

Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring

The use of HPLC-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring

Michael Vogeser*

Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München-Großhadern, München, Deutschland

Zusammenfassung

Die Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie erlaubt erstmals die routinemäßige Anwendung der Massenspektrometrie im therapeutischen Drug-Monitoring. Vor allem durch die Möglichkeit, relativ kurzfristig hochspezifische Multianalyt-Methoden für die Messung praktisch aller Pharmaka zu entwickeln, stellt die Technik eine wesentliche Bereicherung für das Fach dar. Sie konkurriert mit den bisherigen Standardtechniken des therapeutischen Drug-Monitorings, dem Immunoassay bzw. den konventionellen HPLC-Methoden. In der vorliegenden Arbeit werden Stärken und Limitierungen der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie im Vergleich zu diesen Methoden diskutiert, die praktischen Anwendungscharakteristika im Routinebetrieb beschrieben und Entwicklungsperspektiven umrissen.

Schlüsselwörter: Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-Tandem-MS; LC-MS/MS); therapeutisches Drug-Monitoring (TDM).

Abstract

The technique of liquid chromatography-tandem mass spectrometry allows for the first time the routine application of mass spectrometry in therapeutic drug monitoring. Particularly the potential to straightforwardly develop highly specific multi-analyte methods for the quantification of nearly all drugs offers substantial new perspectives for this diagnostic field. The technique competes with the previously used standard techniques of therapeutic drug monitoring, the immunoassay technol-

ogy and conventional HPLC methods. In the present article, strengths and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in relation to these methods are discussed, practical application characteristics are described and perspectives of future developments are outlined.

Keywords: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-Tandem-MS); therapeutic drug monitoring (TDM).

Einleitung

Die Labormedizin ist in den vergangenen Jahren durch die Einführung der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie methodisch wesentlich bereichert worden. Mit Hilfe dieser Technik ist erstmals ein großer Teil der klinisch-chemisch relevanten Analyten einer routinetauglichen, hochspezifischen und sensitiven massenspektrometrischen Detektion zugänglich geworden; bis dahin stand allein die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) zur Verfügung, die nur für wenige niedermolekulare Stoffe und mit sehr großem Aufwand anwendbar ist. Die Darstellung der technischen Grundprinzipien der LC-MS/MS ist Gegenstand einer vorausgegangenen, in "LaboratoriumsMedizin" publizierten Arbeit [1]. Schlüsselprozesse sind die "weiche", derivatisierungsfreie Atmospheric Pressure Ionisation (API), bei der die Analyten durch die Verdunstungskälte der mobilen Phase vor thermischen Einflüssen geschützt werden, sowie die doppelte Massenselektion der so generierten Ionen, die folgendermaßen verläuft: Zunächst wird das intakte Molekülion des Zielanalyten mit Hilfe eines sogenannten Quadrupols aus dem Gesamt-Ionen-Strom herausgefiltert. Dieses Ion wird durch Kollision mit Argon- oder Stickstoff-Atomen zu Fragmentationen desintegriert; aus dem so generierten Fragmentationen-Strom wird mit Hilfe eines zweiten Quadrupols ein charakteristisches Ion selektiert und schließlich detektiert. Entsprechend basiert die Detektion bei der MS/MS-Technologie auf den physikalischen Desintegrationseigenschaften der jeweiligen Analyten.

*Korrespondenz: PD Dr. med. Michael Vogeser, Klinikum der Universität München, Institut für Klinische Chemie, Marchioninistr. 15, 81377 München, Deutschland
Tel.: +49 89 7095 3221
Fax: +49 89 7095 3240
E-mail: Michael.Vogeser@med.uni-muenchen.de

Die LC-MS/MS-Technologie eignet sich besonders gut zur sensitiven Quantifizierung strukturell gut definierter, niedermolekularer Substanzen. Ein mittlerweile gut etabliertes Anwendungsfeld für die LC-MS/MS in der Labormedizin ist das erweiterte Neonatalscreening auf angeborene Stoffwechseldefekte [2]. Das zweite wesentliche labormedizinische Anwendungsfeld der LC-MS/MS ist inzwischen das Therapeutische Drug Monitoring (TDM). Die vorliegende Übersichtsarbeit soll Potential und Grenzen der LC-MS/MS speziell in diesem Bereich aufzeigen und diskutieren und dabei auch praktische Aspekte berücksichtigen.

Die dominierenden analytischen Techniken des TDM sind bislang der Immunoassay sowie (in deutlich geringerem Umfang) die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Die GC-MS hat in der klinisch-diagnostischen Arzneimittelanalytik keinen nennenswerten Stellenwert erlangt. Immunoassays, überwiegend in teil- und vollautomatisierter Testführung, werden vor allem bei Arzneimitteln angewendet, bei denen klare Indikationen für die Spiegelmessung bestehen, die daher relativ breite Anwendung finden und bei denen Resultate schnell – und damit auch möglichst patientennah – erstellt werden müssen. Beispiele sind Immunsuppressiva (Ciclosporin A, Tacrolimus), Aminoglykosid-Antibiotika (besonders Gentamycin und Tobramycin), Glycopeptid-Antibiotika (besonders Vancomycin), Theophyllin, bestimmte Antiepileptika (besonders Carbamazepin und Phenytoin) sowie Digoxin und Digitoxin. HPLC-Verfahren sind in ihrer Handhabung weitaus anspruchsvoller als Immunoassays; sie werden vorwiegend angewendet bei Arzneimitteln, die nicht obligatorisch ein Monitoring verlangen, ein relativ geringes Probenaufkommen haben und bei denen die Befunderstellung im Allgemeinen nicht besonders eilt, was einen Probentransport in spezialisierte Labors erlaubt.

