

**DE STEREOSPECIFIEKE
ENZYMATISCHE HYDROLYSE
VAN SARIN IN PLASMA**

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN
DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN
DE RECTOR MAGNIFICUS DR. P. MUNTENDAM, HOOG-
LERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, TEN
OVERSTAAN VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT TE
VERDEDIGEN OP WOENSDAG 27 SEPTEMBER 1967 TE
16.00 UUR

DOOR

PIETER JOHANNES CHRISTEN

GEBOREN TE 'S-GRAVENHAGE IN 1929

Promotor: Prof. Dr E.M.Cohen

STELLINGEN

1. De door Fleisher c.s. gemeten enzymatische hydrolyse van sarin onder invloed van een rattelever homogenaat is slechts representatief voor één van de stereoisomeren van sarin, gezien de door hen gebruikte testmethode.

J.H. Fleisher c.s., J. Pharmac. exp. Ther. 139 (1963) 390

2. Het is onwaarschijnlijk dat de optische activiteit, door Hoskin en Trick waargenomen tijdens de hydrolyse van tabun onder invloed van ratteplasma, mag worden toegeschreven aan een stereospecifieke hydrolyse van tabun.

F.C.G. Hoskin en G.S. Trick, Can. J. Biochem. Physiol. 33 (1955) 963

3. De veronderstelling van Ramachandran dat DFP, ingespoten bij muizen, zich alleen aan esterasen bindt, is niet juist.

B.V. Ramachandran, Biochem. Pharmac. 15 (1966) 1577

4. De conclusie van Lowe, dat er een grotere verwantschap bestaat tussen de aminozuurvolgorden van papafne en trypsine, dan tussen die van chymotrypsine en trypsine, is niet gerechtvaardigd.

G. Lowe, Nature 212 (1966) 1263

B.S. Hartley c.s., Nature 207 (1965) 1157

5. Aan de mogelijkheid van de asymmetrische oxidatie van sulfoxiden en sulfiden door middel van perzuren via het α -zuurstofatoom van het perzuur ($R - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - \overset{\alpha}{O} - \overset{\beta}{OH}$) is niet voldoende aandacht besteed.

M. Kobayashi en A. Yabe, Bull. chem. soc. Japan 40 (1967) 224

K. Balenovic c.s., Chem. and Ind. (1961) 469

6. De bewering van Rownd, dat renaturatie van gedenateerd DNA beneden 50° praktisch niet optreedt, is in zijn algemeenheid onjuist.

R. Rownd, Br. Med. Bull. 21 (1965) 187

P. Geiduschek, Proc. natn. Acad. Sci. USA 47 (1961) 950

7. De door Stubblefield en Mueller beschreven fluctuaties in de activiteit van het enzym thymidine kinase gedurende de celcyclus behoeven niet noodzakelijk een weerspiegeling te zijn van de fluctuaties in de enzymconcentratie.

E. Stubblefield en G.C. Mueller, Biochem.
biophys. Res. Commun. 20 (1965) 535

R. Okazaki en A. Kornberg, J. biol. chem. 239 (1964) 275

8. De oorzaak van de hartinsufficiëntie, waargenomen bij kunstmatig beademde geatropiniseerde ratten, vergiftigd met hoge doses DFP, dient wellicht geheel of ten dele gezocht te worden in de remming van het membraan-ATP-ase.
9. Er bestaat een dringende behoefte aan een Nederlands nomenclatuur voorschrift voor organische fosforverbindingen, gezien de verwarring die op dit gebied heerst.

Aan mijn ouders
Aan Cootje

VOORWOORD

Dit onderzoek werd verricht in de farmacologische afdeling (hoofd Prof. Dr E. M. Cohen) van het Medisch Biologisch Laboratorium RVO-TNO (directeur Prof. Dr J. A. Cohen).

Mijn erkentelijkheid gaat uit naar allen, die mij bij de bewerking van dit proefschrift behulpzaam zijn geweest.

In het bijzonder ben ik dank verschuldigd

aan mijn promotor Prof. Dr E. M. Cohen en aan de directeur van het MBL, Prof. Dr J. A. Cohen voor hun inspirerende leiding en de prettige sfeer waarin het onderzoek kon worden uitgevoerd,

aan Dr F. Berends voor zijn waardevolle adviezen bij de experimenten en zijn hulp bij het samenstellen van het manuscript,

aan Dr A. J. J. Ooms, directeur van het Chemisch Laboratorium RVO-TNO en Drs H. L. Boter voor hun suggesties tijdens het onderzoek, en aan diverse andere medewerkers van het Chemisch Laboratorium voor hun aandeel in enige experimenten en analyses,

aan mevrouw J. A. C. M. Meyer-van den Muysenberg, die mij bij de uitvoering van het grootste deel der experimenten op bekwame en enthousiaste wijze ter zijde heeft gestaan, en aan de heer D. Westerbeeken mejuffrouw Y. Heitman voor hun vaardige assistentie bij de overige experimenten,

aan de directie van Suffield Experimental Station, Ralston, Alberta, Canada, die de ^{32}P -sarin en -soman verschafte, waardoor het mogelijk was dit onderzoek uit te voeren.

aan het bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO, voor hun toestemming tot publikatie van dit onderzoek in de vorm van een proefschrift,

aan de heren H. E. Groot Bramel, J. J. Weber en hun medewerkers voor de verzorging van de figuren,

aan mejuffrouw G. Landwier, die het voorbereidende typewerk verzorgde,

en aan mijn zuster mejuffrouw D. Christen, die op kundige wijze het manuscript persklaar maakte.

INHOUD

	Pag.
AFKORTINGEN	
INLEIDING	9
HOOFDSTUK 1. Opzet van het onderzoek	14
HOOFDSTUK 2. Materialen en methoden	17
2.1. Materialen	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. De vriesdroogmethode ter bepaling van het percentage gehydrolyseerde sarin	18
2.2.2. Radioactiviteitsmetingen	20
2.2.3. Papierchromatografie	20
2.2.4. Het bepalen van de ^{32}P onzuiverheden in de ^{32}P -sarin en -soman	20
2.2.5. Bepaling van de sarinase-activiteit in plasma volgens de manometrische methode (Warburg)	21
2.2.6. De remming van de sarinase-activiteit door p-hydroxymercuribenzoaat	21
HOOFDSTUK 3. Bruikbaarheid van de vriesdroogmethode ter meting van de hydrolyse van ^{32}P - sarin	22
3.1. Inleiding	22
3.2. Het identificeren van de ontledingsprodukten van sarin	25
3.3. De effectiviteit van de stopvloeistof	25
3.4. Hechting van sarin aan plasma-eiwitten	27
3.4.1. Experimenten met behulp van IRC 50 kolom- men	27
3.4.2. Gelfiltratie over Sephadex G 50 en dialyse	29
3.5. Bespreking van de resultaten	34
HOOFDSTUK 4. Activiteit en rembaarheid van plasma- sarinase	36
4.1. Inleiding	36
4.2. De sarinase-activiteit in plasma van verschillende species	37
4.3. De remming van de sarinase-activiteit door pHMB	37

	Pag.
4.4. De hydrolyse van 0,01 M sarin in ratteplasma bepaald met de Warburg techniek	38
4.5. Conclusies	40
HOOFDSTUK 5. De hydrolyse van ^{32}P -sarin, -soman en -DFP in plasma	41
5.1. Inleiding	41
5.2. Methoden	43
5.3. Verloop van de hydrolyse van ^{32}P -sarin in plasma en andere media	44
5.3.1. Hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in plasma	44
5.3.2. Invloed van p-hydroxymercuribenzoaat op de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in plasma	45
5.3.3. Niet-enzymatische hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in diverse media	45
5.3.4. Invloed van dialyseren op de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in plasma	46
5.3.5. Hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in verdund ratteplasma	48
5.3.6. Hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in ratte- plasma bij 0°	49
5.3.7. Hydrolyse van 0,01 en 1 mM ^{32}P -sarin in plasma	50
5.3.8. Invloed van remming van de sarinase-activi- teit op de hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma	51
5.4. Hydrolyse van ^{32}P -soman en -DFP in ratteplasma	54
5.5. Verloop van de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma, tevoren behandeld met niet-radio- actieve DFP	55
5.6. Bespreking van de resultaten	57
HOOFDSTUK 6. Onderzoek naar de stereospecificiteit van sarinase	66
6.1. Inleiding	66
6.2. Materialen en methoden	68
6.2.1. Acetylcholinesterase	68
6.2.2. Butyrylcholinesterase	69
6.2.3. Overige materialen	69
6.2.4. Bereiding verrijkte sarin	69

	Pag.
6.2.5. Bepaling sarin-gehalte in een oplossing van verrijkte sarin	70
6.2.6. Elektrometrische bepaling van de activiteit van acetylcholinesterase	70
6.2.7. Titrimetrische bepaling van de activiteit van butyrylcholinesterase	71
6.2.8. Extractie van overmaat remmer	71
6.3. Hydrolyse van 0,05 M sarin in ratteplasma, bestudeerd in de polarimeter	72
6.4. Experimenten met "verrijkte" sarin	73
6.4.1. Inleiding	73
6.4.2. Hydrolyse van verrijkte ^{32}P -sarin in ratteplasma	74
6.4.3. Onderzoek naar de mate van verrijking van sarin verkregen door incuberen van 1 mM ^{32}P -sarin met mense-, muize- en cavia-plasma	76
6.4.4. Remming van acetylcholinesterase door verrijkte sarin	78
6.4.5. Reactivering en veroudering van butyrylcholinesterase, na remming door verrijkte, resp. rac.sarin	81
6.4.6. Racemiseren van verrijkte sarin onder invloed van fluoride ionen	86
6.5. Bepaling van de optische draaiing van verrijkte sarin na concentreren	90
6.5.1. Methode van extractie en concentreren	92
6.5.2. Bereiding van een geconcentreerde oplossing van verrijkte sarin	94
6.5.3. Metingen in de polarimeter	95
6.5.4. Bestudering van de racemisatie onder invloed van ammonium fluoride in de polarimeter	96
6.6. Bespreking van de resultaten	98
SAMENVATTING EN CONCLUSIES	105
SUMMARY	113
LITERATUUR	118

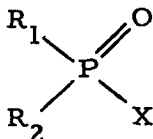
AFKORTINGEN

sarin	isopropyl methylfosfonofluoridaat
soman	pinacolyl methylfosfonofluoridaat
DFP	diisopropyl fosforofluoridaat
tabun	ethyl N,N-dimethylfosforamidocyanidaat
paraoxon	diethyl p-nitrofenyl fosfaat
hydroxysarin	monoisopropyl methylfosfonaat
hydroxysoman	monopinacolyl methylfosfonaat
MBL	Medisch Biologisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie TNO
CL	Chemisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie TNO
AcChE	acetylcholinesterase (waar-cholinesterase)
BuChE	butyrylcholinesterase (pseudo-cholinesterase)
pHMB	parahydroxymercuribenzoaat
MINA	(mono)isonitrosoaceton (1,2 propaandion-1-oxim)
KRB	Krebs-Ringer bicarbonaat
tris	tris(hydroxymethyl)aminomethaan
rac.	racemisch

INLEIDING

Sarin is een vloeistof die behoort tot een groep van organische fosforverbindingen welke, op grond van hun vermogen het enzym acetylcholinesterase (AcChE) irreversibel te remmen, worden aangeduid met de naam cholinesterase-remmers of anticholinesterasen. Het enzym acetylcholinesterase breekt de voor de prikkelgeleiding in het zenuwstelsel onontbeerlijke acetylcholine af tot de fysiologisch veel minder werkzame verbindingen choline en azijnzuur. Verstoring van de enzymactiviteit veroorzaakt ophoping van acetylcholine in het organisme, hetgeen aanleiding geeft tot een complex van typische vergiftigingsverschijnselen, dat spoedig de dood ten gevolge kan hebben. De remming door sarin en ook door de hiermee verwante verbindingen soman, tabun en DFP vindt reeds plaats in zeer lage concentraties van deze verbindingen. Mede op grond van hun grote giftigheid werd tijdens en na de tweede wereldoorlog het gebruik van deze stoffen als chemische strijdstoffen overwogen. Zij worden aangeduid als zenuwgassen. Ook van vele andere estersplitsende enzymen wordt de activiteit door de fosforhoudende anticholinesterasen geremd.

De structuur van de hier genoemde groep van organische fosforverbindingen kan worden voorgesteld door de algemene formule



waarin R_1 en R_2 alkyl-, alkoxy- of amino-groepen kunnen zijn

en X een groep is, die gemakkelijk als negatief ion kan worden afgesplitst. Bij de enzymremming wordt de P-X binding verbroken en hecht de fosforrest zich aan het enzym. De betekenis van R_1 , R_2 en X in de formules van de zenuwgassen is de volgende:

	R_1	R_2	X
sarin	$(CH_3)_2CHO$	CH_3	F
soman	$(CH_3)_3CC(CH_3)HO$	CH_3	F
DFP	$(CH_3)_2CHO$	$(CH_3)_2CHO$	F
tabun	C_2H_5O	$(CH_3)_2N$	CN
paraoxon	C_2H_5O	C_2H_5O	$p-NO_2C_6H_4O$

Het in dit overzicht tevens opgenomen paraoxon is het werkzame omzettingsprodukt van parathion, een aan de zenuwgassen verwant insecticide.

Reeds kort na het bekend worden van de cholinesterase remmende eigenschappen van deze organische fosforverbindingen vonden Mazur en Bodansky (1, 2) dat in dierlijke weefsels een enzym aanwezig is, dat de hydrolyse van DFP katalyseert. Dit werd DFP-ase genoemd. De verbreking van de P-F binding tijdens de hydrolyse van DFP gaat gepaard met het verlies van de toxische werking. In het genoemde enzym bezit het lichaam dus een natuurlijke afweermogelijkheid tegen intoxicatie met DFP. Een hoge activiteit van het DFP-splitssende enzym werd gevonden in nier en lever van mens en konijn, terwijl ook bloedplasma enzymactiviteit vertoonde. De zuivering van DFP-ase en enige eigenschappen, zoals remming en activering van gezuiverde preparaten, bereid uit varkensnieren, werden bestudeerd door Mounter c.s. (3-5), O'Neill c.s. (6, 7) en in het Medisch Biologisch Laboratorium RVO-TNO door Cohen en Warringa (8). De laatst genoemde auteurs toonden aan dat behalve DFP bovendien de zenuwgassen sarin, soman en tabun door het enzympreparaat worden gehydrolyseerd.

Hoskin, Trick en Adie (9-11) onderzochten de enzymatische hydrolyse van sarin en tabun in ratteplasma en Augustinsson c.s. (12-17) maakten een studie van de enzymatische hydrolyse van tabun, DFP, paraoxon en andere organofosfaten in ratte-, konijne- en menseplasma. Het voor de hydrolyse verantwoordelijke enzym uit menseplasma werd enigermate gezuiverd. Aldridge (18), Erdős en Boggs (19) en Becker en Barbaro (20) bestudeerden de enzymatische hydrolyse van paraoxon in serum van mens en konijn.

Omdat veelal met niet gezuiverde enzymen werd gewerkt en bij de wel gezuiverde preparaten een sterke, maar slecht reproduceerbare afhankelijkheid van milieufactoren bleek te bestaan, kon moeilijk worden nagegaan of alle genoemde organofosfaten door één en hetzelfde enzym gesplitst worden. Volgens Augustinsson en Heimbürger (13) zijn er aanwijzingen dat DFP en tabun in konijneplasma door hetzelfde enzym worden gesplitst, maar tabun en paraoxon door verschillende enzymen. Volgens Aldridge (18) wordt paraoxon in konijneplasma door een arylesterase gehydrolyseerd. Ook Augustinsson (21) meent dat arylesterase uit menseplasma organische fosforverbindingen, zoals DFP en tabun, splitst. Erdős en Boggs (19) toonden aan, dat in menseplasma bovendien een andere component dan de arylesterase verantwoordelijk is voor de enzymatische hydrolyse van paraoxon. De resultaten van Main (22) duiden op het bestaan van verschillende enzymen in schape-serum die de hydrolyse van organische fosforverbindingen katalyseren, gezien de grote verscheidenheid in activiteit ten opzichte van diverse substraten, afhankelijk van de enzymbron. Een relatief zuiver preparaat van sarinase uit runderplasma werd bereid door Adie (23), doch de eigenschappen hiervan zijn niet beschreven.

Op de vraag naar de specificiteit van de enzymen in kwestie wordt in dit proefschrift niet ingegaan. Het gebruik van de term "sarinase" betekent niet, dat hiermee een enzym wordt aangeduid dat uitsluitend sarin hydrolyseert.

Aangezien in sarin, soman en tabun een asymmetrisch fosforatoom voorkomt, vertonen deze verbindingen het verschijnsel van stereo-isomerie. Hoskin en Trick (9) en Augustinsson (16) konden aantonen dat in ratte- en konijneplasma de hydrolyse van tabun stereospecifiek verloopt: de resultaten

van hun experimenten wezen op een hydrolyse met ongelijke snelheid van de beide stereo-isomeren. Volgens Augustinsson (16) is de mate van de stereospecificiteit afhankelijk van de herkomst van het enzym; de zogenaamde tabunase uit varkensnieren zou in sterke mate stereospecifiek zijn; bij het enzym uit menseplasma werd stereospecificiteit echter niet waargenomen. Adie c.s. (10) onderzochten de hydrolyse van sarin in ratteplasma; aanwijzingen voor een stereospecifieke hydrolyse onder invloed van sarinase werden hierbij niet gevonden.

Door Cohen c.s. (24-26) werd tijdens een onderzoek naar de invloed van oximen op de hydrolyse van sarin in bloedplasma opgemerkt, dat de hydrolyse van 0,1 mM sarin in plasma afkomstig van rat, mens en muis een bifasisch verloop vertoonde. Anderhalve minuut na het toevoegen van de sarin aan het plasma was reeds ca. 50% gehydrolyseerd, terwijl de hydrolyse van de overige 50% veel langzamer verliep. In aanvullende experimenten konden wij waarschijnlijk maken dat een enzym, aanwezig in het plasma, verantwoordelijk was voor de snelle hydrolyse (27). Het lag voor de hand dit fenomeen te verklaren op basis van een stereospecifieke werking van in het plasma aanwezige sarinase. Daar dit in tegenspraak was met de bovenvermelde resultaten van Adie c.s. (10), moest worden nagegaan wat de oorzaak van de gesignaleerde discrepantie was. Deze auteurs hadden de hydrolyse van sarin in ratteplasma bepaald door meting van de zuurproduktie volgens de manometrische methode en bovendien met een hoge concentratie sarin (0,01 M) gewerkt. In onze experimenten was een honderdmaal lagere concentratie toegepast, omdat zij vergelijkbaar moest zijn met die, welke ook in vivo verwezenlijkt zou kunnen worden, terwijl het verloop van de hydrolyse door ons werd bestudeerd met een methode die was aangepast aan deze lage concentratie. Hierbij werd radioactieve sarin (^{32}P -sarin) gebruikt. Aangezien sarin aanzienlijk vluchtiger is dan zijn hydrolyseprodukt kon de fractie gehydrolyseerde sarin worden bepaald door na verschillende tijden in het reactiemengsel de fractie niet-vluchtige ^{32}P te meten.

Een nader onderzoek, dat mede het onderwerp van dit proefschrift vormt, bracht aan het licht dat het gebrek aan overeenstemming tussen onze resultaten en die van Adie c.s. niet werd veroorzaakt door het verschil in bepalingsmethoden, maar moest worden toegeschreven aan het verschil tussen de gebruikte sarin concentraties.

Uit proeven waarin AcChE werd geïncubeerd met een equimolaire hoeveelheid rac.sarin concludeerde Michel (28) dat de beide stereo-isomeren van sarin een groot verschil in reactiesnelheid ten opzichte van AcChE moeten vertonen en dus waarschijnlijk ook in giftigheid. Zoals hierboven werd vermeld suggereerden onze resultaten, dat de beide stereo-isomeren van sarin door sarinase met ongelijke snelheden worden gehydrolyseerd. Indien dit zo is, zou het dus mogelijk moeten zijn door middel van een enzymatische afbraak selectief één van de isomeren uit het reactiemengsel te verwijderen, de andere te isoleren en hiervan de eigenschappen te bestuderen. Dit aspect was interessant, daar het bij de aanvang van ons onderzoek nog niet was gelukt de stereo-isomeren van sarin apart te synthetiseren of op andere wijze te isoleren. Isolatie van één der stereo-isomeren van sarin zou de mogelijkheid openen om de conclusie van Michel te toetsen. Hierbij zou dan tevens antwoord worden verkregen op de vraag of door sarinase bij voorkeur de meest of de minst toxische isomeer onschadelijk wordt gemaakt.

In dit proefschrift wordt het onderzoek beschreven, waarin uiteindelijk kon worden aangetoond dat het bifasische verloop van de hydrolyse van lage concentraties sarin in plasma van rat, mens en muis inderdaad wordt veroorzaakt door de stereospecifieke werking van het enzym dat deze hydrolyse katalyseert.

Tijdens het onderzoek werd aangetoond dat fluoride ionen, die bij de hydrolyse van sarin vrijkomen, de omzetting van de stereo-isomeren in elkaar katalyseren. Hierdoor kon het falen van Adie c.s. in het aantonen van een stereospecifieke enzymatische hydrolyse van sarin worden verklaard en de schijnbare tegenstelling tussen de resultaten van hun werk en het hier beschrevene uit de weg worden geruimd.

Tenslotte gelukte het een oplossing te verkrijgen die voornamelijk de isomeer van sarin bevatte met de geringste hydrolysesnelheid, welke voldoende geconcentreerd was voor metingen in de polarimeter; deze oplossing bleek het polarisatievlak van gepolariseerd licht naar links te draaien.

HOOFDSTUK 1

OPZET VAN HET ONDERZOEK

Bij onze experimenten werd partij getrokken van het feit dat uit een mengsel van sarin en zijn hydrolyseprodukt (hydroxy-sarin; monoisopropyl methylfosfonaat) de eerstgenoemde verbinding door vriesdrogen kon worden verwijderd. Dit maakte het mogelijk tijdens incubatie van ^{32}P -sarin met bloedplasma de mate van hydrolyse te bepalen door de radioactiviteit van monsters, in snelle opeenvolging uit het incubatiemengsel genomen, na vriesdrogen te meten. Op deze wijze konden hydrolysecurven van sarin in lage concentraties in plasma van diverse diersoorten worden vervaardigd. Een beschrijving van de hierbij toegepaste techniek is in hoofdstuk 2 te vinden.

In hoofdstuk 3 wordt de vriesdroogtechniek aan een nader onderzoek onderworpen, teneinde na te gaan of de met deze methode verkregen resultaten inderdaad representatief zijn voor de hydrolyse van sarin. Aangezien sarin zich bindt aan diverse enzymen en ook een specifieke binding aan plasma-eiwitten a priori niet uitgesloten kon worden, moest worden vastgesteld of, en zo ja in welke mate, dit op de waarnemingen van invloed was. Hiertoe werd met behulp van dialyse en kolomchromatografie bepaald hoeveel sarin zich onder verschillende omstandigheden aan de in plasma aanwezige eiwitten bindt.

Met behulp van de hiervoor gewoonlijk gebruikte manometrische methode (2, 8) werd nagegaan hoe groot de sarinase activiteiten van de verschillende plasmasoorten waren. Gevonden werd dat in ratteplasma de activiteit de grootste was, gevolgd door resp. mense-, muize- en caviaplasma. Dit onderzoek wordt in hoofdstuk 4 beschreven. In dit hoofdstuk wordt tevens aangetoond dat de sarinase activiteit kan worden geremd door incubatie met parahydroxymercuribenzoaat (pHMB). Bovendien worden hier experimenten beschreven die de resultaten van Adie c. s. (10) bevestigen.

Hoofdstuk 5 is gewijd aan een nadere analyse van de hydrolyse van sarin, bepaald onder verschillende omstandigheden met behulp van de vriesdroogmethode. In tegenstelling tot de

hydrolysecurven die resulteerden uit incubatie van 0,1 mM ^{32}P -sarin met ratte-, muize- en menseplasma was de curve, gevonden bij caviaplasma, niet duidelijk bifasisch. De knik in de hydrolysecurve van sarin was het duidelijkst bij lage sarin concentraties en relatief hoge sarinase concentraties. Na incubatie van plasma met pHMB bleek de hydrolyse van sarin niet meer bifasisch te verlopen. De hydrolysecurve van sarin in ratteplasma behandeld met pHMB, viel ongeveer samen met die van de spontane hydrolyse van sarin in een met plasma vergelijkbare buffer.

Andere cholinesterase-remmers bleken slechts dan een bifasische hydrolysecurve te veroorzaken, indien zij een asymmetrisch fosforatoom bevatten: zo vertoonde ^{32}P -soman dit verschijnsel wel en ^{32}P -DFP niet.

Om de invloed van een eventuele binding van ^{32}P -sarin aan plasma-eiwitten onder de gegeven proefomstandigheden uit te sluiten, werden enige experimenten uitgevoerd, waarin de hydrolyse van sarin werd gemeten in ratteplasma dat tevoren met niet-radioactieve DFP was behandeld.

Uit alle in dit hoofdstuk beschreven experimenten bleek, dat slechts de sarinase verantwoordelijk kon worden gesteld voor de knik in de hydrolysecurve van sarin in plasma van rat, mens en muis. Het definitieve bewijs van een stereospecifieke enzymatische hydrolyse, namelijk het aantonen van een verandering van de optische rotatie van een sarin oplossing door meting in een polarimeter tijdens de enzymatische hydrolyse, kon echter nog niet worden geleverd.

Aangezien de concentraties, waarbij de bifasische hydrolyse werd waargenomen, te laag waren om een meetbare draaiing te mogen verwachten, terwijl bij hogere concentraties sarin geen draaiing, maar ook geen bifasisch verlopende hydrolyse werd waargenomen, werd getracht op andere wijze aan te tonen, dat tijdens de beginfase van de hydrolyse in hoofdzaak één stereo-isomeer wordt omgezet. Indien het vermoeden dat de sarinase werking stereospecifiek is juist was, zou de sarin die overblijft nadat 50% is gehydrolyseerd voornamelijk de stereo-isomeer zijn, die het langzaamst met sarinase reageert. Zoals in hoofdstuk 6 wordt beschreven bleek inderdaad de sarin, die op een dergelijke wijze was verkregen, slechts voor een gering percentage snel gehydrolyseerd te worden, indien opnieuw met ratteplasma werd geïncubeerd.

Volgens Michel (28) moet slechts één van beide stereo-isomeren van sarin een krachtige remmer van AcChE zijn, terwijl de andere isomeer betrekkelijk langzaam met dit enzym moet reageren. Berends concludeerde uit zijn experimenten (29, 30) dat de reactie van BuChE met sarin weinig of niet stereospecifiek is, maar dat de twee vormen van het geremde enzym (L en D met betrekking tot de fosfonyl substituent) verschillende eigenschappen bezitten ten aanzien van de snelheid van de reactie met reactivatoren en van de zogenaamde "veroudering". Teneinde na te gaan of met ratteplasma voorbehandelde sarin in hoofdzaak één der stereo-isomere vormen bevatte werd de reactie hiervan met AcChE onderzocht en vergeleken met die van rac.sarin; bovendien werden de eigenschappen bestudeerd van BuChE na remming met deze beide soorten sarin.

Op theoretische gronden werd verondersteld dat fluoride ionen racemisering van sarin zouden kunnen teweegbrengen. Om dit te onderzoeken werd een oplossing van sarin, geïsoleerd uit een mengsel van sarin en ratteplasma waarin meer dan 50% was gehydrolyseerd, met NaF gefocubeerd. Het bleek dat een kortstondige incubatie voldoende was om het materiaal de eigenschappen van rac.sarin te geven, die zowel bij de hydrolyse door ratteplasma als in de reactie met AcChE tot uiting kwamen. Uit deze proeven werd duidelijk dat de concentratie aan fluoride ionen, die vrijkomen bij de hydrolyse van 0,01 M sarin, zeer spoedig groot genoeg is om een zodanige snelle racemisering teweeg te brengen dat noch een bifasisch verloop van de hydrolyse, noch een meetbare optische rotatie kan optreden.

Wil men draaifng van het polarisatievlak van licht kunnen waarnemen, dan moet dus enerzijds de fluoride concentratie klein worden gehouden, terwijl anderzijds een grote concentratie sarin nodig is voor de meting van een significant effect. Aan deze beide voorwaarden kan niet tegelijk worden voldaan in één experiment. Derhalve werd de hydrolyse met ratteplasma tot 50% omzetting uitgevoerd bij betrekkelijk geringe concentratie sarin; daarna werd de hieruit geïsoleerde sarin opgenomen in chloroform en hierin geconcentreerd. De resulterende oplossing bleek het polarisatievlak naar links te draaien. Van dit materiaal kon ook de racemisering onder invloed van fluoride ionen in de polarimeter worden bestudeerd.

De experimenten met de oplossingen, die voornamelijk één van de isomeren van sarin bevatten, zijn beschreven in hoofdstuk 6.

HOOFDSTUK 2

MATERIALEN EN METHODEN

In dit hoofdstuk worden de algemeen gebruikte materialen en methoden vermeld. Specifieke methoden zijn bij de betreffende experimenten beschreven.

2.1. Materialen

2.1.1. ^{32}P - sarin en -soman werden gesynthetiseerd door de chemische sectie van Suffield Experimental Station, Ralston, Alberta, Canada volgens de methoden, beschreven door Reesor c.s. (31). De specifieke activiteit varieerde bij aankomst van 40-80 mCi/g. Met deze preparaten konden gedurende ongeveer twee maanden experimenten worden verricht.

Van de radioactieve vloeistoffen werden voorraad-oplossingen van 0,01 en 0,1 M $\pm$ 5% gemaakt in water- en peroxidevrije isopropanol. De zuiverheid, zoals bepaald met behulp van de dianisidine methode (32), bedroeg 95-96%. Na vriesdrogen was de hoeveelheid ^{32}P van het residu 3-6% van de oorspronkelijk aanwezige radioactiviteit. De voorraad-oplossingen waren, mits bewaard in een diepvrieskast, behoorlijk stabiel. Het gehalte nam in twee maanden met 2-3% af.

2.1.2. ^{32}P - DFP werd betrokken van "The Radiochemical Centre", Amersham, Engeland. Hiervan werd een 0,1 M oplossing gemaakt in water- en peroxidevrije isopropanol. De specifieke radioactiviteit bedroeg bij het begin van de experimenten 50 mCi/g. De zuiverheid, zoals bepaald volgens de dianisidine methode (32), was 95%. Bij vriesdrogen bleek 3% van de ^{32}P niet vluchtig te zijn.

* De betreffende bepalingen werden uitgevoerd in het Chemisch Laboratorium RVO-TNO.

2.1.3. Niet-radioactieve sarin, soman en DFP werden gesynthetiseerd in het Chemisch Laboratorium RVO-TNO.

2.1.4. Plasma was afkomstig van resp.: vrouwelijke witte caviae van 500 tot 700 g, ingeteelde vrouwelijke albino ratten van 200 tot 250 g en ingeteelde vrouwelijke muizen van 20 tot 25 g. De dieren werden onder lichte ether-narcose ontbloed uit de arteria carotis. Zonodig werd bloed van enige dieren samengevoegd. Mensebloed werd verkregen door punctie uit één der oppervlakkige armvenen. Het bloed werd opgevangen in gecalibreerde centrifugebuizen die per ca. 10 ml bloed 0,2 ml van een 5% heparine oplossing bevatten. Na voorzichtig mengen werden de erythrocyten verwijderd door centrifugeren bij ca. 1500 g gedurende 20 minuten. Het plasma van ratten was soms, dat van muizen meestal licht hemolytisch.

2.1.5. De volgende chemicaliën werden uit de handel betrokken: heparine, 5000 IE/ml: Vitrum, Stockholm; p-hydroxymercuribenzoaat: Sigma, St. Louis; albumine, gekristalliseerd uit runderserum: The Armour Laboratories, Kankakee, Illinois; tris (hydroxymethyl) aminomethaan: Light en Co., Colnbrook; veronaal-natrium, p.a.: British Drug Houses, Londen.

2.2. Methoden

2.2.1. De vriesdroogmethode ter bepaling van het percentage gehydrolyseerde sarin. Bij de methode ter meting van het percentage van de toegevoegde sarin dat na een bepaald tijdsverloop was gehydrolyseerd, werd gebruik gemaakt van de eigenschap dat sarin aanmerkelijk vluchtiger is dan zijn hydrolyseprodukt (kpt. sarin 147°). Met behulp van radioactieve sarin kon de hydrolyse hiervan in kleine concentraties in plasma en andere media worden bestudeerd. Vlak voor de uitvoering van elk experiment werd uit de voorraad-oplossing van ^{32}P -sarin, -soman of -DFP met gedemineraliseerd water een geschikte verdunning gemaakt. Oorspronkelijk werden de hydrolyse experimenten van sarin in plasma uitgevoerd in combinatie met experimenten waarin één minuut

na de sarin een oxim oplossing werd toegevoegd. Aan controle-experimenten werd dan in plaats van de oxim oplossing, water toegevoegd. In later uitgevoerde, op zichzelf staande experimenten, werd dit achterwege gelaten.

