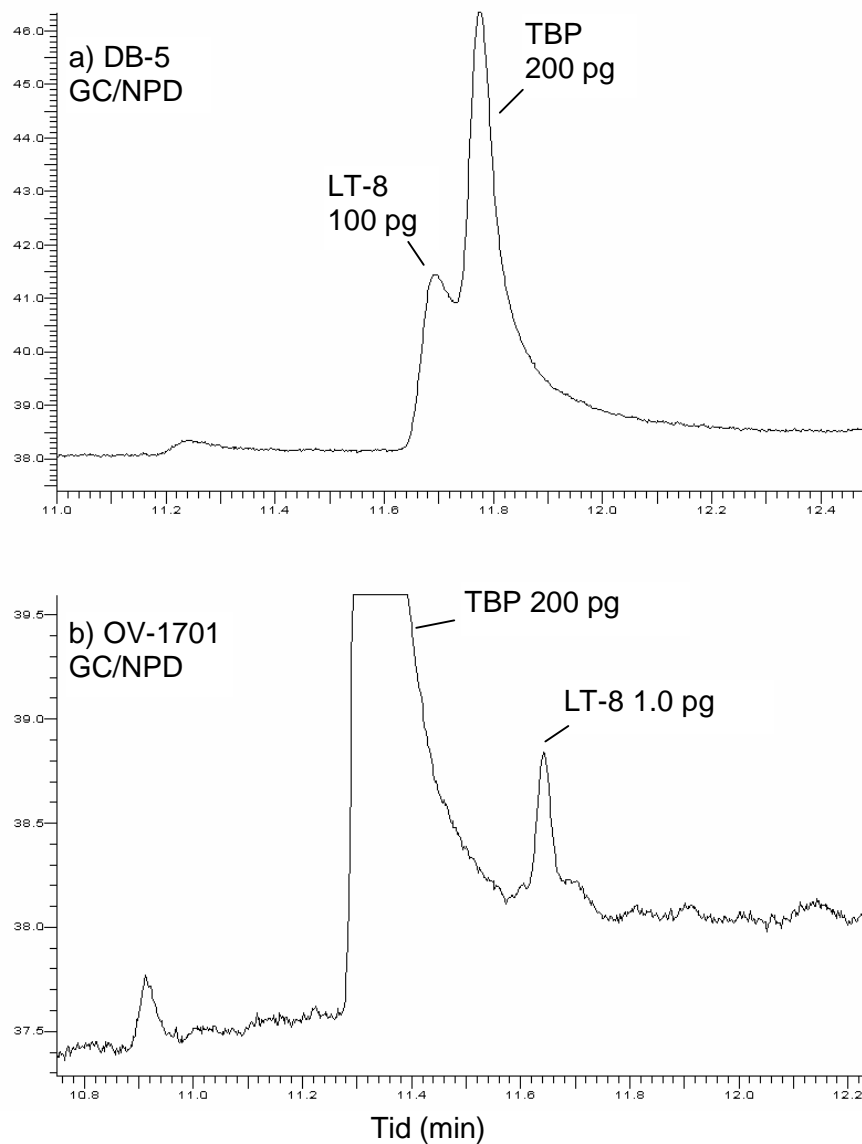


Figur 2. GC-FID av standardlösning innehållande a) 100 pg av LT-8 samt 100 pg TBP intern standard. b) 1 ng LT-8. samt 100 pg TBP, kolonn: DB-5 som i Figur 1. c) 100 pg LT-8. samt TBP 100 pg, kolonn: OV-1701 som i Figur 1.

