

Kinetik des Enzym-Immunoassay und Reproduzierbarkeit der Antiepileptika-Bestimmung

L. Demisch und P. Gebhart

Zentrum der Psychiatrie, Klinisches Labor; Klinikum der J. W. Goethe Universität, Frankfurt/M.

Zusammenfassung:

Beim homogenen enzymatischen Immunoassay wird als Ausmaß des kompetitiven Proteinbindungsprozesses eine Enzymaktivität gemessen. Es wird gezeigt, daß die Enzymaktivität im Meßintervall nicht konstant ist. Die Extinktionszunahme ΔE in Abhängigkeit von der Zeit wird durch Regressionskurven der Form $y = a_1 + b_1x + bx^2$ beschrieben. Bei Annahme einer linearen Beziehung zwischen ΔE und der Meßzeit t ist die Varianz um einen Faktor 10^3 größer, als wenn ein nicht linearer Zusammenhang zugrunde gelegt wird.

Weiterhin wird gezeigt, daß bei Verwendung einer linearen Beziehung zwischen ΔE und t die Berücksichtigung einer hinreichend großen Anzahl von Meßpunkten notwendig ist, um genügend kleine Variationskoeffizienten zu erhalten. In der Praxis sollten daher bei der Bestimmung von Antiepileptika mit rechnerunterstützten Auswertverfahren Taktzeiten kleiner als ca. 5 sec. gewählt werden.

Schlüsselwörter:

Homogener Enzym Immunoassay – Antiepileptica – Enzymkinetik – nicht lineare Regressionskurve – Reproduzierbarkeit.

Summary:

Homogeneous enzymatic immunoassay is commonly used to measure the enzymatic activity as a monitor of the competitive protein binding process. It is shown that the rate of increase of enzymatic activity changes with time over the measurement period. The increase in extinction ΔE as a function of time t can be fitted by means of a second order regression curve which has the form $y = a_1 + b_1x + b_2x^2$. Assuming only a linear relationship between ΔE and t (that is, neglecting the second order term b_2t^2), the variance becomes up to three orders of magnitude higher.

In addition, it will be demonstrated that using commercially available equipment with linear regression capabilities, it is necessary to log a rather large number of measuring points in order to obtain sufficiently small variation-coefficients. Therefore, if antiepileptics are determined by means of automatic calculation procedures, time intervals smaller than 5 sec are recommended.

Key words:

Homogenous enzymatic immunoassay – Antiepileptica – Enzymatic activity – Second order regression curve – Small variation coefficients.

Einleitung

Für das klinische und ärztliche Labor wird sich mehr als bisher die Aufgabe der Blutspiegel-Bestimmung für einige Pharmaka stellen, da Konzentrationsangaben von Arzneimitteln und ihrer physiologisch aktiven Metabolite im Plasma zunehmend Bedeutung für die Aufstellung und Erhaltung optimaler individueller Dosierungen erlangen. Für die antikonvulsive Behandlung mit Phenobarbital, Diphenylhydantoin, Primidon, Ethosuximid und Carbamazepin sind von verschiedenen

Autoren übereinstimmend für einige dieser Pharmaka Korrelationen der Konzentration im Plasma oder Serum mit der therapeutischen Wirksamkeit festgestellt worden (1–5). In zusammenfassenden Arbeiten wurden Tabellen mit empfohlenen therapeutischen Konzentrationsbereichen publiziert (6,7).

Zur Bestimmung der Plasma-Konzentration der Antiepileptika hat sich als spezifische, verlässliche und im klinischen Labor besonders praktikable Methode der homogene enzymatische Immunoassay bewährt. In

vergleichenden Arbeiten wurden sehr gute übereinstimmende Werte für die Bestimmung von Phenobarbital, Diphenylhydantoin und Primidon mit gaschromatographischen (GLC), radioimmunologischen (RIA) und enzymimmunologischen (EIA) Methoden veröffentlicht (8-10).

Verglichen mit dem Radio-Immunoassay und anderen enzymimmunologischen Methoden entfällt beim homogenen Enzym-Immunoassay eine Trennung des Antikörpergebundenen „enzymatisch markierten“ Antigens vom überschüssigen freien „enzymatisch markierten“ Antigen. Im Antikörper-Antigen-Komplex ist das Enzym – bakterielle Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase – desaktiviert, so daß als Ausmaß des kompetitiven Bindungsprozesses die Messung einer Enzymaktivität ohne vorherigen Trennungsschritt möglich ist (siehe Abb.1).