Aan 1,62 ml vers plasma werd bij 37° 0,18 ml van de ^{32}P -sarin verdunning toegevoegd; precies 1 minuut hierna werd 0,20 ml water toegevoegd, waarna met een 1 ml zuigerpipet met uitgetrokken punt monsters, groot 0,20 ml, genomen werden en gepipetteerd in ampullen, bevattende 0,20 ml 0,2 M acetaat buffer van pH 3,5 en ca. 10 mg niet-radioactieve sarin. In dit milieu vindt verdere hydrolyse van de ^{32}P -sarin niet meer plaats (zie 3.3). Het eerste monster werd ongeveer 1,5 minuut na toevoegen van de ^{32}P -sarin genomen. De inhoud van de ampullen werd vervolgens onder omzwenken ingevroren in alcohol-vast CO_2 en drooggevroren. Aan het vriesdroogapparaat, waarvan het hoofdvat werd gekoeld met vloeibare lucht, konden zeven ampullen tegelijk worden drooggevroren. Tussen vriesdroogvat en oliepomp was nog als beveiliging tegen eventueel ontwijken van sarin een uitvriesvat, gevuld met actieve kool en eveneens gekoeld met vloeibare lucht, geschakeld. De druk, die werd gemeten met een pirani vacuümmeter (Speedivac, model B4, Edwards, Engeland), varieerde van 0,02 tot 0,01 mm Hg. Alle sarin werd uit de ampullen verwijderd, tezamen met de overige vluchtige bestanddelen. Hierbij fungeerde de niet-radioactieve sarin als drager voor de ^{32}P -sarin. Vervolgens werd het residu in de ampullen opgelost in 0,4 ml 0,25% ammonia, waarna de inhoud met water werd overgespoeld in een gecalibreerde buis en aangevuld tot 10 ml. In een vloeistofbuis werd de radioactiviteit van de oplossingen bepaald. De radioactiviteit werd uitgedrukt als percentage van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid ^{32}P . Deze werd gemeten door de activiteit te tellen van een monster van een oplossing, die was verkregen door de ^{32}P -sarin oplossing, waarvan was uitgegaan, met 0,1 N NaOH te verdunnen - waarbij de verdunning gelijk was aan die, verkregen in de experimenten met plasma - en aan te vullen tot 10 ml; door de behandeling met loog wordt de sarin volledig gehydrolyseerd.

Bij latere experimenten was het nodig de hoeveelheid ^{32}P -sarin te bepalen in het sublimaat, dat bij het vriesdrogen was verkregen. Ook dit werd gedaan aan de hand van radioactiviteitsmetingen. De methode is in het betreffende hoofdstuk beschreven (6.2.5).

2.2.2. Radioactiviteitsmetingen. De radioactiviteit werd gemeten in een GM-vloeistof telbuis, type M6H van 20th Century Electronics, Engeland, aangesloten op een hoogspanningsvoeding met teller. De efficiëntie bedroeg ca. 7,5%. In de meeste gevallen werd geteld met een standaarddeviatie van $\leq 1\%$. De tellingen werden steeds minstens in duplo verricht.

2.2.3. Papierchromatografie. Voor het bepalen van de ontledingsprodukten van de ^{32}P -sarin en de eventueel aanwezige onzuiverheden werd gebruik gemaakt van papierchromatografie, gecombineerd met autoradiografie. Bij de chromatografie werd Whatman No. 1 papier gebruikt; het chromatogram werd ontwikkeld (stijgend) bij 25° gedurende ca. 16 uur met een mengsel, bestaande uit 90 delen butanol, 10,5 delen azijnzuur en 30 delen water.

De plaats van de ^{32}P -verbindingen werd bepaald aan de hand van de zwarting van een röntgenplaat (Kodak Medical X ray film, blue brand) die gedurende een geschikte tijd het chromatogram bedekt had en vervolgens ontwikkeld en gefixeerd was.

De fosfor-verbindingen werden zichtbaar gemaakt (na autoradiografie) door besproeien van het papier met Hanes' reagens (33), bestaande uit ammonium-molybdaat, perchloorzuur en zoutzuur, gevolgd door ongeveer 7 minuten verhitten op 90° . Voor een goede identificatie van de fosfor-verbindingen en tevens als drager van de gehydrolyseerde ^{32}P -sarin werd op het chromatogram mee opgezet 6 μl van een oplossing van synthetische hydroxysarin die ongeveer 1 mg P/ml bevatte.

2.2.4. Het bepalen van de ^{32}P onzuiverheden in de ^{32}P -sarin en -soman. Gewoonlijk werd van een monster van elke ontvangen hoeveelheid ^{32}P -sarin of -soman, na hydrolyse met 0,1 N NaOH en verdunnen met 0,01 M fosfaat, een papierchromatogram gemaakt en hiervan een autoradiogram, zoals is beschreven onder 2.2.3. Aan de hand van het autoradiogram werden de plaatsen op het papierchromatogram, waar ^{32}P aanwezig was, uitgeknipt, met 10 ml gedestilleerd water geschud en de radioactiviteit van de vloeistof gemeten. Volgens Berends (29) gaat hierbij de ^{32}P -verbinding volledig in oplossing. Hierbij werd meestal gevonden dat on-

geveer 95% van de totale radioactiviteit op de plaats van hydroxysarin of hydroxysoman aanwezig was. Meestal waren slechts verontreinigingen met lage Rf waarden aanwezig (zie hiervoor ook 3.2).

2.2.5. Bepaling van de sarinase-activiteit in plasma volgens de manometrische methode (Warburg)

De bepaling van de sarinase-activiteit in plasma werd uitgevoerd op de wijze die is beschreven door Mazur (2) en Cohen en Warringa (8); in ons geval werd in plaats van DFP, sarin als substraat gebruikt. In het zijvat van het Warburg vaatje werd 0,25 ml plasma gebracht, in het hoofdvat 2,75 ml sarin in KRB (Krebs-Ringer bicarbonaat volgens Krebs en Henseleit (34)). De eindconcentratie aan sarin was 0,01 M. In de controle-experimenten werd KRB in plaats van plasma gebruikt. De badtemperatuur was 37° en de atmosfeer bevatte 5% CO₂ en 95% N₂. Gedurende 5 minuten werd dit gasmengsel doorgeleid, waarna het systeem gesloten werd; na mengen werd elke vijfde minuut de CO₂ produktie gemeten. De sarin werd vlak voor het gebruik opgelost in KRB.

2.2.6. De remming van de sarinase-activiteit door p-hydroxymercuribenzoaat.

Het plasma werd gedurende 1,5 uur geïncubeerd met 1 mM pHMB. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een 0,01 M oplossing van pHMB in 0,02 M glycylglycine, die werd verkregen door 37,9 mg pHMB op te lossen in 10 ml 0,02 M glycylglycine buffer van pH 10, waarna de pH met 1 N HCl werd teruggebracht op 7,8 - 8,0.

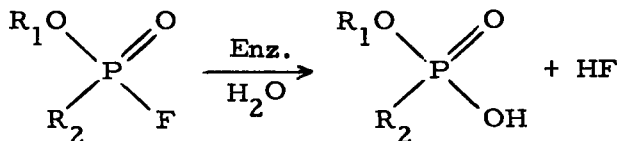
HOOFDSTUK 3

BRUIKBAARHEID VAN DE VRIESDROOGMETHODE TER METING VAN DE HYDROLYSE VAN ^{32}P -SARIN

3.1. Inleiding

Volgens Hoskin (35) worden bij de enzymatische hydrolyse van sarin in serum uitsluitend hydroxysarin en HF gevormd. Harris c.s. (36) vonden dat het enige omzettingsproduct van soman het hydroxysoman (monopinacolyl methylfosfonaat) was, terwijl Cohen en Warringa (37) na injectie van ^{32}P -DFP bij mensen, als enige ^{32}P -verbinding in de urine ^{32}P -diisopropyl fosfaat konden aantonen. Al deze onderzoeken maakten het waarschijnlijk dat bij de enzymatische hydrolyse slechts de P-F binding verbroken wordt, evenals bij de niet-enzymatische, alkalische hydrolyse en bij de reactie met oximen het geval is.

De reactie verloopt dus als volgt:



De vriesdroogmethode, beschreven in 2.2.1, blijkt zeer geschikt te zijn voor het onderzoek naar de hydrolyse van geringe concentraties ^{32}P -sarin in plasma. Door gebruik te maken van deze methode kon in vitro de situatie, die in vivo bestaat in het bloed van met sarin vergiftigde dieren, dichter benaderd worden dan met andere technieken mogelijk was.

Bij het ontwerpen van de vriesdroogmethode werd van de volgende veronderstellingen uitgegaan:

1. In de bestudeerde reactie wordt sarin omgezet in hydroxysarin.
2. Deze reactie komt ogenblikkelijk tot stilstand door de pH

daling (tot ca. pH = 4,5) die optreedt bij het toevoegen aan de acetaat buffer.

3. Bij de daaropvolgende vriesdroogprocedure wordt de ^{32}P -sarin volledig uit het monster verwijderd; dit proces wordt bevorderd door de aanwezigheid van de niet-radioactieve sarin die als drager fungeert.
4. Hydroxysarin is onder de gebruikte omstandigheden in het geheel niet vluchtig.
5. De radioactiviteit die achterblijft na het vriesdrogen, wordt geheel veroorzaakt door hydroxysarin; dit wil niet alleen zeggendat andere omzettingsprodukten niet worden gevormd, maar ook dat de hoeveelheid ^{32}P , die achterblijft ten gevolge van de hechting van sarin aan plasma bestanddelen, mag worden verwaarloosd.

Aangezien voor het onderzoek de vraag of aan deze veronderstellingen wordt voldaan van essentieel belang is, werd van een aantal van de bovenstaande factoren een aparte studie gemaakt, waaraan dit hoofdstuk is gewijd.

- Ad 1. Met behulp van papierchromatografie kon worden aangetoond dat bij de hydrolyse van ^{32}P -sarin in ratteplasma hydroxysarin het enige aantoonbare omzettingsprodukt is (zie sub 3.2).
- Ad 2. Verder werd gevonden dat door het toevoegen van de acetaat buffer de hydrolyse van sarin inderdaad gestopt wordt (zie sub 3.3).
- Ad 3 en 4. Uit radioactiviteitsmetingen bleek dat zuivere ^{32}P -sarin uit een waterige oplossing door vriesdrogen volledig werd verwijderd; werd de sarin voor het vriesdrogen volledig gehydrolyseerd, dan bleef alle radioactiviteit in het kolfje achter (op deze experimenten wordt in dit hoofdstuk niet nader ingegaan).
- Ad 5. Dat de hechting van sarin aan de plasma eiwitten niet in sterke mate optreedt was reeds geconcludeerd uit de waarneming dat het verwijderen van de eiwitten uit het plasma door precipiteren met zoutzuur-aceton na het vriesdrogen geen significante invloed had op de vorm van de hydrolysecurve (38). Zoals in dit hoofdstuk zal worden besproken (zie sub 3.4) bleek ook uit experimenten, waarin de eiwitten bij lage pH werden geadsorbeerd aan de zwakzure kationenwisselaar IRC 50, dat bij incuberen van plasma met 0,1 mM ^{32}P -sarin geen merkbare binding van ^{32}P plaatsvindt.

Bij latere onderzoeken, uitgevoerd in het MBL door Polak c.s. (39), werd evenwel gevonden dat bij ratten, die waren ingespoten met ^{32}P -sarin, een aanzienlijk deel van de in het plasma aanwezige ^{32}P aan eiwit gebonden was. Dit werd aangetoond door middel van gelfiltratie van plasma over Sephadex G50. In deze proeven was de concentratie aan sarin echter lager dan in de door ons uitgevoerde hydrolyse experimenten. Deze resultaten brachten ons ertoe de binding van sarin aan plasma-eiwitten nader te onderzoeken en daarbij ook de gelfiltratie te benutten. Bij het neerslaan van de eiwitten uit het plasma en bij het adsorberen aan IRC 50 moest de pH van het plasma worden verlaagd. Met Sephadex G50 kolommen kon de eventuele ^{32}P -binding bij de pH van het plasma bestudeerd worden. Inmiddels waren ook hydrolyse experimenten van ^{32}P -sarin in plasma uitgevoerd bij geringere sarin concentraties (0,01 mM). Aangezien bij deze kleinere concentraties een eventuele binding aan eiwitten een relatief groter effect zou hebben, werd een meer nauwkeurige bepaling van deze binding noodzakelijk. Deze bleek uitvoerbaar te zijn met de gelfiltratie.

Op deze wijze werd gevonden dat na incuberen van plasma met 0,1 mM ^{32}P -sarin toch een waarneembare binding van ^{32}P aan de eiwitten optreedt. Deze bedroeg echter slechts enkele procenten, zodat hij niet wezenlijk van invloed is op de vorm van de hydrolysecurven zoals die met de vriesdroogmethode verkregen worden. In ratteplasma dat was geïncubeerd met 0,01 mM ^{32}P -sarin, bedroeg de hoeveelheid aan eiwit gebonden ^{32}P echter een vrij hoog percentage van de toegevoegde ^{32}P . In beide gevallen werd evenwel een aanzienlijke vermindering van de hoeveelheid gebonden ^{32}P gevonden, indien de gelfiltratie werd uitgevoerd bij lagere pH dan die waarbij de incubatie plaatsvond. De resultaten duiden erop dat bij de interpretatie van de hydrolyse experimenten met 0,01 mM ^{32}P -sarin rekening dient te worden gehouden met het feit, dat een hoeveelheid hydroxysarin ontstaat doordat aliesterase, geremd door reactie met sarin bij pH 7,8, gereactiveerd wordt door het verlagen van de pH tot 5,5 (40).

Naast de experimenten met Sephadex G50 werd ook dia-

lyse gebruikt voor het onderzoek naar de binding van sarin aan eiwitten. Hierbij werd het incubatiemengsel van plasma en sarin gedurende 24 uur tegen een geschikte buffer gedialyseerd. De resultaten waren vergelijkbaar met die verkregen met Sephadex G50.

3.2. Het identificeren van de ontledingsproducten van sarin

Bij 1,35 ml ratteplasma werd 0,15 ml 1 mM ^{32}P -sarin gepipetteerd. Na 30 minuten werd aan 0,4 ml van het incubatiemengsel druppelsgewijs en onder schudden 2 ml zoutzuur-aceton (1 ml 1 N HCl + 39 ml aceton p.a.) toegevoegd. Het neerslag werd afgecentrifugeerd en het bovenstaande ingedampt, eerst door lucht over te blazen en daarna door onder bevriezing in een vacuüm exsiccator aan een oliepomp droog te dampen. Het residu werd in 0,1 ml water opgelost. Twintig μl van de resulterende oplossing werd aan papierchromatografie onderworpen. Tevens werd een geschikte hoeveelheid van een ^{32}P -sarin oplossing, die gehydrolyseerd was met NaOH en verdund met 0,01 M fosfaat, gechromatografeerd. De verdere uitvoering geschiedde zoals beschreven onder 2.2.3.

In beide experimenten viel de grootste ^{32}P activiteit samen met de toegevoegde niet-radioactieve hydroxysarin. De R_f waarde was 0,76. Dit is in overeenstemming met de door Berends (29) gevonden waarde (R_f 0,79). In beide preparaten werd een vlek met een geringe radioactiviteit aangetroffen met een R_f tussen 0,14 en 0,28; de hiervoor verantwoordelijke producten werden niet geïdentificeerd. Deze verbindingen zijn dus niet ontstaan door incuberen van plasma met sarin; zij waren waarschijnlijk reeds als verontreinigingen in de ^{32}P -sarin aanwezig. Radioactiviteit was niet aanwezig op de plaats van methylfosfonzuur (R_f 0,55).

3.3. De effectiviteit van de stopvloeistof

Om in de monsters van de incubatiemengsels van plasma met sarin (0,2 ml), waarin na nauwkeurig bekende incubatieperioden het percentage gehydrolyseerde sarin bepaald moet worden, de hydrolyse van sarin ogenblikkelijk te kunnen

stoppen, werden deze monsters gepipetteerd in een "stopvloeistof". Deze bestond uit 0,2 ml 0,2 M acetaat buffer van pH 3,5. Deze oplossing bevatte tevens ca. 10 mg niet-radioactieve sarin. De effectiviteit van de stopvloeistof werd op de volgende wijze aangetoond: aan ampullen, bevattende 1 ml 0,2 M acetaat buffer pH 3,5, ca. 0,05 ml sarin en 0,9 ml ratteplasma of water, werd toegevoegd 0,1 ml 1 mM ^{32}P -sarin. De inhoud van de ampullen werd of direct, of na 3 minuten staan bij kamertemperatuur, ingevroren, waarna het percentage gehydrolyseerde ^{32}P -sarin werd bepaald volgens 2.2.1. Tevens werd de mate van hydrolyse bepaald nadat 0,1 mM ^{32}P -sarin eerst gedurende 3 minuten was geïncubeerd met ratteplasma en daarna pas aan de stopvloeistof toegevoegd. De experimenten werden in triplo uitgevoerd. De resultaten zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1
De effectiviteit van de stopvloeistof

	Percentage niet-vluchtige ^{32}P na incuberen van ^{32}P -sarin in:		
	acetaat buffer	acetaat buffer + plasma	plasma
na 0 min	4,8	8,6	
	4,8	8,6	
	4,7	7,6	
na 3 min	5,3	8,8	57
	4,8	8,6	57
	4,7	7,6	59

^{32}P -sarin werd geïncubeerd met resp. acetaatbuffer (pH 3,5), acetaatbuffer + ratteplasma en ratteplasma. Na 0 en 3 min staan bij kamertemperatuur werd het percentage niet-vluchtige ^{32}P bepaald.

Hieruit blijkt dat de pH daling, die door het mengen met de stopvloeistof optreedt, inderdaad het beoogde effect heeft. Zowel de spontane hydrolyse, alsook de door plasma gekata-

lyseerde omzetting komen geheel tot stilstand (vergelijk de waarden na 0 resp. 3 minuten incuberen in de eerste en tweede kolom). Uit deze gegevens volgt dat de gebruikte ^{32}P -sarin reeds ongeveer 4,8% niet-vluchtig ^{32}P materiaal bevatte. In plasma + acetaat buffer wordt een 3-4% hogere waarde gevonden; dit verschil moet waarschijnlijk aan binding aan plasma bestanddelen worden toegeschreven (zie 3.4) en niet aan hydrolyse, aangezien het percentage bij verder incuberen niet toeneemt. De effectiviteit van de stopvloeistof treedt duidelijk aan het licht indien wij de waarden uit de tweede kolom vergelijken met die van de derde; deze geven het percentage niet-vluchtige ^{32}P weer, dat wordt gevonden wanneer ^{32}P -sarin op de normale wijze gedurende 3 minuten met plasma wordt geïncubeerd bij de pH van het plasma en daarna met de stopvloeistof wordt gemengd en drooggevroren. In een tweede serie monsters die op dezelfde wijze waren behandeld, werd na het toevoegen van de stopvloeistof eerst 3 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur en vervolgens ingevroren en drooggevroren. Hierna werd 56, resp. 57 en 59% niet-vluchtige ^{32}P gevonden; ook onder deze omstandigheden treedt dus verdere hydrolyse niet meer op.

3.4. Hechting van sarin aan plasma-eiwitten

3.4.1. Experimenten met behulp van IRC 50 kolommen. Een kolom gevuld met Amberlite IRC 50 in de H^+ vorm kan een scheiding geven tussen eiwitten enerzijds en sarin en hydroxysarin anderzijds, daar de eiwitten bij lage pH in de kolom geadsorbeerd worden. Wordt dan ook een mengsel van plasma, ^{32}P -sarin en ^{32}P -hydroxysarin, aangezuurd tot pH 4,5, op een dergelijke kolom gebracht en de kolom met zuur geëluëerd, dan zullen de eiwitten met de daaraan gebonden ^{32}P in de kolom achterblijven. Slechts de niet aan eiwit gebonden ^{32}P wordt uit de kolom geëluëerd. Uit het eluaat, dat een mengsel van sarin en hydroxysarin bevat, kan de sarin door vriesdrogen worden verwijderd; op grond van de radioactiviteit van het residu kan worden bepaald, hoeveel van de oorspronkelijk aanwezige sarin gehydrolyseerd is.

De IRC 50 kolom. De kolommen, gevormd door een maatpipet van 5 ml, onderin voorzien van een propje glaswol en gevuld met 3 tot 4 ml IRC 50 (H^+ vorm), werden geëquilibreerd met

0,05 M azijnzuur (pH 3,2). De kolommen waren van een koelmantel voorzien en werden met ijswater gekoeld. Aan 1,35 ml plasma werd bij 37° 0,15 ml 1 mM ^{32}P -sarin toegevoegd en na 2 minuten werd uit deze oplossing 0,2 ml gepipetteerd in een kolfje dat 0,2 ml 0,2 M acetaat buffer (pH 3,5) en twee druppels sarin (8 tot 10 mg) bevatte. De eind pH bedroeg circa 4,5. De inhoud van het kolfje werd kwantitatief op de kolom gebracht, waarbij nagespoeld werd met 0,05 M azijnzuur, waarmee ook werd geëluëerd. Van het eluaat werd na een voorloop van 1,5 ml de daaropvolgende 10 ml opgevangen in een ontvanger, gekoeld met ijs. Deze 10 ml bevatte de sarin en hydroxysarin, zoals uit controle experimenten was gebleken; voor- en naloop waren vrij van ^{32}P . Van de 10 ml fractie werd 3 ml met verdunde loog aangevuld tot 10 ml en in de vloeistoftebuis geteld (telling a). De resterende 7 ml werd verdeeld over 4 ampullen en drooggevroren. Na het vriesdrogen werd de inhoud van de ampullen met water en een weinig ammonia overgespoeld in één gecalibreerde reageerbuis en aangevuld tot 10 ml. Deze oplossing werd eveneens in de vloeistoftebuis geteld (telling b). Bovendien werd een monster van 0,2 ml van het oorspronkelijke incubatiemengsel van sarin en plasma met verdunde loog aangevuld tot 10 ml en in de vloeistoftebuis geteld (telling c). De tellingen werden gecorrigeerd voor het nuleffect. Telling c leverde de totaal op de kolom opgezette radioactiviteit, telling a, vermenigvuldigd met 10/3, de uit de kolom geëluëerde activiteit, terwijl telling b, vermenigvuldigd met 10/7, de uit de kolom geëluëerde niet-vluchtige radioactiviteit weergeeft. In tabel 2 zijn de totaal geëluëerde radioactiviteit (sarin + hydroxysarin) en de niet-vluchtige geëluëerde ^{32}P (hydroxysarin) weergegeven als percentages van de opgebrachte hoeveelheid ^{32}P -sarin. Het eluaat bevatte geen of praktisch geen eiwit, zoals bleek uit meting van de absorptie bij 280 m μ in een spectrofotometer (Beckman D.B.). Uit de gegevens van tabel 2 blijkt dat bij plasma van rat, mens, muis en cavia vrijwel alle ^{32}P uit de IRC 50 kolom geëluëerd wordt (1e kolom van tabel 2), dus dat een significante binding aan eiwitten niet optreedt. De percentages niet-vluchtige ^{32}P in het eluaat (2e kolom van tabel 2) bleken bovendien goed overeen te stemmen met de percentages gehydrolyseerde sarin, die bepaald waren met de normale vriesdroogmethode - dus zonder scheiding over IRC 50 - in monsters, die 2 minuten na toevoegen van de sarin aan het plasma (zie 5.3.1) genomen waren.

De resultaten van deze experimenten steunen de veronderstelling (3.1, sub 5), dat het percentage niet-vluchtige ^{32}P , gemeten na vriesdrogen, inderdaad overeenkomt met het percentage gehydrolyseerde sarin, afgezien van de niet-vluchtige verontreinigingen die al voor de hydrolyse aanwezig waren.

Tabel 2

Bepaling met behulp van IRC 50 kolommen, van de niet aan eiwit gebonden ^{32}P in plasma, geïncubeerd met 0,1 mM ^{32}P -sarin

Plasma van	^{32}P in eluaat	Niet-vluchtige ^{32}P in eluaat
	(%)	(%)
rat	102	55
rat	101	53
mens	100	46
mens	100	48
muis	98	55
muis	96	46
cavia	97	24
cavia	100	26

Het plasma werd gedurende 2 minuten geïncubeerd met 0,1 mM ^{32}P -sarin bij 37° ; na aanzuren tot pH 4,5 werden de eiwitten verwijderd met behulp van een IRC 50 kolom. In het eluaat werd het totale ^{32}P gehalte en de hoeveelheid niet vluchtige ^{32}P bepaald; deze werden uitgedrukt in percentage ten opzichte van de op de kolom gebrachte hoeveelheid ^{32}P .

3.4.2. Gelfiltratie over Sephadex G 50 en dialyse. De naam gelfiltratie is gegeven aan een methode waarbij stoffen op grond van de grootte van hun moleculen worden gescheiden over een dextran gel (Sephadex) met poriën van bepaalde afmetingen. Zo dringen verbindingen met een moleculair gewicht groter dan 10.000 in een kolom, gevuld met Sephadex G 50, de poriën van de gelsubstantie niet binnen en lopen bij de elutie snel door de kolom; naarmate de moleculen kleiner zijn dringen zij beter in de poriën en naarmate zij beter in de poriën dringen duurt het uitwasproces door de elutievloeistof langer. Verbindingen bestaande uit kleine moleculen wor-

den dus langzamer uit de kolom geëluëerd dan verbindingen met groot molecuair gewicht. Op deze manier kunnen, in een incubatiemengsel van sarin met plasma, sarin en hydroxysarin worden gescheiden van de eiwitten en de daaraan eventueel gebonden fosforverbindingen.

Aangezien bij de beschreven procedure de scheiding tussen het hoog- en laag-moleculaire materiaal slechts geleidelijk tot stand komt, verlengt de gelfiltratie de tijd, gedurende welke de eiwitten en sarin met elkaar in contact zijn, met een niet exact te bepalen periode. Teneinde de invloed van deze onzekere tijdsfactor te elimineren werd de gelfiltratie pas uitgevoerd, nadat het plasma geruime tijd (30 min) met sarin geïncubeerd was geweest (na een half uur is gemeenlijk 80-90% van de sarin gehydrolyseerd).

Door dialyse zijn sarin en hydroxysarin praktisch volledig uit een incubatiemengsel van plasma met ^{32}P -sarin te verwijderen (29). De aan eiwit gebonden ^{32}P blijft in de dialysehuls achter. Gelijktijdig met de Sephadex experimenten werd ook de scheiding door dialyse toegepast, om na te gaan of op beide manieren overeenkomstige resultaten verkregen werden.

De Sephadex kolommen werden vervaardigd in glazen buizen met een inwendige diameter van 14 mm, onderin voorzien van een glasfilter. De buizen werden op de gebruikelijke manier tot een hoogte van ca. 20 cm gevuld met Sephadex G 50-medium, dat tevoren was geëquilibreerd met 0,9% NaCl in 0,01 M tris-HCl buffer, pH 7,8. Deze oplossing werd ook voor de elutie gebruikt, die bij kamertemperatuur werd uitgevoerd. Het eluaat werd gefractioneerd opgevangen.

Het ^{32}P -gehalte van de fracties werd bepaald in een vloeistofteelbuis, zoals beschreven onder 2.2.2. Het eiwit-gehalte werd bepaald door meting van de absorptie bij 280 m μ . Bij de gebruikte kolommen werd een goede scheiding verkregen tussen laag-moleculaire en aan eiwit gebonden ^{32}P . In de dialyse-experimenten werd het incubatiemengsel van plasma met sarin gedialyseerd tegen 250 ml 0,9% NaCl in 0,01 M tris-HCl buffer van pH 7,8 bij 4° gedurende 24 uur. De buffer werd in deze periode 3 x verversst. Na afloop van de dialyse werd de huls voorzichtig opgeknijpt en de inhoud kwantitatief in een gecalibreerde buis overgespoeld, waarna het ^{32}P -gehalte in de vloeistofteelbuis werd bepaald.

De experimenten werden als volgt uitgevoerd: aan 2,7 ml plasma van rat, mens of cavia werd 0,3 ml 0,1 of 1,0 mM ^{32}P -sarin toegevoegd en het mengsel bij 37° geïncubeerd. Na een half uur werd 1 ml in een dialysehuls gebracht en gedialyseerd op de boven beschreven manier. Tevens werd 1 ml op een Sephadex kolom gebracht en geëluëerd. Bovendien werden monsters van het incubatiemengsel verdund met loog ten behoeve van de bepaling van de hoeveelheid ^{32}P die in de dialysehuls en op de kolom was gebracht. In tabel 3 zijn de resultaten van deze experimenten weergegeven.

Tabel 3

Aan eiwit gebonden ^{32}P , na incubatie gedurende 30 min van plasma met ^{32}P -sarin, bepaald met behulp van Sephadex en dialyse

Plasma van	0,01 mM ^{32}P -sarin		0,1 mM ^{32}P -sarin	
	Sephadex G 50	Dialyse	Sephadex G 50	Dialyse
	(%)	(%)	(%)	(%)
rat	30,5	27,0	5,5	4,8
	33,2	27,9	6,2	5,7
	33,8	29,0	6,5	6,2
	34,8	31,7		
	35,9	32,1		
	37,2	32,8		
	41,6	33,4		
Gem.	35,3	30,6	6,1	5,6
mens	5,7	6,2	6,7	6,8
	8,1	7,7	6,8	7,1
	8,4		8,4	7,2
	7,5		8,8	9,4
Gem.	7,4	7,0	7,7	7,6
cavia	11,3	10,9	4,5	4,4
	11,8	11,0	4,9	5,5
	10,9		5,3	5,6
	11,0		5,9	5,7
			6,5	7,4
Gem.	11,2	11,0	5,4	5,7

Het percentage ^{32}P werd berekend ten opzichte van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid ^{32}P in het incubatiemengsel; de experimenten werden uitgevoerd bij pH 7,8.

In de eerste plaats blijkt uit de tabel dat er een redelijke overeenstemming bestaat tussen de uitkomsten, verkregen met de gelfiltratie en die met de dialyse experimenten. De resultaten tonen verder aan dat bij incuberen met 0,1 mM ^{32}P -sarin in elk der drie plasma soorten ongeveer dezelfde hoeveelheid ^{32}P aan eiwit gebonden wordt; deze varieert van 5-8% van de totale hoeveelheid ^{32}P . Bij incuberen met 0,01 mM ^{32}P -sarin gedragen de plasma soorten zich echter sterk verschillend. Terwijl bij menseplasma het percentage gebonden ^{32}P ongeveer gelijk is aan dat, gevonden bij 0,1 mM en bij caviaplasm a ongeveer het dubbele ervan bedraagt, ligt het bij ratteplasma bijna een factor 6 hoger. De absolute hoeveelheid gebonden ^{32}P is in dit geval bij 0,01 mM sarin ruim de helft van die bij een tienmaal hogere concentratie, hetgeen niet duidt op een normale adsorptie. In 3.5 zullen wij hierop nader ingaan.

In de experimenten waarin na incubatie van plasma met 0,1 mM ^{32}P -sarin met behulp van IRC 50 kolommen de plasma eiwitten gescheiden werden van sarin en hydroxysarin kon geen merkbare binding van sarin aan de plasma eiwitten worden geconstateerd. Dit is niet in overeenstemming met de resultaten van de Sephadex- en dialyseproeven.

In de genoemde IRC 50 experimenten werd, evenals dat bij de bepaling van het percentage hydrolyse van sarin in plasma volgens de vriesdroogmethode werd gedaan, de pH verlaagd tot ca. 4,5. Aangezien het niet uitvoerbaar was met behulp van de IRC 50 kolommen de aan eiwit gebonden ^{32}P bij hogere pH te bepalen, werden de Sephadex experimenten herhaald met monsters, waarvan de pH na de incubatie van plasma met sarin was verlaagd. De eiwitten moesten hierbij uit de kolom worden geëluëerd, dus dienden zij in oplossing te blijven. Het bleek niet mogelijk de pH verder te verlagen dan tot ca. 5,5, omdat dan meestal een neerslag in het plasma ontstond. Voor de elutie van de Sephadex kolommen werd derhalve 0,9% NaCl in 0,01 M acetaat buffer pH 5,5 gebruikt.

De proeven verliepen als volgt: aan 2,7 ml ratteplasma werd toegevoegd 0,3 ml 0,1 of 1,0 mM ^{32}P -sarin. Na een half uur incuberen bij 37° werd 2 ml met ca. 0,08 ml 1 M acetaat buffer (pH 3,5) op pH 5,5 gebracht. Soms ontstond een lichte troebeling welke werd afgecentrifugeerd. Van deze oplossing werd 1 ml op de Sephadex kolom gebracht. Voor en na het aanzuren van het incubatiemengsel van plasma met sa-

rin werden monsters genomen en met loog verdund. Hierin werd de hoeveelheid ^{32}P gemeten waaruit de op de kolom gebrachte hoeveelheid ^{32}P berekend kon worden. Hierbij bleek, dat het afgecentrifugeerde neerslag, indien aanwezig, praktisch geen ^{32}P bevatte. De resultaten zijn weergegeven in tabel 4.

Tabel 4

Aan eiwit gebonden ^{32}P , na incubatie gedurende 30 min van plasma met ^{32}P -sarin en gevolgd door verlaging van de pH tot 5,5, bepaald met behulp van Sephadex kolommen

Plasma van	0,01 mM ^{32}P -sarin	0,1 mM ^{32}P -sarin
	(%)	(%)
rat	5,0	3,5
	4,0	3,9
	Gem. 4,5	3,7
mens	7,0	
	7,1	
	Gem. 7,1	
cavia	5,8	
	5,5	
	Gem. 5,7	

Het percentage ^{32}P werd berekend ten opzichte van de oorspronkelijk in het incubatiemengsel aanwezige hoeveelheid ^{32}P ; de gelfiltratie werd uitgevoerd bij pH 5,5.

Uit een vergelijking van deze gegevens met die van tabel 3 blijkt, dat in een aantal gevallen een gedeelte van de aan eiwit gebonden ^{32}P bij een betrekkelijk geringe pH verlaging, van 7,8 tot 5,5, weer van het eiwit losraakt. De discrepantie tussen de resultaten die werden verkregen met Sephadex- resp. IRC 50 kolommen moet dus waarschijnlijk worden toegeschreven aan dit effect.

3.5. Bespreking van de resultaten

In het begin van dit hoofdstuk hebben wij de criteria geformuleerd waaraan de vriesdroogmethode moest voldoen, wilde deze bruikbaar zijn voor de bestudering van de hydrolyse van sarin in plasma. De hier beschreven experimenten hebben aangetoond dat op bijna alle punten aan de gestelde voorwaarden geheel wordt voldaan. Gevonden werd dat bij de bestudeerde reactie inderdaad hydroxysarin ontstaat en dat de hydrolyse door het toevoegen van de zogenaamde stopvloeistof direct en volledig tot stilstand wordt gebracht. Het is verder duidelijk dat de hoeveelheid ^{32}P , die achterblijft na het vriesdrogen, voornamelijk hydroxysarin is en slechts voor een onbetekende fractie bestaat uit aan plasma bestanddelen gebonden of geadsorbeerde sarin (zie IRC 50 procedure (3.4.1) en effectiviteit stopvloeistof (3.3)).