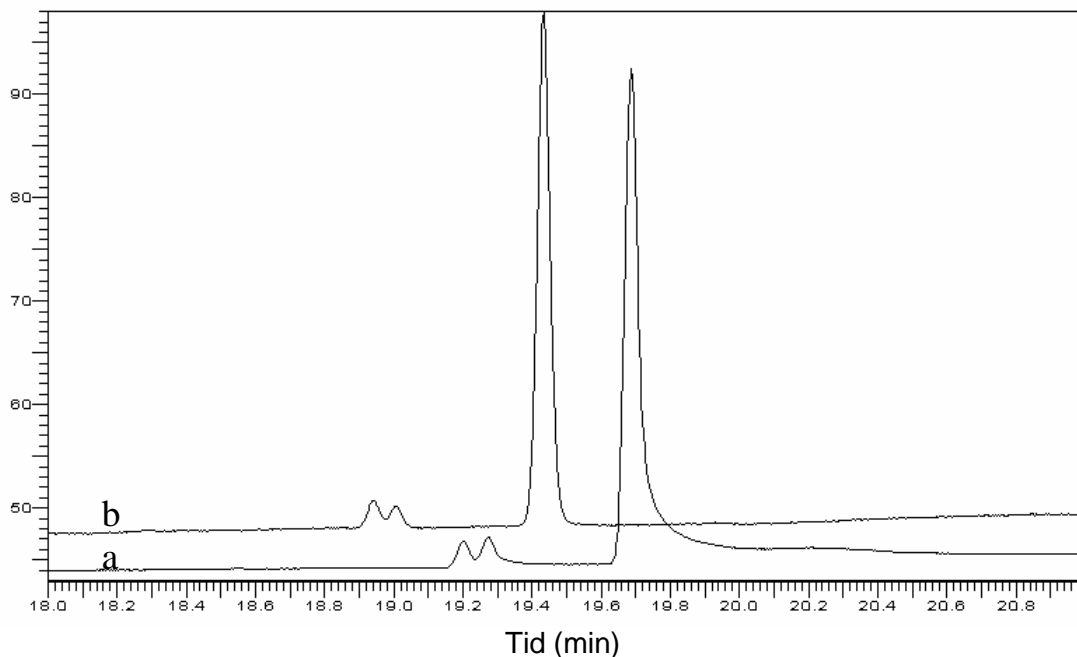
Med den kväve-fosforselektiva NPD:n kan föreningar, som innehåller fosfor detekteras vid omkring 100 gånger lägre nivåer än med FID. I Figur 3 visas analys av en standardlösning med 1 pg/ μ l LT-8 och 200 pg/ μ l TBP på de båda kolonnerna. OV-1701 ger fortfarande en symmetrisk topp från LT-8 vid denna låga nivå nära detektionsgränsen för NPD:n och är därmed lämplig för spåranalys av LT-8. TBP-signalens svansning härrör inte från kolonnen utan är typisk för NPD:n, där kollektorelektrodens kondition kan påverka toppsymmetrin. Speciellt då klorerade lösningsmedel används försämras detektorns "kinetiska egenskaper" gradvis, dock utan att för den skull känsligheten nödvändigtvis påverkas. Det yttrar sig främst genom att signaler från större mängder fosforinnehållande föreningar klingar av långsamt, svansar, vilket försämrar separationen och noggrannheten vid kvantitativ analys.

Svansningen kan minskas genom höjning av detektortemperaturen. Man bör dock ta hänsyn till kolonnens maxtemperatur som för OV-1701 är 280 °C. Så småningom bör dock kollektorelektroden bytas ut, vilket bör återställa resposen.

Detta illustreras i Figur 4.



Figur 3. GC-NPD av standardlösningar innehållande a) 100 pg/μl resp b) 1.0 pg/μl LT-8 samt 200 pg/μl TBP. För signalen från LT-8 vid 11.64 min i det nedre kromatogrammet uppskattas signal/brus-förhållandet S/N = 6/1, vilket ger detektionsgräns ca 0.5 pg injicerad mängd. Vid analyserna av denna spädningsserie erhöles en bakgrund av LT-8 på ca 50 % av lägsta koncentrationen av standardlösningen, 1 pg/μl.



Figur 4. GC/NPD av en lösning innehållande 1 ng LT-8. Kromatogrammen är registrerade med a) en kollektorelektrod använd några månader resp. b) efter byte av detektorns kollektorelektrod. Kromatogrammen är förskjutna i förhållande till varandra.

Upparbetning av blodprover

Fastfas-extraktion med oktadecyl-silica (C18) valdes som uppberedningsmetod för blodproverna. En acetatbuffert vid pH 4.0 användes för att minimera hydrolysis och enzymatisk nedbrytning av LT-8 förorsakad av karboxylesteraser i provet(4). Utvärderingen av utbytet skedde med provvolymen 4 ml. Större provvolymen undersöktes inte. Effekten av en högre jonstyrka hos bufferten för att öka extraktionsutbytet undersöktes.

LT-8 och den interna standarden eluerades med 1 ml metanol. Blodfetter och andra lipofila substanser stannar under dessa betingelser kvar på C18-kolonnen. Vid GC-analysen kan dessa substanser ställa till problem eftersom triglycerider, fosfolipider, kolesterol etc. har låg flyktighet och stannar kvar på kolonnen. De kan med tiden förorsaka problem med adsorption och försämrad separation.