Die Stärken der Immunoassay-Technologie liegen vor allem in der durch weitgehende Automatisierung meist einfachen Handhabbarkeit sowie in kurzen Analysenzeiten und hohem Probendurchsatz. Limitierungen bestehen insbesondere in der sehr aufwändigen Testentwicklung, die nur durch die Industrie realisiert werden kann, entsprechend in einer begrenzten Palette verfügbarer Parameter, sowie in hohen laufenden Reagenzienkosten pro Bestimmung. Stärken der HPLC-Technik sind vor allem die flexible Etablierung von Methoden durch den Laboranwender selbst, unabhängig von der Diagnostika-Industrie, sowie niedrige laufende Sachkosten pro Analyse. Limitiert wird die Anwendung der HPLC-Technik besonders durch die sehr anspruchsvolle und störanfällige Handhabung der analytischen Systeme, eine meist recht arbeitsintensive Probenvorbereitung, eine begrenzte analytische Sensitivität sowie einen geringen Probendurchsatz mit langen analytischen Laufzeiten und einer langen Dauer bis zur Befunderstellung. Die LC-MS/MS-Technologie ermöglicht es inzwischen, Methoden für das Therapeutische Drug Monitoring zu entwickeln, die sowohl Immunoassays wie auch konven-

tionellen HPLC-Verfahren in wesentlichen Punkten überlegen sind.

Stärken der LC-MS/MS gegenüber Immunoassays

- **Flexible Entwicklung** hochspezifischer, leistungsfähiger Meßmethoden durch den Laboranwender unabhängig von der Diagnostika-Industrie; dagegen ist die Entwicklung leistungsfähiger Immunoassays mit der Produktion von Testantikörpern für das klinische Labor höchstens in Ausnahmefällen realisierbar. Auf einen klinischen Bedarf kann so mit Hilfe der LC-MS/MS in kurzer Zeit reagiert werden.
- **Niedrige laufende Kosten** pro Bestimmung; für Probenvorbereitung und Chromatographie werden relativ geringe Mengen an Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril benötigt; aufgrund der geringen erforderlichen Probenvolumina und der begrenzten Anforderungen an die Chromatographie haben die Chromatographie-Säulen eine meist lange Lebensdauer. Damit verursachen die Probenfläschchen den Großteil der laufenden Kosten.
- **Hohe Spezifität** der Detektion; keine analytischen Störungen durch heterophile Antikörper und unspezifische Bindungsinhibitoren; Kreuzreaktionen bzw. Interferenzen durch andere Pharmaka und endogene Stoffe sind sehr unwahrscheinlich.
- Möglichkeit von **Multianalyt-Quantifizierungen**; simultane Messung mehrerer Pharmaka bei Kombinationstherapien (z.B. Immunsuppressiva, antiretrovirale Pharmaka) bzw. Miterfassung relevanter Metaboliten eines Wirkstoffs in einem analytischen Lauf (z.B. Messung von Itraconazol mit OH-Itraconazol).

Stärken der LC-MS/MS gegenüber konventionellen HPLC-Verfahren

- **Geringe Anforderungen an die Probenvorbereitung**; aufgrund der hohen Detektions-Spezifität und -Empfindlichkeit ist eine aufwändige Aufreicherung der Zielanalyten bzw. eine Abreicherung anderer Stoffe durch eine manuelle Festphasen- bzw. Flüssig-Flüssig-Extraktion wie bei konventionellen HPLC-Methoden meist nicht notwendig. Bei der LC-MS/MS ist für einen Großteil der Analyten die Entfernung der Protein-Matrix durch eine einfache Proteinfällung im Rahmen einer Probenvorbereitung ausreichend. Damit ist normalerweise die "Hands-on time" pro Probe bei der LC-MS/MS wesentlich kürzer als bei konventionellen HPLC-Verfahren. Eine automatisierte Festphasen-Extraktion nach Proteinfällung mit Säulenschaltung und permanent verwendeten Extrak-

tionssäulen hat sich in vielen Labors als sehr bedienerfreundliche Standardtechnik bewährt. Hierdurch werden Matrixeffekte, d.h. Störungen der Ionisation durch Komponenten der Probe, sowie das Verschmutzen der Ionenquelle weitestgehend minimiert. Eine solche "Online"-Festphasenextraktion verlängert die Analysenzeit pro Probe um etwa eine Minute, führt aber zu ausgesprochen robusten Methoden für den Großserienbetrieb [3, 4].

- **Geringe Anforderungen an die Chromatographie;** bei der MS/MS-Technologie erfolgt eine "doppelt-massenspezifische" Detektion zahlreicher Einzelstoffe simultan durch Alternieren der aufgezeichneten spezifischen Massenübergänge innerhalb von Sekundenbruchteilen. Daher ist eine vollständige Auftrennung des Probenstoffgemischs nicht notwendig, Zielanalyten können problemlos ko-eluiert werden. Zweck der Chromatographie bei der MS/MS-Technik ist im Wesentlichen die Abtrennung der Zielanalyten von der Rest-Matrix, die zur Störung der Ionisation führen kann (Ion suppression), sowie die Trennung der Zielanalyten von jeweiligen Konjugat-Metaboliten, da es sonst zu Fehlmessungen infolge einer sogenannten "In-source-Fragmentation" von Konjugaten zu Molekülen des Zielanalyten kommen kann [5]. Das notwendige Maß an chromatographischer Trennung kann meistens durch einfache, weitgehend generische Chromatographie-Protokolle mit kurzen Laufzeiten realisiert werden. Dementsprechend ist der Zeitaufwand für die Methodenentwicklung meist überschaubar. Bei konventionellen HPLC-Techniken mit unspezifischen Detektionstechniken wie vor allem der UV-Detektion ist eine vollständige "Baseline"-Trennung des Zielanalyten von allen anderen exogenen und endogenen Stoffen unabdingbar. Dies erfordert eine sehr aufwändige Optimierung der Trennung unter Variation einer Vielzahl von Größen (Zusammensetzung der mobilen Phase, Lösungsmittelart und -anteil, Ionenstärke, pH, Gradientmischprogramm) und unter Variation der Trennsäule (Material und Dimensionen), der Temperatur und der Flußrate. Die Überprüfung der Spezifität konventioneller HPLC-Methoden ist ebenfalls sehr aufwändig, da eine Ko-Elution des Zielanalyten zusammen mit Störsubstanzen sicher ausgeschlossen werden muss; dies gilt insbesondere für Proben von multimorbiden Patienten, die oft zahlreiche Arzneimittel verabreicht bekommen und bei denen Organinsuffizienzen vielfach zu einer Kumulation von Stoffwechselmetaboliten führen. Schon geringe Störungen des chromatographischen Systems im Betrieb können die Validität konventioneller HPLC-Methoden beeinträchtigen (z.B. "Spiking" durch Ausgasungen der mobilen Phasen, Retentionszeitverschiebungen durch Säulenverschleiß).