De Sephadex- en dialyseproeven wijzen echter uit dat in sommige gevallen bij de pH waarbij de hydrolyse wordt uitgevoerd, een niet te verwaarlozen fractie ^{32}P aan eiwit gebonden wordt. De vraag is in welke vorm deze ^{32}P aanwezig is. Snel uitwisselbaar geadsorbeerd materiaal zou met de toegepaste technieken niet worden gevonden, dus blijven als mogelijkheden over, een vrij irreversibele adsorptie van sarin als zodanig of een reactie met eiwitten. In beide gevallen wordt een deel van de sarin aan de bestudeerde reactie onttrokken. Bij de experimenten met 0,1 mM sarin zal het effect hiervan zeer gering zijn. De percentages ^{32}P , gebonden na een half uur incuberen, zijn laag en in de bestudeerde reactie is hoofdzakelijk de beginfase van belang, waarin na 1 minuut al meer dan 50% van de sarin ontleed is. Uit hydrolyse experimenten met 0,01 mM sarin, beschreven onder 5.3.8, kan de conclusie worden getrokken dat de hoeveelheid gebonden ^{32}P in de eerste minuten zeer gering is.

Het is dus in hoofdzaak bij het analyseren van de - na de eerste minuten optredende - langzame hydrolyse van belang na te gaan in hoeverre de binding van ^{32}P aan eiwit de resultaten beïnvloed kan hebben. Bij menseplasma is dit niet erg relevant omdat de binding van ^{32}P aan eiwit ook na incubatie met 0,01 mM ^{32}P -sarin gering is; bij caviaplasma zal wellicht enige correctie nodig zijn. In het geval van hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma waarin werd gevonden dat na een half uur incuberen ca. 35% ^{32}P aan eiwit gebonden is

en dat door aanzuren deze binding weer grotendeels teniet wordt gedaan, is de situatie ondoorzichtig. Is het materiaal dat bij de pH daling vrijkomt, nog sarin, die bij het vriesdrogen ver-vluchtigt, dan hebben wij alleen met een verlaging van de ef-fectieve sarin concentratie te maken. Komt de ^{32}P echter in niet-vluchtige vorm, bijvoorbeeld als hydroxysarin vrij, dan wordt het als gehydrolyseerde sarin geregistreerd, die dan echter op een zeer gecompliceerde wijze is ontstaan en zeker niet via de reacties die wij willen volgen. Recente onderzoe-kingen (40) maken de tweede veronderstelling de meest waar-schijnlijke; ratteplasma bevat nl. een hoge molaire concentratie (ca. 3 μM) aan aliesterase, die door te reageren met sarin geremd wordt en daarbij een aanzienlijk deel van de ^{32}P bindt. Bij het aanzuren treedt een snelle reactivering op waarbij de ^{32}P als hydroxysarin wordt afgesplitst. Bij het onderzoek van de hydrolyse van 0,01 mM sarin in ratteplasma met behulp van de vriesdroogmethode zullen derhalve de resultaten een niet geheel juist beeld van de sarinasewerking geven.

In hoofdstuk 5 (5.5) wordt een experiment beschreven waarin de hydrolyse van ^{32}P -sarin in ratteplasma wordt be-studeerd en waarbij de mogelijkheid tot binding aan plasma-eiwitten sterk wordt verlaagd door het plasma tevoren met niet-radioactieve DFP te behandelen.

HOOFDSTUK 4

ACTIVITEIT EN REMBAARHEID VAN PLASMA-SARINASE

4.1. Inleiding

Aangezien wij meenden dat de snelle hydrolyse van ongeveer de helft van de sarin in plasma van rat, mens en muis, onder bepaalde omstandigheden waargenomen met behulp van de vriesdroogmethode, toegeschreven zou kunnen worden aan een stereospecifieke werking van het enzym sarinase, leek het wenselijk de sarinase activiteit van plasma nader te bestuderen. De hiervoor gewoonlijk gebruikte techniek werd toegepast, namelijk het meten van de hoeveelheid zuur die vrijkomt bij de hydrolyse van sarin volgens de manometrische methode (bij de splitsing van één molecuul sarin worden twee equivalenten zuur gevormd). De hoogste sarinase-activiteit werd gevonden in ratteplasma; hierop volgde resp. die in plasma van mens, muis en cavia.

Vervolgens werd nagegaan op welke wijze de sarinase activiteit min of meer specifiek geremd kan worden. Volgens verscheidene auteurs (2, 4, 8, 15) zijn enzymen die de hydrolyse van tabun en DFP katalyseren, gevoelig voor stoffen die met thiolgroepen reageren. Zo konden Cohen en Warringa (8) de DFP-ase uit de varkensnier remmen met p-chloromercuri-benzoëzuur. Wij onderzochten de werking van de verwante p-hydroxy verbinding. Deze stof bleek in een concentratie van 1 mM de sarinase-activiteit voor ca. 90% te remmen.

Naast de metingen van de initiële hydrolyse snelheid van sarin in plasma voor de bepaling van de sarinase-activiteit werd, eveneens met behulp van de Warburg methode, ook een onderzoek ingesteld naar het verdere verloop van deze hydrolyse. Bij deze experimenten, waarin 0,01 M sarin werd gebruikt, werden de resultaten van Adie c.s. (10), die niet duiden op enige stereospecificiteit en op soortgelijke wijze waren verkregen, bevestigd.

4.2. De sarinase-activiteit in plasma van verschillende species

De bepaling van de sarinase-activiteit in plasma werd uitgevoerd op de onder 2.2.5 beschreven manier. De activiteiten werden uitgedrukt in $\mu\text{l CO}_2$, geproduceerd in 20 minuten bij 37° , per ml plasma; de waarden werden gecorrigeerd voor de spontane hydrolyse. Deze is in het gebruikte medium aanzienlijk, namelijk ca. $100 \mu\text{l CO}_2/20$ minuten. Hierdoor is de nauwkeurigheid van de bepalingen niet al te groot. Tabel 5 geeft de resultaten weer van enige bepalingen in plasma van rat, mens, muis en cavia, waaruit blijkt dat van deze plasma-soorten ratteplasma de hoogste en caviaplama de geringste activiteit bezit.

Tabel 5
Sarinase-activiteit in plasma van diverse species

		$\mu\text{l CO}_2/20 \text{ min/ml plasma}$	
rat	(4) *	544 ± 24	(8) **
mens		219 (196-280)	(4)
muis	(12)	152 (122-182)	(2)
cavia	(2)	78 (44-112)	(4)

De waarden zijn gecorrigeerd voor de spontane hydrolyse. Vermeld zijn de gemiddelden; de tussen () geplaatste getallen geven de uiterste waarden aan.

* Aantal dieren waarvan het plasma werd samengevoegd.

** Aantal bepalingen; voor elke bepaling werd een ander plasma-(mengsel) gebruikt.

4.3. De remming van de sarinase-activiteit door pHMB

Het plasma werd gedurende 1,5 uur met pHMB geïncubeerd bij 37° , zoals is beschreven onder 2.2.6. Vervolgens werden met de Warburg techniek de sarinase-activiteiten bepaald zoals in 2.2.5 is aangegeven. De remming onder invloed van diverse concentraties pHMB is weergegeven in tabel 6.

Deze gegevens tonen aan dat in de gebruikte plasmasoorten een concentratie van 1 mM pHMB nodig is om de sarinase-activiteit voor ca. 90% te remmen. Door deze concentratie pHMB blijkt de pseudocholinesterase-activiteit en de aliesterase-activiteit nog niet merkbaar geremd te worden. Deze bepalingen werden ook in de Warburg uitgevoerd, waarbij als substraat voor de bepaling van de pseudocholinesterase-activiteit het benzoylcholine (concentratie 6 mM) en voor de aliesterase-activiteit het tributyrine (concentratie 14 mM) gebruikt werd.

pHMB veroorzaakt dus in een concentratie van 1 mM een specifieke remming van de sarinase-activiteit in plasma.

Tabel 6

De remming van de sarinase-activiteit door
p-hydroxymercuribenzoaat

pHMB conc. (mM)	% remming			
	rat	mens	muis	cavia
10	97	94	100	100
1	95	88	86	94
0,1	0	0	0	60

Het percentage remming is weergegeven als:

$$\frac{\text{oorspronkelijke activiteit} - \text{activiteit na remming}}{\text{oorspronkelijke activiteit}} \times 100$$

De activiteit werd bepaald nadat het plasma gedurende $1\frac{1}{2}$ uur was geïncubeerd met de aangegeven concentratie pHMB.

4.4. De hydrolyse van 0,01 M sarin in ratteplasma bepaald met de Warburg techniek

De hydrolyse van 0,01 M sarin in ratteplasma werd bestudeerd zoals beschreven onder 2.2.5, waarbij nu echter de hydrolyse over langere tijd werd gevolgd. De experimenten hadden plaats bij 25°.

Naast onbehandeld plasma werd ook plasma gebruikt dat tevoren 1,5 uur was geïncubeerd met 1 mM pHMB (2.2.6). Tevens werd de spontane hydrolyse gevolgd. Fig. 1 geeft de resultaten van een dergelijk experiment weer. Zoals hieruit blijkt vonden ook wij geen aanwijzingen voor een stereospecifieke hydrolyse van sarin onder deze omstandigheden (vergel. ref. 10). De figuur toont aan dat de spontane hydrolyse vrij

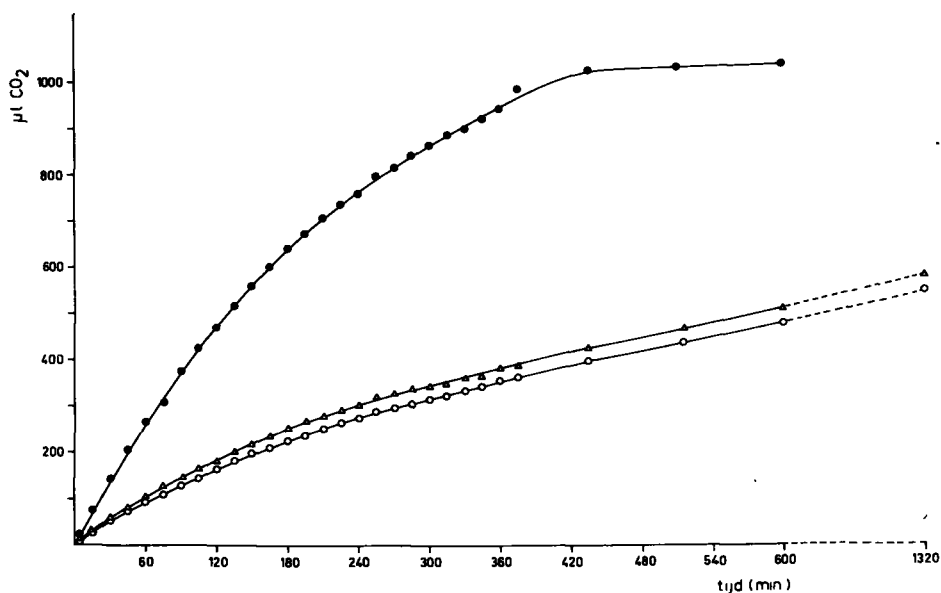


Fig. 1 De hydrolyse van 0,01 M sarin onder invloed van ratteplasma (Warburg methode).

- ratteplasma
- ▲—▲ met 1 mM pHMB behandeld ratteplasma
- KRB in plaats van plasma.

groot is in dit milieu, terwijl tevens blijkt dat de pHMB de sarinase praktisch volledig geremd heeft. De maximaal bereikbare hoeveelheid te produceren CO₂ is 1,33 ml; deze wordt niet bereikt, wellicht doordat een gedeelte van de sarin tijdens het doorleiden van de Warburg vaatjes met CO₂ verdampt en/of reeds voor de eerste meting gehydrolyseerd is.

4.5. Conclusies

Uit de resultaten van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1. Er bestaat een tamelijk groot verschil tussen de sarinase-activiteiten van ratte- en caviaplasma: de activiteit in ratteplasma is ongeveer zevenmaal zo groot als in caviaplasma.
2. 1 mM pHMB geeft in plasma ca. 90% remming van de sarinase-activiteit in 1,5 uur; bij deze concentratie worden de pseudocholinesterase- en aliesterase-activiteit nog niet geremd.
3. Tijdens incubatie van 0,01 M sarin met ratteplasma wordt geen aanwijzing gevonden voor een stereospecifieke hydrolyse (conform Adie c.s. (10)).
4. De Warburg methode is, door de grote spontane hydrolyse van sarin in het gebruikte milieu, minder geschikt voor nauwkeurige sarinase bepalingen.

HOOFDSTUK 5

DE HYDROLYSE VAN ^{32}P -SARIN, -SOMAN EN -DFP IN PLASMA

5.1. Inleiding

In het voorgaande werd aangetoond dat de vriesdroogmethode geschikt geacht mag worden voor het bestuderen van de hydrolyse van lage concentraties sarin in plasma. Ook werd een aantal resultaten vermeld die betrekking hebben op de enzymatische hydrolyse van grotere concentraties sarin in diverse plasmasoorten, die verkregen waren met een meer conventionele bepalingsmethode. Bij deze proeven werd geen enkele aanwijzing gevonden voor een verschil in hydrolysesnelheid van de beide stereo-isomeren. In dit hoofdstuk worden experimenten besproken waarin de hydrolyse, onder invloed van plasma-sarinase, van lage concentraties sarin, soman en DFP werd bestudeerd met behulp van de vriesdroogtechniek. Deze hebben geleid tot de conclusie dat dit enzym, in tegenstelling tot de suggestie die van de resultaten van de Warburg experimenten uitging, wel een duidelijke voorkeur heeft voor één van de stereo-isomeren van sarin.

In de eerste plaats werd het verloop van de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in enige plasmasoorten vergeleken; in plasma van rat, mens en muis verliep deze duidelijk in twee fasen, in caviaplasma vertoonde de hydrolysecurve geen duidelijke knik. Vervolgens werd bij dezelfde plasmasoorten onderzocht welke invloed het remmen van de sarinase-activiteit met pHMB had op de hydrolyse van sarin. In alle gevallen verloor deze het bifasische karakter; er had echter nog wel een vrij snelle hydrolyse plaats, die sterker was dan die van

sarin in water bij dezelfde pH. Aangezien aangenomen moest worden dat deze hydrolyse ook optreedt bij de reactie in onbehandeld plasma, werd getracht de oorzaak van deze spontane hydrolyse te achterhalen. Als mogelijke oorzaken van de sterke spontane hydrolyse, die ook in de Warburg experimenten was waargenomen (hoofdstuk 4), zagen wij een katalyse door zouten of door eiwitten, hetzij aspecifiek of specifiek door een tweede sarinase. Derhalve werd een studie gemaakt van de hydrolyse van sarin in enige buffers en werd de invloed van albumine nagegaan.

Hoewel dit eiwit enigszins stimulerend werkt, bleek dat de hoge hydrolysesnelheid voornamelijk toegeschreven moest worden aan de in het plasma aanwezige ionen. Getracht werd door het plasma tegen een geschikte buffer te dialyseren, de spontane hydrolyse tot redelijke proporties terug te brengen. Dit gelukte bij ratteplasma volledig. In menseplasma bleef echter de hydrolyse, ook na behandeling met pHMB, hoger dan in een vergelijkbare buffer.

Voor een kinetische analyse van de sarinase reacties was het wenselijk dat ook de hydrolyse van de eerste 50% van de sarin kon worden gevolgd. Hiervoor werd in een aantal experimenten verdund plasma gebruikt; in andere werd de reactie bij 0° onderzocht.

Vervolgens werd nagegaan hoe de hydrolyse verloopt, indien een tienmaal hogere, resp. lagere concentratie sarin werd gebruikt (in de vorige proeven was deze steeds 0,1 mM). Bij 0,01 mM werd ook bij caviaplasmā een knik in de hydrolysecurve gevonden, bij 1 mM was deze alleen bij ratteplasma nog duidelijk waarneembaar, bij plasma van mens en muis was het bifasische karakter nauwelijks meer aanwezig. Dit verschijnsel kon in verband worden gebracht met de sarinase-activiteit; bij hoger wordende sarin concentraties blijft het bifasische karakter des te langer aanwezig naarmate plasma met een hogere sarinase-activiteit wordt gebruikt.

Indien de opvatting dat de knik in de hydrolysecurven van sarin veroorzaakt wordt doordat de beide stereo-isomeren met verschillende snelheden door de sarinase worden gesplitst, juist is, zou men verwachten dat een dergelijke curve ook gevonden wordt, indien een verwante, eveneens asymmetrische organofosforverbinding als substraat wordt gebruikt, echter niet bij een symmetrische verbinding. Dit werd geverifieerd

door de hydrolyse in ratteplasma te onderzoeken van ^{32}P -soman, dat asymmetrisch is, en van de symmetrische verbinding ^{32}P -DFP. De resultaten waren volledig in overeenstemming met de hypothese.

In hoofdstuk 3 werd reeds aangetoond dat de binding van de ^{32}P aan de plasma-eiwitten het onderzoek van de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin niet of nauwelijks stoort. Dit werd bevestigd door de resultaten van experimenten waarin de vorming van deze binding zoveel mogelijk werd onderdrukt door het plasma tevoren te behandelen met niet-radioactieve DFP.

5.2. Methoden

De meting van de hydrolyse van ^{32}P -sarin, -soman en -DFP geschiedde volgens de vriesdroogmethode, zoals beschreven onder 2.2.1. De experimenten, beschreven in 5.3.1, -2, -3 en -7, maakten deel uit van proeven die niet in eerste instantie waren ontworpen om de sarinasewerking te bestuderen. Hierdoor was het nodig, dat 1 minuut na toevoegen van het zenuwgas aan het plasma, een hoeveelheid water (10% van het eindvolume) aan het incubatiemengsel werd toegevoegd. Het eerste monster werd ongeveer een halve minuut hierna genomen. In de in het kader van het sarinase onderzoek opgezette experimenten, beschreven in 5.3.4, -5, -6 en -8, en 5.4.5 en -6 werd het toevoegen van water achterwege gelaten en kon het eerste monster 1 minuut na toevoegen van het zenuwgas genomen worden.

De aldus gevonden percentages werden grafisch uitgezet tegen de tijd en de verkregen punten verbonden. Indien het eerste meetpunt duidelijk een knik in de curve leek aan te geven werd het steile deel van de curve als onderbroken lijn getekend omdat, door het hier ontbreken van meetpunten, de plaats van de knik niet exact bekend was.

Daar in feite op de ordinaat het percentage niet-vluchtige ^{32}P is uitgezet werden de curven niet door de oorsprong getrokken, indien enig niet-vluchtig materiaal (meestal 3-4%) in de ^{32}P -sarin oplossing, waarvan werd uitgegaan, aanwezig was.

Dit geldt voor alle curven die vervaardigd zijn met behulp van de resultaten van de vriesdroogmethode.

5.3. Verloop van de hydrolyse van ^{32}P -sarin in plasma en andere media

5.3.1. Hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in plasma. Het plasma, verkregen zoals beschreven onder 2.1.4, werd geïncubeerd met 0,1 mM ^{32}P -sarin en de hydrolyse hiervan werd gevolgd met behulp van de vriesdroogmethode. De resultaten zijn weergegeven in fig. 2 (bovenste curven) waarin het percentage gehydrolyseerde sarin is uitgezet tegen de tijd.

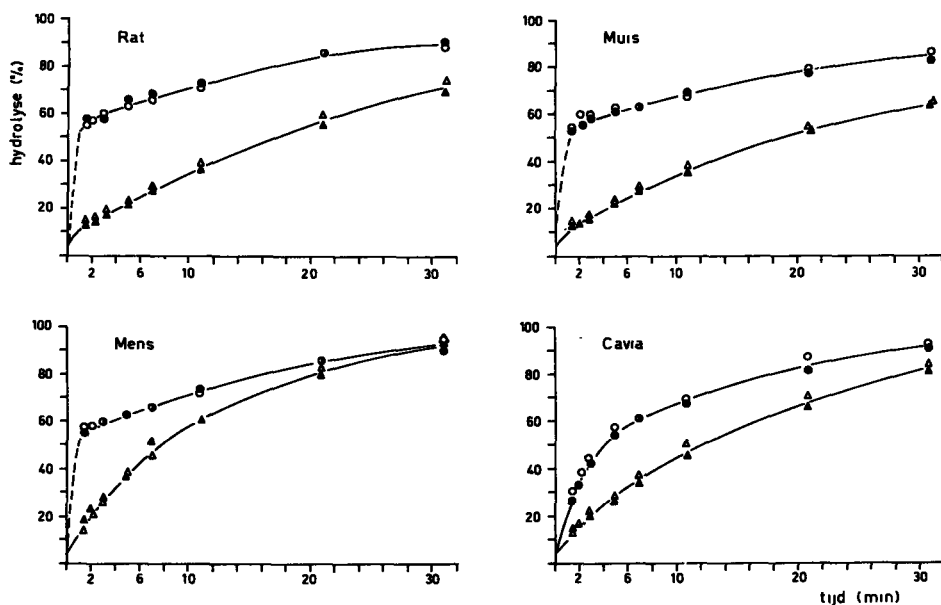


Fig. 2 De hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in plasma.
 ○ en ● onbehandeld plasma
 ▲ en ▲ met 1 mM pHMB behandeld plasma

In plasma van rat, mens en muis is op het moment dat het eerste monster kan worden genomen, dat is ca. 1,5 minuut na toevoegen van de sarin aan het plasma, reeds ongeveer 55% van de sarin omgezet, terwijl de verdere hydrolyse langzamer verloopt. In caviaplasm wordt een meer geleidelijk verlopende hydrolyse gevonden.

5.3.2. Invloed van p-hydroxymercuribenzoaat op de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in plasma.

De sarinase-activiteit werd geremd door het plasma te incuberen met 1 mM pHMB zoals beschreven in 2.2.6. Vervolgens werd ^{32}P -sarin toegevoegd en de hydrolyse hiervan bestudeerd. De resultaten zijn in fig. 2 samengevat. Hierin geven de onderste curven de hydrolyse weer van sarin in plasma dat is behandeld met pHMB.

Uit de resultaten van deze experimenten blijkt dat na remming van de sarinase-activiteit de hydrolyse van sarin niet meer in twee duidelijk in snelheid verschillende fasen verloopt. Toch is de hydrolyse van sarin niet volledig onderdrukt. Vooral in menseplasma is hij nog vrij groot. Hierin is na 30 minuten incuberen met sarin het percentage gehydrolyseerde sarin praktisch gelijk aan de waarde, bereikt in niet met pHMB behandeld plasma (ca. 90%); in het met pHMB behandelde ratteplasma wordt in deze tijd ca. 70% omzetting bereikt; in onbehandeld ratteplasma is dit percentage ca. 90.

5.3.3. Niet-enzymatische hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in diverse media.

Uit de hiervoor beschreven experimenten blijkt, dat in plasma waarin de sarinase-activiteit is geremd met pHMB, nog een vrij aanzienlijke hydrolyse van sarin plaatsvindt (fig. 2). Nagegaan werd aan welke factoren dit kan worden toegeschreven. Hiertoe werd de hydrolyse bestudeerd in diverse media, waarbij de onder 2.2.1 beschreven methodiek werd toegepast, met dien verstande, dat in plaats van plasma, water of buffer werd gebruikt.

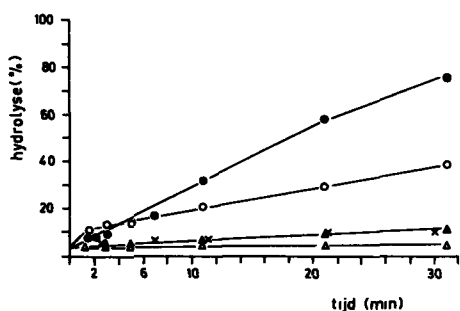


Fig. 3

De hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in diverse media.

- Δ—Δ water
- ▲—▲ 0,01 M veronaal buffer pH 7,8
- x—x 0,01 M tris buffer pH 7,8
- 6% albumine in 0,01 M veronaal buffer pH 7,8
- KRB.

De resultaten zijn weergegeven in fig. 3. Curve (Δ—Δ)

toont de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in water (pH ca. 6,5); deze blijkt zeer gering te zijn. In 0,01 M veronaal buffer, pH 7,8 (curve $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) wordt een snellere hydrolyse gevonden, die vergelijkbaar is met de hydrolyse in 0,01 M tris-HCl, pH 7,8 (curve x—x). De reactie verloopt onder deze omstandigheden echter nog aanzienlijk langzamer dan de hydrolyse in plasma dat is behandeld met pHMB (pH eveneens ongeveer 7,8).

Aangezien het in plasma aanwezige eiwit de spontane hydrolyse van sarin zou kunnen beïnvloeden, werd nagegaan wat het effect is op de hydrolyse van het toevoegen van enzymatisch niet-actief eiwit aan een buffer. Hiertoe werd de hydrolyse van sarin uitgevoerd in een 6% runderserum albumine oplossing in 0,01 M veronaal buffer, pH 7,8 (curve 0—0). Hierin vindt een duidelijk vergrote hydrolyse plaats. Behalve eiwitten bevat het plasma ook nog aanzienlijke concentraties van diverse ionen; de invloed hiervan werd nagegaan door de hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin in Krebs-Ringer bicarbonaat buffer (KRB) te bestuderen. De samenstelling van deze buffer is zodanig gekozen, dat de aard en de concentratie van de ionen zoveel mogelijk overeenkomen met die in plasma (34). In dit milieu werd een vrij grote spontane hydrolyse waargenomen, zoals blijkt uit curve (●—●), die vergeleken kan worden met de hydrolyse in ratteplasma, behandeld met pHMB (vergelijk fig. 2). In dit geval kunnen dus de ionen, aanwezig in het plasma, geheel verantwoordelijk gesteld worden voor de grootte van deze hydrolyse. In menseplasma is de hydrolyse, die overblijft nadat de sarinase is geremd, echter sterker dan die in KRB.

5.3.4. Invloed van dialyseren op de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in plasma. Uit de in de vorige paragraaf beschreven experimenten volgt, dat de in plasma aanwezige ionen de hydrolyse van sarin katalyseren. Dit is in overeenstemming met het werk van Cerfontain en Van Aken (41), die hebben gevonden, dat vooral door fosfaat en bicarbonaat ionen de hydrolyse van sarin sterk wordt gekatalyseerd.

Voor een nadere bestudering van de hydrolyse van sarin onder invloed van sarinase uit plasma was het wenselijk dat de spontane hydrolyse zoveel mogelijk kon worden onderdrukt.

Het was dus nodig deze ionen uit het plasma te verwijderen. Daarom werd nagegaan hoe de hydrolyse van sarin verloopt in plasma van rat en mens, dat gedialyseerd is tegen een 0,01 M tris buffer. Dit verloop werd vergeleken met de hydrolyse van sarin in het niet gedialyseerde plasma. Bovendien werd in beide gevallen de invloed op de hydrolyse nagegaan van het remmen van de sarinase-activiteit. De experimenten werden uitgevoerd met ratte- en menseplasma. Hiervan werden porties van 5-10 ml bij 4° gedurende 24 uur gedialyseerd tegen 250 ml van een oplossing van 0,9% NaCl in 0,01 M tris-HCl buffer, pH 7,8; de buffer werd in deze periode 3 x ververst. Waar dat gewenst was werd de sarinase-activiteit geremd door incuberen met 1 mM pHMB (volgens 2.2.6). De ^{32}P -sarin concentratie bedroeg 0,1 mM. In deze experimenten bleef het toevoegen van water aan het plasma achterwege.

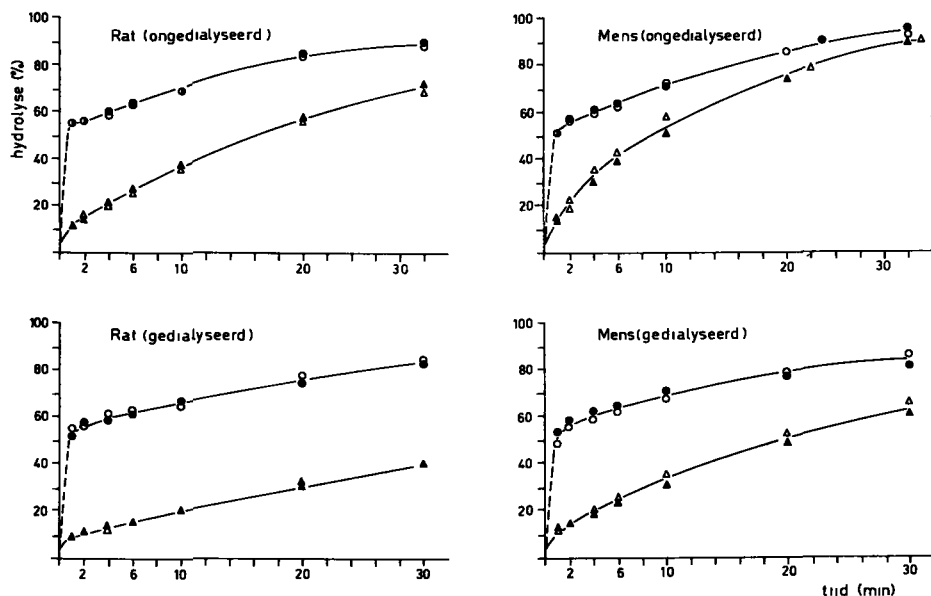


Fig. 4 De hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in al dan niet gedialyseerd plasma.

○ en ● onbehandeld plasma

△ en ▲ met 1 mM pHMB behandeld plasma.

In fig. 4 zijn de resultaten weergegeven. Deze bevestigen de in 5.3.1 beschreven experimenten en tonen aan dat ook 1 minuut na toevoegen van sarin aan plasma reeds 50% van de sarin is omgezet (in 5.3.1 werd het eerste monster pas

na 1,5 minuut genomen). De hydrolyse van sarin in gedialyseerd plasma verloopt, in de langzame fase, duidelijk langzamer dan in onbehandeld plasma. In het gedialyseerde ratteplasma, behandeld met pHMB, is de hydrolyse van sarin ongeveer even groot als in een 6% albumine oplossing in 0,01 M veronaal buffer pH 7,8 (zie fig. 3, curve 0-0); de sarinase-activiteit is dus inderdaad door de pHMB volledig geremd. Ook in menseplasma blijkt na dialyseren en behandelen met pHMB de snelle initiële hydrolyse van sarin verdwenen te zijn, maar de sarin wordt nog wel sneller gehydrolyseerd dan in ratteplasma dat op dezelfde wijze is behandeld, en dus ook sneller dan in de buffer met 6% albumine. Het is niet duidelijk waardoor deze extra hydrolyse wordt veroorzaakt; deze experimenten maken het echter onwaarschijnlijk dat bepaalde ionen in menseplasma hiervoor verantwoordelijk zijn.

5.3.5. Hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in verdund ratteplasma. De tot dusverre beschreven bepalingsmethode van de grootte van de hydrolyse van sarin in plasma van enkele diersoorten levert om technische redenen geen enkel meetpunt op in het snel stijgende eerste deel van de curve. Het is dus nog niet mogelijk een indruk te krijgen over de verhouding tussen de snelheden waarmee de beide componenten van sarin klaarlijkelijk worden omgezet.

Teneinde het verloop van de hydrolyse van de snelle component van sarin nader te kunnen bestuderen, werd de reactie uitgevoerd met verdund ratteplasma, dus bij een lagere enzymconcentratie. Hiertoe werd ratteplasma 5, resp. 10 x verdund met een 0,9% oplossing van NaCl in water. Het verloop van

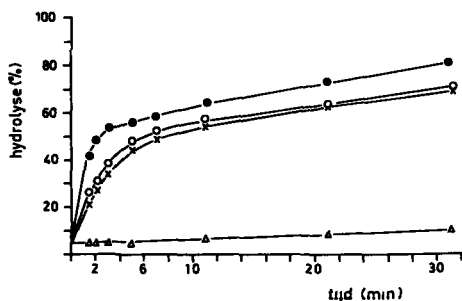


Fig. 5
De hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in verdund ratteplasma.

●—● plasma, 5x verdund
○—○ plasma, 10x verdund
x—x gedialyseerd plasma, 10x verdund
▲—▲ met 1 mM pHMB behandeld gedialyseerd plasma, 10x verdund.

In alle gevallen werd verdund met 0,9% NaCl.

de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in dit verdunde plasma werd gemeten zoals beschreven onder 5.3.4. Tevens werd een experiment met gedialyseerd plasma (zie hiervoor 5.3.4) uitgevoerd, dat 10 x verdund was met 0,9% NaCl. In een bijbehorend controle experiment werd het plasma tevoren met 1 mM pHMB behandeld (volgens 2.2.6). Fig. 5 geeft de resultaten van deze experimenten weer. Inderdaad blijkt het mogelijk op deze wijze enkele meetpunten te verkrijgen in het gebied tussen 0 en 50% hydrolyse. Voor de verdere analyse van deze gegevens wordt verwezen naar 5.6.

5.3.6. Hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma bij 0°. De tot nu toe vermelde experimenten werden alle uitgevoerd bij 37°. De enzymatische hydrolyse van sarin kan ook vertraagd worden door de temperatuur van het reactiemengsel te verlagen. Daarom werden proeven gedaan bij een temperatuur van 0°, waarvan de resultaten zijn neergelegd in fig. 6. Deze experimenten, met 0,1 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma, werden uitgevoerd als beschreven onder 5.3.4.

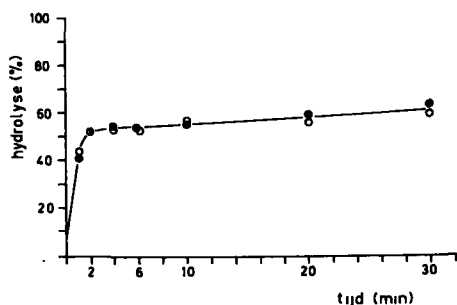


Fig. 6 De hydrolyse bij 0° van 0,1 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma.

