

⑤

Int. Cl. 2:

G 01 T 1/204

⑯ BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



DT 26 01 093 A1

⑪

Offenlegungsschrift 26 01 093

⑫

Aktenzeichen: P 26 01 093.5-33

⑬

Anmeldetag: 14. 1. 76

⑭

Offenlegungstag: 22. 7. 76

⑳

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

15. 1. 75 USA 541243

⑤④

Bezeichnung: Flüssig-Szintillationslösung

⑦①

Anmelder: Beckman Instruments Inc., Fullerton, Calif. (V.St.A.)

⑦④

Vertreter: Wallach, C., Dipl.-Ing.; Koch, G., Dipl.-Ing.; Haibach, T., Dr.;
Feldkamp, R., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦②

Erfinder: Long, Edward C., Huntington Beach, Calif. (V.St.A.)

Prüfungsantrag gem. § 28b PatG ist gestellt

DT 26 01 093 A1

2601093

Patentanwälte
Dipl.-Ing. C. Wallach
Dipl.-Ing. G. Koch
Dr. T. Halbach
Dipl.-Ing. R. Feldkamp
8 München 2
Kaufingerstr. 11 (10) 240275

München, den 14. JAN 1976
15 398 H Na

Beckman Instruments, Inc., Fullerton,
Cal. / USA

Flüssig-Szintillationslösung

Die Erfindung betrifft Flüssig-Szintillationslösungen und deren Verwendung bei der Flüssig-Szintillationszählung der Strahlungsemissionen von radioaktivem Material. Im besonderen betrifft die Erfindung Flüssig-Szintillationslösungen, die sich besonders zur Verwendung mit auf Filtern enthaltenen radioaktiven Proben eignen.

Die Flüssig-Szintillationszählung ist ein analytisches Testverfahren, das für viele biologische Forschungszwecke Anwendung gefunden hat und ein äußerst wirksames System zum Nachweis energiearmer Strahlung, wie beispielsweise der Strahlung von ^{14}C und ^3H , darstellt. Einer seiner Hauptvor-

609830/0628

teile gegenüber anderen Strahlungsnachweissystemen besteht darin, daß die Probe innerhalb des Detektors angeordnet ist, während in anderen Systemen die radioaktive Probe nur in die Nähe des Detektors gebracht wird und durch eine Barriere (beispielsweise Luft oder ein gasförmiges Medium) hindurchtreten muß, welche ^3H oder ^{14}C -Emissionen am Erreichen des Detektors hindert. Bei der Flüssig-Szintillationszählung besteht für die Strahlung eine bessere Nachweiswahrscheinlichkeit, da sie sich innerhalb des Detektors befindet. Im Zusammenhang mit der Flüssig-Szintillationszählung ist bei vielen biochemischen Experimenten die Verwendung von Membranfiltern zum Einfangen und Festhalten von radioaktivem Material erforderlich. Diese Filter werden zusammen mit der daran befindlichen radioaktiven Probe für den Radioaktivitätsnachweis in einen Flüssig-Szintillationszähler eingebracht. Bisher hat die Verwendung derartiger Filter innerhalb des Flüssig-Szintillationszählers Probleme aufgeworfen, welche den Wirkungsgrad bzw. die Ausbeute der Strahlungszählung nachteilig beeinflussen. Zum einen wird ein gewisser Anteil der Strahlung, der Zählvorgänge bewirken könnte, durch das Filter absorbiert und daher nicht in dem Detektor gezählt. Des weiteren wird das in Lösung befindliche radioaktive Material mit einer anderen Zählausbeute bzw. einem anderen Zählwirkungsgrad gezählt als die noch an oder in den Filtern befindliche Materialmenge.

Der Erfindung liegt als Aufgabe die Schaffung einer Flüssig-Szintillationslösung zugrunde, durch welche die vorstehend erwähnten Probleme vermieden und eine maximale Zählausbeute bzw. ein maximaler Zählwirkungsgrad für die an Filtern in Flüssig-Szintillationszählern enthaltenen radioaktiven Proben gewährleistet wird.