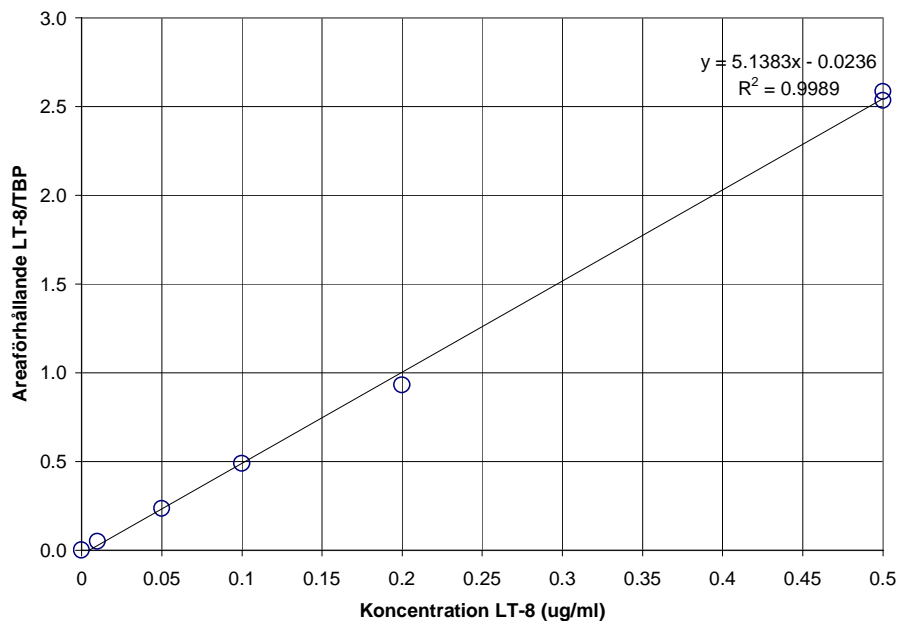
Vid dessa försök undersökte vi inte närmare vilken metanol/vatten-blandning, som var optimal för att eluera LT-8 och den inre standarden TBP från de C18-patroner som användes. En optimering av lösningsmedelsblandningen kan ge renare extrakt och mera robust metod. Ett tjugotal blodprover analyserades under försöken, utan tecken på försämrad kromatografi eller ökat bakgrundsbrus. Om stora provserier skall analyseras kan det vara intressant att minska metanolkoncentrationen för att därmed minska mängden lipofila substanser i eluaten.

Under försöken fann vi att metanol påverkade injektionen av proverna på så sätt att topparean för LT-8 minskade ned till 30 % jämfört med standardlösningarna, vilka preparerats med etylacetat som lösningsmedel. Reproducerbarheten minskade också drastiskt. TBP påverkades inte i samma utsträckning utan topparean blev i stort sett densamma för båda lösningsmedlen. Topparean för LT-8 i metanol/vatten (8:2) var omkring 80 % relativt etylacetatlösningarna. Extrakten från C18-kolonnerna hade den ungefärliga sammansättningen metanol/vatten (9:1) och koncentrerades till

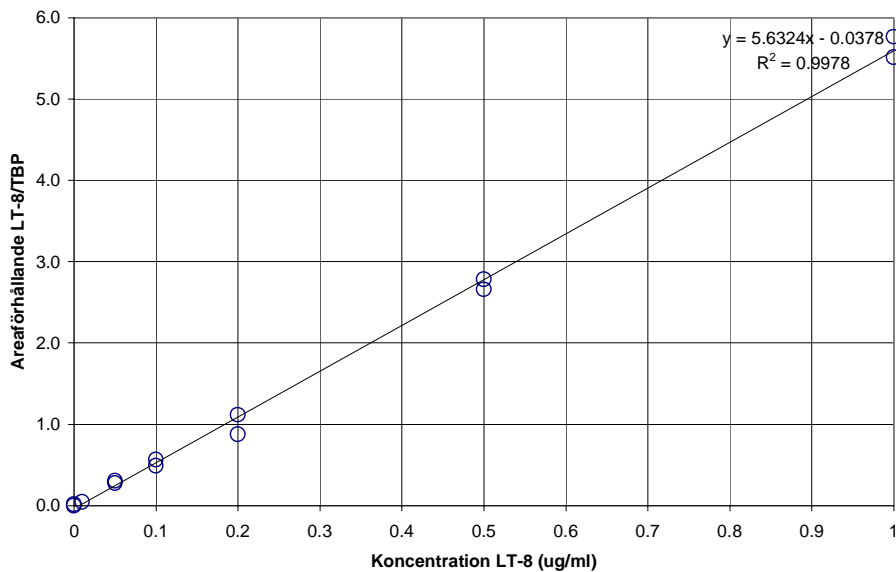
50-100 μ l med hjälp av en Speedvac vacuumcentrifug varefter de späddes innan analys med 900 μ l etylacetat/metanol (8:2) före analys. På så sätt får extrakten en mera enhetlig sammansättning, samtidigt som effekten från metanol minimeras. Utbytet vid Speedvac-koncentreringen bestämdes till 105 ± 2.8 % (n=4).