De hydrolyse vindt, zoals verwacht mag worden, langzamer plaats dan in overeenkomstige experimenten, uitgevoerd bij 37°. Op deze wijze werd echter slechts één meetpunt verkregen in het steile stuk van de hydrolysecurve. De experimenten met verdund plasma (5.3.5) zijn dus beter geschikt om de verhouding van de snelheden, waarmee de beide componenten van sarin klaarblijkelijk worden omgezet, te bestuderen.

5.3.7. Hydrolyse van 0,01 en 1 mM ^{32}P -sarin in plasma. De tot nu toe beschreven experimenten, waarbij aanwijzingen voor een stereospecifieke hydrolyse van sarin in plasma werden gevonden, werden alle uitgevoerd met 0,1 mM sarin. Manometrische experimenten, uitgevoerd met 0,01 M sarin (4.4), wezen niet op een stereospecifieke hydrolyse van sarin; er werd namelijk geen bifasisch verlopende hydrolyse-curve gevonden. Getracht werd een aansluiting tussen de resultaten van deze twee experimenten te verkrijgen door de invloed van de sarin concentratie op de vorm van de hydrolyse-curve nader te onderzoeken; bij dit onderzoek werd de vries-droogmethode gebruikt. Hierbij werd, op de in 2.2.1 beschreven wijze, de hydrolyse bestudeerd van 0,01 resp. 1,0 mM ^{32}P -sarin in plasma van rat, mens, muis en cavia. De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in fig. 7 en 8.

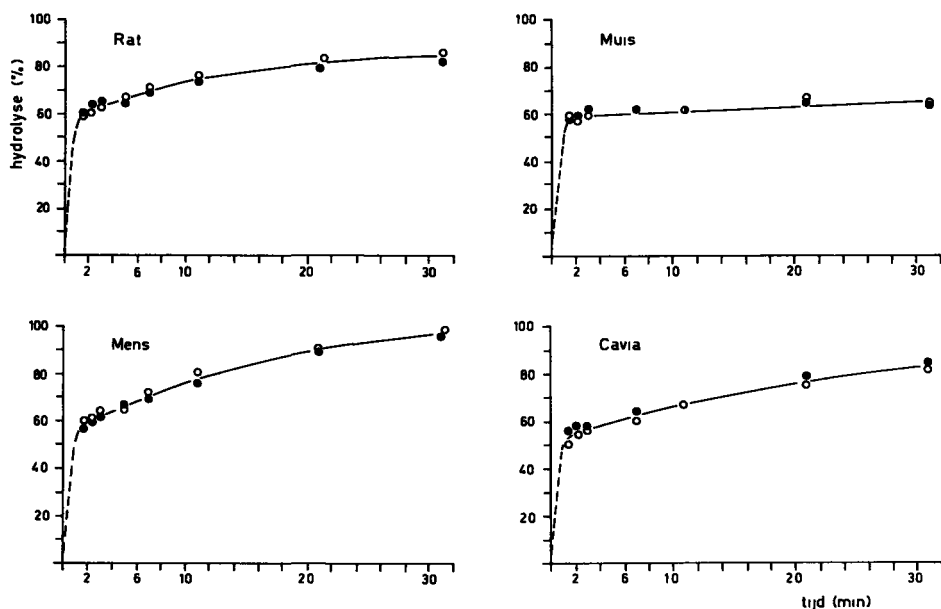


Fig. 7 De hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin in plasma.

Indien wij de in deze figuren voorkomende curven vergelijken met die, gevonden met 0,1 mM sarin (fig. 2), dan valt op, dat in de experimenten met 0,01 mM sarin (fig. 7)

alle curven een bifasisch verloop hebben. In de experimenten met 0,1 mM sarin (fig. 2) is dit alleen het geval waar plasma van rat, mens en muis gebruikt werd terwijl met 1 mM sarin (fig. 8) nog slechts bij ratteplasma een duidelijke knik

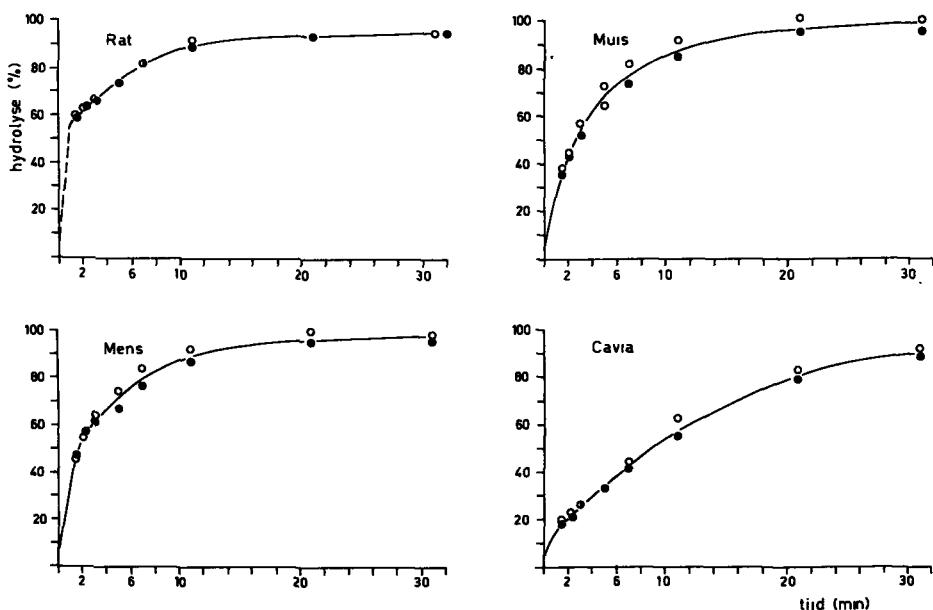


Fig. 8 De hydrolyse van 1 mM ^{32}P -sarin in plasma.

in de hydrolysecurve optreedt; in de andere plasmasoorten vindt een meer geleidelijk verlopende hydrolyse plaats. Er bestaat een duidelijke relatie tussen de sarinase-activiteiten van de plasmasoorten (tabel 5) en de sarin concentratie waarbij nog een knik in de hydrolysecurven optreedt: bij hogere sarin concentraties blijft de knik in de hydrolysecurve het langst gehandhaafd in de experimenten met plasma met het hoogste sarinase gehalte i.c. het ratteplasma.

5.3.8. Invloed van remming van de sarinase-activiteit op de hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma. Bij het gebruik van de vriesdroogmethode voor het bepalen van het percentage gehydrolyseerde sarin wordt ervan uitgegaan dat alle niet-vluchtige ^{32}P afkomstig is

van gehydrolyseerde ^{32}P -sarin en dat er geen noemenswaardige binding van ^{32}P aan plasma-bestanddelen optreedt. In hoofdstuk 3 werd aangetoond dat deze aanname gerechtvaardigd is, wanneer wordt gewerkt bij een concentratie van 0,1 mM ^{32}P -sarin. Met behulp van Sephadex-gelfiltratie werd echter gevonden dat in ratteplasma, dat geïncubeerd wordt met 0,01 mM ^{32}P -sarin, na ca. een half uur 35% van de totale radioactiviteit gebonden is aan eiwitten (3.4, tabel 3). Dit percentage mag zeker niet verwaarloosd worden. Ook in caviaplasma werd een, weliswaar geringere, maar toch vrij aanzienlijke binding van ^{32}P aan eiwitten geconstateerd (11%), indien 30 minuten met 0,01 mM ^{32}P -sarin werd geïncubeerd; bij menseplasma bleef dit verschijnsel binnen redelijke grenzen (7%). De hydrolysecurven van 0,01 mM sarin in plasma, zoals weergegeven in fig. 7, geven dus niet steeds een juist beeld van de hydrolyse van sarin onder de heersende omstandigheden en zouden dus gecorrigeerd moeten worden voor de aan eiwit gebonden ^{32}P . Hiervoor zou het nodig zijn het verloop van de binding tijdens de incubatie te kennen. De meting hiervan is echter niet eenvoudig, aangezien hiervoor een methode beschikbaar moet zijn, waarmee men vrijwel momentaan de vrije en de gebonden ^{32}P van elkaar kan scheiden. De methoden die wij beproefd hebben, te weten neerslaan van de eiwitten met zoutzuur-aceton en scheiden over IRC 50, brengen met zich mee dat het plasma moet worden aangezuurd; hierbij wordt echter een groot gedeelte van de gebonden ^{32}P weer afgesplitst. Bij gebruik van Sephadex en bij dialyseren worden de eiwitten en het laagmoleculaire materiaal geleidelijk van elkaar gescheiden en blijven, althans voor een deel, nog geruime tijd met elkaar in contact. Al deze methoden zijn dus niet geschikt voor het onderzoek van de ^{32}P -binding in de eerste fase van de incubatie.

Wij hebben daarom getracht op een andere manier een indruk te krijgen van de mate waarin de hydrolysecurven van 0,01 mM sarin gestoord worden door de binding aan plasma bestanddelen, namelijk door deze hydrolysecurven te vergelijken met die, welke verkregen worden indien 0,01 mM sarin wordt geïncubeerd met plasma waarvan de sarinase-activiteit is geremd met pHMB. Aangezien gevonden werd dat de grootste binding aan eiwit in ratteplasma plaatsvindt, werd het experiment met dit plasma uitgevoerd.

Van een hoeveelheid ratteplasma werd de ene helft geïncubeerd met 1 mM pHMB teneinde de sarinase-activiteit vol-

ledig te remmen (zie 2.2.6) en de andere helft werd op gelijke wijze behandeld, alleen werd pHMB uit de gebruikte glycyglycine buffer weggelaten. Vervolgens werden beide mengsels geïncubeerd met 0,01 mM ^{32}P -sarin en werd de hydrolyse bestudeerd volgens 5.3.4. De resultaten zijn weergegeven in fig. 9.

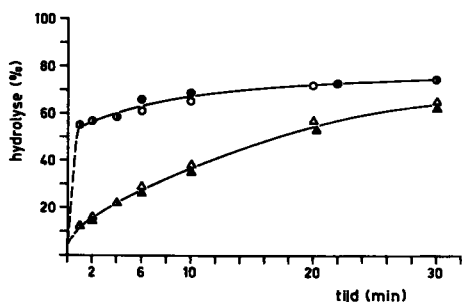


Fig. 9
De hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin in met 1mM pHMB behandeld ratteplasma.

△ en △ met pHMB behandeld plasma
○ en • plasma zonder pHMB.

Ook bij deze concentratie sarin heeft de remming van de sarinase een duidelijk effect op de vorm van de hydrolysecurve, die zich uit in het achterwege blijven van het steile deel. Van meer belang in verband met het zo juist besprokene zijn echter de gegevens betreffende de hoeveelheid gebonden ^{32}P die uit de onderste curve van fig. 9 kunnen worden afgeleid. Door extrapolatie van de curve kan uit de grafiek worden geconcludeerd dat op tijdstip 0 ca. 10% van de toegevoegde ^{32}P in niet-vluchtige vorm aanwezig was. Aangezien de gebruikte sarin reeds 4% niet-vluchtige ^{32}P bestanddelen bevatte, suggereert dit een zeer snelle binding van 5-6% van de ^{32}P aan eiwit. Deze wordt dan gevolgd door een geleidelijke toename van dit percentage tot 35 na 30 minuten (tabel 3). In een hier niet vermeld experiment waarin gebruik werd gemaakt van Sephadex werd gevonden dat pHMB de adsorptie en binding van ^{32}P -sarin niet beïnvloedt (de meeste ^{32}P wordt gebonden aan aliesterase, die niet gevoelig is voor pHMB).

De conclusie lijkt dus gewettigd dat de hydrolysecurven van 0,01 mM sarin in plasma weliswaar een correctie dienen te ondergaan, doch dat deze correctie in de beginfase betrekkelijk gering is en in ieder geval het bifasische karakter onaangetast laat. Ook bij deze concentratie is het dus de sarinase die verantwoordelijk moet worden geacht voor de snelle hydrolyse van een groot deel van de aanwezige sarin.

5.4. Hydrolyse van ^{32}P -soman en -DFP in ratteplasma

Indien de veronderstelling juist is dat de snelle hydrolyse van ca. 50% van de sarin in plasma berust op de specifieke voorkeur van sarinase voor één van de twee stereo-isomeren, zou men een analoog verloop van de hydrolyse verwachten indien plasma wordt geïncubeerd met soman; deze verbinding is te beschouwen als een homoloog van sarin en bezit eveneens een asymmetrisch P-atoom. Daarentegen zou de hydrolyse van DFP niet het bifasische verloop mogen vertonen, omdat deze verbinding geen asymmetrisch P-atoom bevat. Deze redenering berust op de veronderstelling dat deze stoffen door hetzelfde enzym worden gesplitst als sarin. Zoals in hoofdstuk 1 is aangegeven, bestaan hiervoor goede gronden.

In onze experimenten werd gebruik gemaakt van ^{32}P -soman en ^{32}P -DFP. De verbindingen bleken voldoende vluchtig te zijn om door middel van vriesdrogen uit het incubatiemengsel verwijderd te kunnen worden (kpt. soman ca. 190° , DFP 183°); de hydrolyseprodukten bleken niet vluchtig te zijn. De proeven konden derhalve geheel volgens de in 2.2.1 beschreven methode worden uitgevoerd, met dien verstande dat nu de stopvloeistof niet-radioactieve soman of DFP bevatte. Soman werd uitsluitend in een concentratie van 0,1 mM geïncubeerd met plasma, DFP werd in concentraties van 0,1 en 0,01 mM gebruikt. In alle gevallen werd de hydrolyse in ratteplasma onderzocht.

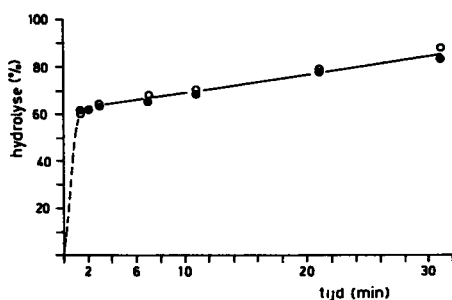


Fig. 10 De hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -soman in ratteplasma.

De resultaten zijn samengevat in fig. 10 en 11. Hieruit blijkt dat de hydrolyse van 0,1 mM soman in ratteplasma ge-

heel analoog verloopt aan die van sarin. Er treedt ook hier een bifasisch verloop op. Bij de hydrolyse van 0,1 mM DFP in ratteplasma vertoont de hydrolysecurve geen knik. Duidelijker is dit nog te zien in de experimenten met 0,01 mM DFP. Deze resultaten geven dus een verdere steun voor de theorie dat de knik in de hydrolysecurve berust op stereospecificiteit van sarinase.

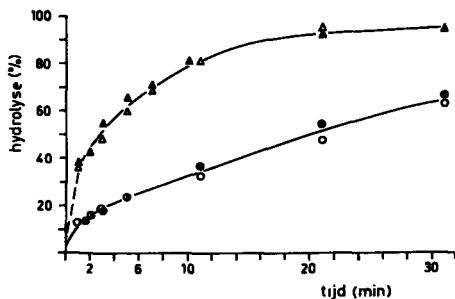


Fig.11 De hydrolyse van 0,01 en 0,1 mM ^{32}P -DFP in ratteplasma.

Δ en ▲ 0,01 mM DFP

○ en ● 0,1 mM DFP.

5.5. Verloop van de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in ratteplasma, tevoren behandeld met niet-radioactieve DFP

Uit de onder 3.4 genoemde experimenten blijkt dat bij incubatie van plasma met 0,1 mM ^{32}P -sarin een hoeveelheid ^{32}P aan eiwitten wordt gebonden die echter betrekkelijk gering is, zodat op grond hiervan geen verkeerde gevolgtrekkingen uit de proefresultaten gemaakt kunnen worden. Dit kon worden bevestigd in experimenten waarin het vermogen van plasma-eiwitten om ^{32}P -sarin te binden werd onderdrukt, door het plasma tevoren met niet-radioactieve DFP te behandelen. Uit hier niet vermelde experimenten bleek dat DFP zich in dezelfde mate aan plasma-eiwitten bindt als sarin; aangenomen werd dat het zich aan dezelfde eiwitten bindt.

Om de blokkade van deze eiwitten te bewerkstelligen werd 2,7 ml ratteplasma gedurende 1 uur geïncubeerd met 0,3 ml 1 mM DFP bij 37°. Er mag worden aangenomen dat in deze

periode de binding van DFP aan eiwitten zijn beslag heeft gekregen. Uit proeven, beschreven in 5.4, blijkt dat na 1 uur incuberen vrijwel geen onveranderde DFP meer over is, zodat voor interferentie van niet omgezet DFP met de reactie tussen sarinase en sarin niet gevreesd behoefde te worden. Vervolgens werd aan 1,62 ml van dit incubatiemengsel 0,18 ml 1 mM ^{32}P -sarin toegevoegd en de hydrolyse hiervan op de in 2.2.1 beschreven manier gevolgd. In een controle experiment werd 2,7 ml plasma geïncubeerd met 0,3 ml water en overigens op identieke wijze behandeld.

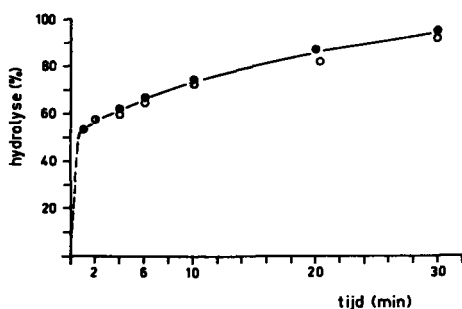


Fig. 12 De hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in met 0,1 mM niet-radioactief DFP behandeld ratteplasma.

- met DFP behandeld plasma
- plasma zonder DFP

Fig. 12 geeft de resultaten van deze experimenten weer. Indien een significante hoeveelheid sarin aan eiwit gebonden zou worden, zouden de hydrolysecurven van het onbehandelde plasma op een hoger niveau moeten liggen dan die van het met DFP behandelde plasma. Dit blijkt niet het geval te zijn. Zelfs loopt in dit en andere hier niet vermelde experimenten de omzetting van sarin in met DFP behandeld plasma steeds iets sneller dan in onbehandeld plasma. Ook de resultaten van de hier beschreven experimenten wijzen uit dat binding van ^{32}P aan eiwit tijdens de incubatie van ratteplasma met 0,1 mM

^{32}P -sarin niet in zo sterke mate optreedt, dat hierdoor een schijnbare toename van de bij de hydrolyse vrijkomende ^{32}P -hydroxysarin wordt teweeggebracht die het eindresultaat merkbaar beïnvloedt.

5.6. Bespreking van de resultaten

De in dit hoofdstuk behandelde resultaten zijn voor een groot gedeelte afkomstig van controle experimenten, behorende bij een ander onderzoek (24-26, 28). Toen duidelijk werd dat de hydrolyse van sarin in plasma een bijzonder verloop had, werden deze gegevens verzameld en aangevuld in een aantal gerichte experimenten waarin dit verschijnsel nader werd onderzocht. De gecombineerde resultaten laten er geen twijfel aan bestaan dat de snelle hydrolyse van ongeveer de helft van de sarin in de onderzochte plasmasoorten moet worden toegeschreven aan de werking van sarinase. Het voornaamste argument hiervoor is het feit dat pHMB, in een concentratie die de sarinase-activiteit volledig remt, deze snelle omzetting geheel onderdrukt en de hydrolyse, in gedialyseerd plasma, terugbrengt tot het niveau van de ontleding in een vergelijkbare albumine oplossing in buffer (fig. 3 en 4). Een tweede aanwijzing is het duidelijke verband tussen de mate waarin het verschijnsel zich voordoet en de activiteit van de aanwezige sarinase van de verschillende plasmasoorten.

De mogelijkheid dat onze waarnemingen voortvloeien uit onvolkomenheden in de gebruikte methodiek wordt uitgesloten door de resultaten van de verschillende controle experimenten. In de experimenten waarin de concentratie van de sarin 0,1 mM is, blijkt de omzetting in plasma van sarin in niet-vluchtige produkten voor meer dan 90% door hydrolyse te worden veroorzaakt; in experimenten waarin de concentratie van de sarin 0,01 mM is, treedt weliswaar een niet steeds verwaarloosbare binding aan eiwit op, maar deze binding blijkt in de eerste minuten nog niet zo groot te zijn dat dit een verklaring kan geven voor de snelle omzetting van ca. 50% van de sarin.

Indien wij trachten het verloop van de hydrolyse nader te analyseren door in de diverse experimenten de logaritme van het percentage niet-gehydrolyseerde sarin (in feite 100 - % niet-vluchtige ^{32}P) uit te zetten tegen de duur van de incubatie, dan vinden wij in de meeste gevallen een lineaire af-

name, hetgeen wijst op een reactie van de eerste orde wat sarin betreft. Enige voorbeelden hiervan zijn gegeven in fig. 13. Uit de hellingen van de rechten die zo goed mogelijk aan de experimentele punten zijn aangepast, kunnen de snelheidsconstanten (k) van de betreffende reacties worden berekend. Dit is voor een aantal experimenten gedaan; de gegevens zijn samengevat in tabel 7.

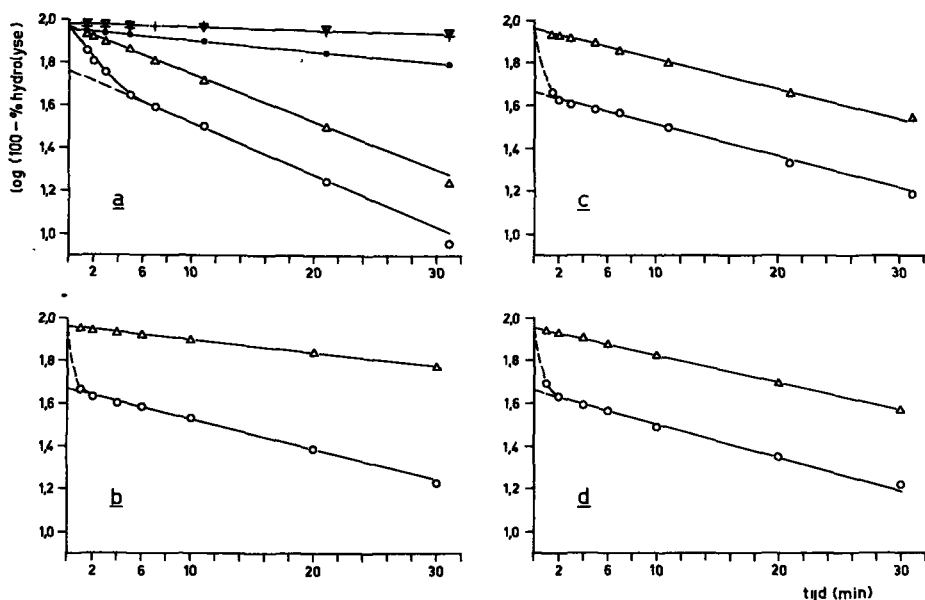


Fig. 13 Onderzoek naar het eerste orde karakter van de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin.

- a) $\nabla-\nabla$ 0,01 M veronaal buffer pH 7,8; $+ - +$ 0,01 M tris buffer pH 7,8; $\bullet-\bullet$ 6% albumine in veronaal buffer pH 7,8 (resultaten van fig. 3)
- $\Delta-\Delta$ met pHMB behandeld caviaplasma; $\circ-\circ$ caviaplasma (resultaten van fig. 2)
- b) $\circ-\circ$ gedialyseerd ratteplasma; $\Delta-\Delta$ gedialyseerd, met pHMB behandeld ratteplasma (resultaten van fig. 4)
- c) $\circ-\circ$ muizeplasma; $\Delta-\Delta$ met pHMB behandeld muizeplasma (resultaten van fig. 2)
- d) $\circ-\circ$ gedialyseerd menseplasma; $\Delta-\Delta$ gedialyseerd, met pHMB behandeld menseplasma (resultaten van fig. 4)

Elk punt geeft het gemiddelde aan van twee waarnemingen.

Voorzover het de experimenten in de diverse buffers betreft vinden wij op deze wijze de k die behoort bij de spontane hydrolyse in het beschouwde milieu. Bij de proeven met plasma is de gevonden snelheidsconstante samengesteld uit de k voor de spontane hydrolyse, de constante voor de langzame

Tabel 7

Snelheidsconstanten voor de hydrolyse van 0,1 mM sarin,
soman en DFP in diverse media

		$k (10^{-3} \text{ min}^{-1})$ in plasma	$k (10^{-3} \text{ min}^{-1})$ in plasma + pHMB
Sarin			
rat	(fig. 4)	48,3	38,4
rat, gedialyseerd	(fig. 4)	32,5	11,4
mens	(fig. 4)	65,8	64,9
mens, gedialyseerd	(fig. 4)	36,2	31,2
muis	(fig. 2)	34,1	32,2
cavia	(fig. 2)	56,0	51,6
rat, 0°	(fig. 6)	6,6	-
rat, gedialyseerd	(fig. 5)	20,2	2,7
(10 x verdund)			
Soman			
rat	(fig. 10)	30,6	
DFP			
rat	(fig. 11)	30,8	
		$k (10^{-3} \text{ min}^{-1})$ in buffer	
Sarin			
0,01 M veronaal (Na), pH 7,8	(fig. 3)		2,9
0,01 M tris (Cl), pH 7,8	(fig. 3)		2,9
6% albumine in 0,01 M veronaal (Na), pH 7,8	(fig. 3)		12,2

enzymatische hydrolyse en een bijdrage van de geleidelijk toenemende binding aan eiwitten. Het is niet waarschijnlijk dat deze laatste component zelf een zuiver eerste-orde karakter zal bezitten. Daar deze bijdrage in de experimenten met 0,1

mM sarin betrekkelijk gering is, zal dit echter weinig storen. Bij de hydrolyse van 0,01 mM sarin in ratteplasma wordt geen zuivere eerste-orde reactie gevonden (fig. 14a), wat mogelijk kan worden verklaard door de relatief grote binding van sarin aan eiwit in deze experimenten (tabel 3). Bij de hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin in caviaplasm, waarin de binding aan eiwit veel geringer is, vinden wij wel een lineair verband tussen de logaritme van (100 - % niet-vluchtige ^{32}P) en de incubatietijd (fig. 14b).

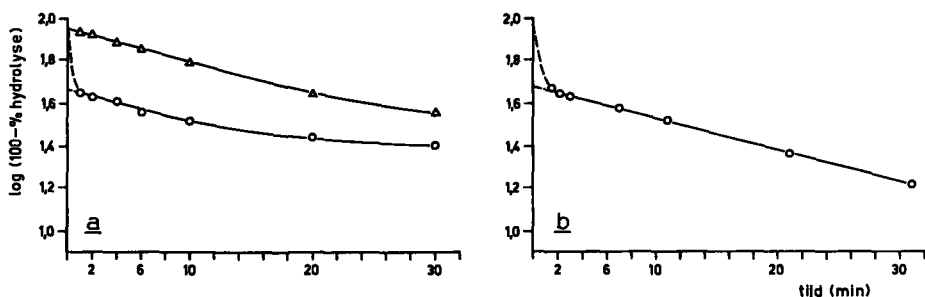


Fig.14 Onderzoek naar het eerste orde karakter van de hydrolyse van 0,01 mM ^{32}P -sarin.
 a) $\circ-\circ$ ratteplasma; $\triangle-\triangle$ met pHMB behandeld ratteplasma (resultaten van fig. 9)
 b) $\circ-\circ$ caviaplasm (resultaten van fig. 7)
 Elk punt geeft het gemiddelde aan van twee waarnemingen.

In onze experimenten is gebleken dat bij sarinase een hoge substraat concentratie ($>0,01\text{ M}$) nodig is, wil het enzym verzadigd raken met substraat; de K_m is dus groot. Indien de werking van het enzym met Michaelis-Menten kinetiek beschreven mag worden zal bij de lage sarin concentratie die in onze experimenten is gebruikt de enzymatische hydrolyse voor de beide stereo-isomeren van sarin inderdaad het karakter van een reactie van de eerste orde hebben.

Bij plasma, waarin de sarinase-activiteit volledig is geremd door pHMB, meten wij de k voor de spontane hydrolyse in plasma, in combinatie met de binding aan eiwitten.

Wij gaan er vanuit dat sarin bestaat uit twee componenten (S_1 en S_2) die met ongelijke snelheid door sarinase worden gehydrolyseerd in reacties van de eerste orde (reactieconstanten k_1 en k_2) en dat hiernaast een eerste-orde reactie (de spontane hydrolyse) optreedt waarin beide componenten niet worden onderscheiden (k_3). De hydrolyse van beide componenten verloopt dus als een reactie van de eerste orde, die van S_1 met de snelheidsconstante $K_1 = k_1 + k_3$, die van S_2 met $K_2 = k_2 + k_3$. De in tabel 7 opgenomen getallen geven dus de waarden voor K_2 aan. Uit deze waarden valt af te leiden dat in gedialyseerd ratteplasma een goede remming van de totale sarinase-activiteit door pHMB plaatsvindt; de snelheidsconstante na remming is praktisch gelijk aan die gevonden in een 6% albumine oplossing in veronaal buffer. In gedialyseerd menseplasma treedt een overeenkomstig effect niet op. Hierin wordt K_2 nauwelijks beïnvloed door remming van de sarinase door incubatie met pHMB. Wel wordt de enzymatische hydrolyse van de snelle component van sarin geremd, zoals uit fig. 13 blijkt. Mogelijk vindt hierin nog hydrolyse van sarin plaats die gekatalyseerd wordt door een enzym dat niet door pHMB wordt geremd. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Erdös en Boggs (19). Deze auteurs vonden een dergelijk verschijnsel in menseplasma met betrekking tot de enzymatische hydrolyse van paraoxon, zoals in hoofdstuk 1 werd vermeld.

In niet-gedialyseerd ratte- en menseplasma is de invloed van de behandeling met pHMB op K_2 gering. Ook in niet-gedialyseerd muize- en caviaplasma wordt de K_2 slechts weinig beïnvloed door incubatie van het plasma met pHMB. Deze experimenten werden echter niet herhaald met gedialyseerd plasma, waardoor de interpretatie moeilijker wordt. Verlaging van de temperatuur waarbij de reactie plaatsvindt van 37° tot 0° geeft een verlaging van K_2 in ratteplasma van 48,3 naar 6,6. Voor 0,1 mM DFP en soman worden in ratteplasma waarden voor K_2 gevonden die wat lager liggen dan die voor sarin.

Het eerste-orde karakter van de hydrolyse van sarin in plasma biedt de mogelijkheid de fractie sarin die snel wordt gehydrolyseerd vrij exact te bepalen. De beide componenten van sarin worden voorgesteld door S_1 en S_2 , waarbij:

$$S = S_1 + S_2 \quad (1)$$

De hydrolyse van S_1 verloopt met de reactieconstante:

$$K_1 = k_1 + k_3 \quad (2)$$

De hydrolyse van S_2 verloopt met de reactieconstante:

$$K_2 = k_2 + k_3 \quad (3)$$

Indien de fracties van S_1 en S_2 in de oorspronkelijke sarin oplossing worden aangeduid met f_1 en f_2 , wordt de reactie beschreven door de volgende vergelijking:

$$\log (S/S_0) = \log (f_1 e^{-K_1 t} + f_2 e^{-K_2 t}) \quad (4)$$

Indien $k_1 \gg k_2$ zal $K_1 \gg K_2$ en zal de term $e^{-K_1 t}$ bij toenemen van t snel naar nul naderen; (4) gaat dan over in:

$$\log (S/S_0) = \log f_2 e^{-K_2 t} = -(K_2 \log e) t + \log f_2 \quad (5)$$

Bij extrapolatie van het tweede, lineaire stuk van de logaritmisch uitgezette hydrolysecurven, dat dus de hydrolyse van de langzame component weergeeft, naar $t = 0$ geeft het snijpunt met de ordinaat de fractie langzame component $(f_2)_{t=0}$ aan. In de praktijk bevat de toegevoegde sarin reeds enig gehydrolyseerd, althans niet-vluchtig, materiaal en bovendien wordt gewoonlijk een hoeveelheid ^{32}P vrijwel momentaan geadsorbeerd, zoals blijkt uit extrapolatie naar $t = 0$ van de hydrolysecurven in plasma, dat is behandeld met pHMB. Aangenomen wordt dat in het materiaal dat op tijd 0 reeds als "gehydrolyseerd" beschouwd moet worden, geen onderscheid tussen S_1 en S_2 is gemaakt. Indien wij nu uitzetten, zoals in onze grafieken gedaan is, $\log$ (vluchtige ^{32}P in procenten van de totaal aanwezige ^{32}P), dan vinden wij de fractie S_2 in de oorspronkelijke sarin door bij de waarde, gevonden door extrapolatie van de curve voor de langzame component naar $t = 0$ op te tellen de helft van de waarde, die gevonden werd in het met pHMB behandelde plasma.

In het gedialyseerde, met pHMB behandelde ratteplasma van fig. 13 wordt voor $t = 0$ op deze manier 8% "gehydrolyseerd" materiaal gevonden. Extrapolatie van de curve voor het onbehandelde plasma naar $t = 0$ levert een waarde van 47%

voor de langzame component. De totale hoeveelheid langzame component in de oorspronkelijke sarin oplossing wordt dan $47\% + 4 = 51\%$. In een aantal experimenten waarin de hydrolyse in plasma met en zonder pHMB werd gemeten, werden deze resultaten op overeenkomstige wijze bewerkt. Tabel 8 geeft deze resultaten weer.

Tabel 8

Fractie langzame component van sarin na extrapolatie naar
 $t = 0$

Ratteplasma	(fig. 4)	50%
Gedialyseerd ratteplasma	(fig. 4)	51%
Ratteplasma	(fig. 2)	52%
Menseplasma	(fig. 2)	53%
Menseplasma	(fig. 4)	55%
Gedialyseerd menseplasma	(fig. 4)	51%
Muizeplasma	(fig. 2)	51%
Caviaplasma	(fig. 2)	61%
Gedialyseerd ratteplasma (10 x verdund)	(fig. 5)	59%

In de meeste gevallen worden waarden gevonden van praktisch 50%. Slechts indien de sarinase-activiteit relatief laag is worden enigszins hogere waarden verkregen. Het feit dat, in die gevallen waarin de hydrolyse voornamelijk door sarinase werking wordt teweegebracht, de twee componenten vrijwel exact in een 1:1 verhouding blijken voor te komen, verleent zeer sterke steun aan de hypothese dat het hier de twee stereo-isomeren van sarin betreft. De waarneming dat de hydrolyse in plasma van het asymmetrische soman wel en van het symmetrische DFP niet bifasisch verloopt kan, in combinatie met bovenvermelde feiten, moeilijk anders geïnterpreteerd worden dan door aan te nemen dat plasma-sarinase een specifieke voorkeur heeft voor één van de stereo-isomeren van de methylfosfonofluoridaten.