In der folgenden Arbeit wird die Frage aufgestellt, ob während der relativ kurzen Inkubationszeit beim homogenen enzymatischen Immunoassay der stationäre Zustand der Immunreaktion erreicht worden ist. Der Vorgang der Gleichgewichtseinstellung sollte in der Kinetik der enzymatischen Reaktion zum Ausdruck kommen.

Ergebnisse

1. Kinetik der Reaktion des enzymatischen Immunoassay

Abb.2 zeigt die Änderung der Extinktionsdifferenz im Meßintervall von 1,7 sec. bis zu 2 Min. nach dem Start

Abb.2

Darstellung der Extinktionszunahme E in 1,7 sec. in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene Diphenylhydantoin (DPH) Konzentrationen; 0 = 0 $\mu\text{g/ml}$; 1 = 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 2 = 5,0 $\mu\text{g/ml}$; 3 = 10 $\mu\text{g/ml}$; 4 = 20,0 $\mu\text{g/ml}$; 5 = 30 $\mu\text{g/ml}$; Taktzeit = 1,7 sec.

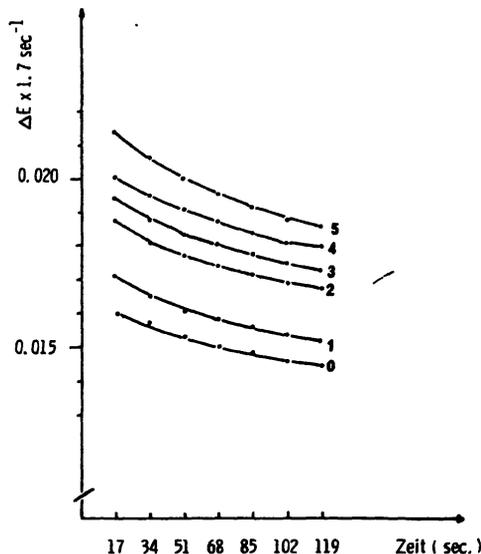
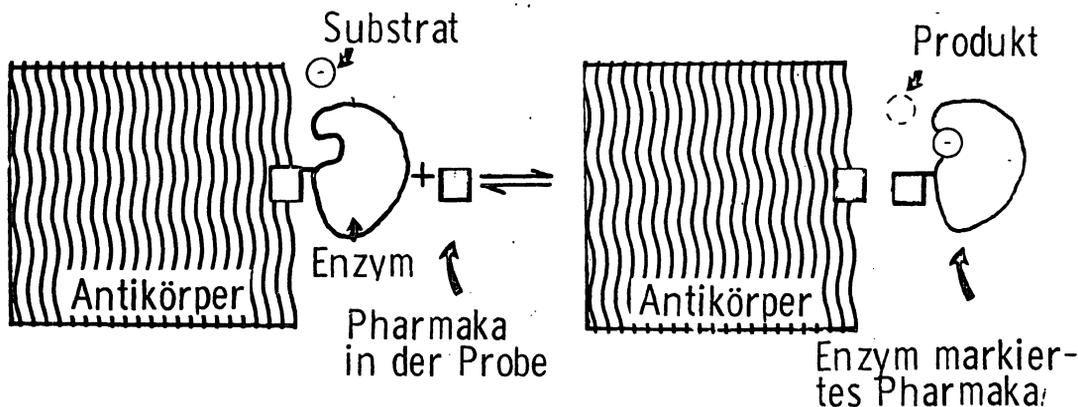


Abb.1

Schematische Darstellung des kompetitiven Proteinbindungsprozesses beim homogenen enzymatischen Immunoassay



der enzymatischen Reaktion für verschiedene Diphenylhydantoin (DPH)-Konzentrationen. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Zunahme der Absorption pro Zeit im Verlauf des Meßintervalls nicht konstant ist, sondern abnimmt.

Der nicht lineare Verlauf der Absorptionzunahme bis 2 Min. nach Beginn der enzymatischen Reaktion wurde durch Kalkulation von nicht linearen Regressionskurven der Form

$$y = a_1 + b_1x + b_2x^2 \quad (1)$$

analysiert. Aus Abb.3 ist ersichtlich, daß die kalkulierte Ausgleichsparabel durch alle Meßpunkte verläuft.