Obwohl die LC-MS/MS insgesamt ideale Voraussetzungen für Anwendungen im TDM bietet, ist es essentiell

wichtig, auch bei dieser Technik vorhandene spezifische Limitierungen klar zu erkennen.

Limitierungen der LC-MS/MS

- **Probendurchsatz;** typische Laufzeiten von LC-MS/MS-Analysen im TDM liegen zwischen drei und fünf Minuten, entsprechend einem Durchsatz von etwa 10 bis 20 Proben pro Stunde; dies ist ein Bruchteil des Durchsatzes automatisierter Immunoassays, der mittlerweile bei manchen Systemen bei über 200 Tests pro Stunde liegt. Wie im vorigen Absatz dargestellt, können für die LC-MS/MS im Allgemeinen einfache chromatographische Bedingungen gewählt werden; dennoch ist die Chromatographie ein unverzichtbarer, integraler Teil des Analysenprozesses für quantitative Anwendungen der MS/MS. Hierin unterscheiden sich LC-MS/MS-Analysen im TDM-Bereich von anderen Anwendungen. Bei eher semiquantitativen Anwendungen der MS/MS in sehr hohen Konzentrationsbereichen der Analyten – wie beim erweiterten Neonatalscreening – kann das MS/MS-System in der Tat als Meßinstrument per se betrachtet werden, bei dem das LC-System lediglich als Probengeber dient. Für TDM-Anwendungen trifft dies nicht zu.
- **Anschaffungskosten;** sie sind um ein Vielfaches höher als diejenigen konventioneller HPLC-Systeme und liegen etwa im Bereich von Immunoassay-Automaten; bei diesen werden die Gerätekosten jedoch häufig langfristig auf die laufenden Reagenzienkosten umgelegt, sodass hohe Anfangsinvestitionen von manchen Labors umgangen werden können. Bei der Implementierung zeitkritischer LC-MS/MS-Analysen muss unbedingt auch eine Back-up-Lösung in die Kostenkalkulation einbezogen werden.
- **Analytische Qualität;** nur für eine Minderheit der relevanten Analyten des TDM sind derzeit stabilisotopenmarkierte interne Standards verfügbar, die ein Höchstmaß an analytischer Richtigkeit gewährleisten (Isotopen-Verdünnungs-Technik); bei der ansonsten nötigen Verwendung von strukturell verwandten Stoffen des Zielanalyten ("Homologen") zur internen Standardisierung wird in manchen Fällen eine nur befriedigende Präzision erreicht. Meistens jedoch werden mit der LC-MS/MS auch ohne den Einsatz Stabilisotopen-markierter interner Standards bessere Variationskoeffizienten als mit vergleichbaren Immunoassays erzielt, wie sich besonders bei der Messung von Tacrolimus und Ciclosporin A zeigt. Unterliegt eine LC-MS/MS-Methode bei minimierter Probenvorbereitung Matrix-Effekten in der Ionisation (Ion suppression, bzw. Ion enhancement) [6], können diese Effekte interindividuell variabel sein. Insgesamt hängt die Validität einer LC-MS/MS-Methode entscheidend davon ab, ob Störeinflüsse von der verwendeten inter-

nen Standard-Substanz vollständig kompensiert werden; dies ist im Einzelfall auch von der jeweiligen Probenvorbereitung abhängig und muss im Rahmen der Methodenvalidierung vor allem durch Tests auf Ion suppression geklärt werden [6]. Auch die Spezifität der Tandem-massenspektrometrischen Detektion darf nicht überschätzt und als absolut angesehen werden [5, 7]. In einer biologischen Probe befinden sich tausende von Substanzen, die durch die Electrospray-Ionisation dem Massenspektrometer zugeführt werden. Durch Mehrfach-Ionisation können aus einem Stoff zahlreiche Masse-zu-Ladungs-Spezies gebildet werden. Aus einem Molekölion resultieren im Allgemeinen etwa 10 Produktionen. Daher ist es grundsätzlich möglich, dass in biologischen Proben die selben Massenübergänge wie diejenigen des Zielanalyten durch endogene Substanzen oder auch durch Xenobiotika gegeben sind (isobare Übergänge). In der Tat findet sich in einem LC-MS/MS-Chromatogramm – bei guter chromatographischer Auftrennung – für einen Massenübergang keineswegs immer nur ein einziger Peak. Im Rahmen der Methodenentwicklung gilt es daher immer zu klären, inwieweit jeweils die chromatographische Trennung (durch einen hohen Anteil organischen Lösungsmittels bzw. kleine Säulendimensionen) minimiert werden darf. Hierbei ist es essentiell, dass tatsächliche Patientenproben zur Validierung verwendet werden. So kann z.B. bei Ciclosporin A-behandelten Patienten ein Metabolit gefunden werden, der identische Massenübergänge aufweist wie das vielfach als interner Standard verwendete Ciclosporin D [8]. In diesem Fall kann eine relativ zeitaufwändige Chromatographie notwendig sein, um valide Resultate zu erzielen. Würde für eine entsprechende Spezifitätsuntersuchung lediglich aufgestocktes "Drug-free"-Plasma verwendet, könnte es zu falschen Schlußfolgerungen kommen. Insgesamt wird deutlich, dass auch LC-MS/MS-Methoden für das TDM trotz der prinzipiell enormen Leistungsfähigkeit der Grundtechnologie einer sorgfältigen Validierung und Qualitätskontrolle bedürfen.

