



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**CORSO DI LAUREA IN CHIMICA E TECNOLOGIA
FARMACEUTICHE**

**Sviluppo e Validazione di un metodo analitico per la
determinazione simultanea di 10 sostanze attive di antitumorali in
ambiente ospedaliero mediante Cromatografia Liquida
accoppiata alla spettrometria di massa (UHPLC-MS/MS)**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Enrica Calleri

Correlatore:

Dott.ssa Cristina Sottani

Tesi di Laurea Magistrale di
Ilham El Ouizi
Matr. 466054

Sommario

Sommario	2
1. Introduzione.....	4
2. Farmacologia e tossicità dei chemioterapici antitumorali	8
3. Normativa	13
4. Valutazione dell'esposizione a CA (monitoraggio ambientale).....	15
5. Tecniche analitiche LC-MS/MS.....	17
5.1. Fondamenti della Cromatografia: Principi e Tecniche.....	17
5.2. Applicazione della Tecnica UHPLC-MS/MS per il Monitoraggio dei Chemioterapici	18
6. Validazione del Metodo Analitico secondo le Linee Guida ICH.....	20
7. Scopo del Lavoro.....	22
8. Parte Sperimentale.....	23
8.1. Materiali e metodi.....	23
8.1.1. Prodotti chimici e reagenti	23
8.1.2. Materiali e Apparecchiature per gli esperimenti.....	24
8.1.3. Strumentazione UHPLC-MS/MS:	25
9. Monitoraggio Ambientale per la valutazione del rischio da esposizione a CA.....	26
9.1. Ottimizzazione della strategia di campionamento.....	27
9.2. Descrizione delle caratteristiche chimico-fisiche dei composti e loro caratterizzazione in spettrometria di massa in triplo quadrupolo	28
10. Risultati.....	30
10.1. Spettri di massa per i singoli composti	32
11. Parametri di validazione del metodo	36
11.1. Preparazione del campione	37
11.2. Preparazione delle Standard Stock Solutions (SSSs) per i 10 analiti e i 3 Standard Interni	37
11.3. Preparazione della Standard Stock Solution SSA1: Mix dei 10 Farmaci Antitumorali	38
11.4. Preparazione delle Working Standard Solutions (WSSs): ISmix (Mix degli Standard Interni) e SSA2 (Mix dei 10 Farmaci Antitumorali)	39
11.5. Curve di Calibrazione:	41
11.5.1. Linearità	41
11.6. Preparazione della curva di calibrazione in solvente e in matrice	42
11.7. Curve di Calibrazione nel Set C per i 10 Analiti	45
11.8. Determinazione dei LOD e LOQ per i 10 Analiti studiati:.....	55

11.9.	Accuratezza e Precisione	58
11.9.1.	Accuratezza e precisione (LOQ)	59
11.9.2.	Accuratezza e Precisione (QCs)	61
11.10.	Recupero Analitico: efficienza globale del metodo	64
11.11.	Ottimizzazione del pH delle fasi mobili e del gradiente cromatografico in UHPLC	66
11.12.	Studio e ottimizzazione della soluzione di desorbimento per l'estrazione degli analiti dalla matrice:	68
12.	Profili Cromatografici del QC2 per i 10 Analiti e i 3 Standard Interni	70
13.	Applicazione del metodo analitico a campioni reali in un ospedale del Nord Italia	71
14.	Conclusione	74
15.	Bibliografia	76

1. Introduzione

La chemioterapia è un trattamento medico che prevede l'uso di farmaci citotossici o antiblastici, indirizzati a distruggere le cellule tumorali e a impedirne la proliferazione e diffusione. Tuttavia, questi farmaci non agiscono esclusivamente sulle cellule tumorali ma possono colpire anche le cellule sane, in particolare quelle in fase di rapida proliferazione, come quelle del midollo osseo, delle mucose, della pelle e dei follicoli piliferi (1). I chemioterapici antiblastici, utilizzati per il trattamento dei tumori, sono il risultato di ricerca scientifica, scoperte accidentali e sviluppo di molecole sintetiche. La loro storia si articola in diverse fasi. Le origini della chemioterapia possono essere fatte risalire alla scoperta che alcune sostanze chimiche avevano effetti tossici sulle cellule cancerose. Uno dei primi principi attivi il mustargen (mecloretamina), è derivato dal gas mostarda. Negli anni '40, è stato utilizzato per trattare linfomi e ha aperto la strada per ulteriori ricerche sui farmaci che distruggono le cellule tumorali (2).

Ad oggi, le previsioni del GLOBOCAN 2022 (3), in accordo anche con quanto dichiarato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), stimano circa 20 milioni di nuovi casi di cancro (19.976.499) e quasi 10 milioni di decessi correlati al cancro (9.743.832) con un incremento che entro il 2050, sarà pari a circa 35 milioni di casi in tutto il mondo. Il cancro rappresenta, pertanto, una delle principali sfide di salute pubblica sia a livello mondiale che in Europa. Secondo le stime del "World Health Organization" (WHO) (4), nel 2019, il cancro, insieme alle malattie cardiovascolari, è tra le prime 10 cause di morte nel mondo e la sua incidenza sta aumentando costantemente.

Esistono diversi metodi disponibili oggi per il trattamento del cancro. Tra questi, i più comuni includono la chirurgia, chemioterapia, radioterapia, terapia ormonale, immunoterapia, terapia genica (5). Le dosi di farmaci somministrate variano notevolmente a seconda della natura specifica della malattia, del suo stadio di evoluzione e delle condizioni generali dei pazienti.

La maggior parte dei farmaci chemioterapici è somministrata in dosi nell'ordine dei milligrammi (6).

La ricerca scientifica nel campo dell'oncologia è in continua evoluzione, con l'obiettivo di migliorare le terapie antineoplastiche, la qualità di vita dei pazienti e di ridurre gli effetti collaterali dei farmaci a breve o lungo termine. Ad esempio, sono state sviluppate strategie terapeutiche integrate, che combinano diverse modalità di trattamento per massimizzare l'efficacia e ridurre gli effetti collaterali. Queste strategie possono includere la combinazione di chemioterapia, radioterapia, immunoterapia, chirurgia e terapie mirate (7).

Oggi, la ricerca continua a cercare farmaci più efficaci e con minori effetti collaterali, con un focus particolare su terapie immunologiche e medicina personalizzata. In sintesi, l'evoluzione dei chemioterapici antitumorali è il risultato di decenni di innovazione e approfondimento delle basi biologiche del cancro.

Un esempio è rappresentato dagli anticorpi monoclonali, la cui somministrazione ha portato a un incremento del successo terapeutico per alcune tipologie di tumore, come il carcinoma della mammella (8).