Die Restvarianz s^2 aller Regressionskurven war kleiner als 1×10^{-5} . Die Streuung der einzelnen Meßpunkte von der Ausgleichsparabel ist also erheblich geringer als die Meßgenauigkeit des digitalen Voltmeters. Der zeitliche Verlauf der Extinktionszunahme beim homogenen enzymatischen Immunoassay wird für alle DPH-Konzentrationen von einer Ausgleichsparabel der Form (1) praktisch vollständig approximiert.

Wie die Abb.3 zeigt, ist die Krümmung der Ausgleichsparabel gering. Es stellt sich daher die Frage, wie groß der Fehler ist, wenn bei der Auswertung des Absorptionsverlaufes mit manuellen oder rechnerunterstützten Verfahren das quadratische Glied der Parabel vernachlässigt wird, d.h. der Verlauf mit einer Geraden approximiert wird. Praktisch interessiert dabei, wie groß der Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Bestimmung ist. In Tab.1 sind die Werte für die Koeffizienten b_1 und b_2 und die Streuung s^2 für eine lineare und nicht lineare Approximation des Absorptionsverlaufes E wiedergegeben. Wie aus Tab.1 hervorgeht, ist die Varianz bei linearer Approximation gegenüber der nicht linearen Approximation um einen Faktor von ca. 10^3 größer. Dies ergibt sich daraus, daß eine lineare Regression die gemessenen Werte nicht genügend approximiert. Der Koeffizient des quadratischen Gliedes b_2 der Ausgleichsparabel hat einen merklichen Einfluß auf die Meßgröße, der nicht vernachlässigt werden kann, wenn man bedenkt, daß b_2t^2 in die Meßgröße ΔE eingeht.

2. Untersuchungen zur Taktzeit

In der Regel werden Auswertungen dieser Meßvorgänge mit Hilfe einer linearen Regression ausgeführt. In diesem Fall spielt, wie im folgenden gezeigt wird, die Anzahl der Datenübernahmen auf die Reproduzierbarkeit der Auswertung eine erhebliche Rolle. Deshalb wurde in einem zweiten Experiment der Einfluß der Taktzeit d.h. der Anzahl der Datenübernahmen auf die Ausgleichsgerade der Extinktionszunahme in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Mit Hilfe einer Eichkurve wurden die Konzentrationen für die verschiedenen Taktzeiten errechnet. Die Daten in Tab.2 zeigen eine zunehmende

Abb.3

Darstellung der Absorptionzunahme für verschiedene Diphenylhydantoin-Konzentrationen nach Kalkulation von Regressionskurven der Form $y = a_1 + b_1x + b_2x^2$ mit einem HP 9821 A Plotter. Die Meßpunkte sind Mittelwerte von drei Experimenten. Die Anfangsextinktionen wurden auf Null bezogen. Konzentrationen von DPH: 0 = 0 $\mu\text{g/ml}$; 1 = 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 2 = 5,0 $\mu\text{g/ml}$; 3 = 10,0 $\mu\text{g/ml}$; 4 = 20,0 $\mu\text{g/ml}$; 5 = 30,0 $\mu\text{g/ml}$

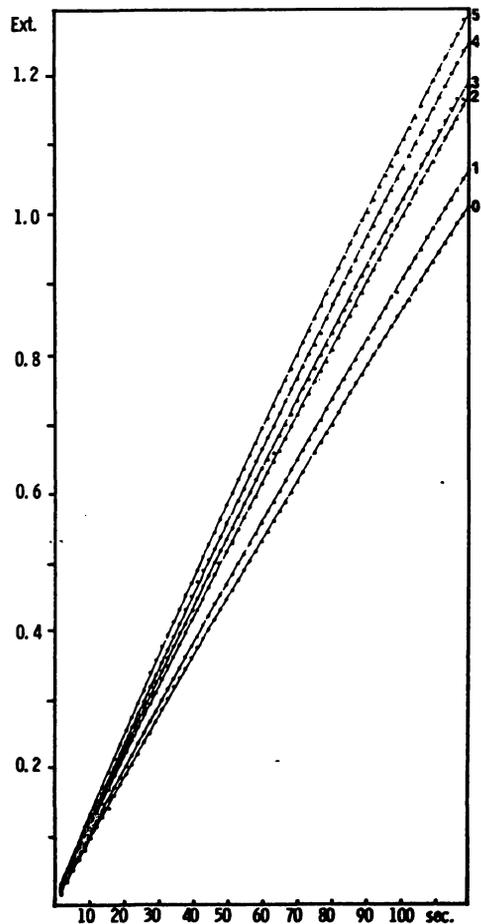
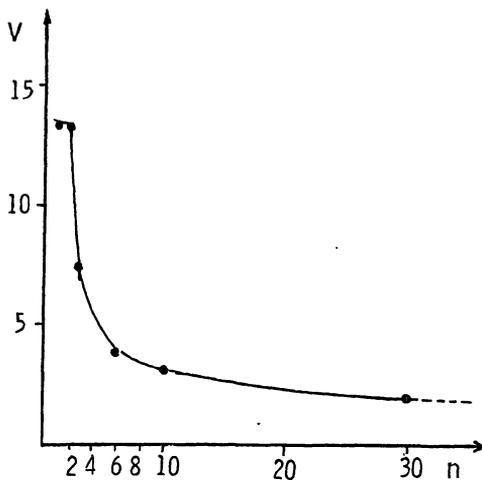