Hoe groot het verschil is in de reactiesnelheid waarmee de twee isomeren van sarin worden gesplitst, is uit de gegevens niet exact te bepalen. Slechts de resultaten verkregen met 10 x verdund plasma laten een schatting toe van de verhouding van de snelheden waarmee de twee componenten worden gesplitst. In tabel 7 zijn de waarden voor K_2 in dit verdunde, wel en niet met pHMB behandelde plasma gegeven (resp. 2,7 en $20,2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). In dit experiment (zie fig. 15) zijn voldoende meetpunten tussen 0 en 50% beschikbaar om een in-

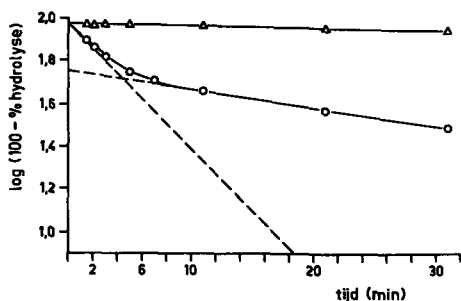


Fig.15
Kinetische analyse van de hydrolyse van 0,1 mM ^{32}P -sarin in verdund ratteplasma.
o-o gedialyseerd plasma, 10x verdund;
Δ-Δ gedialyseerd, met pHMB behandeld plasma, 10x verdund; verdund werd met 0,9% NaCl (resultaten van fig. 5)
Elk punt geeft het gemiddelde aan van twee waarnemingen.

druk te geven van het verloop van de hydrolyse in de beginfase. Nu volgt uit (4), indien $f_1 = f_2 = 0,5$, dat voor $t = 0$:

$$\frac{d \log (S/S_0)}{dt} = \frac{1}{2} (K_1 + K_2) \log e \quad (6)$$

Uit de helling van de raaklijn op $t = 0$, die zo goed mogelijk aan de meetpunten is aangepast (zie fig. 15) volgt dat $K_1 + K_2 = 0,270 \text{ min}^{-1}$ en aangezien $K_2 = 0,020 \text{ min}^{-1}$ en $k_3 = 0,0027 \text{ min}^{-1}$, volgt uit (2) en (3) dat:

$$\begin{aligned} K_1 &= 0,250 \text{ min}^{-1}, \\ k_1 &= 0,247 \text{ min}^{-1} \text{ en} \\ k_2 &= 0,0175 \text{ min}^{-1}. \end{aligned}$$

Volgens deze gegevens blijken de waargenomen snelheidsconstanten van de reactie van sarinase met de beide stereo-isomeren van sarin een factor 14 te verschillen. Aangezien het mechanisme van de sarinase werking niet bekend is, is het niet mogelijk het verschil in reactiesnelheid aan een bepaalde stap in het katalytisch mechanisme toe te schrijven.

Bij de hydrolyse experimenten van 0,1 mM sarin in plasma werd, voor de langzame reactie, steeds een eerste-orde kinetiek gevonden (fig. 13); dit bleek niet altijd het geval te zijn bij 0,01 mM sarin (fig. 14). In de experimenten met 1 mM sarin worden afwijkingen van de verwachte eerste-orde kinetiek gevonden, zoals blijkt uit de resultaten van deze experimenten, zoals die zijn weergegeven in fig. 16. Voor caviaplasm, dat het laagste gehalte aan sarinase bezit, wordt slechts één reactie van de eerste orde gevonden, zodat hier geen aanwijzingen meer zijn voor een verschil in hydrolyse snelheid van de beide stereo-isomeren van sarin. Slechts voor

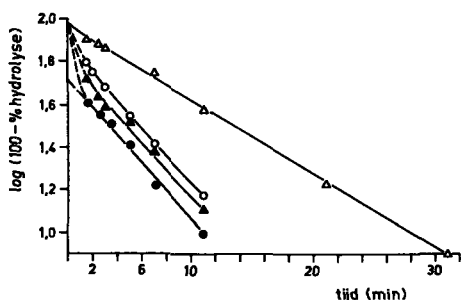


Fig. 16
Onderzoek naar het eerste orde karakter van de hydrolyse van 1 mM ^{32}P -sarin in plasma.
●—● ratteplasma; ▲—▲ menseplasma
○—○ muizeplasma; △—△ caviaplasm
(resultaten van fig. 8)
Elk punt geeft het gemiddelde aan van twee waarnemingen.

ratteplasma wordt bij extrapolatie van de langzame reactie een snijpunt met de ordinaat bij ongeveer 50% gevonden, bij mense- en muizeplasma liggen deze snijpunten bij aanzienlijk hogere percentages. Het verschil in reactiesnelheid voor de beide stereo-isomeren van sarin blijkt bij deze experimenten geringer te zijn dan in de experimenten met 0,1 mM sarin of niet meer aanwezig. Kennelijk gaat de stereospecificiteit geleidelijk verloren bij hogere sarin concentraties. Inderdaad werd in de Warburg experimenten (fig. 1) voor ratteplasma bij de hydrolyse van 10 mM sarin geen enkele aanwijzing meer gevonden voor twee naast elkaar verlopende eerste-orde reacties.

Uit de experimenten die in het volgende hoofdstuk besproken worden, zal blijken waarom de stereospecificiteit van de sarinase geleidelijk verloren lijkt te gaan, indien de sarin concentratie hoger wordt.

HOOFDSTUK 6

ONDERZOEK NAAR DE STEREOSPECIFICITEIT VAN SARINASE

6.1. Inleiding

De resultaten beschreven in het vorige hoofdstuk duiden er in sterke mate op, dat bij de hydrolyse van sarin onder invloed van plasma-sarinase bij voorkeur één van de beide stereo-isomeren wordt gesplitst, althans bij lage concentratie sarin; bij hogere concentraties echter kwam deze stereospecificiteit niet of nauwelijks tot uiting. Het directe bewijs voor een stereospecifiek verloop van de hydrolyse zou zijn geleverd, indien tijdens de reactie een optische rotatie zou worden waargenomen. Immers, sarin zelf bezit een asymmetrisch fosforatoom en kan dus in twee optisch actieve vormen voorkomen, terwijl in het hydrolyseprodukt, het gedissocieerde monoisopropyl methylfosfonaat, de twee zuurstofatomen door de resonantie mogelijkheden equivalent zijn en dus de asymmetrie is opgeheven. Indien tijdens de hydrolyse in hoofdzaak één van de isomeren wordt gesplitst, zal de optische activiteit van de andere tot uiting kunnen komen en worden waargenomen in de polarimeter. De specifieke rotatie van sarin was niet bekend maar wel kon een schatting worden gemaakt van de sarin concentratie, die nodig zou zijn voor een meetbare optische rotatie. Hoewel hierbij bleek dat voor een hydrolyse experiment in de polarimeter gewerkt zou moeten worden met een sarin concentratie, waarbij in de voorafgaande proeven geen aanwijzingen voor een stereospecifieke reactie waren waargenomen, meenden wij dat een dergelijk experiment niet achterwege kon worden gelaten. Hiertoe werd 0,05 M sarin in een polarimeterbuis geïncubeerd met ratteplasma. Er werden echter geen aanwijzingen gevonden dat er in de oplossing enige optische activiteit optrad ten gevolge van de hydrolyse van sarin.

Aangezien het directe bewijs voor een stereospecifieke hydrolyse niet kon worden geleverd, werd getracht langs indirecte weg verder bewijsmateriaal te verkrijgen. Hierbij was het uitgangspunt dat bij incuberen van lage concentraties sarin met plasma, één van beide stereo-isomeren snel wordt afge-

broken; na korte tijd incuberen, met bijvoorbeeld ratteplasma, bevat het incubatiemengsel dus een overmaat van de andere isomeer. Indien wij derhalve na enkele minuten de reactie stoppen en de resterende sarin isoleren, zou deze sarin volgens de hypothese bestaan uit de isomeer die langzaam door sarinase gehydrolyseerd wordt, of althans daar veel "rijker" aan zijn, dan de rac.sarin waarvan werd uitgegaan. Het materiaal dat op deze wijze werd verkregen werd gemakshalve "verrijkte" sarin genoemd.

Van dit materiaal mag men verwachten dat bij herhaald incuberen met ratteplasma de hydrolysecurve geen knik meer zal vertonen, of dat deze knik bij een lager percentage dan 50 zal liggen. Dit bleek inderdaad het geval te zijn in proeven waarin werd uitgegaan van een incubatiemengsel van ratteplasma met 1 mM ^{32}P -sarin. De knik in de hydrolysecurve trad hier op bij ca. 20% gehydrolyseerde sarin.

Op deze manier werden ook de eigenschappen nagegaan van sarin verkregen door kort incuberen van 1 mM ^{32}P -sarin met plasma van mens, muis en cavia. Bij de eerste twee gevallen was dit materiaal duidelijk rijker aan de component die langzaam wordt gehydrolyseerd; na incuberen met caviaplasma was van verrijking echter nauwelijks sprake.

Van verrijkte sarin, dat bereid was door inwerking van ratteplasma, werd de reactie met AcChE vergeleken met die van rac.sarin. Dit werd gedaan naar aanleiding van het werk van Michel (28) en Ooms (42) die op grond van experimenten met rac.sarin postuleerden dat de beide stereo-isomeren van sarin met groot verschil in reactiesnelheid met AcChE zouden reageren.

Bovendien werden de eigenschappen onderzocht van BuChE dat was geremd met resp. verrijkte of rac.sarin. Berends (30) concludeerde namelijk uit experimenten met rac.sarin dat er voor het door L- resp. D-sarin geremd BuChE verschil moet bestaan in de reacties met oximen, die leiden tot herstel van de enzymactiviteit.

In onze experimenten bleek dat verrijkte sarin voornamelijk bestaat uit de isomeer die het snelst met AcChE reageert. In de proeven met BuChE bleken de eigenschappen van het enzym, geremd met verrijkte sarin, duidelijk te verschillen van die van de met rac.sarin geremde cholinesterase (43).

De genoemde experimenten leverden dus zeer sterke argumenten voor een stereospecifieke enzymatische hydrolyse van sarin in plasma. Onverklaard bleef echter, waarom dit verschijnsel bij hoge sarin concentraties niet werd gevonden. De mogelijkheid werd overwogen dat bij deze hoge concentraties misschien racemisering zou kunnen optreden onder katalytische invloed van de fluoride ionen, die bij de hydrolyse vrijkomen. Dit werd onderzocht door de verrijkte sarin te incuberen met NaF. Door deze behandeling bleek de verrijkte sarin weer de eigenschappen van rac.sarin te krijgen, zoals volgde uit hydrolyse experimenten in ratteplasma en proeven waarin AcChE door de resulterende sarin werd geremd. Reeds door betrekkelijk lage concentraties fluoride ionen bleek deze racemisatie te worden veroorzaakt. Hierdoor kon nu ook het falen van de polarimeter proeven en de Warburg experimenten voor het aantonen van een stereospecificiteit worden verklaard. Tijdens de hydrolyse van de bij deze proeven noodzakelijk hoge concentraties sarin wordt de fluoride ionen concentratie spoedig zo hoog dat racemisering gaat optreden, waardoor een optische rotatie niet kan worden waargenomen.

Op grond van deze gegevens was nu wel duidelijk hoe een sarin oplossing met een meetbare optische rotatie verkregen zou kunnen worden, namelijk door de verrijkte sarin te concentreren onder omstandigheden waarbij zo min mogelijk fluoride ionen zouden worden gevormd en aanwezig zouden zijn. Het bleek mogelijk de sarin uit de waterige oplossing van de verrijkte sarin te extraheren door middel van chloroform en de chloroform oplossing te concentreren. Op deze manier werd een oplossing van sarin verkregen die het polarisatievlak naar links draaide. Onder invloed van ammoniumfluoride kon de racemisatie van de sarin in deze oplossing in de polarimeter worden gevolgd. De resultaten van deze experimenten leverden het directe bewijs voor de stereospecifieke enzymatische hydrolyse van sarin in plasma (44).

6.2. Materialen en methoden

6.2.1. Acetylcholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC. 3.1.1.7): het uit runder erythrocyten geïsoleerde, gezuiverde en door toevoeging van serum albumine gestabiliseerde preparaat van Winthrop Laboratories, U.S.A. De specifieke activiteit bedroeg ongeveer 1 E/mg eiwit (één E is de

hoeveelheid enzym die één μmol acetylcholine splitst per minuut; 0,01 M substraat, 25°, pH 7,4).

6.2.2. Butyrylcholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC.3.1.1.8) werd in het MBL gezuiverd uit paardeserum volgens de methode van Strelitz (45) en Jansz en Cohen (46). De specifieke activiteit bedroeg ca. 100 E/mg eiwit (één E is de hoeveelheid enzym die één μmol acetylcholine splitst per minuut; 0,02 M substraat, 25°, pH 7,4).

6.2.3. Overige materialen (voorzover niet vermeld zie onder 2.1.3): acetylcholine chloride: Fluka A.G., Zwitserland; monoisonitroso-aceton (MINA): gesynthetiseerd in het CL; chlo-roform p.a.: E. Merck, Darmstadt, gedestilleerd.

6.2.4. Bereiding verrijkte sarin. Om uit een incubatiemengsel van plasma met sarin de nog niet omgezette sarin in handen te krijgen werd een vriesdroogapparaat, voorzien van slijpstukken, geconstrueerd waaraan een peerkolfje van ca. 25 ml, dat het incubatiemengsel bevatte, en een opvangbuis, waarin de vluchtige bestanddelen verzameld werden, bevestigd konden worden. Tussen peerkolf en opvangbuis en tussen opvangbuis en vacuümpomp waren vacuümkranen aanwezig; in de verbinding met de vacuümpomp was een T-stuk aanwezig waardoor met een pirani vacuümmeter de druk kon worden gemeten. De opvangbuis werd gekoeld met vloeibare lucht. Het peerkolfje werd, nadat het was gevuld en verbonden was met het vriesdroogapparaat, gekoeld met vloeibare lucht; vervolgens werd het apparaat aangesloten op een vacuümpomp. Zodra de druk ongeveer 0,01 mm Hg was, werd de kraan tussen het apparaat en de pomp gesloten en de vloeibare lucht onder het peerkolfje verwijderd. Wanneer in het peerkolfje het oppervlak van het ingevroren incubatiemengsel zo groot mogelijk was, waren na 1 à 2 uur praktisch alle vluchtige bestanddelen overgesublimeerd uit 2-3 ml incubatiemengsel.

De bereiding van de verrijkte sarin verliep als volgt: aan 1,8 ml plasma werd in een peerkolfje bij 37° toegevoegd 0,2 ml 0,01 M ^{32}P -sarin, welke was bereid door direct voor de proef een geschikte hoeveelheid van de 0,1 M ^{32}P -sarin voorraad-oplossing met water te verdunnen; na 4 minuten werd toegevoegd 0,4 ml 1 M acetaat buffer, pH 3,5, waarna de in-

houd direct werd ingevroren, onder omzwenken, in alcohol-vast CO₂. Het kolfje werd met het vriesdroogapparaat verbonden en het mengsel gevriesdroogd. Na het vriesdrogen werd het sublimaat, vlak voordat hiermee een experiment werd uitgevoerd, ontdooid.

6.2.5. Bepaling sarin-gehalte in een oplossing van verrijkte sarin. De verrijkte sarin is afkomstig van ³²P-sarin zodat, indien alle ³²P in de oplossing van verrijkte sarin als ³²P-sarin aanwezig is, door middel van radioactiviteitsmetingen het gehalte aan sarin kan worden bepaald. Uit opnieuw vriesdrogen van de verrijkte sarin bleek dat meer dan 99% nog als vluchtige ³²P aanwezig was; aangenomen werd dan ook dat alle gevonden ³²P uit ³²P-sarin bestond. Uit de resultaten van een bepaling van het sarin-gehalte met behulp van de dianisidine methode (32) bleek deze veronderstelling juist te zijn.

Bij deze metingen werd als referentie gebruik gemaakt van een ³²P-standaard oplossing, die verkregen was door verdunnen van de ³²P-sarin voorraad-oplossing. Hiertoe werd aan 1 ml van deze oplossing 3 ml 0,1 N NaOH toegevoegd, waarna volgens de methode van Berenblum en Chain (47)*, in enigszins gewijzigde vorm, het fosfor-gehalte werd bepaald. Een gedeelte van deze gehydrolyseerde ³²P-sarin werd verder verdund tot de ³²P-standaard-oplossing waarvan het gehalte aan fosfor bekend was en gecorreleerd kon worden met de radioactiviteit.

6.2.6. Elektrometrische bepaling van de activiteit van acetylcholinesterase. De methode wordt door Ooms (42) beschreven en is een variant van die van Michel (48). Bij deze methode werd gebruik gemaakt van een pH meter van het fabrikaat "Electronic Industries Ltd.", model 23a, welke speciaal ingericht is voor het nauwkeurig meten van pH verschillen.

De bepaling werd als volgt uitgevoerd: in een bekerglas van 25 ml werd 10 ml van een buffer gebracht van pH 8,1 (44,73 g KCl, 4,124 g veronaal natrium en 0,545 g-KH₂PO₄

* De bepaling werd uitgevoerd in het Chemisch Laboratorium RVO-TNO.

in 2 liter water, met 0,1 N HCl op pH 8,1 gebracht) en 1 ml van een acetylcholine chloride oplossing (1 g acetylcholine chloride in 50 ml buffer). Dit mengsel werd geplaatst in een thermostaatbad van $25^{\circ} \pm 0,1$. Na temperatuur instelling werd 1 ml enzym oplossing toegevoegd en na mengen werd de pH gemeten (pH_1). Na precies 30 minuten werd de pH weer gemeten (pH_2). $\text{pH}_1 - \text{pH}_2$ is een maat voor de enzymactiviteit en is binnen het door ons gebruikte gebied recht evenredig met de hoeveelheid toegevoegd enzym.

6.2.7. Titrimetrische bepaling van de activiteit van butyrylcholinesterase. Deze enzymactiviteitsbepaling werd verricht door continue titratie met 0,1 N NaOH in een automatische titrator, Radiometer type TTT 1 met recorder type SBR 2 en titratie-opstelling type SBU 1, bij constante temperatuur (25°) en pH (7,5) en met acetylcholine als substraat zoals door Berends (29) beschreven.

Het titratievatje bevatte 18 ml 0,55 mM fosfaatbuffer van pH 7,5 en 2 ml 0,2 M acetylcholine chloride (eindconcentratie fosfaat 0,5 mM, acetylcholine 0,02 M). De enzymoplossing werd hieraan toegevoegd in een volume van 100-250 μl , afhankelijk van de enzymactiviteit. Gedurende de eerste 5 minuten verliep deze titratie als een reactie van de nulde orde; na die tijd kon hiervan een geringe afwijking optreden door enzymremming onder invloed van het gevormde choline. Het aantal μl verbruikte loog per 5 minuten werd, na correctie voor de spontane substraathydrolyse, gebruikt als maat voor de enzymactiviteit.

6.2.8. Extractie van overmaat remmer. Na de remming van BuChE door sarin diende de overmaat remmer verwijderd te worden onder omstandigheden waarbij de veroudering (zie 6.4.5) en de spontane reactivering zo gering mogelijk waren. Hiertoe werd een rondbodemkolf, bevattende de BuChE oplossing en een hoeveelheid met water verzadigde, peroxide-vrije ether, aan een zogenaamde roterende verdampers geplaatst. Hierbij maakte de kolf een hoek van ca. 45° met de werktafel; tijdens het roteren, waarbij continu een waterlaag onder de ether wordt doorgetrokken, werd de kolf gekoeld in ijswater. Indien 10-15 ml geremde BuChE oplossing driemaal gedurende 10 minuten met een viervoudige overmaat

ether aan dit proces werd onderworpen, was ca. 99% van de overmaat sarin verwijderd.

Uit de resulterende waterige oplossing werd de ether aan de roterende verdampers bij 0° onder verminderde druk verwijderd. Voordat de ether werd toegevoegd werd de kolf gewogen, zodat tijdens het indampen door herhaalde wegingen kon worden gecontroleerd of alle ether was verwijderd. Voor afwijkingen van het oorspronkelijke gewicht werd bij het omrekenen op de oorspronkelijke enzymactiviteit zonodig een correctie aangebracht.

6.3. Hydrolyse van 0,05 M sarin in ratteplasma, bestudeerd in de polarimeter

Voor de uitvoering van dit experiment hebben wij ons gebaseerd op de proeven van Hoskin en Trick (9). Deze namen een draaiing van het polarisatievlak van licht waar gedurende de incubatie van 0,05 M tabun in ratteplasma. Zij gebruikten hiervoor ratteplasma dat was verdund met een bicarbonaat buffer.

Aangezien het ons van groot belang leek de verhouding tussen de enzymatische en de spontane hydrolyse zoveel mogelijk in het voordeel van de eerste te verschuiven, werd in onze experimenten onverdund plasma gebruikt, terwijl de aanwezigheid van ionen die de spontane hydrolyse kunnen katalyseren (bijvoorbeeld bicarbonaat!) werd vermeden. Derhalve werd het plasma gedialyseerd tegen een tris-HCl buffer (pH 7,6) van 0,6 M; deze hoge concentratie was nodig om te voorkomen dat het zuur, dat bij de hydrolyse van sarin vrijkomt (twee equivalenten per mol), tot een te sterke pH daling en daardoor tot onwerkzaam worden van het enzym (3, 11), zou leiden. De pH zakte nu tot ca. 6,8 in 2,5 uur. Bij lagere tris concentratie daalde de pH verder en bovendien begonnen de eiwitten neer te slaan.

De experimenten werden uitgevoerd bij een temperatuur van $25,0^{\circ} \pm 0,1$ en licht van een golflengte van 546 mμ in een 10 cm lange buis in een Perkin-Elmer polarimeter, model 141, waarin een draaiing met een nauwkeurigheid van $\pm 0,002^{\circ}$ kan worden afgelezen. De incubatie werd voortgezet gedurende 2,5 uur. In deze periode trad geen noemenswaardige verandering op in de rotatie, zodat op grond van deze experimenten niet

geconcludeerd kan worden dat de hydrolyse van sarin in ratteplasma stereospecifiek verloopt. In overeenkomstige experimenten met 0,05 M tabun als substraat werd door ons echter ook geen draaiing geconstateerd.

Hoewel tijdens de uitvoering van deze experimenten de specifieke draaiing van sarin niet bekend was, mocht op grond van gegevens over andere organische fosfor-verbindingen een meetbare draaiing worden verwacht bij een overmaat van één van beide isomeren van ca. 3 mM*.

Indien er een duidelijk verschil bestaat in de snelheid waarmee de twee isomeren worden gehydrolyseerd, zou een dergelijke situatie zich bij de hydrolyse van 0,05 M sarin zeker moeten voordoen.

6.4. Experimenten met "verrijkte" sarin

6.4.1. Inleiding. De resultaten uit de vorige paragraaf suggereren dat de stereospecificiteit van sarinase bij hogere concentraties dan 1 mM geheel teloor gaat. Indien wij de hydrolyse in plasma willen gebruiken om van sarin specifiek één van beide isomeren te laten omzetten, teneinde een hoeveelheid sarin te kunnen isoleren die in hoofdzaak uit de andere stereo-isomeer bestaat, kan deze reactie dus het beste bij lage sarin concentraties (ca. 0,1 mM) worden uitgevoerd. In verband met de hoeveelheden en de concentraties die wij van dit materiaal voor een optische rotatiemeting tot onze beschikking willen krijgen, is het echter gewenst de incubatie-concentratie zo hoog mogelijk te kiezen. Aangezien bij de hydrolyse in ratteplasma ook met 1 mM sarin nog duidelijke aanwijzingen waren gevonden voor een stereospecifiek verloop van de reactie (zie fig. 16), werd besloten deze concentratie voor onze proeven te gebruiken. Hierbij werd in principe dezelfde werkwijze gevolgd als bij de vriesdroogmethode. ^{32}P -sarin werd geïncubeerd met ratteplasma en na 4 minuten werd de reactie gestopt door de pH te verlagen met acetaatbuffer (in dit geval uiteraard zonder niet-radioactieve sarin). Vervolgens werd het reactiemengsel snel ingevroren en werden de vluchtige bestanddelen door sublimeren onder verminderde druk eraan ont-

* Een redelijke waarde voor de specifieke draaiing leek 25° (c in g/ml l=10 cm, wij namen hiervoor de helft van de waarde gevonden voor de overeenkomstige chloorverbinding isopropyl methylfosfonochloridaat (64)); een draaiing van $0,01^{\circ}$ wordt dan bereikt voor een overmaat aan één der stereo-isomeren van 0,4 mg/ml = 2,9 mM.

trokken en opgevangen. Op deze wijze werd na ontdooien een waterige oplossing van ^{32}P -sarin verkregen, die voor de verdere experimenten werd gebruikt. De pH van deze oplossingen van verrijkte sarin (zie 6.1) was ongeveer 3.

In de eerste proeven werd de duur van de incubatie enigszins gevarieerd. Volgens de hydrolysecurve (fig. 8) zou na 2 minuten reeds meer dan 50% van de sarin gehydrolyseerd zijn, maar dat betekende niet dat na deze periode de "snelle" isomeer reeds volledig was omgezet; wellicht zou de overmaat aan de "langzame" isomeer in de resterende sarin relatief groter zijn na een iets langere incubatietijd. Inderdaad bleek het materiaal, verkregen uit sarin die 4 minuten met ratteplasma was geïncubeerd, meer verrijkt te zijn dan de na 2 minuten geïsoleerde sarin. In de volgende bereidingen werd daarom de tijd van 4 minuten aangehouden; langer incuberen had misschien nog een iets hoger percentage verrijking kunnen opleveren, maar zou ook hebben geleid tot een te sterke afname van de opbrengst aan sarin. Het sarin-gehalte werd bepaald uit het ^{32}P -gehalte, zoals beschreven in 6.2.5. De verrijkte sarin bevatte gewoonlijk ca. 0,25 mM sarin. Voor experimentele details betreffende de bereiding van de verrijkte sarin zij verwezen naar 6.2.4.

Naast de bereiding van verrijkte sarin door middel van incuberen met ratteplasma werd de reactie ook uitgevoerd door incuberen van 1,0 mM ^{32}P -sarin met mense-, muize- en ca-viaplasm.

6.4.2. Hydrolyse van verrijkte ^{32}P -sarin in ratteplasma. De hydrolyse in ratteplasma van de verrijkte ^{32}P -sarin, die op de boven vermelde wijze was bereid, werd bestudeerd met behulp van de vriesdroogtechniek zoals beschreven in 2.2.1 en 5.3.4. In Fig. 17 zijn de resultaten van enige proeven grafisch uitgezet. De onderste curve van fig. 17a toont het verloop van de hydrolyse van sarin die na 2 minuten geïsoleerd werd uit het reactiemengsel van 1 mM ^{32}P -sarin en ratteplasma; de eindconcentratie van de verrijkte ^{32}P -sarin bedroeg hierbij 0,041 mM. De bovenste curve is afkomstig van een controle-experiment met 0,050 mM rac. ^{32}P -sarin. De onderste curve van fig. 17b geeft een beeld van de hydrolyse van verrijkte sarin, die verkregen werd na een incubatie met ratteplasma gedurende 4 minuten. Hierin zijn de resul-

taten van twee experimenten verwerkt waarvoor de concentraties van de verrijkte sarin resp. 0,022 en 0,026 mM waren. De bijbehorende controle-experimenten (0,025 mM rac.³²P-sarin) zijn weergegeven in de bovenste lijn.

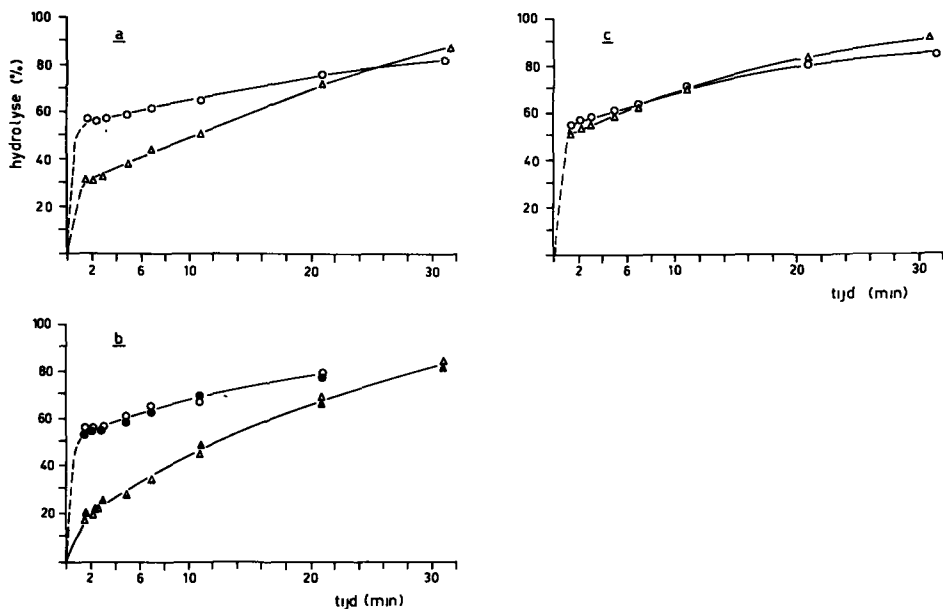


Fig.17 De hydrolyse van verrijkte ³²P-sarin in ratteplasma.

- a) Δ-Δ sarin, gedurende 2 minuten verrijkt in ratteplasma (conc. 0,041 mM)
o-o 0,050 mM sarin.
- b) Δ en Δ sarin, gedurende 4 minuten verrijkt in ratteplasma (conc. 0,022 en 0,026 mM); o en • 0,025 mM sarin (duplo bepaling).
- c) verdere controle experimenten: Δ-Δ hydrolyse in ratteplasma van sarin, geïsoleerd na incubatie gedurende 4 minuten met door pHMB behandeld ratteplasma (conc. 0,064 mM); o-o idem van 0,025 mM sarin, verdund met plasma-sublimaat.

In beide gevallen blijkt de verrijkte sarin aanzienlijk minder van de component te bevatten die snel door sarinase wordt afgebroken dan rac.sarin. In het materiaal dat 2 minuten geïncubeerd is geweest met ratteplasma is dat hoogstens 30%; in de verrijkte sarin, geïsoleerd na 4 minuten incuberen, is dit bedrag gedaald tot onder de 20%.

Tijdens de bereiding van de verrijkte sarin wordt de hydrolyse gestopt door een hoeveelheid acetaat buffer toe te voegen. Dit heeft tot gevolg dat tijdens het vriesdrogen ook azijnzuur sublimeert en in de verrijkte sarin terechtkomt. Deze

hoeveelheid blijkt zo groot te zijn, dat de pH van het incubatiemengsel van plasma met verrijkte sarin (7,0 - 7,2) lager is dan die van het mengsel in de hydrolyseproeven met gewone sarin (7,7 - 8,0). Aangezien de aanwezigheid van azijnzuur in de verrijkte sarin op grond van de verlaging van de pH niet ongunstig is voor de stabiliteit van de sarin, werd niet de pH van de verrijkte sarin-oplossing bijgesteld, maar werd in de controleproeven (fig. 17a, b) de pH van het incubatiemengsel teruggebracht tot 7,0 - 7,2 door azijnzuur aan de rac.sarin toe te voegen. Zoals uit de figuur blijkt, heeft dit geen invloed op de vorm van de hydrolysecurve. Fig. 17c toont twee verdere controleproeven. In de ene werd de normale vriesdroogprocedure toegepast op ratteplasma, waaraan water was toegevoegd in plaats van ^{32}P -sarin oplossing en na 4 minuten incuberen acetaat buffer. De ^{32}P -sarin voorraad-oplossing werd met dit sublumaat verdund tot de vereiste concentratie en het mengsel werd met ratteplasma geïncubeerd ($\Delta-\Delta$). In het tweede werd de ^{32}P -sarin geïsoleerd uit ratteplasma, waarvan de sarinase-activiteit was geremd met 1 mM pHMB (2.2.5) en vervolgens gedurende 4 minuten was geïncubeerd met 1 mM ^{32}P -sarin (0—0). In beide gevallen werd de normale hydrolysecurve waargenomen met een snelle omzetting van ongeveer 50% van de sarin.

Deze resultaten tonen aan, dat de verrijkte sarin zich op de verwachte wijze onderscheidt van rac.sarin en zij vormen een duidelijke bevestiging van de opvatting dat de sarinase uit ratteplasma een sterke voorkeur heeft voor één van de beide stereo-isomeren van sarin. Zeer duidelijk wordt dit onderstreept door een vergelijking van de curve uit fig. 17b ($\Delta-\Delta$) en fig. 17c (0—0), waaruit het effect van de remming van de sarinase op de eigenschappen van de overgesublimeerde sarin blijkt.

6.4.3. Onderzoek naar de mate van verrijking van sarin verkregen door incuberen van 1 mM ^{32}P -sarin met mense-, muize- en caviaplasm.

Uit de experimenten beschreven in 5.3.7 kan men afleiden dat ook bij plasma van mens en muis de hydrolyse van 1 mM sarin nog enigermate stereospecifiek verloopt; bij caviaplasma was hiervoor geen enkele aanwijzing aanwezig. Getracht werd deze waarnemingen te verifiëren door de sarin, die niet is omgezet na een kortstondige incubatie van 1 mM ^{32}P -sarin met

deze plasmasoorten, te isoleren en de hydrolyse hiervan in ratteplasma te bestuderen, een en ander geheel analoog aan de experimenten beschreven in 6.4.2. Bij mense- en muizeplasma, waarin de hydrolyse niet veel langzamer verloopt dan in ratteplasma, werd gedurende 4 minuten geïncubeerd, voordat de overgebleven sarin werd geïsoleerd. Bij caviaplasmaveroort de hydrolyse veel langzamer; hier werden twee incubatietijden geprobeerd, namelijk 6 en 10 minuten. De resultaten zijn weergegeven in fig. 18.