Il sito dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) fornisce i dati di consumo dei farmaci antineoplastici tramite il rapporto OsMed 2022. Secondo questo rapporto, i farmaci antineoplastici e immunosoppressori costituiscono la prima categoria terapeutica per spesa pubblica e costo medio per DDD, che rappresenta la dose definita giornaliera (in inglese, defined daily dose) (9).

In complesso, questi farmaci rappresentano una spesa di circa 6.932 milioni di euro, corrispondente al 28% della spesa totale. Rispetto all'anno precedente, tale spesa è aumentata del 5%. Tra il 2017 e il 2022 il valore della spesa pro capite per farmaci di classe A e acquistati dalle strutture pubbliche ha un evidente trend di crescita, dovuto sia all'aumento dei consumi sia al costo medio per DDD.

Inoltre le DDD/1000 ab die dei farmaci antineoplastici e immunomodulatori (numero medio di dosi definite giornaliere consumate da 1000 abitanti) sono passate da 13,3 nel 2014 a 18,7 nel 2022: la tabella seguente dettaglia inoltre la variazione della spesa lorda pro capite e delle DDD/1000 ab die a seconda del sesso dei pazienti e delle classi di età della popolazione (9).

PRINCIPALI INDICI DI SPESA, DI CONSUMO E DI ESPOSIZIONE
Farmaci antineoplastici e immunomodulatori

Spesa pubblica* in milioni di euro (% sul totale)	6.932,3	(28,0)
Δ % 2022-2021		5,0
Range regionale spesa lorda pro capite:	75,9	142,2
DDD/1000 ab die* (% sul totale)	18,7	(1,4)
Δ % 2022-2021		7,2
Range regionale DDD/1000 ab die:	14,5	21,3

* comprende la prescrizione convenzionata e gli acquisti da parte delle strutture sanitarie pubbliche



Distribuzione per età e sesso della spesa, della prevalenza d'uso e dei consumi in regime di assistenza convenzionata e distribuzione per conto 2022 (Figura e Tabella)



Fascia d'età	Spesa lorda pro capite			DDD/1000 ab die		
	Maschi	Femmine	Totale	Maschi	Femmine	Totale
0-4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
5-14	0,6	1,7	1,1	0,4	1,5	1,0
15-24	1,1	1,2	1,1	0,6	0,7	0,7
25-34	2,1	3,2	2,6	0,9	1,7	1,3
35-44	3,1	7,9	5,5	1,4	6,2	3,8
45-54	4,7	15,9	10,4	2,5	16,9	9,8
55-64	8,7	16,4	12,6	5,3	19,5	12,6
65-74	14,4	18,3	16,4	10,4	24,4	17,8
75+	26,1	14,3	19,1	26,9	22,0	24,0

Figura 1: Spesa Pubblica e Consumo di Farmaci Antineoplastici e Immunomodulatori

La tabella successiva n°1 (estratta dalla tabella 3.30 del Rapporto OsMed 2022) rappresenta la spesa totale e le DDD totali dei diversi farmaci erogati in regime di assistenza convenzionata e di acquisto diretto. Emerge che i farmaci oncologici e quelli immunosoppressori e immunomodulatori costituiscono la prima e la terza categoria in ordine di spesa pubblica totale (rispettivamente 4368 e 1761,4 milioni), nonostante il numero limitato di DDD (rispettivamente 235,6 e 103,9 milioni).

Tabella 1

Sottogruppo	Spesa totale (milioni)	DDD totali (milioni)
Farmaci oncologici	4368	235,6
Farmaci per l'ipertensione e lo scompenso cardiaco	2043,1	8040,6
Immunosoppressori ed immunomodulatori	1761,4	103,9
Antidiabetici	1352,4	1439,5
Ipolipemizzanti	1045,4	2449,8
Asma e BPCO	1040,5	687,6
Anticoagulanti	942,2	627,4
Sclerosi multipla	799,8	62,9
Antibiotici	779,5	347,4
Farmaci per l'ulcera peptica e malattia da reflusso gastroesofageo (MRGE)	749,2	1855,7
Vaccini	639,2	25,2
Antivirali anti-HIV	613,6	54,2
<i>altri</i>	2344,6	4891,4

Tabella 1: Spesa pubblica e consumo in DDD dei farmaci per principali categorie terapeutiche

2. Farmacologia e tossicità dei chemioterapici antitumorali

I chemioterapici antitumorali possono essere classificati come segue:

- a) agenti alchilanti (es. Dacarbazina, Busulfan, Cisplatino, Carboplatino, Ciclofosfamide, Ifosfamide, Melfalan, Mitomicina C, Tio-TEPA)
- b) antimetaboliti (5-fluorouracile, Metotrexato, Gemcitabina)
- c) inibitori del fuso mitotico (Taxolo, Vinblastina, Vincristina)
- d) inibitori dell'enzima topoisomerasi II (Doxorubicina, Epirubicina)
- e) generatori di radicali liberi (Daunorubicina, Camptotecina, Irinotecan)

a) Farmaci alchilanti

Gli agenti alchilanti si suddividono in diverse classi in base alla loro struttura chimica e al meccanismo d'azione. Tra le principali categorie troviamo le mostarde azotate, le nitrosouree, gli alchilsolfonati, i derivati dell'etileneimina, gli agenti a base di platino, i triazeni e altri composti alchilanti. Questa classificazione riflette la varietà di approcci utilizzati per interferire con il DNA delle cellule tumorali, sottolineando l'importanza di questi farmaci nel trattamento di numerosi tipi di tumore (10).

Gli agenti alchilanti agiscono principalmente alchilando le basi azotate del DNA, in particolare la guanina. Questo processo interrompe la replicazione e la trascrizione del DNA, inducendo l'apoptosi delle cellule tumorali. La loro natura elettrofila favorisce reazioni con nucleofili, come l'azoto e l'ossigeno presenti nel DNA, formando addotti covalenti e causando rotture del DNA (10).

Questi farmaci sono impiegati nel trattamento di numerosi tipi di tumore, tra cui leucemie, linfomi e tumori solidi come il carcinoma ovarico e i tumori cerebrali. Tuttavia, il loro utilizzo comporta effetti collaterali significativi. La tossicità per il midollo osseo rappresenta uno degli effetti più rilevanti, con conseguenti neutropenia, anemia e trombocitopenia. Inoltre, l'uso prolungato è associato a un aumento del rischio di tumori secondari, come la leucemia mieloide acuta. Anche sintomi gastrointestinali, tra cui nausea e vomito, possono influenzare negativamente la qualità della vita dei pazienti. Una gestione adeguata di questi effetti collaterali è essenziale per garantire un trattamento efficace e sicuro (11).