Abb. 4

Abhängigkeit des Variationskoeffizienten V von der Anzahl der Datenübernahmen n bei der Rechnerunterstützten Auswertung der Extinktionszunahme mit Hilfe einer linearen Regression; Meßintervall 30 sec.; Diphenylhydantoin Konzentration 15,0 $\mu\text{g/ml}$



Streuung der Einzelwerte von der Regressionsgeraden mit steigender Anzahl N der Datenübernahmen. Dieser Zusammenhang ist aufgrund des nicht linearen Verlaufs der Extinktionszunahme (siehe Abb. 1 und Abb. 2) zu erwarten. Tab. 2 und Abb. 4 geben den Zusammenhang zwischen der Anzahl der übernommenen Meßpunkte und dem Variationskoeffizient V wieder. Der Variationskoeffizient V kann durch Verkürzung der Taktzeit verkleinert werden, wenn der Auswertung des Absorptionsverlaufs beim homogenen enzymatischen Immunoassay eine lineare Regression zugrunde gelegt wird. Wie Abb. 4 zeigt, ist der Bereich zwischen 2 und 6 Datenübernahmen im Meßzeitraum von 30 sec. für die Auswertung nach einer linearen Regression besonders kritisch, da in diesem Bereich eine Verbesserung des Variationskoeffizienten von 13 auf kleiner als 5 erfolgt.

Diskussion

Für die Messung von Enzymaktivitäten ist das Vorliegen linearer Reaktionsverhältnisse eine wichtige Bedingung, um vergleichbare Resultate zu erhalten. Diese Bedingung gilt offenbar für den enzymatischen Teil der Reaktion beim homogenen enzymatischen Immunoassay nicht. Der Verlauf der Extinktionszunahme als Funktion der Zeit ist nicht linear. Er wird durch Ausgleichsparabeln der Form $y = a_1 + b_1x + b_2x^2$ beschrieben. Die Streuung der Einzelwerte bei Approximation an eine Parabel ist kleiner als 10^{-5} . Im Vergleich mit der Varianz bei Approximation an eine Gerade ist dieser Wert um einen Faktor 10^3 kleiner. Die Krümmung des Absorptionsverlaufs ist mit großer Wahrscheinlichkeit Ausdruck des nicht erreichten stationären Zustands der Immunreaktion. Die Menge des enzymatisch aktiven Proteins ver-

Tab. 1

Vergleich zwischen linearer und nicht linearer Approximation des Absorptionsverlaufs beim enzymatischen Immunoassay. Bestimmung von Diphenylhydantoin (DPH) 15 $\mu\text{g/ml}$; Taktzeit 1 sec. entsprechend 30 Datenübernahme in 30 sec. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