Utbytet vid extraktion av en 4 ml vattenlösning med 100 ng LT-8 bestämdes till 99 % (n=2). Utbytet av TBP befanns också vara kvantitativt. Vid dessa försök var dock spridningen i data stor på grund av metanolinnehållet. Försöket bör upprepas vid kommande mätningar.

I Figur 6 visas en kalibreringskurva upprättad efter analys av standardlösningar av LT-8 preparerade i etylacetat/metanol/vatten (7:2:1) med TBP som intern standard. Kurvan är linjär upp till 1 ng injicerad mängd, motsvarande en koncentration av 1 μ g/ml.



Figur 5. Kalibreringskurva för LT-8 med TBP som intern standard preparerad genom analys av standardlösningar 0.01-0.5 ug LT-8/ml etylacetat/metanol/vatten (7:2:1).



Figur 6. Kalibreringskurva för LT-8 i blod med TBP som intern standard. Till 1 ml blod tillsattes 10-1000 ng LT-8. Proverna upparbetades och analyserade med GC/NPD.

Metoden utvärderades genom att tillsätta varierande mängd LT-8 sattes till färskt, hepariniserat blod (nyligen donerat av en frisk, frivillig person) som blandats med stabiliseringsbuffert (1:3). Utbytet vid nivåer från 10 ng/ml till 1 µg/ml blod utvärderades. Dubbelprov gjordes vid varje koncentration. I Figur 5 har areaförhållandet LT-8/TBP plottats mot mängden tillsatt LT-8. Data visar att metoden är linjär över hela det studerade intervallet. Korrelationskoefficienten vid linjär regression var 0.9978, interceptet nära 0. Utbytet från blodproverna bestämdes genom jämförelse med ett prov, där en känd mängd LT-8 tillsattes efter extraktionen. I Tabell 1 anges utbyten för proverna.

Det befanns nödvändigt att centrifugera proverna före extraktionen eftersom C18-kolonnerna satte igen efter 1-2 ml av blod-buffertblandningen gått igenom. Efter centrifugering 10 min med en vanlig bordcentrifug erhöles en klar supernatant som enkelt passerade extraktionskolonnen. Utbytet vid extraktionen begränsas naturligtvis eftersom pellet efter centrifugering inte extraheras. Detta avspeglar sig i resultaten i tabell 1, där båda proverna vid den lägsta koncentrationen 0.01 µg/ml och det ena vid 0.05 µg/ml extraherades utan att först centrifugera. Extraktionsutbytet ligger då kring 85-95 %, medan det sjunker när blodkropparna separerats genom med centrifugering. På grund av att därmed inte hela provet extraherades begränsades utbytet vid extraktion av blod till 65-75 % (Tabell 1).

Tabell 1. Utbyte vid extraktion av 1 ml blod vid varierade LT-8-koncentration.

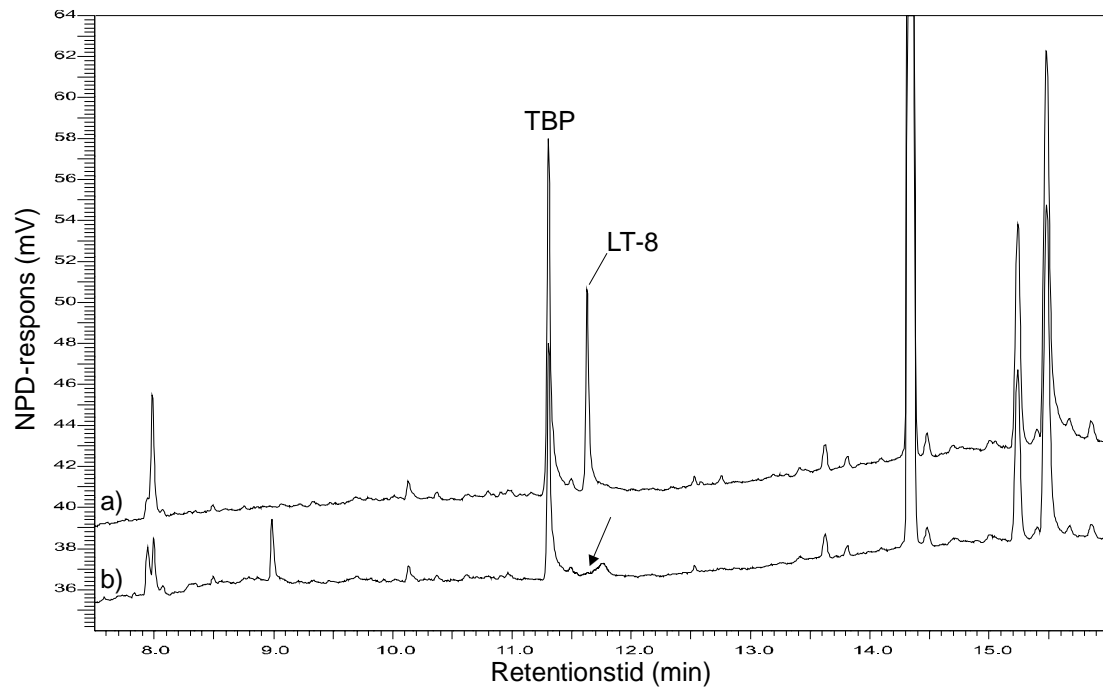
Mängd LT-8 tillsatt (μg)	Areaförhållande (LT-8/TBP)	Utbyte (%)
0	0,000	-
0	0,014	-
0,01	0,053	95 ^a
0,01	0,046	85 ^a
0,05	0,303	84 ^a
0,05	0,277	78
0,10	0,490	67
0,10	0,562	76
0,20	0,875	59
0,20	1,116	74
0,50	2,658	70
0,50	2,784	73
1,00	5,765	76
1,00	5,514	73