- **Handhabung;** die Bedienerfreundlichkeit gegenwärtig erhältlicher LC-MS/MS-Systeme ist noch weit vom Standard heutiger Immunoassay-Automaten entfernt. Entsprechend ist in einem LC-MS/MS-Labor vor allem auch ein sehr sorgfältiges, kontinuierliches Mitarbeiter-Training notwendig. Arbeitsanleitungen müssen umfassend und individuell verfasst werden. Im Allgemeinen liegt die direkte Systemverantwortlichkeit für LC-MS/MS-Systeme bei einem Akademiker. Die täglichen Bedienungsmaßnahmen und das Ansetzen analytischer Serien durch das technische Assistenzpersonal, von der Probenvorbereitung bis zur Auswertung, sind sehr komplex und mit zahlreichen Arbeitsschritten verbunden. Dabei ist die Zahl der Fehlerquellen verglichen mit Immunoassay-Systemen weitaus größer (z.B. unrichtiges oder versäumtes

Nachfüllen der mobilen Phasen, Fehlbeschriftungen von Gefäßen bei der Probenvorbereitung oder Fehlzusordnungen in der Probenliste). Werden technische Probleme erst am Serienende bemerkt (z.B. Verstopfen der Elektrospray-Kapillare, Probleme der Gasversorgung, Leerlaufen der mobilen Phasen, Überschreiten von Druckmaxima der HPLC-Pumpen), kommt es durch den notwendigen Neustart langer Serien unter Umständen zu einer erheblichen Verspätung der Befunderstellung, möglicherweise mit direkten Folgen für die Patientenversorgung.

Geräte- und Arbeitscharakteristika

Momentan werden LC-MS/MS-Systeme von vier Firmen angeboten (Applied Biosystems, ThermoFinnigan, Varian, Waters). Dabei sind unterschiedlich leistungsstarke Systeme verfügbar. Das Preisspektrum für LC-MS/MS-Komplettsysteme reicht von etwa 250.000 € bis 600.000 €. Ein Geräte-Leasing ist grundsätzlich möglich.

MS/MS-Geräte sind im Allgemeinen sehr robust. Mit meist sehr geringem Wartungs- und Instandhaltungsaufwand ist prinzipiell ein 24-Stunden-Dauerbetrieb realisierbar. Bei der LC-MS/MS erfolgt die Ionisation bei Atmosphären-Druck. Dies ermöglicht, dass selektiv ein "sauberer" Ionen-Strahl in den Höchstvakuum-Bereich des Massenspektrometers geleitet wird; nicht ionisierte Verunreinigungen werden abgefangen. Hierdurch wird die Verschmutzung schwer zugänglicher Teile des Massenspektrometers minimiert. Entsprechend müssen diese Systembestandteile im Rahmen einer Wartung nur sehr selten gereinigt werden. Im Gegensatz dazu gelangt bei der GC-MS das gesamte chromatographische Eluat in den Hochvakuum-Bereich, sodass in meist kurzen Intervallen sehr aufwändige Reinigungsarbeiten durch den Anwender notwendig sind. Aus dem gleichen Grund ist bei der GC-MS eine sehr aufwändige Probenvorbereitung mit möglichst weitgehender Matrixabreicherung unumgänglich. Instandhaltungsmaßnahmen an Quellenbestandteilen der LC-MS/MS, die vom Anwender selbst vorzunehmen sind, wie Tausch der Spray-Kapillare und Reinigung des Einlasses, sind nicht sehr zeitintensiv, müssen aber sehr sorgfältig ausgeführt werden.

Der technische Service von klinisch eingesetzten MS/MS-Systemen ist – verglichen mit klinisch-chemischen bzw. immunochemischen Analysengeräten – derzeit teilweise noch problematisch. Bei labormedizinischen Standardanalyzern besteht herstellerseitig größtes Interesse daran, dass Systeme reibungslos arbeiten, weil nur dann der Absatz entsprechender Reagenzien gewährleistet ist. Die Situation ist bei reinen Geräteherstellern, wie es derzeit für die Anbieter von LC-MS/MS-Systemen noch weitgehend gilt, eine völlig andere. Wartungsverträge mit garantierten kurzen "Response-Zeiten" sind auf die Gegebenheiten in der pharmazeutischen Industrie aus-

gerichtet und entsprechend außerordentlich teuer. Daher ist eine relativ tiefgreifende gute Gerätekenntnis, welche auch zu Fehlerbehebungen befähigt, für den LC-MS/MS-Anwender im klinischen Routinelabor essentiell, da nur so ein reibungsloser Laborbetrieb gewährleistet werden kann. Aufgrund der hohen Zahl bewegter Teile ist dabei das HPLC-Modul mit Probengeber im Allgemeinen weitestgehend störanfälliger als das MS/MS-Modul. Analytbezogener applikativer Service wird gegenwärtig weder von Geräteherstellern noch von der Diagnostika-Industrie geboten.

HPLC und MS werden bei den vier kommerziell verfügbaren Systemen von einer gemeinsamen Software gesteuert. Diese Software-Pakete sind jedoch verglichen mit immunochemischen Analysengeräten keineswegs umfassend. So werden wesentliche Teile des Gesamtsystems nicht kontrolliert bzw. entsprechende Fehler werden nicht gemeldet (z.B. Unterbrechung des Gasflusses, Kühlung der Turbomolekular-Vakuumpumpen, Flüssigkeitsstände von mobilen Phasen bzw. Flüssigkeitsabfall). Einschalt- und Ausschaltsequenzen müssen höchst gewissenhaft eingehalten werden, um Schäden zu vermeiden (z.B. muss API-Gas eingeschaltet werden, bevor die Quelle aktiviert wird, um Überhitzungen zu verhindern; keine entsprechende Warnmeldung der Software). Softwareseitig sind bei allen Geräteherstellern noch erhebliche Verbesserungen hinsichtlich der Anwenderfreundlichkeit und Betriebssicherheit nötig.

Die Quantifizierung innerhalb von Mess-Serien erfolgt bei LC-MS/MS-Verfahren durch entsprechende Auswertemodule der Systemsoftware; dennoch müssen grundsätzlich alle Chromatogramme vom Bediener visuell kontrolliert und z.B. bei uneinheitlicher Basis-Linien-Ziehung nachintegriert werden. Dies stellt einen nicht zu vernachlässigenden Zeitaufwand dar.