Esempio:

La ciclofosfamide è un estere ciclico fosfamidico della mecloretamina ed è uno degli agenti alchilanti più diffusi, grazie al suo ampio spettro di attività e alla facilità d'uso. È efficace nel trattamento di vari tumori solidi ed ematologici, come linfomi e leucemie. Oltre al suo utilizzo in oncologia, è impiegata nel trattamento di malattie autoimmuni grazie alle sue proprietà immunosoppressive. Inoltre, trova applicazione nella preparazione per i trapianti di midollo osseo, contribuendo a ridurre il rischio di rigetto. In sintesi, la ciclofosfamide è un farmaco versatile e cruciale nella pratica clinica.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, la ciclofosfamide subisce un'attivazione metabolica, trasformandosi in 4-idrossi-ciclofosfamide (4OHCP), che coesiste in equilibrio con il suo isomero, aldofosfamide (ALDO). Il 4OHCP rappresenta la forma attiva dotata di azione citotossica (12).

Tuttavia, l'uso della ciclofosfamide non è privo di effetti collaterali. Tra gli effetti avversi più comuni si annoverano la tossicità per il midollo osseo, che può causare neutropenia, anemia e trombocitopenia, aumentando il rischio di infezioni e complicazioni ematologiche. L'uso prolungato di ciclofosfamide è inoltre associato a un rischio maggiore di sviluppare tumori secondari, come la leucemia mieloide acuta. Altri effetti collaterali includono sintomi gastrointestinali, quali nausea e vomito, che possono influire negativamente sulla qualità della vita dei pazienti (10–12)

b) Antimetaboliti

Gli antimetaboliti agiscono alterando i processi metabolici che regolano la sintesi di folato, purine, pirimidine, nucleosidi, DNA e RNA. Si possono classificare in :

- Antagonisti dell'acido folico (es. metotrexato)
- Antagonisti delle purine (es. 6-mercaptopurina)
- Antagonisti delle pirimidine (es. 5-fluorouracile e gemcitabina)

Il primo antifolato ad essere utilizzato in clinica è stata l'aminopterina. Tuttavia, a causa della sua tossicità imprevedibile, l'aminopterina è stata sostituita dal **metotrexato (MTX)** all'inizio degli anni Cinquanta. L'effetto antifolato del metotrexato deriva dalla sua struttura, simile a quella dell'acido folico, che consente l'inibizione competitiva della diidrofolato reduttasi (DHFR). Il DHFR è un enzima chiave nella sintesi del timidilato e delle purine; catalizza la riduzione dei folati a tetraidrofolato (THF) in due fasi: nella prima fase, i folati vengono ridotti

a diidrofolato (DHF), che viene poi convertito in THF, la forma attiva dei folati, presente in diverse forme nell'organismo (13)

Il metotrexato (MTX) è un agente importante per il trattamento della leucemia acuta, del linfoma e dell'osteosarcoma. È anche utilizzato nel trattamento dei tumori del trofoblasto gestazionale. Inoltre, il metotrexato fa parte del regime chemioterapico combinato con ciclofosfamide e fluorouracile (CMF) per il trattamento del carcinoma della mammella, inclusi i trattamenti adiuvanti (14)

Il metotrexato (MTX) ad alte dosi può causare effetti collaterali comuni come nausea, vomito e anomalie epatiche. Altri sintomi gastrointestinali includono stomatite, diarrea e ulcere. A dosi elevate, si possono verificare mal di testa, affaticamento e alopecia, con un rischio di cirrosi a lungo termine. Inoltre, il MTX può causare mielosoppressione grave, specialmente se combinato con farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) (15)

Il 5-fluorouracile (5-FU) è un analogo dell'uracile, in cui l'atomo di idrogeno in posizione C-5 è sostituito da un fluoro. Questo farmaco entra rapidamente nelle cellule attraverso un meccanismo di trasporto facilitato simile a quello dell'uracile. All'interno della cellula, il 5-FU viene convertito in diversi metaboliti attivi, tra cui la fluorodeossiuridina monofosfato (FdUMP), la fluorodeossiuridina trifosfato (FdUTP) e il trifosfato di fluorouridina (FUTP). Questi metaboliti interrompono la sintesi dell'RNA e inibiscono l'enzima timidilato sintasi (TS), essenziale per la sintesi del timidilato, necessario per la replicazione e la riparazione del DNA. La diidropirimidina deidrogenasi (DPD) è l'enzima chiave nel catabolismo del 5-FU, convertendo il farmaco in diidrofluorouracile (DHFU), con alta espressione nel fegato.(16)

Il fluorouracile ha diverse applicazioni sistemiche nel trattamento di vari tipi di carcinoma, inclusi quelli anale, avanzato delle vie biliari, della cervice uterina, dell'esofago e del colon-retto (17–20). Secondo l'American Society of Clinical Oncology (ASCO), è raccomandato per il carcinoma nasofaringeo (21). Inoltre, esiste un protocollo approvato per il trattamento del carcinoma vescicale muscolo-invasivo da parte dell'American Urological Association, ASCO, American Society for Radiation Oncology e Society of Urologic Oncology (22). Il fluorouracile è anche un trattamento di riferimento per il carcinoma del colon-retto (23).

L'uso sistemico del fluorouracile può causare vari effetti collaterali, tra cui diarrea, vomito, nausea e disidratazione. Effetti più gravi includono neutropenia, febbre, leucopenia (24), con aumentato rischio di infezioni. Altri effetti gravi possono comprendere cardiotossicità (25), encefalopatia (26) e tossicità neurologica (27). L'applicazione topica minimizza gli effetti sistemici ma può causare irritazione cutanea e ulcere (28).

c) Inibitori del fuso mitotico

I farmaci inibitori del fuso mitotico possono essere classificati in quattro principali categorie in base al loro meccanismo d'azione: leganti della microtubulina, inibitori degli enzimi microtubulinici, inibitori degli enzimi mitotici e inibitori del checkpoint mitotico.

Gli agenti leganti la microtubulina, si legano all'eterodimero della tubulina stabilizzando i microtubuli impedendone la dissociazione. Questo ostacola il ciclo mitotico. Gli inibitori degli enzimi microtubulinici o delle chinesine mitotiche impediscono la funzione del fuso, causando l'arresto mitotico e la morte cellulare. Poiché le chinesine mitotiche non sono espresse nelle cellule nervose, questa classe di inibitori non causa neuropatia periferica. Gli Inibitori del Checkpoint mitotico agiscono su checkpoint come Chk1 (29).