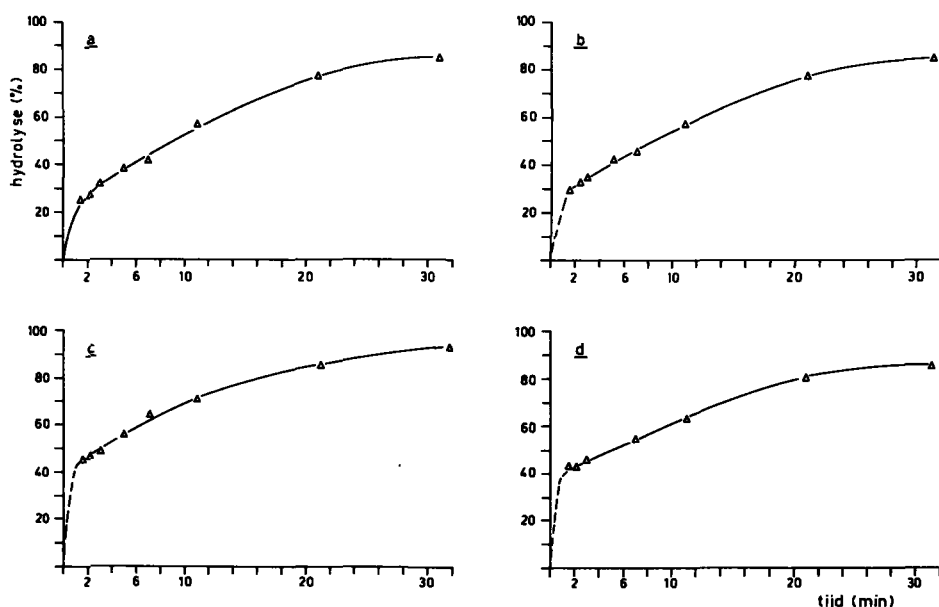


Fig.18 De hydrolyse in ratteplasma van in mense-, muize- of caviaplasmaveroortte ^{32}P -sarin.

- a) sarin, gedurende 4 minuten verrijkt in menseplasma (conc. 0,026 mM)
- b) sarin, gedurende 4 minuten verrijkt in muizeplasma (conc. 0,033 mM)
- c) sarin, gedurende 6 minuten verrijkt in caviaplasmaveroort (conc. 0,045 mM)
- d) sarin, gedurende 10 minuten verrijkt in caviaplasmaveroort (conc. 0,025 mM)

De hydrolysecurve van het materiaal dat was verkregen uit het incubatiemengsel van resp. plasma van mens en muis vertoont een knik die ver beneden de 50% ligt (fig. 18a en 18b). Dit wijst erop dat ook in deze plasmasoorten de hydrolyse van 1 mM sarin stereospecifiek verloopt. De hydrolysecurven van de sarin die werd geïsoleerd na een incubatie met caviaplasmaveroort gedurende 6 resp. 10 minuten buigen pas boven

de 40% af (resp. 45 en 42%). In overeenkomstige experimenten met rac.sarin (fig. 17a en b, bovenste curven) ligt dit punt echter tussen de 50-55%. Waarschijnlijk bestaat er dus ook bij de incubatie van caviaplasma met 1 mM sarin nog enig verschil tussen de snelheden waarmee de beide isomeren worden gehydrolyseerd.

6.4.4. Remming van acetylcholinesterase door verrijkte sarin. Zowel door Michel (28) als door Ooms (42) werd gevonden dat sarin zich bij de remming van AcChE gedraagt alsof het uit twee componenten bestaat die in equimolaire hoeveelheden aanwezig zijn en waarvan de ene component veel sneller met de cholinesterase reageert dan de andere. Dit werd waargenomen in experimenten die werden uitgevoerd door een AcChE oplossing, waarvan de concentratie aan actieve groepen bekend was, te incuberen met sarin in concentraties die in dezelfde orde van grootte lagen; het verloop van de remming werd gevolgd door van tijd tot tijd de resterende enzymactiviteit te bepalen. In proeven waarin de sarin niet in overmaat aanwezig was, bleek de remmingsreactie vrijwel tot stilstand te komen bij een percentage geremd enzym dat ongeveer de helft bedroeg van wat verwacht zou worden, indien al de sarin met het enzym had gereageerd. Deze observaties werden verklaard op grond van het voorkomen van sarin in twee stereo-isomere vormen. Het verschil in reactiesnelheid van de twee isomeren van sarin is kennelijk zo groot dat binnen de duur van het experiment de één vrijwel volledig reageert en de andere nauwelijks aan de reactie toekomt*.

Indien wordt gewerkt met een AcChE oplossing van bekende molariteit, kan uit het verloop van de reactie dus de molaire concentratie van de isomeer van sarin met de hoge reactiesnelheid worden bepaald, mits deze lager is dan die van het enzym. Dit principe hebben wij gebruikt om de samenstelling van de verrijkte sarin te onderzoeken. Aangezien nog moest blijken of die isomeer, die in de verrijkte sarin in overmaat aanwezig is, in de reactie met AcChE de hoge of de lage affiniteit zou vertonen, werd een iets minder dan equimolaire hoeveelheid (verrijkte) sarin gebruikt. Voor een juiste

* Recente onderzoekingen van Boter c.s. (49) toonden aan dat het verschil in de reactiesnelheden tenminste 4000 is.

interpretatie van de resultaten was het van essentieel belang dat de uitgangs-concentraties goed bekend waren. Om het effect van een eventuele onnauwkeurigheid in de AcChE concentratie op te heffen, werden de resultaten vergeleken met die van controle-experimenten met rac.sarin. Ook werden proeven uitgevoerd met rac.sarin die, wat de voorbehandeling en de concentratiebepaling betreft, zoveel mogelijk identiek was met de verrijkte sarin. De uitvoering verliep als volgt: een AcChE oplossing, waarvan de concentratie aan actieve groepen was bepaald uit de enzymactiviteit en de activiteit per katalytisch centrum (42, 50) werd geïncubeerd met verrijkte of rac.³²P-sarin in de gewenste concentratie. Hiertoe werden gelijke volumina van de AcChE oplossing en de remmer oplossing, beide in de veronaal buffer van pH 8,1, bij elkaar gevoegd en het mengsel geïncubeerd bij 25°. Op bepaalde tijdstippen werden monsters genomen en hierin werd de enzymactiviteit bepaald zoals beschreven in 6.2.6. Deze werd uitgedrukt als het percentage van de activiteit van het enzym voor het toevoegen van de remmer.

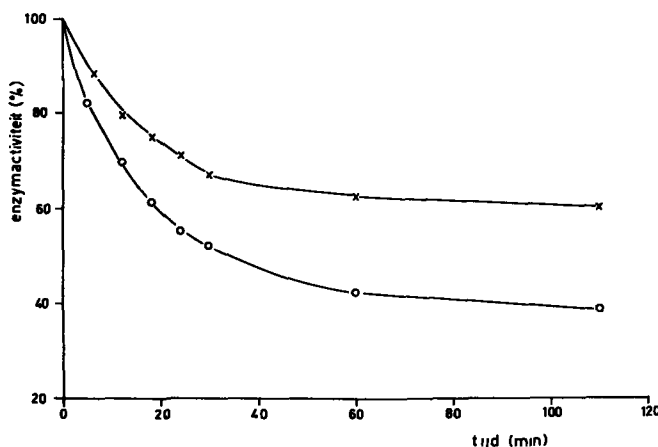


Fig.19 De remming van acetylcholinesterase door sarin.

x—x 3,84 nM rac. sarin
 o—o 3,84 nM verrijkte ³²P-sarin
 enzymconcentratie 4,88 nM

In fig. 19 zijn de resultaten weergegeven van een experiment, waarin de reactie van 4,88 nM AcChE met 3,84 nM verrijkte, resp. rac.sarin werd bestudeerd. De verrijkte sarin was verkregen zoals beschreven in 6.2.4. Hoewel in beide gevallen de totale sarin concentratie gelijk is, blijkt de ver-

rijkte sarin (0—0) het enzym sneller te remmen dan de racemische verbinding (Δ — Δ), terwijl ook het percentage remming dat tenslotte wordt bereikt duidelijk hoger ligt. In een controle-experiment werd AcChE geïncubeerd met drie verschillende preparaten van rac. sarin. Hierbij waren de concentraties en incubatie omstandigheden volkomen vergelijkbaar. De enzymconcentratie bedroeg steeds 4,34 nM. De eerste sarin oplossing was verkregen, uitgaande van een afgewogen hoeveelheid zeer zuivere niet-radioactieve sarin; de eindconcentratie bedroeg 3,40 nM. Het tweede preparaat was bereid door het vriesdrogen van een waterige oplossing van ^{32}P -sarin; de eindconcentratie was eveneens 3,40 nM. De derde portie sarin was geïsoleerd door vriesdrogen van het reactiemengsel, verkregen door ^{32}P -sarin gedurende 4 minuten te incuberen met ratteplasma, waarvan de sarinase-activiteit was geremd met 1 nM pHMB; de eindconcentratie was in dit geval 3,38 nM. Van de beide laatste preparaten werd de sarin concentratie op grond van de ^{32}P -activiteit bepaald. De resultaten zijn weergegeven in fig. 20. Het blijkt dat de drie sarin preparaten volkomen

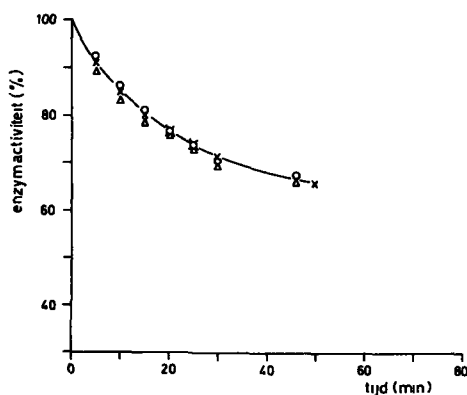


Fig. 20

De remming van acetylcholinesterase door sarin; controle experimenten.

- x 3,40 nM rac sarin
 - Δ 3,40 nM ^{32}P -sarin, gesublimeerd
 - o 3,38 nM ^{32}P -sarin, gesublimeerd na incubatie gedurende 4 minuten met door 1 mM pHMB geremd ratteplasma
- enzymconcentratie 4,34 nM.

identiek verlopende reacties met AcChE gaven. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de bepaling van de sarin concentratie door middel van radioactiviteitsmetingen betrouwbaar is en dat de technieken, gebruikt bij het isoleren van de verrijkte sarin, geen aanleiding geven tot artefacten. Derhalve is het verschil tussen de rac. en de verrijkte sarin in de reactie met AcChE

(fig. 19) reëel en een duidelijke aanwijzing dat de verrijkte sarin voor meer dan de helft uit de isomeer bestaat die snel met het enzym reageert. Uit de gebruikte concentraties en het percentage remming na 110 minuten berekenen wij voor de rac.sarin een gehalte aan deze isomeer van 51%; voor de verrijkte sarin bedraagt dit 78%.

6.4.5. Reactivering en veroudering van butyrylcholinesterase, na remming door verrijkte, resp. rac.sarin. Bij de reactie van cholinesterase met remmers van het organofosfaat type wordt de fosforgroep gesubstitueerd aan de hydroxylgroep van de serine in het actieve centrum (51, 52). Door het geremde enzym te incuberen met bepaalde oximen of hydroxamzuren kan deze fosfor bevattende substituent weer worden afgesplitst, waarbij de enzymactiviteit terugkeert (53, 54). Deze reactie noemt men reactivering. In het geval dat in het gefosforyleerde enzym in de substituent een esterbinding aanwezig is, wordt vaak nog een andere reactie waargenomen, namelijk een spontane hydrolyse van deze esterbinding, waardoor in het geremde enzym een negatief geladen substituent achterblijft die niet ontvankelijk is voor de reactie met de reactivatoren (29). Het geremde enzym kan dus niet meer gereactiveerd worden. De overgang van een reactiveerbare naar een niet-reactieerbare vorm vindt meestal vrij geleidelijk plaats en wordt de "veroudering" van het geremde enzym genoemd. Bovenstaande reacties zijn schematisch weergegeven in fig. 21.

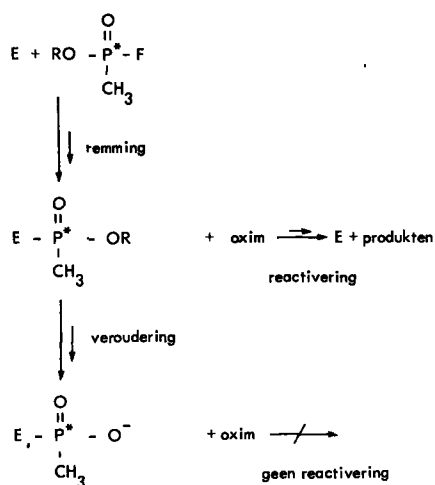


Fig. 21
Remming, reactivering en veroudering van cholinesterase; schematisch overzicht (zie tekst 6.4.5).

Berends (30) vond dat de reactivering door de oximen P_2AM (1 methyl 2 hydroxyiminomethylpyridinium jodide) en $MINA$ van $BuChE$, dat geremd was met sarin, een bifasisch verloop had, namelijk een aanvankelijk snelle reactie, waarin ongeveer de helft van het geremde enzym werd gereactiveerd, gevolgd door een langzaam verder oplopen van het percentage reactivering. Nader kinetisch onderzoek wees uit dat het hier een eigenschap van het geremde enzym betrof; ca. 50% hiervan reageerde snel met deze oximen, de andere helft werd gereactiveerd in een reactie (van de eerste orde) met een aanzienlijk lagere snelheidsconstante. Ook de veroudering van dit geremde enzym bleek een bifasisch verloop te vertonen; deze reactie kwam vrijwel tot stilstand nadat ongeveer de helft van het geremde $BuChE$ was verouderd. Deze beide verschijnselen werden alleen waargenomen bij $BuChE$ dat was geremd met een asymmetrische fosforverbinding, niet na reactie met bijvoorbeeld DFP . Berends verklaarde deze waarnemingen door aan te nemen dat bij de reactie van $BuChE$ met sarin twee vormen van het geremde enzym ontstaan, namelijk het D- en L-(isopropyl methylfosfonyl)-enzym, in ongeveer gelijke hoeveelheden; deze beide stereo-isomere geremde enzymen zouden zich onderscheiden door een verschil in geneigdheid tot reactie met reactivatoren en tot veroudering. Deze verklaring impliceert dat $BuChE$ bij de remming weinig of geen voorkeur heeft voor L- of D-sarin in afwijking van het gedrag van $AcChE$. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Ooms (42) die aangeeft dat bij de reactie van $BuChE$ met sarin voor de twee isomeren geen significant verschillende reactiesnelheden worden waargenomen. Uit recente onderzoeken van Boter c.s. (49) volgt echter dat er wel een verschil bestaat, maar dat dit slechts een factor 2 bedraagt. In fig. 21 zijn de reacties, waarin de twee stereo-isomeren zich verschillend kunnen gedragen, aangegeven met twee pijlen van ongelijke lengten; voor de remming van $BuChE$ door sarin zou dit dus niet gelden.

Indien de boven vermelde verklaring juist is, kan een onderzoek van het verloop van de reactivering en de veroudering van $BuChE$, dat is geremd met sarin, inlichtingen verschaffen over de verhouding waarin de twee stereo-isomeren in de gebruikte sarin aanwezig zijn. In de volgende paragrafen is een dergelijk onderzoek beschreven dat uitgevoerd is door de reactivering en veroudering van $BuChE$, geremd met resp. rac. en verrijkte sarin, te vergelijken.

Voor deze experimenten werd de verrijkte ^{32}P -sarin gebruikt die volgens 6.2.4 was bereid. De rac.sarin werd verkregen door een waterige oplossing van ^{32}P -sarin te vriesdrogen. Het gebruikte enzym was opgelost in 0,01 M fosfaat buffer, pH 7,4 en had een activiteit van ca. 50 E/ml ($0,7 \mu\text{M}$) en 3,5 E/mg eiwit. Ter stabilisering van het enzym werd 2 mg runderserum albumine per ml toegevoegd. Tien ml van deze oplossing werd geïncubeerd bij kamertemperatuur met 0,15 ml verrijkte resp. rac. ^{32}P -sarin (eindconcentratie sarin $3 \mu\text{M}$) gedurende 2 uur. Hierna was de enzymactiviteit voor meer dan 99% geremd. De overmaat remmer werd verwijderd door extractie met ether (zie 6.2.8). Het aldus verkregen materiaal werd gebruikt voor het onderzoek van de reactivering en veroudering.

6.4.5.1. Reactivering. De reactivering werd bestudeerd door het geremde enzym te incuberen met 0,02 M MINA en het herstel van de enzymactiviteit met de tijd te volgen. Hiervoor werd 2 ml van de oplossing van het geremde enzym gemengd met 2 ml 0,04 M MINA in 0,01 M fosfaat buffer, pH 7,4 en geïncubeerd bij 25° in een thermostaatbad. Op diverse tijdstippen werden monsters van 250-100 μl genomen waarvan de enzymactiviteit werd bepaald volgens de pH-stat methode (6.2.7). De gemeten enzymactiviteit werd uitgedrukt als per-

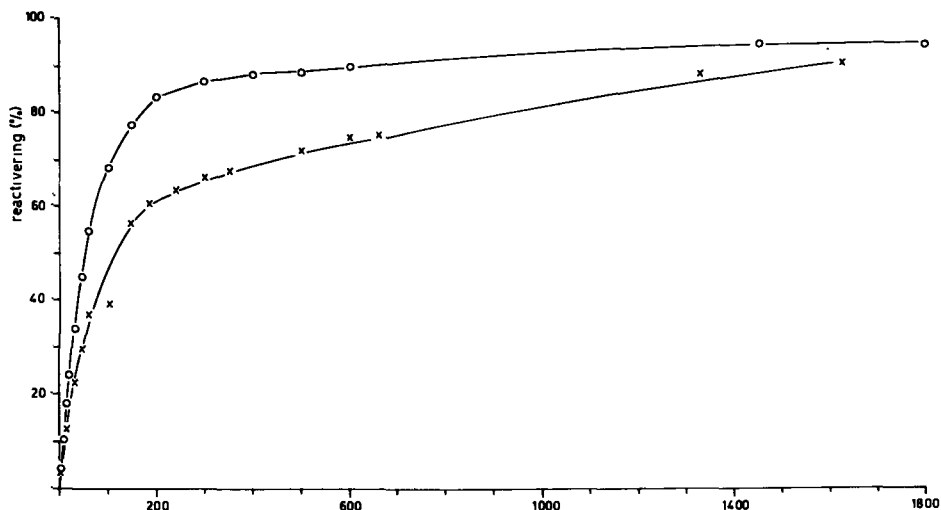


Fig. 22 De reactivering door MINA van butyrylcholinesterase, geremd door sarin.
o-o BuChE, geremd door verrijkte sarin; x-x BuChE, geremd door rac. sarin.

centage van de waarde die maximaal kon worden bereikt door het geremde enzym langdurig te incuberen met 0,1 M MINA (dit werd bepaald in de hierna te bespreken verouderingsproeven). Deze waarde lag ongeveer 10% lager dan de theoretische waarde die werd berekend uit de activiteit van het enzym voor de remming. In fig. 22 zijn de resultaten van dit experiment weergegeven. Deze tonen aan dat van BuChE, geremd met verrijkte sarin, een grotere fractie snel wordt gereactiveerd dan van het door rac.sarin geremde enzym. Het bifasische karakter van de reactivering blijkt nog duidelijker indien van dezelfde resultaten de $\log(100 - \%$ reactivering) tegen de tijd wordt uitgezet zoals in fig. 23 is geschied. Extrapolatie van de langzame (eerste-orde) reactie naar $t = 0$ (verg. 5-6) laat zien dat het enzym na de reactie met rac.sarin ongeveer 52% van de snel te reactiveren component bevatte, BuChE geremd met verrijkte sarin ongeveer 83%.

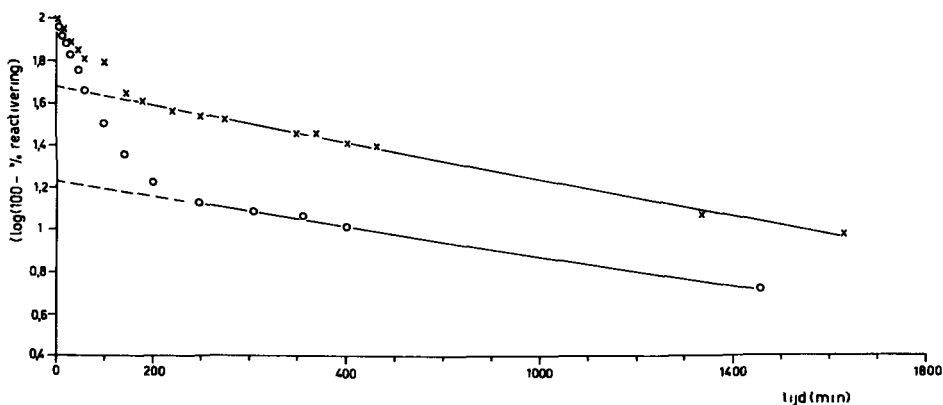


Fig.23 Kinetische analyse van de reactivering door MINA van butyrylcholinesterase, geremd door sarin.

- BuChE, geremd door verrijkte sarin;
- ×—× BuChE, geremd door rac. sarin (gegevens afkomstig van fig.22)

6.4.5.2. Veroudering. De veroudering werd onderzocht door het geremde enzym te bewaren bij 25° en van tijd tot tijd in monsters te bepalen welk percentage reactivering nog kon worden bereikt. Daar deze incubatie vele dagen werd voortgezet en het optreden van bacteriegroei vermeden diende te worden, werd deze incubatie onder toluendamp uitgevoerd.

Hiertoe werden de buisjes, waarin zich 5 ml geremd enzym bevond, afgesloten met een rubberstop, waar doorheen een glazen buisje stak dat aan onder- en bovenzijde was afgesmolten, maar een opening opzij onder de stop had; dit buisje bevatte een druppel toluen. Op diverse tijdstippen werden monsters genomen van 0,5 ml. Hieraan werd 0,5 ml 0,2 M MINA (pH 7,4) toegevoegd. Vervolgens werden deze monsters geïncubeerd bij 25°; na 24, 48 en 72 uur werd de enzymactiviteit bepaald. Deze nam na 48 uur gewoonlijk niet verder toe. De op deze wijze bepaalde maximaal bereikbare activiteit van elk monster werd vergeleken met de activiteit van het enzym voor de remming (na correctie voor verdunningsfactoren). De veroudering werd uitgedrukt in het percentage niet meer te reacteren enzymactiviteit. De resultaten zijn afgebeeld in fig. 24. Deze tonen aan dat bij de aanvang van de incubatie reeds ca. 10% van het geremde enzym is verouderd (verg. 6.4.5.1)

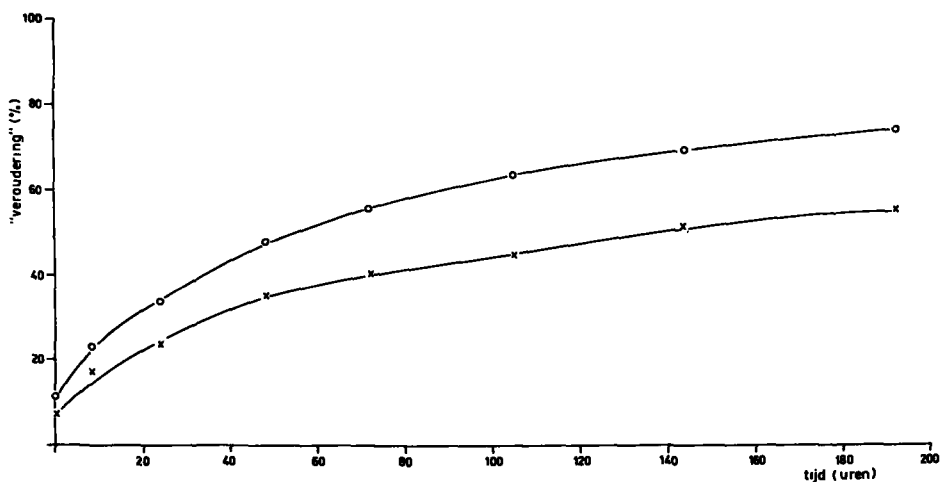


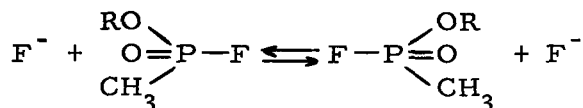
Fig. 24 De veroudering van butyrylcholinesterase, geremd door sarin.

o—o BuChE, geremd door verrijkte sarin; x—x BuChE, geremd door rac. sarin.

en, wat belangrijker is, dat de veroudering duidelijk sneller verloopt en een hoger percentage bereikt in het enzym dat geremd is met verrijkte sarin, dan in de met rac. sarin behandelde BuChE. Een nadere analyse van deze gegevens is weinig zinvol, aangezien door de lange duur van de incubatie een vrij aanzienlijke spontane reactivering en enige denaturatie plaatsvindt die interfereren met de eigenlijke veroudering.

6.4.6. Racemiseren van verrijkte sarin onder invloed van fluoride ionen. Het feit dat de stereospecificiteit van plasma-sarinase verloren lijkt te gaan bij hogere sarin concentraties zou kunnen worden verklaard door aan te nemen dat één van de produkten die bij de hydrolyse van sarin ontstaan de omzetting van de beide stereo-isomeren in elkaar kan katalyseren. Bij lage concentraties sarin zal dit produkt slechts in geringe hoeveelheden worden gevormd en zal van de racemisatie weinig hinder worden ondervonden; bij hogere concentraties echter zou de racemisatie ertoe kunnen leiden dat de langzaam gesplitste isomeer met meetbare snelheid in de andere wordt omgezet, die daarna door de sarinase snel wordt afgebroken. Een dergelijk mechanisme zou ook verklaren waarom de hydrolyse van 1 mM sarin in ratte-, mense- en muizeplasma met vrijwel gelijke snelheid verloopt (afgezien van de eerste fase); wellicht is in deze reacties de racemisatie de snelheidsbepalende stap.

In de eerste plaats komt als katalysator voor de racemisatie het bij de hydrolyse vrijkomende fluoride ion in aanmerking, volgens het volgende reactieschema:



(racemisatie onder invloed van fluoride ionen zou ook verklaren waarom alle pogingen de stereo-isomeren van sarin te synthetiseren hadden gefaald; in de laatste stap van de synthese was namelijk een hoge concentratie fluoride ionen aanwezig. In recente onderzoeken zijn Boter c.s. (49) erin geslaagd de synthese van de stereo-isomeren van sarin tot een goed einde te voeren o.a. door de aanwezigheid van fluoride ionen zoveel mogelijk te vermijden).

Wij hebben de veronderstelling dat fluoride ionen de racemisatie in de hand werken, onderzocht door de invloed van incubatie met NaF op de eigenschappen van de verrijkte sarin te bestuderen.

6.4.6.1. Invloed van behandelen van verrijkte sarin met natrium fluoride op de hydrolyse in ratteplasma. Voor deze experimenten werd een hoeveelheid verrijkte sarin gebruikt die 0,26 mM sarin bevatte; de

pH van deze oplossing was 3,3. Hiervan werd 2 ml gedurende 1 uur geïncubeerd met 5 mM NaF bij 25°. Vervolgens werd van dit materiaal de hydrolyse in ratteplasma bestudeerd op de manier beschreven in 5.3.4 en 2.2.1; de eindconcentratie sarin was 0,026 mM. In controle-experimenten werd de hydrolyse in ratteplasma onderzocht van resp. de oorspronkelijke verrijkte sarin, van dit materiaal na 1 uur staan bij 25° (eindconc. 0,026 mM) en van 0,025 mM rac.sarin. De resultaten zijn weergegeven in fig. 25. Curve (Δ — Δ) werd verkregen met de onbehandelde verrijkte sarin. Deze viel geheel samen met die van het materiaal dat 1 uur bij 25° was bewaard; deze curve is niet opgenomen in deze figuur. Curve (0—0) werd gevonden voor rac.sarin, curve (Δ — Δ) voor de verrijkte sarin

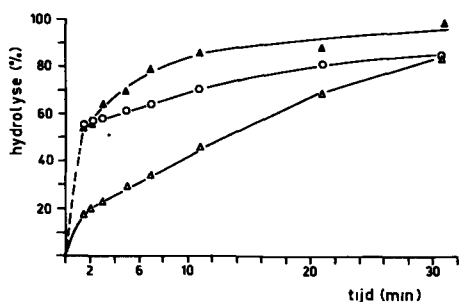


Fig. 25

De hydrolyse in ratteplasma van verrijkte sarin, behandeld met NaF.

Δ — Δ 0,026 mM verrijkte sarin

o—o 0,025 mM rac. sarin

Δ — Δ 0,026 mM verrijkte sarin, tevoren in een concentratie van 0,26 mM gedurende 1 uur geïncubeerd met 5 mM NaF.

die was behandeld met NaF (door vriesdrogen werd vastgesteld dat dit laatste materiaal door deze behandeling niet reeds gedeeltelijk was gehydrolyseerd; ca. 99% van de ^{32}P was nog vluchtig). De resultaten tonen duidelijk aan dat de incubatie met NaF de hydrolysecurve drastisch doet veranderen. Voor de behandeling bevatte de verrijkte sarin minder dan 20% van de isomeer die snel wordt gehydrolyseerd. Door de inwerking van NaF is dit opgevoerd tot ca. 50%, zoals in de rac.sarin, waarvan de verdere hydrolyse echter minder snel verloopt dan van het materiaal dat NaF bevat. Uit dit resultaat kan men concluderen dat onder invloed van 5 mM NaF (vermoedelijk dus van de fluoride ionen) de verrijkte sarin is overgegaan in rac.sarin. De versnelde hydrolyse van de tweede helft van de sarin kan waarschijnlijk worden toegeschreven aan een voortgaan van de racemisatie in het ratteplasma, waar de NaF concentratie nog 0,5 mM bedraagt. Aangezien de eigenschappen van de verrijkte sarin zelf niet veranderen door bewaren bij

25°, treedt hierin kennelijk geen noemenswaardige racemisatie op; door de wijze waarop dit materiaal wordt verkregen is het vrij van fluoride ionen en door de lage pH, een gevolg van de aanwezigheid van het mee gesublimeerde azijnzuur, wordt de hydrolyse, dus de produktie van fluoride, sterk onderdrukt.

Met behulp van de volgende experimenten werd getracht een indruk te krijgen bij welke concentratie aan NaF de racemisatie een factor van betekenis gaat worden. Hiervoor werd 0,24 mM verrijkte sarin gedurende 10 minuten bij 25° gefnucubeerd met resp. 0; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 en 5,0 mM NaF. Vervolgens werd van dit materiaal de hydrolyse in ratteplasma gedurende de eerste 5 minuten onderzocht op de gebruikelijke manier (eindconc. sarin 0,024 mM). De resultaten zijn weergegeven in fig. 26. Hieruit blijkt dat in 10 minuten reeds duidelijk enige racemisering is opgetreden met 0,75 mM NaF,

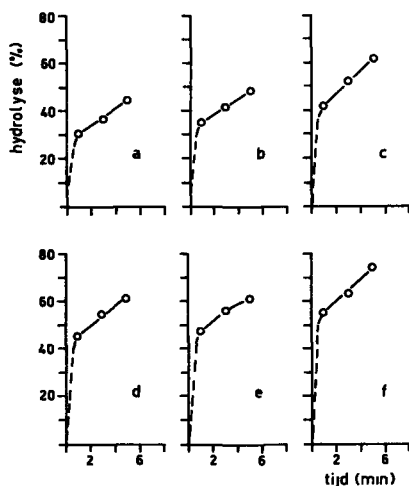


Fig. 26 De hydrolyse in ratteplasma van verrijkte sarin, behandeld met NaF; invloed van de NaF concentratie.

0,024 mM verrijkte sarin; de verrijkte sarin werd tevoren, in een conc. van 0,24 mM, gedurende 10 minuten geïncubeerd met resp. 0 (a), 0,5 (b), 0,75 (c), 1,0 (d), 1,25 (e) en 5 (f) mM NaF.

terwijl met 5,0 mM NaF dit proces binnen 10 minuten is voltooid. Vervolgens werd bij 0,75 mM NaF het verloop van de racemisatie met de tijd nagegaan. Aan porties van 0,5 ml verrijkte sarin (conc. 0,23 mM) werd 5 µl water, of 5 µl 75 mM

NaF toegevoegd. Na incuberen gedurende 10, 20 en 30 minuten bij 25° werd de hydrolyse in ratteplasma bestudeerd op de gebruikelijke wijze. De resultaten zijn samengevat in fig. 27. Er vindt een geleidelijke verschuiving plaats van de knik in de hydrolysecurve die erop wijst dat de racemisering door NaF een met de tijd voortschrijdende reactie is, die onder de gebruikte omstandigheden een halveringstijd heeft die op ca. 11 minuten kan worden geschat.

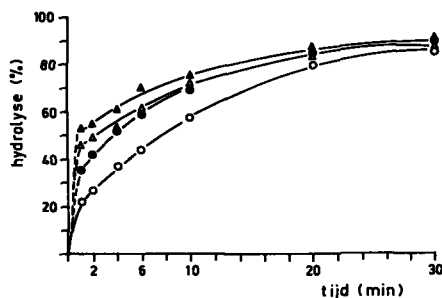


Fig. 27

De hydrolyse in ratteplasma van verrijkte sarin, behandeld met 0,75 mM NaF; invloed van de tijd van incubatie.

0,023 mM verrijkte sarin; de verrijkte sarin werd tevoren, in een conc. van 0,23 mM geïncubeerd met 0,75 mM NaF gedurende resp. 10 (●—●), 20 (▲—▲) of 30 (■—■) min; ○—○ verrijkte sarin zonder NaF.