Die verschiedenen Techniken der Atmospheric pressure ionization (API), Electrospray ionization (ESI), Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) und Atmospheric pressure photo-ionization (APPI) können außer mit Quadrupol-MS/MS-Analysatoren prinzipiell auch mit einfacheren massenspektrometrischen Detektions-Systemen gekoppelt werden. Geräte mit nur einem Quadrupol-Massenfilter ohne Kollisionszelle (Single stage-Systeme) erlauben eine massenselektive HPLC-Detektion, die zweifellos der UV- und der Fluoreszenz-Detektion überlegen ist, aber weitaus weniger spezifisch und sensitiv ist als die Tandem-massenspektrometrische Detektion. Entsprechend sind bei biologischen Proben unter Verwendung solcher Detektoren eine aufwändige Probenvorbereitung und eine umfangreiche Chromatographie mit langen Laufzeiten notwendig. Da Single stage-Systeme preislich nicht deutlich unterhalb von MS/MS-Systemen angesiedelt sind, ist ihre Anwendung im TDM momentan und wohl auch künftig recht begrenzt. Bei der sogenannten Ion Trap-Technik werden Ionen einer bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis in ei-

nem elektrischen Feld gesammelt und dann diskontinuierlich zu Fragmentationen desintegriert. Man spricht hier von "MS-MS in time" im Gegensatz zur "MS-MS in space" bei der Quadrupol-MS/MS-Technik. Die Ion Trap-Technik erlaubt es, aus den Fragmentationen der "1. Generation" ein definiertes Ion zu selektieren und einer erneuten Desintegration zu unterziehen; somit ist nicht nur ein MS/MS-Betrieb, sondern ein MSⁿ-Betrieb möglich. Damit verspricht die Ion Trap-Technik im Prinzip eine noch höhere Detektionsspezifität als die Quadrupol-MS/MS-Technik. Aufgrund ihres diskontinuierlichen Arbeitsprinzips liefern Ion Trap-Systeme allerdings nur relativ wenig Datenpunkte über einem chromatographischen Peak. Daher ist diese – preislich relativ günstige – Technik bisher überwiegend für qualitative Untersuchungen verwendet worden, während die Eignung von Ion Trap-Systemen für quantitative Anwendungen bislang erst in wenigen Arbeiten untersucht worden ist [9, 10].

Anwendung der LC-MS/MS im Therapeutischen Drug Monitoring

Obwohl routinetaugliche LC-MS/MS-Systeme seit etwa 10 Jahren kommerziell verfügbar sind, ist die Anwendung dieser Technik im Therapeutischen Drug Monitoring bis jetzt noch auf eine relativ überschaubare Anzahl von Laboratorien begrenzt geblieben. Im Bereich der pharmakokinetischen Analytik der pharmazeutischen Industrie hat sich die LC-MS/MS in kurzer Zeit als Standardtechnik etabliert und sowohl GC-MS als auch konventionelle HPLC-Methoden fast vollständig verdrängt. Das Immunsuppressivum Sirolimus (syn. Rapamycin) hat der Anwendung der LC-MS/MS in der labormedizinischen Routine einen wesentlichen Impuls gegeben. Für das Präparat, das im Gegensatz zu Tacrolimus und Ciclosporin keine Nephrotoxizität aufweist, wird vom Hersteller ein regelmäßiges Spiegelmonitoring gefordert. Als Sirolimus im Jahr 2000 auf den Markt kam, war der für die klinischen Zulassungsstudien verwendete Immunoassay zur Vollblut-Spiegelmessung von Sirolimus allerdings nicht mehr kommerziell verfügbar. Die Messung von Sirolimus mittels konventioneller HPLC-UV-Technik verlangt aufgrund des sehr niedrigen Konzentrationsbereichs und der geringen UV-Absorption des Analyten eine sehr arbeitsaufwändige Probenvorbereitung und ist daher für große Serien kaum anwendbar. Entsprechend war die rasche Etablierung der Messung von Sirolimus mittels LC-MS/MS in einer ausreichenden Zahl von Labors zwingend für die klinische Einführung dieses Präparates, das die Transplantationsmedizin zweifellos wesentlich bereichert. So wurden in den Labors von Transplantationszentren relativ rasch entsprechende Systeme implementiert. Da diese Systeme bzw. die notwendigen Back-up-Systeme in den Labors teilweise freie Messkapazität haben, ist die Messung von Ciclosporin A bzw. Tacrolimus (FK506) mittels einer einheitlichen

LC-MS/MS-Methodik eine interessante Alternative zur kostenintensiven Messung dieser Parameter mittels Immunoassays geworden.

Es ist mittlerweile offensichtlich, dass die LC-MS/MS ernsthaft und dauerhaft mit den beiden bisherigen Standardtechniken des therapeutischen Monitorings, dem Immunoassay bzw. konventionellen HPLC-Verfahren, konkurriert. Zweifellos wird die LC-MS/MS-Technologie auf Dauer einen festen Platz im methodischen Spektrum des Therapeutischen Drug Monitoring einnehmen.

Konkurrenz zu etablierten Immunoassays

Die LC-MS/MS wird sich in den kommenden Jahren als komplementäre Technik zum Immunoassay vermutlich in einer stetig wachsenden Zahl von Labors etablieren. Bei welchen Parametern der LC-MS/MS gegenüber der Immunoassay-Technologie relevante "Marktanteile" zukommen werden, ist momentan noch nicht klar abzusehen. Für Analyten, bei denen eine sehr rasche Befunderstellung in der Klinik oder in deren direkter Nähe notwendig ist und für die leistungsfähige Immunoassays bereits zur Verfügung stehen – wie es z.B. für Vancomycin, Theophyllin, Methotrexat oder Phenytoin der Fall ist –, wird sich die LC-MS/MS trotz eines gewissen Einsparungspotentials bei Reagenzienkosten aufgrund der komplexen Gesamt-Handhabung solcher Systeme und der relativ zeitintensiven Analytik kaum durchsetzen. Bei den extrem kostenintensiven Immunoassays zur Messung von Immunsuppressiva, die typischerweise in großen Serien in Transplantationszentren verwendet werden, ist eine Umstellung auf die LC-MS/MS-Technik mit ihren niedrigen laufenden Materialkosten für viele Labors eine realistische Alternative. Bei einer Kostenkalkulation sollte jedoch die relativ hohe Personalbindung der LC-MS/MS mit einberechnet werden. Werden die spezifischen technisch-logistischen Anforderungen der LC-MS/MS angemessen berücksichtigt, kann sie zweifellos als Routinetechnik für alle Immunsuppressiva genutzt werden. Insbesondere ist vor einer Umstellung zu beachten, dass bei Tacrolimus und Ciclosporin von den Probeneinsendern oft schon nachmittags die Werte morgendlicher Blutentnahmen erwartet werden, weil die Abenddosierung festgelegt werden muss. Bei einem Probendurchsatz von 10–20 Proben pro Stunde und einer vorgeschalteten manuellen Probenvorbereitung kann diese Forderung abhängig von der Probenzahl eines Transplantationszentrums problematisch sein und den Parallelbetrieb zweier Systeme erfordern. Vor allem bei der im stationären Sektor zeitkritischen Immunsuppressiva-Analytik muss in einem entsprechenden Labor grundsätzlich ein lückenloses Back-up-Konzept etabliert sein, sowohl instrumentell als auch personell. Bei der Messung von Tacrolimus wird mit der LC-MS/MS aufgrund der höheren Analysenspezifität gegenüber Immunoassays eine um etwa 30% niedrigere Wertelage gefunden; dies muss in den Dosis-Anpassungs-Richtli-