Alcuni esempi di farmaci includono i taxani (ad esempio, il paclitaxel, noto come Taxol, e il docetaxel) e gli alcaloidi della Vinca (ad esempio, la vincristina e la vinblastina).

d) Inibitori della topoisomerasi I/II

Le topoisomerasi sono enzimi molto importanti che regolano la topologia del DNA e sono fondamentali per azioni biologiche come la replicazione, la trascrizione e la riparazione del DNA. L'emergere e la diffusione del cancro sono stati strettamente associati alla disregolazione delle topoisomerasi (30).

Le topoisomerasi I sono in grado di provocare una rottura su un singolo filamento della doppia elica del DNA, rilassando il DNA un giro alla volta. Le topoisomerasi II, agiscono introducendo tagli su entrambi i filamenti della doppia elica del DNA per svolgerlo. Il taglio avviene tramite trans-esterificazione (31). Gli inibitori della topoisomerasi sono quindi diventati potenziali farmaci antitumorali grazie alla loro capacità di ostacolare la normale funzione di questi enzimi. Gli inibitori della topoisomerasi I (es. Irinotecano) stabilizzano il complesso di rottura, mentre gli inibitori della topoisomerasi II (es. Doxorubicina ed etoposide) rompono il complesso con il DNA, causando rotture del DNA. Questi inibitori hanno dimostrato efficacia terapeutica nel trattamento di vari tipi di cancro, come il cancro al seno, ai polmoni e alle ovaie (30).

e) Generatori di radicali liberi

I radicali liberi sono atomi, molecole o ioni che contengono elettroni di valenza spaiati. Questi elettroni spaiati consentono ai radicali liberi di estrarre elettroni da altri composti, conferendo loro un'elevata reattività. I radicali liberi sono generalmente transitori e reagiscono in modo non selettivo con le molecole circostanti. In chimica, i radicali liberi sono intermedi vitali associati a diversi processi chimici, tra cui la polimerizzazione radicalica e la catalisi, ecc. Sebbene l'eccesso di radicali liberi possa causare problemi di salute, essi possono anche essere utilizzati come strumenti utili per applicazioni biomediche (32).

Il meccanismo d'azione dei generatori di radicali liberi nel trattamento del cancro si basa sulla loro capacità di indurre stress cellulare e promuovere l'apoptosi. Radicali attivi come $\bullet\text{OH}$, $\text{Cl}\bullet$, NO e radicali organici ($\text{R}\bullet$) provocano diversi tipi di stress cellulare, tra cui stress ossidativo, stress da radicali del cloro e stress nitrosativo. Questi tipi di stress portano a un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, perossidazione lipidica, danni alle proteine, rotture del DNA a doppio filamento, riduzione degli antiossidanti intracellulari e disfunzione mitocondriale. Nel complesso, questi effetti compromettono la funzione cellulare, amplificano le risposte infiammatorie e, infine, inducono l'apoptosi (32).

Un esempio è dato dalla doxorubicina. Questo agente antitumorale si intercala nel DNA, inibisce gli enzimi topoisomerasi, altera il corretto funzionamento dei mitocondri e aumenta la produzione di radicali liberi e il danno ossidativo. Tuttavia, i meccanismi d'azione precisi della doxorubicina sono complessi e ancora relativamente sconosciuti.

La doxorubicina ha un'alta capacità di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), che possono essere sia radicali che non radicali. Queste ultime agiscono come messaggeri cellulari negli eventi di segnalazione redox quando le loro concentrazioni sono mantenute relativamente basse. Tuttavia, una produzione eccessiva di ROS può contribuire al danno al DNA attraverso l'azione dei radicali sulle basi del DNA e sullo scheletro zucchero-fosfato. Il danno non riparato può portare ad apoptosi, arresto del ciclo cellulare e senescenza. Inoltre, la loro eccessiva produzione costituisce il meccanismo principale della cardiotoxicità della doxorubicina e delle antracicline (33).

3. Normativa

Il D.Lgs. 18 febbraio 1999, entrato in vigore a marzo dello stesso anno, ha rappresentato un passaggio fondamentale per regolamentare la preparazione dei farmaci antitumorali, seguendo le linee guida della Commissione Unica del Farmaco e le direttive dell'Istituto Superiore per la Prevenzione e Sicurezza sul Lavoro (ISPESL), dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e della Commissione Oncologica Nazionale (CON).

La direttiva 2004/37/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, riguardante gli agenti cancerogeni e mutageni, mira a proteggere i lavoratori dai rischi associati all'esposizione professionale a tali agenti. In essa sono chiaramente definiti come agenti pericolosi i composti cancerogeni, mutageni e reprotoxici.

La direttiva 2004/37/CE, ha subito successive modifiche ed è stata recepita in Italia attraverso il D.Lgs. 81/2008 – TITOLO IX, CAPO II, dedicato alla "Protezione da agenti cancerogeni e mutageni".

Questo decreto impone una serie di obblighi per garantire la sicurezza durante l'uso e la manipolazione di sostanze che presentano rischi cancerogeni o mutageni, stabilendo anche criteri di classificazione e monitoraggio.

La classificazione delle sostanze oggetto di monitoraggio è disciplinata dal regolamento Norma 1272/2008, che prevede diverse categorie a seconda della loro pericolosità. Le principali categorie riguardano:

Tossicità specifica per organi bersaglio (esposizione ripetuta) - STOT:

Categoria 1: Sostanze che producono o si presume possano produrre effetti significativi sull'uomo.

Categoria 2: Sostanze che si presume possano provocare effetti nocivi.

Per tossicità specifica si intende un'esposizione prolungata che può produrre effetti significativi e duraturi per la salute umana, sia reversibili che irreversibili.

Secondo la Norma 1272/2008, le sostanze cancerogene e mutagene sono classificate come segue:

Sostanze cancerogene:

Categoria 1A: Sostanze con effetti cancerogeni accertati per l'uomo.

Categoria 1B: Sostanze che si presume possano essere cancerogene per l'uomo.

Categoria 2: Sostanze di cui si sospettano effetti cancerogeni.

Sostanze mutagene:

Categoria 1A: Sostanze accertate capaci di causare mutazioni ereditarie nelle cellule germinali umane.

Categoria 1B: Sostanze considerate in grado di causare mutazioni ereditarie nelle cellule germinali.

Categoria 2: Sostanze sospettate di causare mutazioni ereditarie.

Sostanze tossiche per la riproduzione (hanno effetti sulla riproduzione umana):

Categoria 1A: Sostanze con tossicità accertata per la riproduzione umana.

Categoria 1B: Sostanze presumibilmente tossiche per la riproduzione.