a) proverna extraherades utan föregående centrifugering

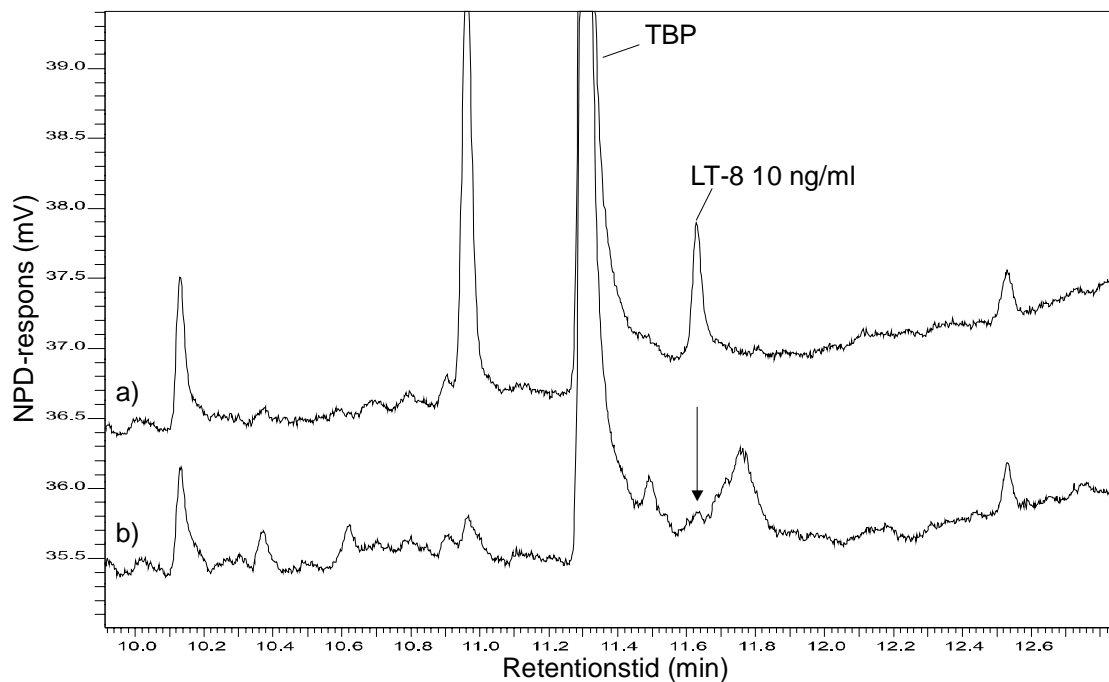
Utbytet vid extraktion av LT-8 i blod med C18-fastfasextraktion bestämdes vid ett separat experiment till omkring 90 %. I detta experiment spikades 2 ml av supernatanten från blodbuffertblandningen med 1 μg LT-8 och extraherades. Intern standard tillsattes eluatet efter extraktionen. Provet jämfördes med en standardlösning preparerad från ett eluat av ett blankprov, detta för att ge en kalibreringslösning med samma sammansättning som provet.