nien des jeweiligen Transplantationszentrums entsprechend berücksichtigt werden. Ein Alternieren zwischen LC-MS/MS- bzw. Immunoassay-Analytik ist dementsprechend nicht praktikabel.

Konkurrenz zu etablierten konventionellen HPLC-Methoden

Bei Analyten, deren Messung keiner besonderen Eile unterliegt und bei denen Befunderstellungszeiten von 24–48 Stunden akzeptabel sind, wird sich in den kommenden Jahren vermutlich tendenziell die Zentralisierung der Analytik in Einsendelabors fortsetzen. Dort werden konventionelle HPLC-Techniken voraussichtlich weitgehend von der LC-MS/MS verdrängt werden. Die verringerte Personalbindung, der höhere Probendurchsatz und die höhere analytische Zuverlässigkeit verglichen mit konventionellen HPLC-Techniken wiegen – eine gute Geräteauslastung vorausgesetzt – die hohen Geräteanschaffungskosten der LC-MS/MS auf. Etablierte Analyten, bei denen dies vermutlich zutrifft, sind u.a. trizyklische Antidepressiva [11], Antiepileptika wie Lamotrigin, Topiramat [12], Oxcarbazepin [13], Gabapentin [14] oder Levetiracetam, Tuberkulostatika, antiretrovirale Substanzen [15], Amiodaron [10], Busulfan [16] oder Itraconazol [17]. Wenngleich noch nicht für alle angesprochenen Wirkstoffe entsprechende LC-MS/MS-Methoden publiziert sind, besteht an deren Machbarkeit prinzipiell kein Zweifel [18].

Innovative und wissenschaftliche Anwendungen

Bezogen auf die Gesamtzahl der heute eingesetzten Arzneimittel ist nur für einen kleinen Teil der Wirkstoffe ein Therapeutisches Drug Monitoring etabliert. Für die Mehrzahl der Arzneimittel kann mit Standarddosierungen, teilweise orientiert an biometrischen Variablen bzw. Basisparametern von Nieren- und Leberfunktion, in der Tat eine hinreichende Sicherheit der Therapie hinsichtlich Wirksamkeit und Ausbleiben von unerwünschten Nebenwirkungen erreicht werden. Allgemein ist ein Therapeutisches Drug Monitoring bei Arzneimitteln relevant, bei denen ein enges therapeutisches Fenster besteht, ein Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Zusammenhang vorliegt, relevante inter- und intraindividuelle Varianzen in Resorption, Metabolisierung und Elimination bestehen und für die kein einfacher, funktioneller Parameter zur Therapieüberwachung verfügbar ist. Für eine Reihe von Parametern, die bislang nicht spiegeladaptiert verabreicht werden, liegen bereits Daten vor, die für den Nutzen eines TDM sprechen, wobei ein solches Monitoring aber vor allem mangels Verfügbarkeit eines gut handhabbaren Meßverfahrens noch nicht "flächendeckend" etabliert ist. Mit konventionellen HPLC-Techniken ist die Messung für diese Stoffe generell zwar möglich, für eine Anwendung im großen Umfang ist die HPLC jedoch nicht ausreichend praktikabel. Als Beispiel kann hier der Wirk-

stoff Ribavirin genannt werden; an einem großen Kollektiv konnte gezeigt werden, dass ein Spiegel von 3.000 µg/l überschritten werden muss, um kombiniert mit Interferon eine verbesserte Heilungsrate chronischer Hepatitis C-Infektionen zu erzielen [19]. Weitere Beispiele sind (nach Herstellerinformationen) Ganciclovir (auch als aktiver Metabolit von Valganciclovir) in der Behandlung und Prophylaxe von CMV-Infektionen oder die Messung von Azathioprin-Metaboliten in der Behandlung des M. Crohn [20]. Bei solchen Parametern wäre die Entwicklung von Immunoassays für die Diagnostika-Industrie zwar prinzipiell interessant, bei noch nicht konkret taxierbarem Markt werden jedoch die sehr hohen Entwicklungskosten für solche Tests gescheut. Dagegen ermöglicht hier die Anwendung der LC-MS/MS in zentralisierten Labors bereits kurzfristig ein routinemäßiges TDM in größerem Umfang, was direkt zu verbesserten Behandlungsergebnissen bei reduzierten Behandlungskosten beitragen wird.