6.4.6.2. Invloed van behandelen van de verrijkte sarin met natrium fluoride op de reactie met acetylcholinesterase. De resultaten, beschreven in de vorige paragraaf, duiden erop dat door een incubatie met NaF de verrijkte sarin wordt omgezet in rac.sarin, althans indien wij de hydrolyse in ratteplasma als maatstaf hanteren. De invloed van NaF op de verhouding tussen de twee stereo-isomeren in de verrijkte sarin werd nader onderzocht door middel van de reactie met AcChE. De reactie werd uitgevoerd geheel analoog aan de experimenten uit 6.4.4. De AcChE concentratie bedroeg 4,88 nM. Het enzym werd geïncubeerd met resp. 3,96 nM rac.sarin, 3,95 nM verrijkte sarin en 3,95 nM verrijkte sarin die tevoren gedurende 30 minuten met 2,2 mM

NaF was behandeld; de incubatie met NaF werd uitgevoerd bij 25° door aan 0,5 ml 0,22 mM sarin 5 µl 0,22 M NaF toe te voegen. Ook in dit experiment werd geconstateerd dat de behandeling met NaF geen hydrolyse van de sarin tot gevolg heeft. De resulterende remmingscurven zijn afgebeeld in fig. 28. Duidelijker nog dan uit de resultaten van de hydrolyse in ratteplasma blijkt hieruit, dat na de behandeling met NaF de verrijkte sarin zich volkomen gedraagt als rac.sarin.

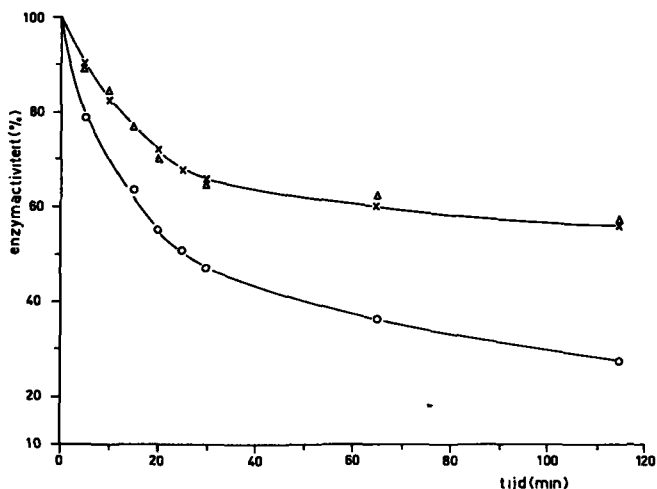


Fig. 28

De remming van acetylcholinesterase door verrijkte sarin, behandeld met NaF.

x-x 3,95 nM verrijkte sarin, tevoren in een conc. van 0,22 mM gedurende 30 min geïncubeerd met 2,2 mM NaF.; o-o 3,95 nM verrijkte sarin; Δ 3,96 nM rac. sarin; enzymconcentratie 4,88 nM.

6.5. Bepaling van de optische draaiing van verrijkte sarin na concentreren

De tot dusver beschreven resultaten wijzen erop dat de hydrolyse van sarin door plasma-sarinase stereospecifiek verloopt, doch dat deze stereospecificiteit bij hogere sarin concentratie niet tot uiting komt in een knik in de hydrolysecurve of een meetbare optische rotatie, doordat de vrijkomende fluoride ionen de racemisering van de resterende sarin bevorderen. Voor het waarneembaar zijn van een optische draaiing in de gebruikte polarimeter zou de concentratie van één iso-

meer van sarin volgens onze schatting minstens 3 mM groter moeten zijn dan die van de andere (zie 6.3). Indien wij dit concentratie-verschil zouden willen bereiken in een experiment waarin rac. sarin wordt geïncubeerd met plasma, zou de aanvangsconcentratie minstens tweemaal zo hoog moeten zijn. In het experiment, beschreven in 6.3, werd 0,05 M sarin geïncubeerd met onverdund ratteplasma; hierbij duurde het ca. 45 minuten voor de helft van de sarin was omgezet. Uit de proeven met NaF bleek dat in de verrijkte sarin bij 0,5 mM fluoride reeds racemisering werd waargenomen; geschat kan worden dat in 1 mM fluoride sarin binnen een half uur geheel wordt geracemiseerd. Deze concentratie aan fluoride is in een experiment met 0,02 - 0,05 M sarin in ratteplasma binnen enkele minuten bereikt. Wij moeten dan ook concluderen dat het waarnemen van een optische rotatie tijdens de hydrolyse van een dergelijke concentratie sarin in plasma niet mogelijk is, tenzij er middelen worden gevonden de fluoride ionen, die bij de reactie vrijkomen, direct onschadelijk te maken.

In de hier beschreven experimenten hebben wij een andere weg bewandeld om een oplossing van sarin in handen te krijgen die zoveel meer van de ene isomeer bevatte dan van de andere, dat een optische draaiing kan worden waargenomen. De resultaten verkregen met de verrijkte sarin wijzen erop dat dit materiaal voor ongeveer 80% uit de isomeer bestaat die langzaam door sarinase wordt gesplitst. De totale sarin concentratie in deze oplossingen bedraagt ongeveer 0,25 mM, een concentratie die dus naar schatting nog wel een factor 10 te laag is voor een juist waarneembare draaiing in de polarimeter. In principe zou het echter mogelijk moeten zijn een meer geconcentreerde oplossing van deze sarin te bereiden. Wij hebben getracht dit te bereiken, in de eerste plaats door bij het vriesdrogen het sublimaat gefractioneerd op te vangen. Hierbij werd uitgegaan van 1 mM ^{32}P -sarin in 3 ml ratteplasma. Na 4 minuten incuberen werd aangezuurd, ingevroren en gevriesdroogd. Het sublimaat werd in fracties van 0,2 ml opgevangen. De eerste fracties bleken relatief de meeste sarin te bevatten. Een hogere concentratie dan 1 mM sarin werd op deze manier echter niet bereikt. Zoals verwacht kon worden, werd ook met deze sarin geen draaiing in de polarimeter geconstateerd. Een verdere concentrering van het op deze wijze verkregen produkt was dus nodig. Aangezien sarin in waterige oplossing ook bij lage pH aan enige hydrolyse onderhevig is

en bij deze hydrolyse fluoride ionen vrijkomen, leek het concentreren van de verrijkte sarin in waterig milieu niet erg zinvol. Getracht werd daarom de sarin met een organisch oplosmiddel uit de waterige oplossing te extraheren en de zo verkregen oplossing te concentreren. Dit oplosmiddel moest aan de volgende eisen voldoen:

- a) een zeer goed oplosmiddel zijn voor sarin, zodat met een betrekkelijk klein volume de sarin grotendeels geëxtraheerd kan worden uit de 0,25 mM waterige oplossing,
- b) zeer slecht mengbaar zijn met water, zodat bij de extractie zo weinig mogelijk water wordt opgenomen,
- c) vrij vluchtig zijn, met het oog op het verder concentreren van de oplossing.

Aan de gestelde eisen bleek chloroform het best te beantwoorden.

6.5.1. Methode van extractie en concentreren. In 6.2.8 werd beschreven hoe overmaat sarin uit een waterige oplossing van geremde BuChE werd verwijderd door extractie met ether in een schuin opgestelde rondbodempkolf, verbonden met een roterende verdamper. Deze wijze van extraheren biedt de volgende voordelen:

- a) de temperatuur kan op eenvoudige manier worden geregeld,
- b) men kan zonder veel risico met radioactieve en giftige stoffen werken,
- c) instellen van het verdelingsevenwicht gaat redelijk snel,
- d) men hoeft niet te wachten op het ontmengen en
- e) er vormt zich geen tussenlaag.

In dit apparaat kan bovendien in dezelfde opstelling zowel het extraheren als het indampen van de organische laag geschieden.

Doordat met radioactieve sarin gewerkt werd kon gemakkelijk worden gecontroleerd of tijdens het indampen verliezen werden geleden. De roterende verdamper was via een uitvriesvat, gekoeld met alcohol-vast CO₂, verbonden met een waterstraalluchtpomp; gemeten werd hoeveel radioactiviteit in dit uitvriesvat terecht kwam.

Voor het verwijderen van de overmaat sarin uit de BuChE oplossing moest een oplosmiddel worden gebruikt dat niet scha-

delijk was voor het geremde enzym; dit leidde tot de keus van ether. Als extractiemiddel voor sarin is ether echter niet de meest geschikte vloeistof; het neemt vrij veel water op en de verdelingscoëfficiënt is niet zeer gunstig; deze bedraagt ongeveer 1. Gezocht werd naar een niet met water mengbare vloeistof met een gunstigere verdelingscoëfficiënt. Volgens Rosenthal c.s. (55) is van een aantal door deze auteurs onderzochte organische oplosmiddelen, de verdelingscoëfficiënt voor sarin tussen organische fase en water voor chloroform het gunstigst; de verdelingscoëfficiënt bedroeg 31 (temp. 25-29°). Chloroform voldoet aan de in 6.5 gestelde eisen; het neemt namelijk zeer weinig water op en is vrij vluchtig.

Een hoeveelheid van 4 ml 0,6 mM ^{32}P -sarin oplossing (pH 4) werd met chloroform geëxtraheerd door roteren bij 0° gedurende 10 minuten in een rondbodem van 100 ml. Hierna werd het ^{32}P -gehalte van de waterige en de organische fase bepaald en hieruit de verdelingscoëfficiënt. Deze was ca. 15; deze waarde veranderde niet indien de extractie langer werd voortgezet.

Vervolgens werd nagegaan of een sarin oplossing in chloroform aan de roterende verdamper geconcentreerd kon worden. Hierbij hebben wij aangenomen dat het gehalte aan de verrijkte sarin ongeveer 100 x vergroot moest worden. Voor het vullen van de kleinste polarimeterbuis met een lichtweg van 10 cm was 1 ml nodig. Wij moesten dus in staat zijn de sarin uit een oplossing van 100 ml te extraheren met chloroform en het extract te concentreren tot ca. 1 ml, zonder dat daarbij ernstige verliezen optraden. Dit werd getest door 100 ml 0,25 mM ^{32}P -sarin oplossing (pH 4) gedurende 10 minuten met 100 ml gedestilleerde chloroform (p.a.) in een rondbodemkolf, die gekoeld werd met ijswater, te laten roteren. Vervolgens werd 90 ml van de chloroform oplossing bij 0° aan de roterende verdamper ingedampt onder verminderde druk; de druk werd zodanig geregeld dat schuimen niet optrad. Het volume werd teruggebracht tot 0,7 ml. Volgens radioactiviteitsmetingen bevatte deze oplossing 96% van de oorspronkelijke in de 90 ml chloroform aanwezige hoeveelheid ^{32}P . Op deze wijze was het dus zeer goed mogelijk de oplossing in chloroform te concentreren zonder veel sarin te verliezen.

In dit experiment bleek dat bij deze grote volumina het verdelingsevenwicht na 10 minuten roteren nog niet was be-

reikt. Nader onderzoek wees uit dat dit na 30 minuten wel het geval was. Gezien het feit dat de oplossing van verrijkte sarin 1 uur bij 25° kon worden bewaard zonder dat er een significante hydrolyse of racemisatie optrad (zie 6.4.6.1), was het niet te verwachten dat een extractie gedurende 30 minuten bij 0° de samenstelling van de sarin merkbaar zou beïnvloeden. In de volgende experimenten werd deze periode dan ook aangehouden. Voor een meer efficiënte extractie werd niet éénmaal met 100 ml maar tweemaal met 50 ml chloroform geëxtraheerd gedurende 30 minuten bij 0°. Met deze procedure werd 95% van de sarin aan de waterlaag onttrokken.

6.5.2. Bereiding van een geconcentreerde oplossing van verrijkte sarin. Voor het bereiden van de verrijkte ^{32}P -sarin werd in principe dezelfde techniek gebruikt als beschreven in 6.2.4, welke werd aangepast aan de grotere hoeveelheden die nodig waren. De incubatie met ratteplasma werd uitgevoerd in vier buizen van 140 bij 34 mm, die aan de bovenzijde waren voorzien van een slijpstuk NS 24/29. In elke buis werd 25 ml ratteplasma geïncubeerd met 0,5 ml 0,1 M ^{32}P -sarin in isopropanol (eindconcentratie sarin 2,0 mM) bij 25°. Na 5 minuten werd 2,5 ml 1 M acetaat buffer (pH 3,5) toegevoegd; vervolgens werden de reactiemengsels ingevroren door de buizen te laten roteren in alcohol-vast CO_2 , zodat het materiaal zich in een dunne laag langs de wand afzette. Daarna werden de buizen aangesloten op een vriesdroogapparaat met wijde openingen en één centraal opvangvat, dat werd gekoeld in vloeibare lucht (temperatuur -190°) waarbij slechts tussen uitvriesvat en pomp een vacuümkraan aanwezig was. Het apparaat werd aangesloten op een oliepomp die een druk van ongeveer 0,01 mm Hg handhaafde. Na 5 tot 7 uur werd de sublimatie beëindigd; het sublimaat had na ontdooien een volume van 90-100 ml. Hierin werd de sarin concentratie bepaald door middel van radioactiviteitsmetingen. Vervolgens werd de extractie met 2 x 50 ml chloroform uitgevoerd (zie 6.5.1). Ook van de chloroform oplossing werd het ^{32}P -sarin gehalte bepaald. Het extract werd geconcentreerd aan de roterende verdampers bij 0° en 57 mm Hg. In verband met experimenten, waarin de racemisatie van dit materiaal onder de invloed van NH_4F werd onderzocht, was het wenselijk een geconcentreerde oplossing in isopropanol te bereiden. Daarom werd het verwijderen van de chloroform voortgezet tot nog

slechts een zeer klein volume overbleef. In een representatief experiment bedroeg dit 0,15 ml. Met water- en peroxidevrije isopropanol werd aangevuld tot 1,5 ml. In dit experiment werd 96% van de sarin, die in het sublimaat aanwezig was, in de chloroform teruggevonden. Hiervan ging bij het concentreren 14% verloren. Volgens de ^{32}P -bepaling bevatte de geconcentreerde oplossing in isopropanol-chloroform 55 mM sarin; bij een analyse in de gaschromatograaf* werd een concentratie van 60 mM gemeten. Met dit materiaal werden de experimenten, beschreven in de volgende paragrafen, uitgevoerd.

6.5.3. Metingen in de polarimeter. Van de isopropanol-chloroform oplossing van de geconcentreerde verrijkte sarin (6.5.2) werd de optische rotatie gemeten bij verschillende golflengten. De meting werd verricht in een microbuis van 10 cm lengte, met een inhoud van 1 ml (zie 6.3). De resultaten zijn weergegeven in tabel 9.

Tabel 9

Optische draaiïng van geconcentreerde verrijkte sarin

Golflengte (m μ)	Draaiïng (°)
578	- 0,067
546	- 0,076
436	- 0,131
365	- 0,207

Teneinde de mogelijkheid te kunnen uitschakelen dat de optische rotatie van het concentraat veroorzaakt zou kunnen zijn door optisch actieve verbindingen (andere dan sarin) afkomstig uit het plasma, werd hiervoor een controle-experiment uitgevoerd, waarin 4 x 25 ml ratteplasma, in de afwezigheid van sarin, aan dezelfde bewerkingen werd onderworpen als hierboven beschreven. Nadat het extract was geconcentreerd tot 1 ml werd de optische rotatie bepaald. Deze was voor de verschillende golflengten minder dan 0,003°. De waargenomen optische rotatie (tabel 9) moet derhalve aan sarin

* Deze bepaling werd uitgevoerd in het Chemisch Laboratorium RVO-TNO.

worden toegeschreven. Hiermee is de opvatting dat de verrijkte sarin een overmaat van één van beide stereo-isomeren bevat, definitief bevestigd en tevens de veronderstelling dat de plasma-sarinase voornamelijk de hydrolyse van één van deze isomeren katalyseert.

Uit het feit dat de geconcentreerde verrijkte sarin het polarisatievlak naar links draait moet worden geconcludeerd dat de voorkeur van de sarinase uitgaat naar de rechts draaiende sarin.

Met het optisch actieve sarin preparaat werd ook een experiment uitgevoerd waarin de remming van AcChE werd bestudeerd, op de wijze beschreven in 6.4.4. Uit het resultaat kon een schatting worden gemaakt van de samenstelling van de sarin; deze bevatte 67,5% van de ene isomeer, waarvan wij nu weten dat het (-)-sarin is. Dit is lager dan voorheen in de verrijkte sarin werd bepaald. In het onderhavige experiment werd echter 2 mM in plaats van 1 mM sarin gebruikt voor de incubatie met ratteplasma, hetgeen dit verschil wellicht kan verklaren. De optisch actieve sarin heeft dus een optische zuiverheid van 35%; de concentratie bedroeg 55 mM. Hieruit berekenen wij voor optisch zuivere sarin de volgende specifieke rotatie:

$$[\alpha]_{365}^{25} = 77^{\circ} \quad \text{en} \quad [\alpha]_{578}^{25} = 25^{\circ} \text{ (absoluut).}$$

6.5.4. Bestudering van de racemisatie onder invloed van ammonium fluoride in de polarimeter.

Uit de invloed van incubatie met NaF op de eigenschappen van de verrijkte sarin werd geconcludeerd dat het fluoride de omzetting van de ene stereo-isomeer van sarin in de andere sterk katalyseert. Het feit dat wij nu konden beschikken over een hoeveelheid sarin met een meetbare optische rotatie maakte het mogelijk voor deze conclusie het directe bewijs te leveren, door de optisch actieve sarin in de polarimeterbuis te incuberen met een fluoride en het verloop van de optische rotatie te meten. Aanvankelijk werd hiervoor een geconcentreerde oplossing van de verrijkte sarin in chloroform gebruikt. Getracht werd racemisatie te bewerkstelligen door de chloroform oplossing te mengen met een verzadigde oplossing van NaF in chloroform. Een afname van de optische rotatie met de tijd

werd echter niet waargenomen. Kennelijk is de maximaal bereikbare concentratie aan fluoride ionen in chloroform zo laag dat geen significante racemisatie plaatsvindt. Te zelfder tijd werden in het CL experimenten uitgevoerd waarin de racemisatie van de inmiddels synthetisch bereide stereo-isomeren van sarin onder invloed van NH_4F in aceton en isopropanol werd onderzocht. Aan de hand van de daarbij verkregen ervaringen kozen wij voor onze proeven watervrije isopropanol als oplosmiddel voor de verrijkte sarin en NH_4F als fluoride, dat beter oplosbaar bleek dan NaF .

Het experiment werd uitgevoerd met de geconcentreerde oplossing van verrijkte sarin, beschreven in de beide vorige paragrafen, met een α_{365}^{25} van $-0,207^\circ$. Eén ml van deze oplossing werd in de polarimeterbuis gemengd met 0,1 ml van een oplossing van NH_4F in water- en peroxidevrije isopropanol (eindconc. NH_4F 0,6 mM, sarin 0,050 M)*. Na sluiten en goed mengen werd de buis, waarvan de temperatuur op $25,0^\circ \pm 0,1$ werd gehouden, in de polarimeter geplaatst. Hierin werd met regelmatige tussenpozen de rotatie bij 365 m μ afgelezen. De eerste meting werd gedaan 5 minuten na het toevoegen van de NH_4F . Aangezien het homogeen verdelen van de NH_4F werd bemoeilijkt door de zeer kleine diameter van de buis was op dat moment de menging waarschijnlijk nog niet volledig. Daarom werd pas na 10 minuten met de eigenlijke

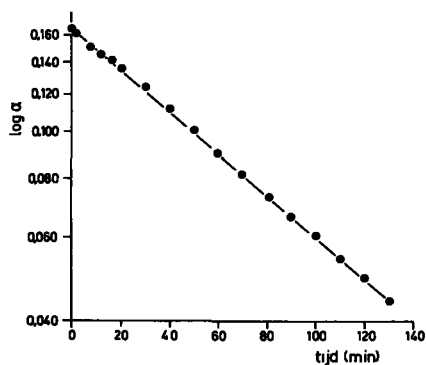


Fig. 29

De racemisatie van optisch actieve sarin onder invloed van NH_4F , gemeten bij 364 m μ
0,05 M sarin; 0,6 mM NH_4F .

meting begonnen. De resultaten hiervan zijn weergegeven in fig. 29, waarin de logaritme van de absolute waarde van de draaiing is uitgezet tegen de tijd.

* De fluoride bepaling werd uitgevoerd in het Chemisch Laboratorium RVO-TNO.

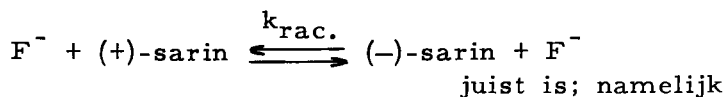
Wij zien dat onder deze omstandigheden de optische rotatie duidelijk afneemt, hetgeen de opvatting dat fluoride ionen racemiserend werken, bevestigt. De afname van de draaiing verloopt als een reactie van de eerste orde met een halveringstijd van 70 minuten.

6.6 Bespreking van de resultaten

De waarneming dat het vluchtige radioactieve materiaal - geïsoleerd uit een oplossing van 1 mM ^{32}P -sarin die gedurende enige minuten was geïncubeerd met ratteplasma - optisch actief was, levert de definitieve bevestiging van de veronderstelling dat plasma-sarinase een voorkeur vertoont voor één van de stereo-isomeren van sarin. Er behoeft namelijk niet aan getwijfeld te worden dat het geïsoleerde materiaal sarin is, zoals o.a. blijkt uit de reactie met cholinesterase, uit de gaschromatografische identificatie en uit het feit dat door een behandeling met NaF een stof werd verkregen die zich niet onderscheidde van rac.sarin.

Uit de optische rotatie en de optische zuiverheid van het aldus verkregen linksdraaiende ^{32}P -sarin preparaat berekenen wij voor de $[\alpha]_{578}^{25}$ van de zuivere stereo-isomeer een waarde van -25° . Boter c.s. (49) geven op grond van de door hen gesynthetiseerde preparaten van optisch actieve sarin, met een optische zuiverheid tussen 54-76%, een waarde van 20° . Het feit dat de twee waarden voor $[\alpha]_{578}^{25}$ onderling 20% verschillen moet waarschijnlijk aan de invloed van het oplosmiddel op de rotatie worden toegeschreven. Boter c.s. gebruikten aceton; in onze experimenten werd isopropanol gebruikt die 10% chloroform en waarschijnlijk nog resten azijnzuur bevatte.

Het verkrijgen van een optisch actieve sarin oplossing werd pas verwezenlijkt toen het vermoeden was gerezen dat fluoride ionen racemiserend zouden werken op sarin en derhalve bij de bereiding dienden vermeden te worden; dit vermoeden kon vervolgens experimenteel worden bevestigd. Hierbij bleek de racemisering in isopropanol, onder invloed van NH_4F , te verlopen als een reactie van de eerste orde. Dit is inderdaad te verwachten, indien het door ons opgestelde reactieschema:



$$\frac{d[(+)\text{-S}]}{dt} = -k_{\text{rac.}} [\text{F}^-] [(+)\text{-S}] + k_{\text{rac.}} [\text{F}^-] [(-)\text{-S}] = -\frac{d[(-)\text{-S}]}{dt}$$

$$\alpha = \left\{ [(+)\text{-S}] - [(-)\text{-S}] \right\} [\alpha]$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = \left\{ \frac{d[(+)\text{-S}]}{dt} - \frac{d[(-)\text{-S}]}{dt} \right\} [\alpha]$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = -2 k_{\text{rac.}} [\text{F}^-] \left\{ [(+)\text{-S}] - [(-)\text{-S}] \right\} [\alpha] = -2 k_{\text{rac.}} [\text{F}^-] \alpha$$

$$\log \alpha / \alpha_0 = -2 k_{\text{rac.}} [\text{F}^-] t \log e.$$

De gemeten (pseudo)-eerste-orde constante $K_{\text{rac.}} = 2 k_{\text{rac.}} [\text{F}^-]$. Op deze wijze berekenen wij uit de resultaten van het racemiseringsexperiment in de polarimeter (6.5.4) een waarde voor $k_{\text{rac.}}$ van $8,5 \text{ liter mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (aannemende dat NH_4F volledig is gedissocieerd).

Boter c.s. (49) verrichtten een soortgelijk experiment met een rechtsdraaiende sarin oplossing (0,08 M) in isopropanol en 0,51 mM NH_4F en vonden een halveringstijd van 15 minuten. Dit betekent een $k_{\text{rac.}}$ van $46 \text{ liter mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Het verschil moet waarschijnlijk geweten worden aan het verschil in effectieve fluoride concentratie. In onze experimenten bevatte de isopropanol oplossing 10% CHCl_3 , waardoor de dissociatie van NH_4F in ionen mogelijk wordt onderdrukt; de aanwezigheid van enig azijnzuur kan eveneens de concentratie F^- -ionen verlaagd hebben, namelijk door het verschuiven van het dissociatie-evenwicht van HF .

Bij het onderzoek van de invloed van incuberen van de verrijkte sarin met NaF op de eigenschappen van het materiaal als substraat voor ratteplasma (6.4.6.1; fig. 26) taxeerden wij de tijd waarin de relatieve verrijking tot de helft was teruggelopen op ca. 11 minuten. Dit experiment werd uitgevoerd met 0,75 mM NaF bij pH 3,3. Rekening houdend met de onvolledige dissociatie van HF ($\text{pK} = 3,14$) vinden wij uit deze gegevens $k_{\text{rac.}} = \text{ca. } 73 \text{ liter mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

De racemiserende werking van F^- -ionen biedt ons een afdoende verklaring voor de oorspronkelijke discrepantie die bestond tussen de resultaten van hydrolyse experimenten in plasma met hoge resp. lage sarin concentraties. De vraag

rijst echter of de racemisering ook bij de lage concentraties nog een factor van betekenis is en zo ja in hoeverre het reactiemechanisme, waarop de berekeningen van k_1 , k_2 en f_2 uit hoofdstuk 5 (5.6) gebaseerd waren, hierdoor aan geldigheid verliest. In fig. 25 zien wij een duidelijke invloed op het hydrolyse-patroon van 0,5 mM NaF. In ratteplasma, dat tevoren was geïncubeerd met 0,1 mM DFP (fig. 12) - en dat dus reeds 0,1 mM F^- bevatte - bleek de hydrolyse van sarin iets sneller te verlopen dan in onbehandeld plasma. De aanwezigheid van 0,075 mM NaF tijdens de hydrolyse van 0,023 mM geracemiseerde verrijkte sarin geeft echter geen aanleiding tot een hydrolysecurve die afwijkt van het normale patroon (fig. 27).

Afwijkingen moeten wij verwachten indien de $k_{rac.}[F^-]$ niet meer mag worden verwaarloosd ten opzichte van k_2 . De hydrolyse van de (-)-sarin verloopt dan immers langs twee wegen (indien wij de spontane hydrolyse buiten beschouwing laten): ten eerste door de directe werking van de sarinase, met reactiesnelheidsconstante k_2 , ten tweede door de omzetting in (+)-sarin, dat snel door sarinase wordt ontleed. Wij mogen aannemen dat $k_1 \gg k_{rac.}[F^-]$, zodat de hydrolyse langs deze weg met een pseudo-eerste-orde snelheidsconstante ($= k_{rac.}[F^-]$) verloopt. Dit betekent echter ook, dat de k_2 , zoals wij die in 5.6 berekend hebben, slechts dan de snelheidsconstante waarmee (-)-sarin door het enzym wordt gehydrolyseerd weergeeft, indien $k_r[F^-]$ ten opzichte van k_2 mag worden verwaarloosd.

Voor een experiment met gedialyseerd ratteplasma en 0,1 mM sarin vonden wij $k_2 = 0,021 \text{ min}^{-1}$ (tabel 7). Indien wij voor $k_{rac.}$ 73 liter $\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ nemen en voor $[F^-]$ de concentratie als 50% van de sarin is gesplitst, wordt $k_{rac.}[F^-] = \text{ca. } 0,004 \text{ min}^{-1}$. De invloed op de bepaling van k_2 is dus gering gezien de nauwkeurigheid van de experimenten.

Bij de hydrolyse van 1 mM sarin in plasma van rat, mens en muis lijkt de reactie, afgezien van het initiële gedeelte, in deze drie plasmasoorten ongeveer even snel te verlopen, alsof niet het sarinase-gehalte maar een andere factor de reactiesnelheid bepaalt, bijvoorbeeld de racemiseringssnelheid. In deze reacties is de K_2 ca. $0,150 \text{ min}^{-1}$, en $k_{rac.}[F^-]$, berekend als boven, ongeveer $0,036 \text{ min}^{-1}$. De indruk dat de omzetting van (-)- in (+)-sarin de snelheidsbepalende stap is in deze experimenten is dus niet juist, indien voor $k_{rac.}$ de correcte waarde werd gebruikt.

Bij de bepaling van k_1 en k_2 uit de experimenten met 10 x verdund gedialyseerd ratteplasma en 0,1 mM sarin werd gevonden $k_1 = 0,247 \text{ min}^{-1}$, en $k_2 = 0,017 \text{ min}^{-1}$. Voor onverdund, gedialyseerd ratteplasma bedroeg de k_2 ca. $0,021 \text{ min}^{-1}$, dus geenszins een factor 10 hoger, zoals men theoretisch zou verwachten. De k_1 voor het onverdunde plasma kan niet met enige nauwkeurigheid worden bepaald; uit het feit dat binnen 1 minuut meer dan 50% van de sarin is gehydrolyseerd kan echter worden afgeleid dat deze minstens $1,4 \text{ min}^{-1}$ moet bedragen. De factor 10 verschil lijkt bij k_1 dus wel aanwezig. Het geringe verschil in de k_2 -waarden zou verklaard zijn, indien in de tweede fase van de reactie voornamelijk de racemisering en niet de hydrolyse van (-)-sarin werd gemeten. De $k_{\text{rac.}} [\text{F}^-]$ bedraagt echter slechts $0,004 \text{ min}^{-1}$ en een correctie van deze orde van grootte heft de discrepantie niet op. Weliswaar wordt het verschil in reactiesnelheid van beide isomeren ca. 18 in plaats van 14, doch de resultaten met het onverdunde plasma wijzen erop dat dit verschil waarschijnlijk aanzienlijk groter is (namelijk minstens een factor 70).

Ook het feit dat de extrapolatie naar $t = 0$ voor de hydrolysecurven verkregen bij incubatie van 0,1 mM sarin met cavia- resp. verdund ratteplasma (dus bij lage sarinase-activiteit) aangeeft dat ca. 60% in plaats van 50% van de oorspronkelijke sarin langzaam gehydrolyseerd zou worden (zie tabel 8), zou verklaard kunnen worden, indien gedurende de hydrolyse de racemisering een factor van belang was, doch ook hiervoor is de berekende racemiseringssnelheid te gering. Wij beschikken echter niet over een directe bepaling van de $k_{\text{rac.}}$ onder de omstandigheden van de hydrolyse-experimenten. Mogelijk is de gebruikte waarde voor $k_{\text{rac.}}$, slechts éénmaal bepaald onder afwijkende omstandigheden, niet representatief voor de reacties in plasma. Verder onderzoek naar de racemisering onder invloed van fluoride ionen lijkt dan ook gewenst; wellicht zullen de resultaten bovenvermelde discrepanties kunnen opheffen.

Indien de racemisering van sarin onder invloed van fluoride ionen inderdaad verloopt volgens het in 6.4.6 weergegeven $\text{S}_\text{N}2$ -mechanisme, duidt dit op een grote affiniteit van het fluoride ion voor het centrale fosforatoom. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Dostrowsky en Halmann (56) die vonden dat fluoride een opvallende reactiviteit bezit ten opzichte van de fosforylgroep en met recente bevindingen van

Heilbronn (57), die heeft aangetoond dat de affiniteit van fluoride ionen voor het fosforatoom in de cholinesterase-remmer tabun van dien aard is, dat in waterige oplossing een reactie kan verlopen waarin de cyanide groep wordt afgesplitst als CN^- en vervangen door F. Ook de reactivering door NaF van cholinesterasen, die geremd zijn met organische fosforverbindingen (58), kan als een aanwijzing voor het bestaan van deze affiniteit worden beschouwd; in dit geval kan men echter ook denken dat de reactivering een gevolg is van een directe interactie van NaF met het enzym. Het is namelijk bekend dat zowel AcChE als BuChE geremd worden door NaF (59).

In dit verband is het van belang na te gaan in hoeverre remming of reactivering door NaF de resultaten kan hebben beïnvloed van onze experimenten, waarin de reactie met AcChE werd bestudeerd van verrijkte sarin, die tevoren met NaF was geïncubeerd. Volgens Heilbronn (59) wordt AcChE voor ca. 30% geremd door 1 mM NaF (25°, pH 7,4). In onze experimenten werd de verrijkte sarin geïncubeerd met 2,2 mM NaF. Voor de daaropvolgende reactie met AcChE werd het incubatiemengsel echter ongeveer 10.000 maal verdund, zodat een storende invloed van het fluoride op de reactie van AcChE met sarin uitgesloten kan worden geacht. Ditzelfde geldt ook voor een eventuele reactivering van het door sarin geremde AcChE; Heilbronn vermeldt namelijk een reactivering van 34%, bereikt in 45 minuten bij 1 mM NaF (bij 37°, pH 7,4).

De hydrolyse van tabun in ratteplasma is volgens Hoskin en Trick (9) een stereospecifieke reactie. Met 25 x verdund plasma en 5 mM tabun namen deze onderzoekers in de Warburg (25 mM bicarbonaat) een bifasisch reactieverloop waar. In deze experimenten was de verhouding tussen de zuiver enzymatische en de spontane hydrolyse echter zeer ongunstig; gedurende vrijwel de gehele reactie was de laatste groter dan de eerste. Bovendien blijkt bij een analyse van de resultaten dat de tabun slechts ca. 40% van de component zou bevatten die snel wordt gehydrolyseerd, terwijl de auteurs vermelden dat de totale langzame hydrolyse een snelheidsconstante had die 5 x zo klein was als die van de spontane hydrolyse. Het is dan ook twijfelachtig of deze resultaten als een reëel argument voor een stereospecifieke werking van de "tabunase" mogen worden gebruikt.