Kromatogrammen i Figur 7 visar analyser av blodprov med och utan tillsats av LT-8. I det område som LT-8 och den interna standarden eluerar ses inte några större signaler från störande föreningar. Till blodproverna sattes 100 ng H/TBP. Detektionsgränsen för LT-8 kan uppskattas ur Figur 8 där kromatogrammet för den lägsta nivån jämförs med blankkontrollen. En antydning till signal från LT-8 kan ses i blankprovet och uppskattas till ca 10 % av det med 10 ng spikade provet. Detektionsgränsen ligger därmed på 2-3 ng LT-8/ml blod i dessa försök.

Detektionsgränsen kan sänkas om proverna koncentreras genom att provvolymen kan reduceras från 1 ml till 20-50 μl . Det som begränsar hur långt ned i koncentration man kan komma är naturligtvis främst blankvärden och bakgrund från störande föreningar. Även den ökande vattenhalten i proverna med ökande koncentring kan ge problem vid injektionen.



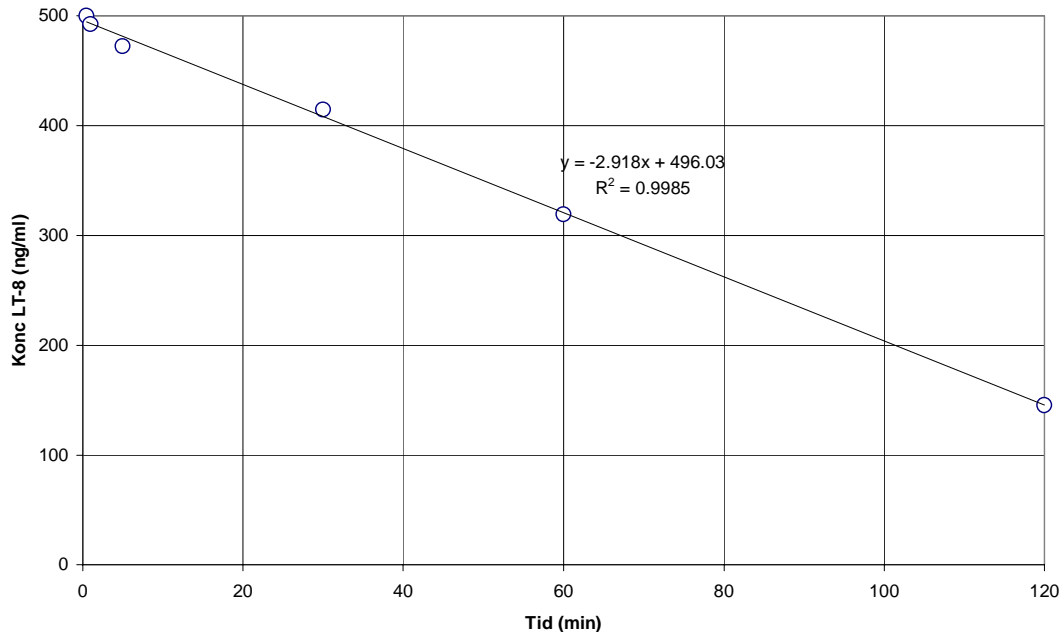
Figur 7. GC/NPD-analys av extrakt från blodprov med 100 ng LT-8/ml blod samt blod utan LT-8. Proverna extraherades med C18 fastfaskolonn, a) 100 ng LT-8/ml blod. b) Blankprov. Intern standard i båda proverna, 200 ng TBP.



Figur 8. Jämförelse av GC/NPD-analys av 1 ml blodprov med 10 ng LT-8/ml och blankprov., a) 10 ng LT-8/ml blod. b) Blankprov. Intern standard 200 ng TBP. En detektionsgräns på omkring 2 ng LT-8/ml kan uppskattas ur detta experiment.

Nedbrytningshastighet för LT-8 i blod

Stabiliteten för LT-8 i blod undersöktes genom att bestämma koncentrationen av LT-8 efter inkubation vid rumstemperatur upp till 2 timmar. Färskt blod tappades från en frivillig försöksperson och 0.5 µg LT-8/ml tillsattes. Delprov togs vid förutbestämda intervall mellan 0.5 till 120 min. Iskyld stabiliseringsbuffert (1:3, prov:buffert) tillsattes för att stoppa enzymatisk och spontan nedbrytning. Proverna upparbetades och analyserades som tidigare beskrivits.