Neben Arzneimitteln, bei denen bereits gute Daten eine spiegeladaptierte Therapieindividualisierung sinnvoll erscheinen lassen, ein TDM aber mangels großserientauglicher Analytik noch nicht etabliert ist, gibt es eine erhebliche Zahl von häufig eingesetzten Arzneimitteln, bei denen grundsätzliche Überlegungen und vorläufige Ergebnisse dafür sprechen, dass ein TDM zur Verbesserung von Behandlungserfolgen beitragen kann, für die jedoch entsprechende Studien noch nicht durchgeführt wurden. Als Beispiele sind hier u.a. synthetische Steroide [21], selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs) [22], das Antimykotikum Voriconazol [23] oder Cytochrom-P450-abhängig metabolisierte Zytostatika wie Cyclophosphamid und Paclitaxel zu nennen [24]. Da der Ausgang entsprechender Studien jedoch prinzipiell offen ist, kann nicht erwartet werden, dass die Diagnostika-Industrie umfangreich in die Entwicklung zuverlässiger, großserientauglicher Immunoassays investieren wird. Gleiches gilt für die Arzneimittelhersteller, die aus Marketinggründen im Allgemeinen eine stark restriktive Haltung gegenüber derartigen Studien einnehmen. Auch hier kann die LC-MS/MS-Technologie eine wesentliche Lücke schließen, da sie es erlaubt, mit überschaubarem Entwicklungsaufwand und begrenzter Personalbindung höchst zuverlässige Methoden selbst für umfangreiche Multicenter-Studien bereitzustellen. Mit konventionellen HPLC-Methoden würden bei größeren Studien rasch Kapazitätsgrenzen erreicht und die Zuverlässigkeit der Resultate entspricht in keiner Weise derjenigen massenspektrometrischer Methoden.

Durch die Erkenntnisse der Pharmakogenetik wird zunehmend offensichtlich, dass genetische Faktoren erhebliche interindividuelle Varianzen in der Resorption, Verteilung und Elimination von Arzneimitteln determinieren. Auch hier gewinnt das TDM an Bedeutung, etwa wenn bei einem Patienten nach genetischen Untersuchungen ein hypo- oder hypermetabolisierender Phänotyp wahrscheinlich ist und einschlägige Arzneimittel zwingend verabreicht werden müssen (z.B. 5-Fuoruracil

oder Azathioprin). Neben den Ansätzen zu einer Genotypisierung relevanter Arzneimittel metabolisierender Enzymsysteme (z.B. CYP-P450-Genotypisierung in Chip-Array-Technologie) hat auch eine entsprechende Phänotypisierung ein erhebliches diagnostisches Potential. Hierfür können Test-Cocktails verwendet werden, um aus den Konzentrationsverhältnissen von Ausgangssubstanzen und typischen Metaboliten in Blut oder Urin Rückschlüsse zu ziehen auf die Aktivität der entsprechenden Stoffwechselwege [25]. Für derartige Multianalytquantifizierungen stellt die LC-MS/MS eine ideale analytische Basis dar.

Zusammenfassend erscheint die Prognose angemessen, dass sich die LC-MS/MS-Technologie in den kommenden Jahren zu einem wesentlichen "Motor" für das TDM und die klinische Pharmakologie insgesamt entwickeln wird.

Technische Entwicklungsperspektiven

Die Anwendungscharakteristika derzeit verfügbarer LC-MS/MS-Systeme sind noch weitgehend auf die Gegebenheiten von Spezial- und Forschungslabors (wie etwa der pharmazeutischen Industrie) ausgerichtet. Dort ist im Allgemeinen eine relativ große Zahl sehr gut qualifizierter Mitarbeiter ausschließlich für ein derart komplexes Analysensystem zuständig. Davon unterscheidet sich die Situation in einem klinischen Labor meist deutlich, in dem die Mitarbeiter normalerweise an mehreren, technisch völlig unterschiedlichen Arbeitsplätzen eingesetzt werden, um so einen lückenlosen 7-Tage-Betrieb aufrechtzuerhalten. Dies ist angesichts der komplexen Handhabung derzeit verfügbarer LC-MS/MS-Systeme problematisch. Zweifellos ist es grundsätzlich möglich, durch eine Reihe von Weiterentwicklungen von Hardware und Software die Praktikabilität von LC-MS/MS-Systemen wesentlich zu verbessern. Wünschenswert sind u.a. Flüssigkeits-Management-Systeme mit Füllstanderkennung von mobilen Phasen und Flüssigabfall, Steck-Schlauchverbindungen für konfektionierte Lösungsmittel-Kanister sowie vereinfachte Start- und Abschaltprozeduren. Vorstellbar ist auch die Entwicklung weitgehend geschlossener Komplettsysteme auf Basis der LC-MS/MS, die unter einer einheitlichen Software und auf einer Plattform auch die Probenaufbereitung einschließen und so eine Primärprobenezuführung erlauben.

Eine gesteigerter Probendurchsatz von LC-MS/MS-Systemen ist ein weiteres wesentliches Entwicklungsziel. Dazu können optimierte chromatographische Systeme mit sehr hoher Trennkapazität beitragen, evtl. in einem miniaturisierten Format ("Lab-on-a-chip"-Prinzip), aber auch ein so genanntes Multiplexing. Dabei erfolgt die chromatographische Trennung mehrerer Proben parallel. Entweder wird dann nur während der Elution der Zielanalyten in das MS/MS-System gefördert, oder die Electrospray-Quelle alterniert durch einen Schrittmotor in Sekundenbruchteilen zwischen zwei oder mehreren

HPLC-Kanälen (MUX-Technologie). Entsprechende komplexe Ansätze zur Steigerung des Probendurchsatzes befinden sich jedoch noch im Experimentalstadium.

In den vergangenen Jahren konnten alle Gerätehersteller von Gerätegeneration zu Gerätegeneration eine gesteigerte Empfindlichkeit erreichen, vor allem durch einen optimierten Transfer der Ionen von der Quelle in das Hochstvakuum. Mit den Basisgeräten der jeweiligen Hersteller ist für die meisten Analyten ohne arbeitsaufwändigen Aufreicherungs-Schritt in der Probenvorbereitung derzeit eine Nachweisgrenze im niedrigen $\mu\text{g/l}$ -Bereich realisierbar, was für die allermeisten Anwendungen im TDM ausreichend ist. Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit von LC-MS/MS-Systemen kann jedoch auch für das TDM praktische Vorteile haben: Ein geringeres injiziertes Primärprobenvolumen reduziert Kontaminationen, verlängert die Standzeiten der Komponenten und steigert vermutlich insgesamt die Robustheit des Gesamtsystems weiter. Außerdem könnten empfindlichere Systeme die Akquisition von Massenübergängen ermöglichen, die eine geringere Ionenausbeute, aber eine höhere Spezifität als die Standard-Massenübergänge aufweisen. So würde auch in größerem Umfang das Prinzip von "Quantifier" und "Qualifier" nutzbar, d.h. die vergleichende Akquisition mehrerer Massenübergänge eines einzelnen Analyten mit dem Ziel, mögliche Interferenzen sicher aufzudecken. Zu beachten ist allerdings, dass eine gesteigerte Empfindlichkeit auch dazu führen kann, dass bisher irrelevante Störfaktoren wie Lösungsmittelkontaminationen ein Problem werden.