Zu diesem Zweck ist gemäß der Erfindung eine Flüssig-

Szintillationslösung aus fünf Komponenten vorgesehen, nämlich ein Gemisch aus (a) einem Flüssig-Szintillationslösungsmittel, (b) einer Primär-Szintillationslösungs-substanz (solute), (c) einer Sekundär-Szintillationslösungs-substanz (solute), (d) mehreren wesentlich voneinander verschiedenen oberflächenaktiven Stoffen und (e) einem Filterauflösungs- bzw. -durchsichtigmachungsmittel.

Die erfindungsgemäße Lösung kann in einem Flüssig-Szintillationszähler verwendet werden und gewährleistet entweder eine Auflösung und/oder eine Durchsichtigmachung des Filters. Indem das Filter aufgelöst oder durchsichtig gemacht wird, werden radioaktive Zählvorgänge in der Probe aus dem Filter freigesetzt und eine höhere Zählausbeute gewährleistet. Des Weiteren besitzt die erfindungsgemäße Lösung eine hohe Zählausbeute für ^3H , eine hohe Beständigkeit gegenüber Chemolumineszenz und vermag biologische Proben wie beispielsweise Proteine, Nucleinsäure und organische Verbindungen zu emulgieren. Die erfindungsgemäße Flüssig-Szintillationslösung eignet sich auch gut zur Verwendung in gekühlten wie auch in auf Umgebungstemperatur betriebenen Zählern.

Die erfindungsgemäße Flüssig-Szintillationslösung ist jeder anderweitigen, derzeit in einer Flüssig-Szintillationszählapparatur verwendeten Lösung überlegen. Sie unterscheidet sich von anderen bekannten Lösungsvermittlern dadurch, daß mehrere wesentlich voneinander verschiedene oberflächenaktive Stoffe in Kombination mit einem Filterauflösungs- und/oder -durchsichtigmachungsmittel verwendet sind.

Bei der erfindungsgemäßen Flüssig-Szintillationslösung wird dem Flüssig-Szintillationslösungsmittel Energie von dem Strahlung emittierenden Isotop (^3H oder ^{14}C) in der

radioaktiven Probe zugeführt. Sobald dies der Fall ist, gehen die Lösungsmittelmoleküle in einen angeregten Zustand über (das heißt die Elektronen gelangen auf ein höheres Energieniveau). Das Molekül der Primär-Szintillationslösungssubstanz (solute) absorbiert Energie von den angeregten Lösungsmittelmolekülen und reemittiert sodann Energie in Form von Licht bei einer auf den Empfindlichkeitsbereich eines Photomultipliers abgestellten Wellenlänge. Die Sekundär-Szintillationslösungssubstanzen (solutes) tun das gleiche, nur bei längeren Wellenlängen.

Da die meisten biologischen Proben in wässriger Lösung vorliegen und umgekehrt das Flüssig-Szintillationssystem ein aromatisches Lösungsmittel benötigt, ist ein Lösungsvermittlersystem ("solubilizer system") (das heißt ein oberflächenaktiver Stoff oder mehrere derartige oberflächenaktive Stoffe) erforderlich, um die wässrige Phase in der organischen Phase zu einer homogenen Phase für den Zählvorgang zu dispergieren. Ohne einen derartigen Lösungsvermittler sind organische Lösungsmittel mit Wasser unvermischbar. Der bevorzugte Lösungsvermittler gemäß der Erfindung besteht aus mehreren wesentlich voneinander verschiedenen oberflächenaktiven Stoffen.

Das Filterauflösungs- und/oder -durchsichtigmachungsmittel bewirkt eine Auflösung und/oder Durchsichtigmachung des die radioaktive Probe enthaltenden Membranfilters und trägt somit zur Freisetzung oder zum Aufbrechen von Molekülbindungen zwischen dem Filter und der Probe bei.

Diese sämtlichen Bestandteile sind inert bezüglich chemischer Reaktivität untereinander und mit den Komponenten der Energieübertragung, welche die Chemolumineszenz, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz bewirken.