Categoria 2: Sostanze sospettate di tossicità riproduttiva.

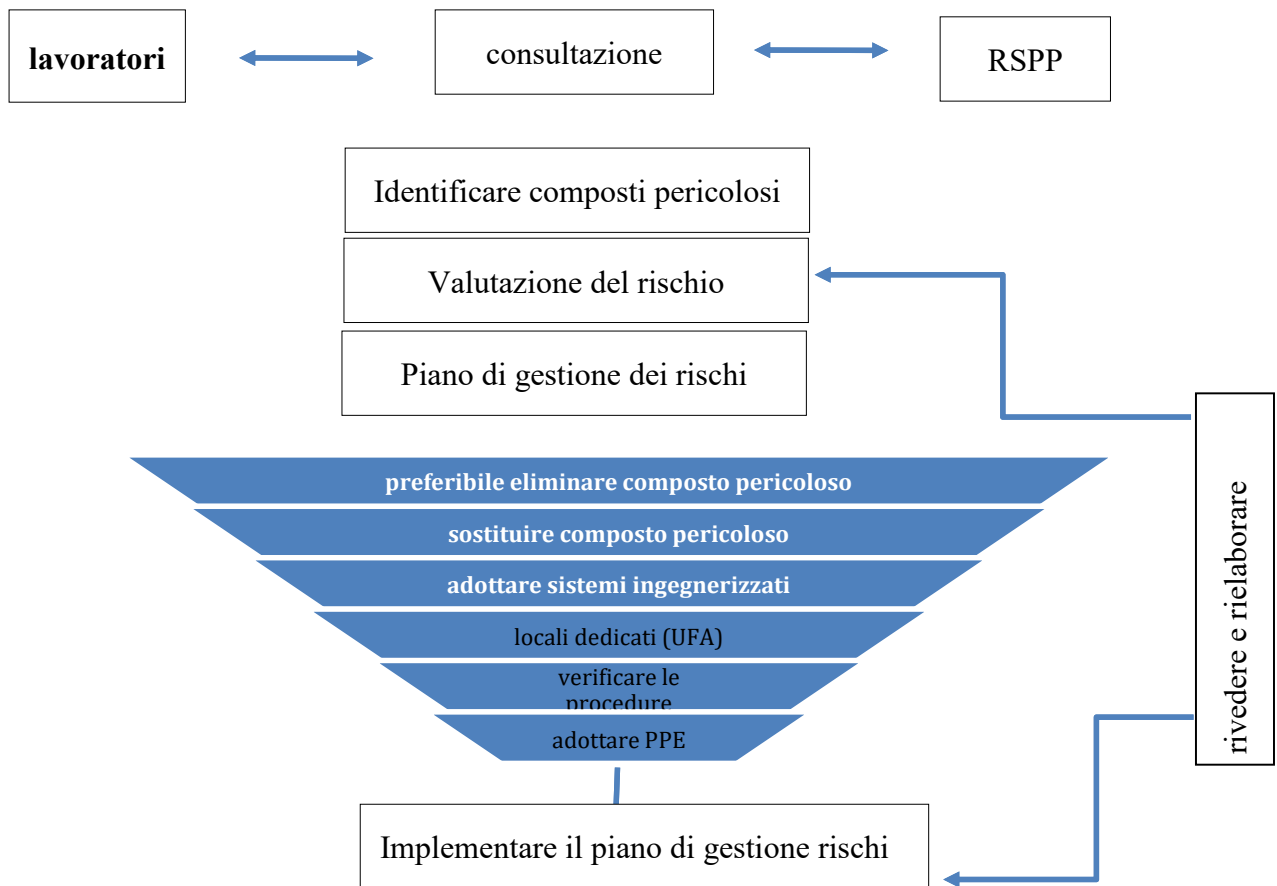
4. Valutazione dell'esposizione a CA (monitoraggio ambientale)

La valutazione dei rischi deve essere effettuata per tutte le attività in cui i lavoratori possono essere esposti a CA come risultato del loro lavoro. Ciò include le attività in cui i lavoratori (compresi i lavoratori temporanei e interinali), preparano formulazioni a base di chemioterapici antiblastici e/o somministrano tali farmaci. La preparazione avviene in locali chiusi all'interno dell'Unità Farmaci Antiblastici (UFA) e opportunamente segnalati per effettuare in sicurezza le operazioni di miscelazione e allestimento sacche da destinarsi successivamente ai reparti. Si riportano le principali caratteristiche.

Si riporta di seguito lo schema riassuntivo delle persone coinvolte e delle attività necessarie per gestire il rischio di esposizione a CA in ambiente di lavoro.

1. **Consultazione dei lavoratori e del Responsabile del Servizio di Prevenzione e Protezione (RSPP):** Il coinvolgimento diretto dei lavoratori, insieme al RSPP, è essenziale per identificare le sostanze pericolose.
2. **Identificazione dei composti pericolosi:** Questa fase si concentra sull'individuazione delle sostanze chimiche a rischio, che costituiscono un potenziale pericolo durante le operazioni di preparazione e somministrazione.
3. **Valutazione del rischio:** Una volta identificati i composti pericolosi, viene condotta una valutazione dettagliata del rischio per determinare il livello di esposizione e le relative conseguenze.
4. **Piano di gestione dei rischi:** Sulla base della valutazione, viene sviluppato un piano che include misure preventive e correttive per minimizzare i rischi identificati.
5. **Revisione e rielaborazione:** Periodicamente, il piano di gestione dei rischi viene rivisto e aggiornato per rispondere a nuove esigenze operative o a cambiamenti nelle condizioni di lavoro.
6. **Implementazione del piano di gestione:** L'ultima fase consiste nell'applicazione pratica delle misure previste dal piano, garantendo la formazione e il supporto necessari ai lavoratori.

Lo schema offre una visione sintetica e chiara dell'approccio sistematico utilizzato per ridurre al minimo l'esposizione a CA, evidenziando l'importanza di un monitoraggio continuo e della collaborazione tra tutte le parti coinvolte.



5. Tecniche analitiche LC-MS/MS

5.1. Fondamenti della Cromatografia: Principi e Tecniche

Il monitoraggio dei chemioterapici antitumorali in ambito ospedaliero rappresenta una priorità per garantire la sicurezza del personale sanitario esposto a queste sostanze altamente tossiche. Tra le tecniche analitiche utilizzate per la determinazione e la quantificazione di questi composti spiccano la cromatografia liquida (HPLC e UHPLC), spesso accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS), e la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), oltre ad altre metodologie specifiche.