Neben gerätetechnischen Entwicklungen hin zu einem benutzerfreundlichen und flexiblen MS/MS-basierten Routine-Analyzer mit einer Minimierung der Eingriffe durch den Bediener kann vor allem auch das Angebot an kompletten, analytischspezifischen Komponenten-Kits durch die Diagnostika-Industrie insgesamt die Praktikabilität der LC-MS/MS in Routineanwendungen verbessern. Entsprechende Kits sollten neben Kalibrator- und Kontrollmaterialien die jeweiligen mobilen Phasen, Probenvorbereitungs- und Trennsäulen und vor allem geeignete interne Standard-Substanzen enthalten. Durch derartige konfektionierte Lösungen einerseits und optimierte Hardware andererseits erscheint es realistisch, dass sich in den kommenden Jahren die Praktikabilität von LC-MS/MS-Anwendungen an diejenige von Immunoassay-Automaten annähern wird und entsprechend die Anforderungen an das Bedienungspersonal sinken werden.

Fazit

Die LC-MS/MS bereichert das Therapeutische Drug Monitoring zweifellos wesentlich. Es handelt sich um eine sehr flexible und produktive, aber in ihrer Handhabung derzeit noch anspruchsvolle Technologie. Die LC-MS/MS konkurriert bei allen bislang im TDM etablierten Para-

metern sowohl mit der Immunoassay-Technik als auch mit konventionellen HPLC-Verfahren. Stärken der Technik (wie niedrige Verbrauchskosten) und Limitierungen (wie relativ geringer Probendurchsatz) müssen für den jeweils beabsichtigten Einsatz nüchtern analysiert und bewertet werden. Eine dominierende Rolle wird die LC-MS/MS vermutlich bei allen innovativen Parametern erlangen, für die in Zukunft ein TDM neu etabliert wird. Gerätehersteller und der Diagnostika-Industrie bietet die LC-MS/MS über den gegenwärtigen technischen Stand der Methode hinaus ein großes Entwicklungspotential, um die Praktikabilität in der Routineanwendung zu verbessern.

Danksagung

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Ute Spöhrer, Apotheke des Klinikums der Universität München, für die eingehende Revision des Manuskripts.

Literatur

1. Vogeser M. Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie in der klinischen Chemie. *J Lab Med* 2004;28: 195–204.
2. Wilcken B, Wiley V, Hammon J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003;348:2304–12.
3. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood. *Clin Chem* 2002;48:955–8.
4. Vogeser M, Fleischer C, Meiser B, Groetzer J, Spöhrer U, Seidel D. Quantification of sirolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using on-line solid-phase extraction. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:40–5.
5. Vogeser M, Zachoval R, Spöhrer U, Jacob K. Potential lack of specificity using electrospray tandem-mass spectrometry for the analysis of mycophenolic acid in serum. *Ther Drug Monit* 2001;23:722–4.
6. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38: 328–34.
7. Kushnir MM, Rockwood AL, Nelson GJ, Yue B, Urry FM. Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38: 319–27.
8. Vogeser M, Spöhrer U. Pitfall in the high-throughput quantification of whole blood cyclosporin A using LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:400–2.
9. Kollroser M, Schober C. Determination of Coumarin-type Anticoagulants in Human Plasma by HPLC-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with an Ion Trap Detector. *Clin Chem* 2002;48:84–91.
10. Kollroser M, Schober C. Determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *J Chromatogr B* 2002;766:219–26.
11. Gutteck U, Rentsch KM. Therapeutic drug monitoring of 13 antidepressant and five neuroleptic drugs in serum with

- liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1571–9.
12. Britzi M, Soback S, Isoherranen N, Levy RH, Perucca E, Doose DR, et al. Analysis of topiramate and its metabolites in plasma and urine of healthy subjects and patients with epilepsy by use of a novel liquid chromatography-mass spectrometry assay. *Ther Drug Monit* 2003;25:314–22.
 13. Maurer HH, Kratzsch C, Weber AA, Peters FT, Kraemer T. Validated assay for quantification of oxcarbazepine and its active dihydro metabolite 10-hydroxycarbazepine in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2002;37:687–92.
 14. Ifa DR, Falci M, Moraes ME, Bezerra FA, Moraes MO, de Nucci G. Gabapentin quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study. *J Mass Spectrom* 2001;36:188–94.
 15. Villani P, Feroggio M, Gianelli L, Bartoli A, Montagna M, Maserati R, et al. Antiretrovirals: simultaneous determination of five protease inhibitors and three nonnucleoside transcriptase inhibitors in human plasma by a rapid high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay. *Ther Drug Monit* 2001;23:380–8.
 16. Murdter TE, Coller J, Claviez A, Schonberger F, Hofmann U, Dreger P, et al. Sensitive and rapid quantification of busulfan in small plasma volumes by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clin Chem* 2001;47:1437–42.
 17. Vogeser M, Spöhrer U, Schiel X. Determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma by use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:915–20.
 18. Maurer HH. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem* 2005;38:310–8.
 19. Jen JF, Glue P, Gupta S, Zambas D, Hajian G. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit* 2000;22:555–65.
 20. Wright S, Sanders DS, Lobo AJ, Lennard L. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:1123–8.
 21. Taylor RL, Grebe SK, Singh RJ. Quantitative, highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for detection of synthetic corticosteroids. *Clin Chem* 2004;50:2345–52.
 22. Morello KC, Wurz GT, DeGregorio MW. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:361–72.
 23. Vogeser M, Schiel X, Spöhrer U. Quantification of voriconazole in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:730–4.
 24. van Schaik RH. Implications of cytochrome P450 genetic polymorphisms on the toxicity of antitumor agents. *Ther Drug Monit* 2004;26:236–40.
 25. Yin OQ, Lam SS, Lo CM, Chow MS. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2921–33.