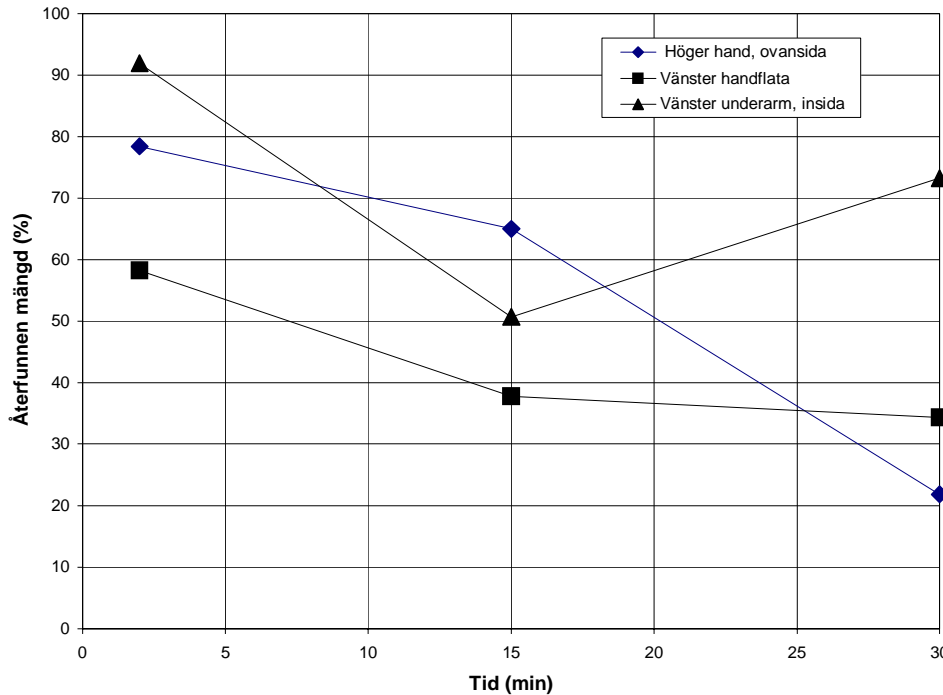


Figur 9. Nedbrytning av LT-8 i blod. Helblod spikades med 0.5 µg LT-8/ml. Delprov togs under upp till 2 timmar för analys.

Figur 9 visar att LT-8 försvinner relativt snabbt i blod. Halveringstiden var vid detta försök 90 min. Anpassning av en rät linje till mätpunkterna ger nedbrytningshastigheten $2.9 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ eller $11 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1}$. Nedbrytningen i blod sker förmodligen genom enzymatisk hydrolys av esterbindningarna av fosforylfosfataser och/eller karboxylesteraser i blodproverna. Enzymatisk nedbrytning av fosfonofluoridater (soman etc.) har i tidigare undersökningar visat sig kunna minimeras genom surgörning av provet till pH 3,5-4.⁷ Genom att tillsätta 0.1 M acetatbuffert pH 4 kunde LT-8 stabiliseras i blodprov så att ingen eller försumbar nedbrytning noterades upp till 60 min, vilket medger tillräckligt med tid för extraktion av proverna.

Hudpenetration av LT-8

Penetration av LT-8 i hud undersöktes genom att lägga en 4 µl-droppe direkt på huden och efter en förutbestämd tid analysera den mängd som kunde återfinnas genom ett avtorkningsprov. Prover applicerades dels på handens ovansida, i handflatan och på underarmens insida. Den mängd som kunde återfinnas efter avtorkning med Kleenex fuktad med PBS (phosphate buffered saline) plottades i Figur 10.



Figur 10. Penetration av LT-8 i hud. Återfunnen mängd LT-8 plottad mot tid efter applicering av 1 st 4 μ l-droppe.

Resultaten indikerar att spridningen vid dessa försök är stor. För att minimera exponeringen gjordes enbart ett försök vid varje mätpunkt. Vid avtorkningen av den återstående mängden med en pappersservett fuktad med en vattenlösning förväntas enbart den substans som ligger omedelbart vid huden följa med. Från Figur 10 uppskattas att ungefär halva den pålagda mängden har penetrerat efter 30 min.

Analys av LT-8 i vävnad och blod från gris

Utbytesförsök med blod gjordes för att konfirmera tidigare resultat, samt för att verifiera att bedövningsmedel och liknande inte stör. Vävnadsprov togs för att utveckla metoden för koncentrationsbestämning av LT-8 i vävnad.

Blod och vävnad från gris erhöles från NUS (Norrlands universitetssjukhus) och förvarades på is till försökens början (16-20 tim). Vävnad togs från skinkan, ca 5 x 5 cm inkl. fettvävnad. Blod, ca 10 ml, togs i hepariniserade rör.

Utbytesförsöken med blod utfördes på samma sätt som tidigare. 100 μ g LT-8 tillsattes 0.5 ml blod varefter stabiliseringsbuffert tillsattes och provet upparbetades.