La cromatografia è una tecnica separativa utilizzata per isolare i componenti di una miscela complessa, basandosi sulle loro interazioni con due fasi: una fase stazionaria e una fase mobile. Questo metodo sfrutta le differenze nelle proprietà chimico-fisiche dei composti per ottenere la separazione.

La fase stazionaria è un materiale immobile, generalmente costituito da un solido o un liquido immobilizzato su un supporto solido. Essa interagisce con i composti della miscela attraverso meccanismi come adsorbimento, partizione, scambio ionico o affinità. La forza di queste interazioni determina la velocità con cui ciascun componente viene trattenuto e, di conseguenza, la loro separazione lungo la colonna cromatografica. La scelta della fase stazionaria dipende dalla natura dei campioni da analizzare. Ad esempio, per composti idrofobici, si utilizzano fasi stazionarie idrofobiche come C18 o C8, mentre per composti più polari si adottano fasi feniliche o cianopropiliche.

La fase mobile, invece, è il fluido che scorre attraverso la colonna e trasporta i componenti della miscela. Può essere un liquido, come avviene nella cromatografia liquida, o un gas, come nella cromatografia gassosa. La fase mobile è spesso composta da un solvente o una miscela di solventi, e la sua composizione influisce significativamente sulla separazione dei componenti. Ad esempio, per l'analisi di farmaci e metaboliti, si utilizzano fasi mobili contenenti modificatori organici come acetonitrile o metanolo, combinati con acqua e spesso addizionati con acidi o tamponi per regolare il pH.

Il meccanismo di separazione si basa sull'interazione differenziale dei componenti della miscela con la fase stazionaria e la fase mobile. I composti con maggiore affinità per la fase stazionaria si muovono più lentamente, mentre quelli con maggiore affinità per la fase mobile

migrano più rapidamente. Questo comportamento differenziale porta alla separazione dei componenti mentre la fase mobile attraversa la colonna.

Dopo la separazione, i componenti vengono rilevati utilizzando diversi metodi, tra cui la spettrometria di massa (MS) e la spettroscopia UV-Vis. La scelta del metodo di rilevamento dipende dalla natura dei composti analizzati e dalla sensibilità richiesta per l'analisi (34).

5.2.Applicazione della Tecnica UHPLC-MS/MS per il Monitoraggio dei Chemioterapici

la spettrometria di massa tandem (MS/MS) accoppiata alla cromatografia liquida (LC) si distingue per la sua sensibilità, specificità e capacità di rilevare concentrazioni estremamente basse, inferiori a ppm (nell'ordine di ppb) di composti target in matrici complesse (35,36).

In effetti, nel presente lavoro di tesi, è stata utilizzata la tecnica UHPLC-MS/MS per la determinazione e la quantificazione di dieci chemioterapici antitumorali in matrice ambientale. La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la sua evoluzione, la cromatografia liquida ultra-performante (UHPLC), sono strumenti fondamentali per separare le sostanze organiche dai potenziali interferenti presenti nei campioni ospedalieri, ad esempio in differenti matrici (aria, superfici, fluidi biologici). L'uso di colonne con particelle di dimensioni inferiori ai 2 μm in UHPLC consente un'elevata efficienza e risoluzione analitica, riducendo i tempi di analisi e l'uso di solventi, rendendo la tecnica più sostenibile (36).

La spettrometria di massa tandem (MS/MS) offre ulteriori vantaggi, tra i quali identificare e quantificare in modo preciso i composti target attraverso un processo a tre stadi: il primo quadrupolo (Q1) che separa gli ioni sulla base del rapporto massa/carica (m/z), il secondo quadrupolo (Q2) che funge da cella di collisione, priva di campi elettromagnetici, per frammentare gli ioni selezionati, e il terzo quadrupolo (Q3) che analizza i frammenti, consentendo sia una caratterizzazione sia una quantificazione accurata e specifica (36).

Questa combinazione di tecniche, nota come LC-MS/MS, è ampiamente utilizzata per il biomonitoraggio del personale sanitario esposto e per il monitoraggio delle contaminazioni ambientali nelle farmacie ospedaliere e nei reparti.

Grazie ai limiti di rilevabilità nell'ordine di ppb e alla possibilità di analizzare contemporaneamente più composti, l'UHPLC-MS/MS rappresenta oggi una delle tecniche di elezione nell'ambito dell'industria farmaceutica e applicata anche per garantire la sicurezza in ambito ospedaliero e minimizzare i rischi di esposizione (35,36).

La figura sottostante n°3 rappresenta il sistema UHPLC-MS/MS utilizzato per l'analisi degli analiti.



Figura 3: Sistema UHPLC-MS/MS utilizzato per l'analisi degli analiti

6. Validazione del Metodo Analitico secondo le Linee Guida ICH

Nel presente studio di tesi, la validazione del metodo analitico è stata effettuata in conformità alle linee guida ICH (37) che rappresentano uno standard internazionale per la valutazione dell'affidabilità e della qualità dei metodi analitici utilizzati nei settori farmaceutico, chimico e biotecnologico. Lo scopo della validazione è dimostrare che il metodo analitico è idoneo all'uso previsto, garantendo risultati precisi, accurati e riproducibili anche in presenza di condizioni operative variabili.

Le linee guida identificano parametri chiave per la validazione, tra cui:

- **Accuratezza:** Esprime la vicinanza tra il valore misurato e un valore di riferimento accettato. È fondamentale per garantire che i risultati analitici rappresentino correttamente la quantità dell'analita presente nel campione.
- **Precisione:** Riflette la ripetibilità dei risultati sotto le stesse condizioni operative e può essere suddivisa in ripetibilità, precisione intermedia (variazioni interne al laboratorio) e riproducibilità (confronto tra laboratori)
- **Specificità:** È la capacità del metodo di distinguere il composto di interesse da altre sostanze presenti nel campione, come impurità, prodotti di degradazione ed eccipienti. Questo parametro è cruciale per evitare interferenze nei risultati analitici.
- **Linearità e Intervallo:** La linearità rappresenta la capacità del metodo di fornire risultati proporzionali alla concentrazione dell'analita, mentre l'intervallo stabilisce i limiti operativi del metodo, coprendo le concentrazioni comprese tra il minimo e il massimo accettabili.
- **Limite di Rilevamento (LOD):** Il limite di rilevamento è definito come la quantità minima di analita che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata, in un campione. Questo parametro è importante per determinare la sensibilità del metodo e la sua capacità di identificare tracce di sostanze .
- **Limite di Quantificazione (LOQ):** Il limite di quantificazione è la quantità minima di analita che può essere quantificata con precisione e accuratezza accettabili. Il LOQ è cruciale per garantire che le misurazioni siano affidabili e utilizzabili per scopi analitici
- **Robustezza:** Valuta la capacità del metodo di mantenere la sua affidabilità nonostante piccole variazioni nei parametri analitici, come temperatura, pH o composizione della

fase mobile. La robustezza è essenziale per garantire la riproducibilità in diverse condizioni operative.