Das Flüssig-Szintillations-Lösungsmittel ist der Hauptbestandteil der erfindungsgemäßen Zusammensetzung. Das Flüssig-Szintillations-Lösungsmittel dient zum Auflösen sämtlicher vier übrigen Komponenten der erfindungsgemäßen Lösung. Das Lösungsmittel soll des weiteren einen solchen Reinheitsgrad besitzen, daß es bei Verwendung in dem Flüssig-Szintillationsgerät nur einen geringfügigen Untergrund aufweist und einen hohen Zähl-Wirkungsgrad besitzt. Bevorzugte Lösungsmittel für die Zwecke der Erfindung sind Toluol und Xylol. In dieser Hinsicht besitzt Toluol einen hohen Wert des Verhältnisses von Zähl-Wirkungsgrad, bezogen auf die Gestehungskosten, außerdem ist es nicht-explosiv und nicht-toxisch. Das Lösungsmittel sollte in einer ausreichenden Menge vorliegen, um eine Wechselwirkung zwischen den Szintillationslössubstanzen und den Strahlungsemissionen der radioaktiven Probe nach deren Zugabe zur Lösung zu ermöglichen.

Die Primär-Lösssubstanzen (auch als Primär-Szintillations-Fluore bezeichnet) sind aromatische Fluoreszenzstoffe. Vorzugsweise sind sie in dem Lösungsmittel löslich und beeinträchtigen die Wirkungen der anderen Bestandteile nicht. Bevorzugte Primär-Szintillationslössubstanzen sind PPO, das heißt 2,5-Diphenyloxazol und Butyl PBD, das heißt 2-(4'-t-Butylphenyl)-5-(4"-biphenyl)-1,3,4-oxdiazol. Die zuerst erwähnte Substanz ist besonders bevorzugt, da sie hochlöslich ist, ein wirksamer Photonenemitter ist und außerdem stabil und billig ist. Die Primär-Szintillationslössubstanzen sollen in ausreichender Menge vorliegen, um bei Zugabe der radioaktiven Probe zu der Lösung eine zählbare Szintillation in der Lösung zu gewährleisten. Der bevorzugte Anteil von PPO in der Lösung liegt im Bereich von 6,5 bis 5,5 g/l Lösung, der bevorzugte Anteil von Butyl PBD im Bereich von 8,5 bis 7,5 g/l.

Die (auch als Sekundärfluore bezeichneten) Sekundär-Szintillations-Lösssubstanzen sind aromatische Fluoreszenzstoffe, deren Fluoreszenzspektren bei längeren Wellenlängen als die der Primärfluore liegen. Die bevorzugten Sekundär-Flüssig-Szintillationslösssubstanzen sind POPOP/1,4-Bis[2-(5-Phenylloxazolyl)]-benzol und Dimethyl POPOP/1,4-Bis[2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)]-2-benzol.

Die Sekundär-Szintillations-Lösssubstanz soll, zusammen mit den Primär-Szintillations-Lösssubstanzen, in ausreichender Menge vorliegen, um nach Zugabe der radioaktiven Probe zu der Lösung eine zählbare Szintillation in der Lösung zu gewährleisten. Die bevorzugten Mengenbereiche von POPOP und Dimethyl POPOP sind 0,65 bis 0,55 g/l Lösung.

Es sind mehrere wesentlich voneinander verschiedene oberflächenaktive Stoffe erforderlich, um die wässrige Phase und die organische Phase in eine homogene Phase für die Flüssig-Szintillationszählung zu dispergieren. Unter "wesentlich voneinander verschiedene oberflächenaktive Stoffe" soll definitionsgemäß verstanden werden, daß (1) entweder ein oberflächenaktiver Stoff vorzugsweise öllöslich, ein anderer vorzugsweise wasserlöslich ist, oder (2) daß die oberflächenaktiven Stoffe unterschiedlichen chemischen Familien angehören (beispielsweise kann die polare Gruppe in dem Molekül des einen oberflächenaktiven Stoffes eine Carboxylgruppe sein, während die andere eine Sulfonatgruppe ist) oder (3) daß die oberflächenaktiven Stoffe unterschiedlichen Tensidtypen angehören, das heißt daß einer ein anionischer oberflächenaktiver Stoff und der andere ein nicht-ionischer oberflächenaktiver Stoff ist, oder schließlich (4) daß ein oberflächenaktiver Stoff als ein Dispergiermittel wirkt, während der andere als ein die Oberflächenspannung verringerndes Mittel (Detergens) wirkt. Die