Art der Approximation	Koeffizienten		Streuung s^2
	b_1	b_2	
$y = a + b_1x + b_2x^2$ Ausgleichsparabel	$1,1838 \times 10^{-2}$ $\pm 0,0016 \times 10^{-2}$	$3,12 \times 10^{-5}$ $\pm 1,14 \times 10^{-5}$	$8,5 \times 10^{-6}$ $\pm 3,2 \times 10^{-6}$
$y = a + b_1x$ Regressionsgerade	$1,1844 \times 10^{-2}$ $\pm 0,0022 \times 10^{-2}$	—	$3,4 \times 10^{-3}$ $\pm 0,95 \times 10^{-3}$

ringert sich im Verlauf des Meßvorganges geringfügig. Die bimolekularen Antigen-Antikörperreaktionen sind schnelle Reaktionen, die im msec.-Bereich abreagieren. Darauf folgen langsamere Reaktionen wie Aggregationsreaktionen, die in der Regel 20–30 Min. dauern und zur Ausbildung des stationären Zustandes führen. Da meist Antikörpergemische von 20–30 Molekülpopulationen vorliegen, ist die Natur dieser Reaktionen unklar. Andere Gründe für den nicht linearen Verlauf wie ungenügende Substratsättigung, Temperaturgradienten etc. können ausgeschlossen werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit des zweiten langsameren Teils der Immunreaktion wird von der Konzentration des Antigens in der Probe mitbestimmt. Wie aus Abb.2 hervorgeht, ist eine deutliche Abhängigkeit der Krümmungsänderung pro Zeit von der Konzentration des Pharmakons in der Probe ersichtlich. Bei Übernahme einer steigenden Anzahl von Meßdaten erhält der nicht lineare Verlauf bei der Kalkulation der Steigung ein größeres Gewicht. Diese Tatsache drückt sich folglich auch in der größeren Streuung der Meßwerte von der Regressionsgeraden aus (siehe Tab.2). Die Verwendung linearer Approximationen bei rechnerunterstützten Auswertungen führt aber zu einer erheblichen Vereinfachung des Programms, da eine einfache Beziehung zwischen der Steigung der Regressionsgeraden der Absorptionzunahme ΔE und der Konzentration der zu bestimmenden Substanz hergestellt werden kann.

Bei der Einrichtung von enzymatischen Immunmeßplätzen mit rechnerunterstützter Auswertung oder der

Ausrüstung eines vorhandenen digitalen Fotometers mit einem Rechner sollte die Anzahl der Datenübernahmen in den Rechner beachtet werden. Die Taktzeit der Impulsauslösung zur Datenübernahme vom DVM sollte kleiner als 10 sec. sein und möglichst unter 5 sec. liegen, wenn mit genügend kleinen Variationskoeffizienten gerechnet werden soll. Taktzeiten kleiner als 1 sec. führen zu keiner wesentlichen Verbesserung des VK. Im Gegenteil wird sich bei sehr kleinen Taktzeiten das elektronische Rauschen des digitalen Voltmeters als zusätzliche Fehlerquelle bemerkbar machen.

Methodik

Reagenzien: EMIT-AED Diphenylhydantoin Assay wurde von Syva Corp., Palo Alto, Californien oder E. Merck AG, Darmstadt bezogen. Reagenz A (Antikörper/Substrat-Reagenz aus stand. Globulinpräparat/Glukose-6-phosphat und NAD), Reagenz B (mit Glukose-6-phosphatdehydrogenase EC 1.1.1.49 markiertes Diphenylhydantoin), EMIT-AED Bezugsstandards (0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 $\mu\text{g/ml}$); EMIT-AED Kontrolle (15,0 $\mu\text{g/ml}$) und Pufferlösung (0,055 M Tris-Puffer pH 7,9) wurden mit einem Ultralab 2075 Diluter (LKB Instrument GmbH) dosiert. Abweichend von den Anweisungen des Herstellers wurden bei jedem Pipettierschritt 50 μl mit 300 μl Pufferlösung verdünnt. Nach dem Dosieren von Reagenz B erfolgte ein Delay von 10 sec. Die Absorption wurde bei 340 nm mit einem digitalen Zweistrahlspektralphotometer Modell 24 (Beckman Instruments, Inc., Irvine, Calif.) gemessen. Das Gerät war mit einer ther-

Tab.2

Zusammenhang zwischen der Taktzeit und der Reproduzierbarkeit der Antikonvulsiva. Bestimmung mit dem enzymatischen Immunoassay bei linearer Approximation des Extinktionsverlaufs. Bestimmung von Diphenylhydantoin 15 $\mu\text{g/ml}$; 3 Experimente \pm SD.