Augustinsson (16) verrichtte soortgelijke experimenten, eveneens met 5 mM tabun, waarbij echter het plasma nauwe-

lijks werd verdund en dus de verhouding tussen de enzymatische en de spontane hydrolyse veel gunstiger lag. De resultaten van dit grondige onderzoek wezen uit dat de enzymatische hydrolyse van tabun in ratteplasma verloopt alsof het substraat bestaat uit ongeveer gelijke delen van twee componenten, die met verschillende snelheden worden gesplitst. Hetzelfde verschijnsel deed zich voor bij de hydrolyse onder invloed van een gezuiverd preparaat van de "fosforylfosfatase" uit varkensnier en -lever; aangetoond werd dat de voorkeur van het plasma-enzym en van het enzym uit de nier naar dezelfde component uitging. Daarentegen verliep de hydrolyse in konijnplasma en die onder invloed van het gezuiverde enzym uit menseplasma alsof tabun uit slechts één component bestond. Deze resultaten stemmen, wat het ratteplasma betreft, overeen met hetgeen wij vonden voor sarin. Ten opzichte van sarin vertoonde echter ook menseplasma een duidelijke stereospecificiteit; er bestaan evenwel aanwijzingen dat dit plasma een tweede "sarinase" bevat (zie 5.6). Mogelijk is dit enzym, waarvan ten opzichte van sarin geen stereospecificiteit werd waargenomen (zie fig. 4), in hoofdzaak verantwoordelijk voor de hydrolyse van tabun, hetzij door een grote activiteit ten opzichte van tabun, of doordat bij de zuivering (voornamelijk) op dit enzym werd geselecteerd.

Tegen de door Hoskin en Trick verrichte proeven, waarin de hydrolyse van 50 mM tabun onder de invloed van 10 x verdund ratteplasma verliep in 0,1 M bicarbonaat in een polarimeterbuis, zijn soortgelijke bedenkingen aan te voeren als tegen hun Warburg experimenten. Hierbij werd waargenomen dat, in vergelijking met de uitgangsoplossing, voorbijgaand een negatieve optische rotatie optrad, die maximaal ca. $-0,30^\circ$ bedroeg (α_D ; $l \approx 40$ cm). Indien tabun dezelfde molaire rotatie zou hebben als sarin, zou de $[\alpha]_D$ voor tabun ca. 22° (abs) bedragen; een draaiing van $-0,30^\circ$ zou dan betekenen, dat op het moment van de meting in de oplossing een overmaat van 22 mM van de linksdraaiende isomeer aanwezig was, bij een aanvangsconcentratie van 50 mM rac. tabun. Gezien de relatief zeer grote spontane hydrolyse in deze experimenten moet dit voor onmogelijk worden gehouden.

In ons experiment met tabun, waarin de omstandigheden veel gunstiger waren voor een stereospecifieke hydrolyse (zie 6.3), kon geen enkele verandering in de optische rotatie worden waargenomen. Augustinsson was evenmin in staat de resul-

taten van Hoskin en Trick te reproduceren, doch bij deze onderzoeker stonden technische moeilijkheden een betrouwbare meting van de rotatie in de weg. Al met al lijkt het weinig waarschijnlijk dat de door Hoskin en Trick gevonden optische activiteit mag worden toegeschreven aan de stereospecifieke werking van "tabunase".

In verband met de bezwaren die tegen de overige resultaten van deze auteurs aangevoerd kunnen worden, is het onzeker, welke waarde toegekend moet worden aan de mededeling dat de toxiciteit van het incubatiemengsel van tabun met ratteplasma sneller afnam dan verwacht werd op grond van de CO_2 -produktie in de Warburg, waaruit de hoeveelheid gehydrolyseerde tabun werd berekend. Hieruit werd geconcludeerd dat in ratteplasma de meest giftige stereo-isomeer van tabun het snelst wordt afgebroken. Volgens ons onderzoek bestaat bij sarin de omgekeerde situatie, hetgeen goed aansluit bij de resultaten van Ooms en Boter (61) die voor een serie optisch actieve S-alkyl p-nitrofenyl methylfosfonothiolaten vonden, dat steeds de minst giftige enantiomeer - namelijk die met de laagste anticholinesterase-activiteit - het snelst werd afgebroken door "paraoxonase" uit schapeserum. Tabun zou zich dus in dit opzicht misschien onderscheiden van sarin en genoemde fosfonothiolaten, hetgeen voorshands niet uitgesloten kan worden gezien de afwijkende samenstelling van het tabunmolecuul, waardoor deze stof niet zonder meer is te vergelijken met de andere verbindingen.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Literatuur

Sarin is één van de organische fosforverbindingen met sterk cholinesterase-remmende eigenschappen die wel zenuwgassen worden genoemd. Van een aantal van deze over het algemeen zeer giftige stoffen is het bekend dat de hydrolyse wordt gekatalyseerd door enzymen die zijn aangetroffen in een aantal organen, zoals de lever, de nier en in het bloed van verscheidene diersoorten (1-17). Afhankelijk van het substraat dat door de verschillende onderzoekers werd gebruikt, werden deze enzymen sarinases, tabunases of DFP-asen genoemd; er bestaan echter aanwijzingen dat dit onderscheid kunstmatig is. Tijdens de hydrolyse worden de zenuwgassen omgezet in niet-giftige producten. Hoewel pogingen tot zuivering zijn beschreven hebben deze niet geleid tot een definitieve karakterisering van één van deze enzymen.

Sarin bevat een asymmetrisch fosforatoom en komt in twee stereo-isomere vormen voor; deze zouden zich in reacties met enzymen verschillend kunnen gedragen. Adie c.s. (10) trachtten aan te tonen dat de hydrolyse van sarin onder invloed van ratteplasma-sarinase stereospecifiek verloopt, doch waren hiertoe niet in staat. Daarentegen vonden Michel (28) en Ooms (42) duidelijke aanwijzingen, dat bij de remming van acetylcholinesterase (AcChE) de twee isomeren van sarin zich wel verschillend gedragen en constateerde Berends (30) dat de stereo-isomerie van sarin de reactivering en de veroudering van butyrylcholinesterase (BuChE), dat geremd is met sarin, merkbaar beïnvloedt.

Eigen onderzoek

In onze onderzoeken werd in vitro de hydrolyse van sarin in plasma bestudeerd in concentraties die eventueel (bij vergiftigingen) ook in vivo zouden kunnen voorkomen, namelijk ca. 0,1 mM.

- Om in staat te zijn het verloop van de reactie bij een dergelijke, lage concentratie te volgen werd radioactieve ^{32}P -sarin gebruikt en werd een methode ontwikkeld waarmee gehydrolyseerde sarin (hydroxysarin) gescheiden werd van sarin, waarna de hoeveelheden uit radioactiviteitsmetingen berekend konden worden. Bij de scheidingsmethode werd gebruik gemaakt van het feit dat sarin vluchtig is, in tegenstelling tot hydroxysarin. Gedurende de reactie werden uit het mengsel van ^{32}P -sarin en plasma (of een ander medium) in snelle opeenvolging monsters genomen, waarin de hydrolyse van sarin terstond tot stilstand werd gebracht door aanzuren en invriezen; vervolgens werd in vacuo de niet omgezette sarin door sublimeren verwijderd en de radioactiviteit van het residu gemeten. De bruikbaarheid van deze methode werd experimenteel aangetoond. Hierbij bleek dat praktisch alle niet-vluchtige ^{32}P , aanwezig in plasma dat met 0,1 mM ^{32}P -sarin was geïncubeerd, uit hydroxysarin bestond; slechts een gering percentage van de oorspronkelijk toegevoegde ^{32}P bleek aan eiwit gebonden te worden. Bij een concentratie van 0,01 mM ^{32}P -sarin evenwel lag dit percentage hoger en kon dit, vooral bij ratteplasma, niet meer verwaarloosd worden.
- 2.2.1
- 3.3
tabel 1
- tabel 2, 3
- 3.2
- Andere radioactieve verbindingen, afkomstig van ^{32}P -sarin, werden niet gevonden.
- fig. 2, 4
- Op deze wijze werd de hydrolyse bestudeerd van 0,1 mM ^{32}P -sarin in enkele plasma-soorten. Bij ratte-, mense- en muizeplasma vertoonden de hydrolysecurven een duidelijke knik; in ongeveer 1 minuut werd ca. 50% van de sarin gehydrolyseerd, doch de omzetting van de rest verliep met een veel geringere snelheid.
- tabel 6
- fig. 2, 4
- Door incuberen met 1 mM parahydroxymercu-ribenzooat (pHMB) wordt de sarinase-activiteit in plasma vrijwel volledig geremd. Wanneer een dergelijk plasma met sarin werd geïncubeerd, werd de knik in de hydrolysecurve niet waargenomen. Dit leidde tot de conclusie dat de sarinase verantwoordelijk was voor het bifasische verloop van de hydro-

lysecurven. Een zeer aannemelijke verklaring leek de veronderstelling dat sarinase een onderscheid zou maken tussen de twee stereo-isomeren van sarin, waardoor de enzymatische hydrolyse van de ene isomeer aanzienlijk sneller zou verlopen dan die van de andere.

Deze veronderstelling werd door een aantal experimentele resultaten gesteund.

- tabel 5
fig. 2, 7, 8 a) Het voorkomen van een knik in de hydrolysecurve was afhankelijk van de sarinase-activiteit. Naarmate deze hoger was kwam het bifasische verloop van de hydrolyse meer tot uiting.
- fig. 13-16 b) In de tweede fase verliep de hydrolyse als een reactie van de eerste orde, hetgeen verwacht werd voor een enzymatische reactie (K_M voor sarin $\approx 0,01$ M).
- tabel 8 c) Het totale verloop van de hydrolyse kon worden verklaard door aan te nemen dat het substraat uit twee componenten bestond die gelijktijdig, doch met verschillende snelheid, werden omgezet.
- fig. 10 d) Uit een kinetische analyse volgde dat deze twee componenten in het uitgangsmateriaal vrijwel exact in een 1:1 verhouding aanwezig moesten zijn.
- fig. 11 e) De hydrolyse in ratteplasma van het eveneens asymmetrisch gebouwde zenuwgas soman verliep bifasisch; die van het symmetrische DFP daarentegen niet.

- Niet verklaard kon echter worden het feit dat bij hogere sarin concentraties het bifasische karakter van de hydrolyse minder uitgesproken was of zelfs geheel niet meer werd waargenomen. Bij 1 mM sarin vertoonde slechts de hydrolysecurve voor ratteplasma nog een duidelijke knik; in een experiment met 10 mM sarin werd ook bij ratteplasma geen aanwijzing meer gevonden voor een bifasisch verloop van de hydrolyse (cf. Adie c.s.; ref. 10). Toen getracht werd het directe bewijs voor een stereospecifieke enzymatische hydrolyse van sarin in ratteplasma te leveren door de reactie in een polarimeterbuis te laten verlopen, werd niet waargenomen dat er tijdens de hydrolyse een verandering in de optische rotatie optrad; ook voor dit experiment werd een hoge
- fig. 8
 - fig. 1
 - 6.3

sarin concentratie gebruikt, namelijk 50 mM. De voorlopige conclusie was dat de hydrolyse van sarin in plasma waarschijnlijk stereospecifiek verloopt, doch dat dit door een nog onbekende oorzaak uitsluitend bij lage substraat concentraties tot uiting kan komen.

Het verdere onderzoek werd derhalve met deze concentraties verricht; hierin werden de eigenschappen bestudeerd van de niet-omgezette sarin, die in een incubatiemengsel van plasma met sarin overbleef nadat de snelle initiële hydrolyse verlopen was. Dit materiaal werd door vriesdrogen geïsoleerd uit ratteplasma dat was geïncubeerd met 1 mM ^{32}P -sarin en na 4 min. was aangezuurd en ingevroren. De aldus verkregen oplossing zou voornamelijk de stereo-isomeer van sarin moeten bevatten, die door sarinase langzaam wordt gehydrolyseerd.

fig. 17 Inderdaad bleek van deze "verrijkte" sarin slechts ca. 20% door ratteplasma snel gehydrolyseerd te worden. Acetylcholinesterase werd door een
fig. 19 ongeveer equimolaire hoeveelheid van deze sarin beter geremd dan door de overeenkomstige hoeveelheid rac. sarin. Ook werden de eigenschappen van butyrylcholinesterase, die geremd was met resp. "verrijkte" en rac. ^{32}P -sarin onderzocht. Bij de remming toont dit enzym vrijwel geen voorkeur voor één van de isomeren van sarin (30, 49), maar volgens Berends (30) reageren de door de twee stereo-isomeren geremde enzymen met verschillende snelheden bij de reactivering door oximen en bij de zogenaamde veroudering (zie fig. 21). Onze resultaten bevestigden deze bevindingen.

fig. 22-24 Het enzym dat geremd was met rac. sarin vertoonde een bifasische reactie met monoisonitrosoacetone (MINA), waarbij ca. 50% snel werd gereactiveerd; ongeveer de helft van het geremde enzym "verouderde" met een meetbare snelheid. Het enzym dat geremd was met de "verrijkte" sarin bleek echter voor ruim 80% uit de snel te reactiveren component te bestaan, terwijl ook het gehalte aan geremd enzym dat ontvankelijk was voor "veroudering" ver boven de 50% lag.

fig. 18

Ook sarin, geïsoleerd uit een oplossing van 1 mM ^{32}P -sarin die gedurende enige minuten was gefincubeerd met mense- resp. muizeplasma, bleek relatief rijker te zijn aan de component die door ratteplasma langzaam wordt gehydrolyseerd. Deze resultaten steunden de veronderstelling, dat in de "verrijkte" sarin de beide stereo-isomeren niet in equimolaire hoeveelheden aanwezig waren, en dus, dat bij de hydrolyse van sarin in plasma een stereospecifieke reactie betrokken was.

fig. 25

fig. 28

fig. 26, 27

Het feit dat bij hogere concentraties sarin de hydrolyse in plasma niet met een aantoonbare stereospecificiteit verliep kon worden verklaard, toen was aangetoond dat fluoride ionen een snelle racemisering van sarin teweegbrengen. Indien een waterige oplossing van "verrijkte" sarin met natrium fluoride werd gefincubeerd (bijv. 30 min met 1 mM NaF) verkreeg dit materiaal weer de eigenschappen van rac.sarin, zoals bleek uit de hydrolyse in ratteplasma en uit het verloop van de reactie met acetylcholinesterase. De mate van de racemisering was afhankelijk van zowel de fluoride concentratie als van de duur van de incubatie.

Geschat kon worden dat bij 1 mM NaF de relatieve verrijking (overmaat van de ene stereo-isomeer) in ca. 8 min tot de helft terugliep.

Fluoride ionen komen vrij bij de hydrolyse van sarin. Hierdoor zal in experimenten met sarin in concentraties van 0,01 M en hoger lang voordat de helft van de sarin is gehydrolyseerd de concentratie aan fluoride ionen reeds zo groot worden, dat de racemisering van de nog niet omgezette sarin een eventuele stereospecifieke hydrolyse volledig zal maskeren. Op grond van deze overwegingen moest geconcludeerd worden dat het aantonen van een optische rotatie door een directe meting in de polarimeter tijdens de hydrolyse van sarin in plasma niet mogelijk was, aangezien voor een meetbare optische activiteit vrij hoge concentraties sarin gebruikt zouden moeten worden. Het bleek echter wel mogelijk een oplossing van sarin met een meetbare optische activiteit te verkrijgen door de "verrijkte" sarin te con-

centreren onder omstandigheden waarin zowel de vorming als de aanwezigheid van fluoride ionen zoveel mogelijk werd beperkt. Hiervoor werd de sarin uit een waterige oplossing van "verrijkte" sarin geëxtraheerd met chloroform en vervolgens werd het extract onder verminderde druk geconcentreerd. Deze geconcentreerde sarin oplossing (0,05 M) bleek het polarisatievlak van licht naar links te draaien ($\alpha_{578}^{25} = -0,07^\circ$; $\alpha_{365}^{25} = -0,21^\circ$). Uit het verloop van de reactie van dit materiaal met acetylcholinesterase kon de optische zuiverheid worden bepaald, waarna uit de gemeten optische rotatie kon worden berekend dat $[\alpha]_{578}^{25} = 25^\circ$ (abs).

fig. 29

Nadat uit de geconcentreerde oplossing de chloroform grotendeels was verwijderd en vervangen door isopropanol, werd ammonium fluoride toegevoegd (tot een concentratie van 0,6 mM) en de racemisering van de sarin gevolgd in de polarimeter. Deze bleek te verlopen als een reactie van de eerste orde met een halveringstijd van 70 min ($k_{rac.} = 8,5 \text{ liter mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Door deze resultaten was zowel het directe bewijs voor de stereospecifieke werking van plasmasarinase geleverd, als ook de discrepantie tussen de uitkomsten van de experimenten bij lage resp. hoge sarin concentraties verklaard.

De belangrijkste conclusies die uit dit onderzoek getrokken konden worden, zijn hieronder samengevat:

	(-)-sarin	(+)-sarin
hydrolyse in ratte-, mense- en muizeplasma	langzaam	snel
remming van AcChE	snel	langzaam
remming van BuChE	geen grote verschillen	
reactivering door MINA van geremd BuChE	snel	langzaam
veroudering van geremd BuChE	snel	langzaam

Nabeschouwing

Op grond van de door ons gevonden stereospecificiteit van plasma-sarinase (27) kon Heilbronn (60) een verklaring geven van het door haar gevonden verschijnsel dat ongezuiverde butyrylcholinesterase in menseplasma, na remming door sarin, sneller gereactiveerd wordt en sneller veroudert dan het overeenkomstige gezuiverde enzym. Dit kon verklaard worden door aan te nemen dat de sarinase in het ongezuiverde preparaat snel één der isomeren van sarin omzet, waardoor butyrylcholinesterase in dit preparaat voornamelijk met die isomeer reageert, die een snel "verouderend" en snel te reactiveren geremd enzym geeft, terwijl het gezuiverde enzym met beide isomeren zal reageren. Dat deze vormen van geremd enzym ontstaan is in overeenstemming met de door ons gevonden resultaten.

Ooms en Boter (61) vonden voor een aantal door hen gesynthetiseerde stereo-isomeren van p-nitrofenylfosfonaten dat de meest toxische isomeer het minst snel door het enzym paraoxonase uit schape-serum wordt gehydrolyseerd. Deze reactie verloopt dus geheel analoog aan die tussen sarin en sarinase uit plasma.

Uit het feit dat de remming van acetylcholinesterase door rechtsdraaiende sarin ca. 4000 maal minder sterk is dan die onder invloed van de linksdraaiende isomeer, kan men concluderen dat de eerstgenoemde nauwelijks giftig is. Op grond hiervan zal dus in vivo van sarinase geen duidelijke ontgiftigende werking te verwachten zijn aangezien de linksdraaiende isomeer van sarin vrij langzaam wordt afgebroken. Slechts in combinatie met een snelle racemisering, zoals die door fluoride ionen kan ontstaan, zou een gunstig effect van de aanwezigheid van sarinase te verwachten zijn.

Albanus c.s. (62) vermelden dat zij een verlaging van de toxiciteit van sarin vonden, indien de proefdieren tevoren met NaF werden ingespoten. Dit zou toegeschreven kunnen worden aan een racemi-

serende werking van het fluoride, die tot een effectievere ontgifting door sarinase zou leiden. De auteurs zelf schrijven dit effect toe aan de reactivering door NaF van geremde cholinesterasen. Een argument ten gunste van hun verklaring is dat een dergelijke ontgifting door NaF ook gevonden werd ten aanzien van een organische fosforverbinding die volgens Tammelin (63) in bloedplasma niet aan een enzymatische hydrolyse onderhevig is.

SUMMARY

The organophosphorus compound sarin (isopropyl methylphosphonofluoridate) belongs to a group of very effective cholinesterase inhibitors, so-called nerve gases.

Sarin contains an asymmetric phosphorus atom. According to Michel (28) and Ooms (42) only one of the two stereoisomers reacts rapidly with acetylcholinesterase (AcChE). Berends (30) could explain the results obtained in his experiments on reactivation and "ageing" of sarin-inhibited butyrylcholinesterase (BuChE) only on the basis of the asymmetry of the phosphorus atom of the phosphorylated enzyme.

table 5 The hydrolysis of sarin is catalysed by enzymes present in blood and several other organs of the animal body; their activity can be inhibited by p-hydroxymercuribenzoate (pHMB). According to Adie
table 6 et al. (10) the hydrolytic action on sarin of "sarinase" in rat plasma is not stereospecific.

In our experiments the hydrolysis of low concentrations of sarin in plasma was investigated using ^{32}P -labelled sarin. For the determination of the percentage hydrolysis advantage was taken of the fact that sarin is volatile but its hydrolysis product (hydroxysarin) is not; during the incubation of sarin with plasma samples were taken at short intervals which were acidified and frozen instantaneously to terminate the hydrolysis. Non-hydrolysed sarin was removed by lyophilization and the residual radioactivity was determined and used as a measure for the amount of hydroxysarin formed. The reliability of this method was shown in control experiments.

table 2, 3 In experiments with 0.1 mM ^{32}P -sarin, the concentration mostly used, ^{32}P -hydroxysarin accounted for practically all non-volatile ^{32}P ; only a few per cent of the radioactivity remaining after lyophilization originated from ^{32}P bound to plasma proteins.

In blood plasma incubated with 0.01 mM ^{32}P -sarin however, the fraction of the ^{32}P that became bound to proteins could not be neglected and had to be taken into account when interpreting the hydrolysis graphs. This was especially the case when rat plasma was used.

fig. 2, 4 When studied with this technique, the hydrolysis of 0.1 mM ^{32}P -sarin in plasma from rat, man and mouse, was found to follow a biphasic course: about 50% of the sarin was converted into hydroxy-sarin within one minute (the interval after which the first sample could be taken) while the hydrolysis of the remainder proceeded at a much lower rate. However, if prior to the addition of sarin the plasma of the three species mentioned had been incubated with 1 mM pHMB (which inhibited the sarinase activity) a rapid hydrolysis of about 50% of the sarin was not observed. This phenomenon was explained on the assumption that sarinase was responsible for the biphasic course of the hydrolysis in pHMB untreated plasma, due to a stereospecific action of this enzyme. The results of several experiments supported this hypothesis.

table 5 a) The biphasic character of the hydrolysis curve was dependent on the sarinase activity of the plasma; the higher the activity, the more pronounced was the deflection of the curve at about 50% hydrolysis.

fig. 2, 7, 8 b) During the second stage of the reaction first-order kinetics were observed, as was to be expected for sarinase catalysed hydrolysis, since the K_M for sarin ≈ 0.01 M.

fig. 13-16 c) The overall course of the hydrolysis was consistent with the presence of two substrates hydrolysed simultaneously, but at different rates.

table 8 d) Kinetic analysis of the graphs indicated that the starting material contained both substrates in an almost exact 1:1 ratio.

fig. 10 e) The hydrolysis in rat plasma of the nerve gas soman which is also asymmetric followed a biphasic pattern, in contrast to the hydrolysis of the symmetrical organophosphate DFP.

fig. 11

fig. 7, 8
fig. 1

However, when higher concentrations of sarin were used, the hydrolysis curves were only slightly biphasic, or not biphasic at all. At 1 mM the hydrolysis of sarin in rat plasma still followed a biphasic course, but not at 10 mM. An experiment in which 50 mM sarin was incubated with rat plasma in a polarimeter tube did not provide evidence for a stereospecific hydrolysis since no change of the optical rotation was observed. Apparently the assumed stereospecific action of plasma-sarinase could only be detected at low substrate concentrations.

Next the properties were investigated of the non-hydrolysed sarin, which remained in an incubation mixture of plasma and a low concentration of sarin after the fast initial hydrolysis had occurred. This material was isolated by sublimation from rat plasma that was acidified and frozen after 4 minutes of incubation with 1 mM ^{32}P -sarin.

fig. 17

fig. 19

It was assumed that the sarin thus obtained consists predominantly of the stereoisomer that is hydrolysed by sarinase at the lower rate. It appeared that only 20% of this so-called enriched sarin was hydrolysed within one minute by rat plasma. Enriched sarin proved to be a better inhibitor for AcChE than racemic (rac.) sarin, when tested under identical conditions. A comparison was made of the properties of BuChE, inhibited with enriched and with rac. sarin respectively. The two stereoisomers of sarin react with this enzyme at about the same rate; the resulting stereoisomeric inhibited enzymes (D- and L- with respect to the phosphonyl substituent), however, are reported to react at a different rate on reactivation by oximes and on "ageing" (see fig. 21).

fig. 22-24

In our experiments BuChE inhibited with rac. sarin was reactivated by MINA in a biphasic reaction; approximately 50% of the enzymatic activity could be restored very rapidly. About half of the inhibited enzyme was susceptible to "ageing". On the other hand BuChE inhibited with "enriched" sarin contained over 80% of the component that was readily reactivated by MINA and substantially more than 50% of this inhibited enzyme was susceptible to "ageing".

fig. 18

Also sarin which was isolated from a solution of 1 mM ^{32}P -sarin in plasma of man or mouse after a few minutes of incubation appeared to be relatively rich in the component that was hydrolysed slowly by rat plasma. These results supported the assumption that "enriched" sarin contained unequal amounts of the two stereoisomers and consequently, that the hydrolysis in plasma involved a stereospecific reaction.

fig. 25

fig. 28

fig. 26, 27

The discrepancy between the results obtained with 0.1 mM sarin and those with high concentrations of sarin could be explained after the observation was made that fluoride ions bring about a racemisation of sarin. When an aqueous solution of "enriched" sarin was incubated with NaF for 30 minutes with 1 mM NaF, the resulting material was identical to rac.sarin, as found for the hydrolysis by rat plasma and its reaction with AcChE. The rate of racemisation was found to depend on the concentration of fluoride and on the incubation time. In 1 mM NaF the excess of one stereoisomer decreased with a half life of approximately 8 minutes. Fluoride ions are liberated when sarin is hydrolysed. At the higher concentration of sarin sufficient fluoride ions will be released to cause a rapid racemisation which will mask the stereospecific course of the enzymatic hydrolysis.

Under these conditions no optical rotation will be found. It should be possible however, to obtain a solution with a measurable optical rotation by concentrating the "enriched" sarin under conditions in which the formation, as well as the presence of fluoride ions was minimized. Therefore an aqueous solution of "enriched" sarin was extracted with chloroform. After concentration of the solution it appeared to be laevorotatory ($\alpha_{578}^{25} = -0.07^\circ$, $\alpha_{365}^{25} = -0.21^\circ$).

From the kinetics of the reaction of this material with AcChE the optical purity could be determined. By combining this figure with the optical rotation an $[\alpha]$ of 25° (abs.) could be calculated.

fig. 29

After replacement of the major part of the chloroform by isopropanol and addition of NH_4F to a final concentration of 0.6 mM the course of the racemisation could be observed in a polarimeter. It appeared to follow first-order kinetics with a half-life of 70 min. ($k_{\text{rac.}} = 8.5 \text{ litres mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

These results provided direct proof of the stereospecific action of sarinase; they also explain the apparent discrepancies between the findings obtained in experiments with low and with high concentrations of sarin.

The following table summarizes the main results:

	(-) sarin	(+) sarin
hydrolysis in plasma from rat, man and mouse	slow	fast
inhibition of AcChE	fast	slow
inhibition of BuChE	no great differences	
reactivation with MINA of inhibited BuChE	fast	slow
ageing of inhibited BuChE	fast	slow

LITERATUUR

- 1) A. Mazur en O. Bodansky, J. Biol. Chem. 163 (1946) 261.
- 2) A. Mazur, J. Biol. Chem. 164 (1946) 271.
- 3) L.A. Mounter, C.S. Floyd en A. Chanutin, J. Biol. Chem. 204 (1953) 221.
- 4) L.A. Mounter en A. Chanutin, J. Biol. Chem. 204 (1953) 837.
- 5) L.A. Mounter en A. Chanutin, J. Biol. Chem. 210 (1954) 219.
- 6) J.J. O'Neill, Proefschrift, Ann Arbor University Michigan, 1955.
- 7) J.J. O'Neill, T. Wagner-Jauregg, Y. Snider, C. Castle en M. Stolberg, Fed. Proc. 14 (1955) 261.
- 8) J.A. Cohen en M.G.P.J. Warringa, Biochim. Biophys. Acta 26 (1957) 29.
- 9) F.C.G. Hoskin en G.S. Trick, Can. J. Biochem. Physiol. 33 (1955) 963.
- 10) P.A. Adie, F.C.G. Hoskin en G.S. Trick, Can. J. Biochem. Physiol. 34 (1956) 80.
- 11) P.A. Adie, Can. J. Biochem. Physiol. 36 (1958) 15.
- 12) K.B. Augustinsson en G. Heimbürger, Acta Chem. Scand. 8 (1954) 753.
- 13) K.B. Augustinsson en G. Heimbürger, Acta Chem. Scand. 8 (1954) 1533.
- 14) K.B. Augustinsson en G. Heimbürger, Acta Chem. Scand. 9 (1955) 310.
- 15) K.B. Augustinsson en G. Heimbürger, Acta Chem. Scand. 9 (1955) 383.
- 16) K.B. Augustinsson, Acta Chem. Scand. 11 (1957) 1371.
- 17) K.B. Augustinsson en J.E. Casida, Biochem. Pharmacol. 3 (1960) 60.
- 18) W.N. Aldridge, Biochem. J. 53 (1953) 117.
- 19) E.G. Erdös en L.E. Boggs, Nature 190 (1961) 716.
- 20) E.L. Becker en J.F. Barbaro, Biochem. Pharmacol. 13 (1964) 1219.
- 21) K.B. Augustinsson, J. Histochem. and Cytochem. 12 (1964) 744.
- 22) A.R. Main, Biochem. J. 75 (1960) 188.
- 23) P.A. Adie, Can. J. Biochem. Physiol. 34 (1956) 1091.
- 24) E.M. Cohen, P.J. Christen en E. Mobach, Biochem. Pharmacol. 8 (1961) 120.

- 25) E.M. Cohen, P.J. Christen en E. Mobach, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 10 (1962) 273.
- 26) P.J. Christen en E.M. Cohen, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 13 (1965) 191.
- 27) P.J. Christen en E.M. Cohen, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 12 (1963) 286.
- 28) H.O. Michel, *Fed. Proc.* 14 (1955) 255.
- 29) F. Berends, Proefschrift, Rijksuniversiteit Leiden, 1964.
- 30) F. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* 81 (1964) 190.
- 31) J.B. Reesor, B.J. Perry en E. Sherlock, *Can. J. Chem.* 38 (1960) 1416.
- 32) B. Gehauf, J. Epstein, G.B. Wilson, B. Witten, S. Sass, V.E. Bauer en W.H.C. Rueggeberg, *Anal. Chem.* 29 (1957) 278.
- 33) C.S. Hanes en F.A. Isherwood, *Nature* 164 (1949) 1107.
- 34) H.A. Krebs en K. Henseleit, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 210 (1932) 33; 217 (1933) 191.
- 35) F.C.G. Hoskin, *Can. J. Biochem. Physiol.* 34 (1956) 75.
- 36) L.W. Harris, L.M. Braswell, J.P. Fleisher en W.J. Cliff, *Biochem. Pharmacol.* 13 (1964) 1129.
- 37) J.A. Cohen en M.G.P.J. Warringa, *J. Clin. Invest.* 33 (1954) 459.
- 38) E.M. Cohen, P.J. Christen en E. Mobach, in voorbereiding.
- 39) R.L. Polak, E.M. Cohen en M.M. Meeuws, in voorbereiding.
- 40) P.J. Christen en E.M. Cohen, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* ter perse.
- 41) H. Cerfontain en G.M.F.A. van Aken, MBL rapport 1955, nr. 26.
- 42) A.J.J. Ooms, Proefschrift, Rijksuniversiteit Leiden, 1961.
- 43) P.J. Christen, F. Berends en E.M. Cohen, *Proc. 3rd Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Warsaw* (1966) 281.
- 44) P.J. Christen en J.A.C.M. van den Muysenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 110 (1965) 217.
- 45) F. Strelitz, *Biochem. J.* 38 (1944) 86.
- 46) H.S. Jansz en J.A. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* 56 (1962) 531.
- 47) I. Berenblum en E. Chain, *Biochem. J.* 32 (1938) 286.
- 48) H.O. Michel, *J. Lab. Clin. Med.* 34 (1949) 1564.
- 49) H.L. Boter, A.J.J. Ooms, G.R. van den Berg en C. van Dijk, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 85 (1966) 147.

- 50) J.A. Cohen en M.G.P.J. Warringa, *Biochim. Biophys. Acta* 11 (1953) 52.
- 51) J.A. Cohen, R.A. Oosterbaan, H.S. Jansz en F. Berends, *J. Cell. and Comp. Physiol.* 54 (1959) 231.
- 52) H.S. Jansz, R.A. Oosterbaan, F. Berends en J.A. Cohen, *Proc. 5th Intern. Congr. Biochemistry, Moscow 1961*, vol.4 Pergamon Press, Oxford (1963) 45.
- 53) A.F. Childs, D.R. Davies, A.L. Green en J.P. Rutland, *Brit. J. Pharmacol.* 10 (1955) 462.
- 54) I.B. Wilson en S. Ginsburg, *Biochim. Biophys. Acta* 18 (1955) 168.
- 55) R.W. Rosenthal, R. Proper en J. Epstein, *J. Phys. Chem.* 60 (1956) 1596.
- 56) I. Dostrovsky en M. Halman, *J. Chem. Soc.* (1953) 508.
- 57) E. Heilbronn, *Acta Chem. Scand.* 19 (1965) 521.
- 58) E. Heilbronn, *Biochem. Pharmacol.* 14 (1965) 1363.
- 59) E. Heilbronn, *Acta Chem. Scand.* 19 (1965) 1333.
- 60) E. Heilbronn-Wikström, *Svensk Kemisk Tidskrift* 77 (1965) 11.
- 61) A.J.J. Ooms en H.L. Boter, *Biochem. Pharmacol.* 14 (1965) 1839.
- 62) L. Albanus, E. Heilbronn en A. Sundwall, *Biochem. Pharmacol.* 14 (1965) 1375.
- 63) L.E. Tammelin, *Ark. kemi* 12 (1958) 287.
- 64) H.S. Aaron, R.T. Uyeda, H.F. Frack en J.I. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 617.