bevorzugte Vielfalt von wesentlich unterschiedlichen oberflächenaktiven Stoffen findet sich in einem unter der Bezeichnung Bio-Solv^R BBS-3 von der Firma Beckman Instruments, Inc. hergestellten und vertriebenen wässrigen Löslichkeitsvermittlersystem, welches Moleküle mit einer polaren (wasserlöslichen) und einer nicht-polaren (in organischer Phase löslichen) Gruppe enthält. Dieses System enthält zwei verschiedene oberflächenaktive Stoffe - etwa 50 % des Systems besteht aus Triton X-100 (Isooctylphenol-polyäthoxyäthanol) von Rohm und Haas, während etwa die übrigen 50 % ein von McKesson Chemical hergestelltes Aerosol MA-80 (Natriumdihexylsulfosuccinat) ist. Die mehreren wesentlich verschiedenen oberflächenaktiven Stoffe sollten im Überschuß über die Menge vorliegen, die erforderlich ist, um das Gemisch thermodynamisch stabil zu machen und eine vollständige Vermischbarkeit der organischen und der wässrigen Flüssigkeiten zu gewährleisten. Bei Verwendung des erwähnten Bio-Solv^R-Lösungsvermittlers liegen die bevorzugten Anteile im Bereich von 95 bis 105 ml/l Szintillationslösung. Die erwähnten Bio-Solv^R-Lösungsvermittler emulgieren ferner Proteine, Nucleinsäuren und andere organischen Verbindungen und gestatten daher die Verwendung dieser Substanzen in der radioaktiven Probe.

Das erfindungsgemäß verwendete Filterauflösungs- und/oder -durchsichtigmachungsmittel ermöglicht oder erleichtert das Aufbrechen chemischer Bindungen innerhalb des Filters. Unter Auflösen ist hierbei zu verstehen, daß das Membranfilter seine physikalische oder körperliche Struktur verliert und sich in der Szintillationslösung auflöst. Unter Durchsichtigmachung ist zu verstehen, daß das Membranfilter zwar seine Struktur behält, daß jedoch Licht durch das Filter hindurchtreten kann und jegliche mit dem Filter in Berührung stehende radioaktive Isotope mit fast dem gleichen

Wirkungsgrad bzw. fast der gleichen Ausbeute wie nicht mit dem Filter in Berührung stehende, sondern in der Lösung befindliche radioaktive Isotope gezählt werden. Als Filter für die Zwecke der vorliegenden Erfindung eignen sich alle beliebigen heute bekannten kommerziellen Membranfilter (beispielsweise Millipore und Sartorius). Normalerweise bestehen diese entweder aus Cellulosenitrat, Celluloseacetat oder einem Gemisch von Cellulosenitrat/Celluloseacetat. Gemäß der Erfindung werden Membranfilter ohne weiteres innerhalb 20 Minuten aufgelöst.

Die bevorzugten Filterauflösungs- und/oder -durchsichtigmachungsmittel sind zyklische Äther, an erster Stelle Tetrahydrofuran. Diese Verbindung löst Cellulosenitratfilter sowie Filter aus einem Cellulosenitrat/Celluloseacetat-Gemisch auf und macht Celluloseacetatfilter durchsichtig. Dieses Mittel soll in der Lösung in ausreichender Menge vorhanden sein, um diese Funktionen erfüllen zu können. Für Tetrahydrofuran betragen die bevorzugten Anteilsmengen 95 bis 105 ml/l Lösung.