Taktzeit sec.	Anzahl d. Datenübernahmen N	Steigung der Regressionsgeraden $y = a + b_1 x$	Streuung $s_{x,y}^2$	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	Variationskoeffizient V
1	31	$1,184 \times 10^{-2}$ $\pm 0,0018 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-3}$ $\pm 0,95 \times 10^{-3}$	$15,5 \pm 0,3$	1,9
3	11	$1,186 \times 10^{-2}$ $\pm 0,0018 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-3}$ $\pm 0,56 \times 10^{-3}$	$16,1 \pm 0,4$	2,5
6	6	$1,186 \times 10^{-2}$ $\pm 0,0034 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-3}$ $\pm 0,86 \times 10^{-3}$	$16,0 \pm 0,6$	3,8
10	4	$1,187 \times 10^{-2}$ $\pm 0,01 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-3}$ $\pm 1,4 \times 10^{-3}$	$16,1 \pm 1,2$	7,4
15	3	$1,190 \times 10^{-2}$ $\pm 0,017 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-3}$ $\pm 0,82$	$16,5 \pm 2,2$	13,3
30	2	$1,190 \times 10^{-2}$ $\pm 0,017 \times 10^{-2}$	0,0	$16,5 \pm 2,2$	13,3

misch regulierten Durchflußzelle und Sipper System ausgerüstet. Das digitale Voltmeter (DVM) war mit einem programmierbaren Tischcomputer TC 110 (Tews Elektronik, Hamburg) verbunden. Lineare Regression, Korrelationskoeffizienten, Standardabweichungen und Varianzen wurden mit dem TC 110 gerechnet. Mit Hilfe eines variablen Taktgebers konnten die Übernahmeimpulse der DVM-Werte verändert werden. Die Anzahl der Datenübernahmen pro Zeit (= Taktzeit) wurde von 30 bis 0,5 sec. variiert. Nicht lineare Regressionskurven der Form $y = a_1 + b_1x + b_2x^2$ wurden mit einem Hewlett Packard 9821 A Rechner kalkuliert und mit einem HP 9862 A Plotter graphisch dargestellt.

Danksagung:

Wir danken Herrn Dr. U. Demisch, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt, für die Unterstützung.

Schrifttum:

1. BUCHTHAL, F., SVENSMARK, O.:
Serum concentration of diphenylhydantoin (phenytoin) and phenobarbital and their relation to therapeutic and toxic effects.
Psychiatr. Neurol. Neurochir. **74** (1971) 117-136.
2. BOOKER, H. E., HOSOKOWA, K., BURDETTE, R. D., DARCEY, B.:
Clinical study of serum primidone plasma levels.
Epilepsia **11** (1970) 395-402.
3. LUND, L.:
Anticonvulsant effect of diphenylhydantoin to plasma levels.
Arch. Neurol. **31** (1974) 289-294.
4. SHERWIN, A. L., ROBB, J. P., LECHTER, M.:
Improved control of epilepsy by monitoring plasma ethosuximide.
Arch. Neurol. **28** (1973) 178-181.
5. HELMCHEN, H. (Hrsg.):
Antiepileptische Längzeitmedikation.
Bibliotheca Psychiatr. **151**, S. Karger, Basel 1975.
6. WOODBURY, D. M., FINGL, E.:
Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: *The pharmacological basis of therapeutics* (Goodman, L. S., and Gilman, A., eds.), p. 201.
Macmillan Publishing Co., New York 5th Ed. 1975.
7. WINEK, C. L.:
Tabulation of therapeutic, toxic, and lethal concentrations of drugs and chemicals in blood.
Clin. Chem. **22** (1976) 832-836.
8. BOOKER, H. E., DARCEY, B. A.:
Enzymatic immunoassay vs. gas/liquid chromatography for determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in serum.
Clin. Chem. **21** (1975) 1766-1768.
9. SUN, L., WALWICK, E. R.:
Primidone analyses: correlation of gas chromatographic assay with enzyme immunoassay.
Clin. Chem. **22** (1976) 901, 902.
10. SPIEHLER, V., SUN, L., MIYADA, D. S., SARANDIS, S. G., WALWICK, E. R., KLEIN, M. W., JORDAN, D. B., JESSEN, B.:
Radioimmunoassay, enzym immunoassay, spectrophotometry and gas-liquid chromatography compared for determination of phenobarbital and diphenylhydantoin.
Clin. Chem. **22** (1976) 749-753.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Lothar Demisch und Peter Gebhart,
Zentrum der Psychiatrie, Klinisches Labor,
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Heinrich-Hoffmann-Straße 10,
6000 Frankfurt 71