Questi parametri sono stati considerati e applicati rigorosamente durante il lavoro sperimentale, assicurando che il metodo analitico utilizzato fosse conforme agli standard richiesti e idoneo per l'analisi prevista.

7. Scopo del Lavoro

La sicurezza e la salute dei lavoratori è il focus del processo di valutazione del rischio di esposizione ad agenti chemioterapici in quanto permette di prendere decisioni appropriate per la gestione del rischio in ambiente di lavoro. Nell'ambito di questo processo, la valutazione dell'esposizione professionale gioca un ruolo fondamentale. Il monitoraggio ambientale e biologico rappresenta lo strumento più utilizzato descritto in molta parte della letteratura (35,38,39). Nel presente studio di tesi è stato affrontato il tema del monitoraggio ambientale per la determinazione in traccia di principi attivi di antitumorali presenti sulle superfici in ambiente di lavoro, quale può essere la farmacia ospedaliera e l'area di somministrazione.

Un monitoraggio ben standardizzato permette al datore di lavoro di migliorare e programmare la gestione del rischio tra gli operatori sanitari. Ciò implica che alcune fasi del processo siano sviluppate e validate per poter ripetere nel tempo la procedura in modo da stoccare dati riproducibili ed affidabili.

Questo processo, pertanto, include le seguenti fasi:

- 1) Identificare le sostanze pericolose
- 2) Valutare il rischio mediante la consultazione di sostanze pericolose
- 3) Valutare l'esposizione professionale mediante effettuazione del monitoraggio che include:
 - a. Lo sviluppo della procedura di campionamento
 - b. Lo sviluppo e la validazione di un metodo analitico che consenta di ottenere la fotografia della contaminazione da chemioterapici in un ambiente di lavoro

Nel presente lavoro di tesi sono state studiate sperimentalmente ed ottimizzate le condizioni di metodo sia per il punto a e b.

La validazione del processo (campionamento ed analisi) ha consentito di massimizzare i recuperi dei principi attivi dalle superfici e di determinare la loro presenza in ambiente di lavoro analizzando un pannello di 10 composti che sono tra i più rappresentativi in termini di tossicità e di quantità manipolata dagli operatori.

Pertanto, l'identificazione delle sorgenti di contaminazione ha permesso in ultima istanza di adottare le misure di sicurezza più idonee e di progettare un piano di gestione del rischio per tenere sotto controllo la contaminazione.

8. Parte Sperimentale

8.1. Materiali e metodi

8.1.1. Prodotti chimici e reagenti

Lo sviluppo del metodo si basa sull'analisi di 10 composti che sono stati acquistati singolarmente, alcuni in soluzione come standard certificati, altri in polvere. Pertanto, in quest'ultimo caso, pesati accuratamente e diluiti in solvente organico.

Il 5-fluorouracile, l'ifosfamide, e la ciclofosfamide erano in soluzione in fiale e sono stati forniti da lab mix (ultrascientific Italia Srl) alla concentrazione di 1000 µg/mL; la doxorubicina, l'epirubicina, il metotrexato sono stati forniti da "TOKIO CHEMICAL" in quantità assolute di 25 mg, 10 mg, 1000 mg rispettivamente; la gemcitabina è stata acquistata da lab mix (Ultrascientific Italia Srl) sotto forma di fiala (numero 5), con una concentrazione di 1000 µg/mL; inoltre l'etoposide e il paclitaxel, sono stati forniti da Ehrenstorfer in quantità assolute di 100 mg, 25 mg rispettivamente; il docetaxel è stato fornito da lab mix (ultrascientific Italia Srl) in quantità assolute di 5 mg; ogni prodotto ha un codice di identificazione CUS.

Sono state preparate 10 soluzioni madri per i 10 farmaci antitumorali: le soluzioni madri di questi 6 analiti (il 5-fluorouracile, gemcitabina, doxorubicina, epirubicina, ifosfamide, ciclofosfamide) sono state preparate alla concentrazione di 100000 ng/mL in metanolo, mentre per i 4 analiti rimanenti (etoposide, paclitaxel, metotrexato, docetaxel), le soluzioni madri hanno una concentrazione di 1000000 ng/mL per dissoluzione di 10 mg in 10 mL di metanolo.

Il 5-Fluorouracil-¹³C, ¹⁵N₂ è stato fornito da C/D/N Isotopes INC, in quantità assolute di 5 mg, la trofosfamide è stata fornita da Ultrascientific Italia Srl sotto forma di fiala (numero 4), con una concentrazione di 1000 µg/mL. L'epidaunorubicina è stata fornita da Ehrenstorfer, in quantità assolute di 5 mg.

Sono state preparate tre soluzioni di standard interni. La soluzione di 5-Fluorouracil-¹³C, ¹⁵N₂ è stata preparata alla concentrazione di 1.000.000 ng/mL in metanolo, dissolvendo 10 mg di composto in 10 mL di metanolo. Le soluzioni di trofosfamide e epidaunorubicina sono state preparate a una concentrazione di 100.000 ng/mL in metanolo. Considerato il numero degli analiti e la complessità delle soluzioni standard, si rimanda alle tabelle riassuntive che forniscono lo schema di preparazione. (Tabella n°6, Tabella n°7, Tabella n°8, Tabella n°9).

Tutti i solventi sono di grado MS (Spettrometria di Massa) eccetto il dimetilsolfossido e tutte le sostanze chimiche sono state ottenute nel grado analitico più alto disponibile.

L'acido formico, il 2-propanolo, l'acetonitrile e il metanolo sono stati acquistati da Merck KGaA (Darmstadt, Germania), il formiato di ammonio è stato acquistato da Alfa Aesar / Thermo Fisher Scientific. Il dimetilsolfossido è stato acquistato da Sigma-Aldrich.

L'acqua utilizzata è acqua ultra pura filtrata con resina C-18, adatta per sistemi UHPLC ad alte prestazioni.