Die Szintillationslösung gemäß der Erfindung ist allen bekannten, kommerziell verfügbaren Szintillationslösungen, welche mit Membranfiltern verwendet werden können, aus den folgenden Gründen überlegen: (a) Sie vermag Isotope mit einem höheren Wirkungsgrad bzw. höherer Ausbeute als andere Lösungen zu zählen, das heißt sie zählt ^3H -Substanzen mit einem Zählwirkungsgrad bzw. einer Zählausbeute von bis zu 40 %, (b) sie löst fast alle kommerziell verfügbaren Membranfilter auf und/oder macht sie durchsichtig, (c) sie unterliegt keinem Energieübergang, welcher Chemolumineszenz, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz zur Folge hat, (d) sie vermag Proteine, Nucleinsäure und andere organische Verbindungen, die normalerweise in biologischen Proben

vorliegen und die Szintillationslösung stören, soferne sie nicht in einer homogenen Phase vorliegen, zu emulgieren, und (e) sie besitzt einen sehr breiten Anwendungsbereich, in-dem sie sowohl in gekühlten wie auch in bei Umgebungstemperatur arbeitenden Zählern funktionsfähig ist.

Im folgenden wird ein spezielles Ausführungsbeispiel der Erfindung beschrieben.

Beispiel

Es wurde folgende Flüssig-Szintillationslösung hergestellt:

Toluol (Szintillations-
reinheitsgrad)

PPO	6,0 g
Dimethyl POPOP	0,6 g
Bio-Solv ^R BBS-3	100 ml
Tetrahydrofuran	100 ml

Die vier zuletzt angeführten Bestandteile wurden in einer zur Auflösung ausreichenden Menge Toluol gelöst, wonach sodann mit weiterem Toluol auf 1 l Lösung aufgefüllt wurde.

Eine biologische Probe, welche ³H auf einem Cellulosenitrat-Membranfilter enthielt, wurde zu 10,0 ml der vorstehend genannten Szintillationslösung zugegeben. Nach 20 Minuten mit etwas Schütteln war das Cellulosenitratfilter vollständig in der Lösung aufgelöst.

Das Gemisch wurde sodann in einen Flüssig-Szintillationszähler verbracht. Es ergab sich eine Zählausbeute bzw. ein

Zählwirkungsgrad der Probe zwischen 30 und 40 %.

Zusammenfassung

Gegenstand der Erfindung ist eine Flüssig-Szintillationslösung, welche (1) ein Szintillationslösungsmittel, (2) eine Primär-Szintillationslössubstanz (solute), (3) eine Sekundär-Szintillationslössubstanz (solute), (4) mehrere wesentlich voneinander verschiedene oberflächenaktive Stoffe und (5) ein Filterauflösungs- und/oder -durchsichtigmachungsmittel enthält.

Patentansprüche:

M**Patentansprüche**

1. Flüssig-Szintillationslösung, gekennzeichnet durch ein Gemisch aus (a) einem Flüssig-Szintillationslösungsmittel, (b) einer Primär-Szintillationslössubstanz (solute), (c) einer Sekundär-Szintillationslössubstanz (solute), (d) mehreren wesentlich voneinander verschiedenen oberflächenaktiven Stoffen und (e) einem Filterauflösungs- bzw. -durchsichtigmachungsmittel.
2. Flüssig-Szintillationslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Filterauflösungs- bzw. -durchsichtigmachungsmittel ein zyklischer Äther ist.
3. Flüssig-Szintillationslösung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Szintillationslösungsmittel Toluol ist.
4. Flüssig-Szintillationslösung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Primär-Szintillationslössubstanz (solute) PPO ist.
5. Flüssig-Szintillationslösung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundär-Szintillationslössubstanz (solute) Dimethyl POPOP ist.
6. Flüssig-Szintillationslösung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die mehreren wesentlich verschiedenen oberflächenaktiven Stoffe Isooctylphenol-polyäthoxyäthanol und Natriumdihexylsulfosuccinat sind.

7. Flüssig-Szintillationslösung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Filterauflösungs- bzw. -durchsichtigmachungsmittel Tetrahydrofuran ist.