Av vävnaden togs ca 1 g som delades med skalpell i mindre delar. 10 μ l av en vattenlösning av 20 μ g LT-8/ μ l fördelades över vävnaden. Efter 1 minut tillsattes 3 ml stabiliseringsbuffert (0.2 M natriumacetat pH 4.0) innehållande 400 μ g tributylfosfat. Proverna homogeniserades med Ultra-Turrax och centrifugerades därefter. Supernatanten avskiljades och extraherades med en C18-patron på samma sätt som för blodproverna.

Tabell 2. Utbyte av LT-8 från blod och vävnad från gris.

	Volym	Area		Areaförhållande LT8/TBP	Utbyte (%)
	(ml)	LT-8	i. s.		
Standard	-	5862	14886	0.39	
Blank	0.5	0	17638	0	
Blod - 1	0.5	6226	14299	0.44	112
Blod - 2	0.5	7253	17840	0.41	104
Blod - 3	0.5	5142	15868	0.32	83
Blod - 4	0.5	5912	14111	0.42	107

LT8-koncentration: 200 ng/ml, mängd intern standard: 200 ng

Tabell 3. Utbyte av LT-8 från vävnad från gris.

	Vikt (g)	Area		Areaförhållande LT8/TBP	Utbyte (%)
		LT-8	i. s.		
Standard		10481	9327	0.39	
Blank	1.07	-	7040	0	-
Blank	0.86	-	7675	0	-
Vävnad - 1	0.96	10565	124759	0.085	8
Vävnad - 2	0.91	7986	15866	0.503	45
Vävnad - 3	1.05	7597	41646	0.182	16
Vävnad - 4	1.02	8502	56503	0.150	14
Vävnad - 5	0.98	9903	14373	0.689	62
Vävnad - 6	1.00	8662	38770	0.223	20

Mängd LT-8: 200 ng/g vävnad, mängd intern standard: 400 ng

Utbytet i blod från gris överensstämmer väl med det som tidigare erhållits med humant blod. Medelvärdet i dessa försök är 101 % med standardavvikelsen 12.8.

Utbytet från vävnadsförsöken varierar betydligt mera och är generellt sett lägre än i blod. I Tab 3 ses att nivåer från 62 % ned till 8 % erhöles. Variationer i utbytet från vävnad är förväntat, eftersom vävnader inte är lika homogena som blodprover. Några av resultaten avviker kraftigt och är oacceptabelt låga. I dessa fall beror det låga värdet framför allt på en oväntat hög respons för den interna standarden, medan responsen för LT-8 låg på ungefär samma nivå. Detta kan bero på kontaminering, exempelvis av hudlagret eller på en interfererande substans med samma retentionstid som den interna standarden. Inför djurförsöken bör därför en serie kontrollförsök genomföras för att reda ut orsakerna till variationerna.

Det kan också diskuteras om den valda koncentrationsnivån av LT-8 vid dessa experiment är realistisk. Möjligen kommer de djurexperimentella studierna med LT-8-beläggning utföras vid högre nivåer än i detta försök (0.2 µg/g vävnad). Vid ökande nivåer minskar naturligtvis kontaminationsrisken i motsvarande grad.

Referenser

1. Törngren, S., Persson, S-Å., Ljungquist, Å., Berglund, T., Nordstrand, M., Hägglund, L., Rittfeldt, L., Sandgren, K. and Söderman, E. (1998) Clin. Toxicol., **36** (6), 567-573.
2. a) Trogen, L. H. (1993) Synthesis of Trialkylphosphonoacetates and Mixtures thereof – Possible Poor Man's VX Simulants. Proceedings of the 7th International Simulant Workshop, ERDEC SP-015, 277. b) Tunemalm, A.-K., Cheong, K.W., Trogen, L. and Fångmark, I. (1999) Multivariate Characterisation as a Method for Selection of Stimulans for CW Agents. FOA-R-99-01199-862—SE, (ISSN 1104-9154).
3. (1988) Undersökningar av den kemiska mutageniciteten hos ett similiämne, LT-8 F, i Ames' test. FOAtox rapport.
4. (1988) Undersökning av akut hudirriterande förmåga hos ett similiämne; LT-8 F. FOAtox rapport.
5. (1988) Undersökning av akut oral toxicitet hos ett similiämne, LT-8 F. FOAtox rapport.
6. Karlsson, B. M., Waara, L. M., Fredriksson, S-Å., Koskinen, L-O. J. (1997) Pharm. Pharmacol. **49**: 296-300.
7. Benschop, H.P., Bijleveldt, E.C., Matthijs, F.O., Degenhardt, C.A.E.M., Van Helden, H.P.M, De Jong, L.P.A. (1985) Anal. Biochem. **151**: 242-253.