8.1.2. Materiali e Apparecchiature per gli esperimenti

Per la realizzazione degli esperimenti descritti in questa tesi, sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Provette da 15 mL e 50 mL sono realizzate in polipropilene e sono state fornite da Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germania).
- Porta provette, Ranks: Supporti per provette e vials rispettivamente, sono stati acquistati da VWR, Avantor (Milano, Italia).
- I vials Agilent (con i relativi tappi agilent): sono da 2 mL con chiusura a vite, di colore ambrato, dotati di spot per scrittura e certificazione, sono realizzati in vetro borosilicato di tipo 1, e sono stati acquistati da VWR, Avantor (Milano, Italia).
- Micro insert: Inserti in vetro per vials, utilizzati per ridurre il volume del campione e migliorare la precisione delle analisi.
- Filtri da 0.45 μm : per la filtrazione delle soluzioni, rimuovendo particelle di dimensioni superiori a 0.45 μm .
- Siringhe insulina da 1 mL, sono stati forniti da Becton Dickinson S.A. (Madrid, Spain).
- Aghi lunghi: sono stati acquistati da B. Braun (Melsungen, Germania).
- Matraci da 10 mL sono stati acquistati da VWR, Avantor (Milano, Italia).
- Parafilm: per proteggere i campioni dalla contaminazione e dall'evaporazione, è stato acquistato da Bemis Company, Inc. (Neenah, nel Wisconsin).
- Pipette meccaniche monocanali e puntali di diversi volumi.
- Vortex con potenza di 51 W, è stato acquistato da VWR.

8.1.3. Strumentazione UHPLC-MS/MS:

L'analisi è stata utilizzata per la determinazione e la quantificazione di dieci chemioterapici antiblastici in matrice ambientale, condotta utilizzando la tecnica UHPLC-MS/MS, in particolare con la strumentazione Agilent QqQ 6460 a triplo quadrupolo, nota come *ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry* (UHPLC-ESI-MS/MS). Questa metodologia combina l'efficienza della cromatografia liquida ad alte prestazioni con la sensibilità e la specificità della spettrometria di massa.

Il sistema Agilent QqQ 6460 è dotato di una sorgente in modalità *electrospray* (ESI), che consente di ionizzare i composti analizzati in modo efficace. Questo sistema offre numerosi vantaggi per l'analisi quantitativa e qualitativa, tra cui la selezione degli ioni: i tre quadrupoli lavorano in sequenza, con il primo quadrupolo (Q1) che separa gli ioni sulla base del rapporto massa/carica (m/z), il secondo quadrupolo (Q2) che funge da cella di collisione per frammentare gli ioni selezionati, e il terzo quadrupolo (Q3) che analizza i frammenti, consentendo una quantificazione accurata e un'elevata specificità.

Grazie alla sensibilità e alla precisione, è stato possibile ottenere dati affidabili e significativi (36).

La figura 4 sottostante mostra uno schema della cromatografia liquida in triplo quadrupolo.

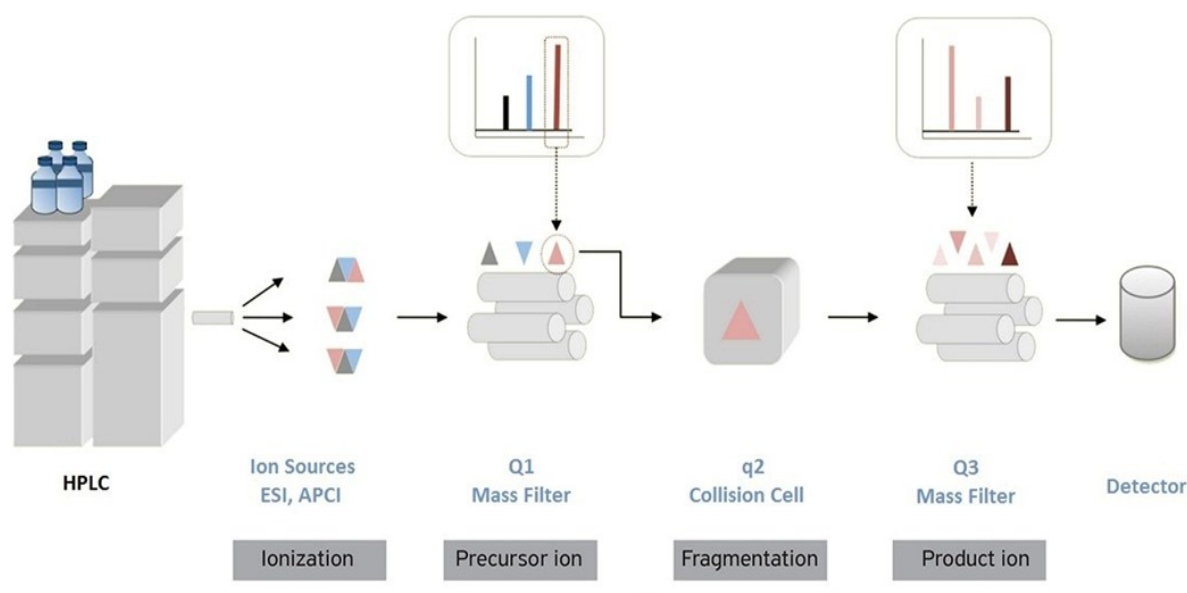


Figura 4: Cromatografia Liquida in Triplo Quadrupolo (UHPLC-MS/MS)

9. Monitoraggio Ambientale per la valutazione del rischio da esposizione a CA

Monitoraggio ambientale di chemioterapici antitumorali si basa sull'utilizzo di substrati quali wipe di tessuto non tessuto (TNT). Le dimensioni dei wipes e l'area di campionamento sono state oggetto di ottimizzazione nel corso dello studio della metodologia che, nel suo complesso, viene descritta di seguito.

Il monitoraggio ambientale si articola in differenti fasi, in quanto la miscela di 10 principi attivi è composta da sostanze con caratteristiche chimico-fisiche estremamente differenti. Il valore di log P varia da -0,89 per il 5-Fluorouracile a 3,0 per il paclitaxel. I 4 punti principali che sono stati oggetto di sperimentazione sono i seguenti:

- Ottimizzazione delle condizioni di campionamento per massimizzare la raccolta di principi attivi di CA dalle superfici.
- Ottimizzazione delle condizioni di rilascio dei principi attivi dai wipes: procedura di estrazione per desorbimento.
- Acquisizione dei dati di spettrometria di massa (transizione *m/z* del *parent ion* e dei *fragment ions*) per ciascun principio attivo al fine di ottenere un profilo UHPLC cromatografico in modalità *multiple ion monitoring* (MRM)
- Ottimizzazione delle condizioni cromatografiche: scelta della fase stazionaria della colonna cromatografica UPLC e delle fasi mobili. Studio di ottimizzazione del pH delle fasi mobili in funzione della presenza di 5-fluorouracile in miscela con composti lipofili come le antracicline e i taxani.

9.1.Ottimizzazione della strategia di campionamento

Durante questo studio, abbiamo affrontato la sfida di sviluppare una strategia di campionamento efficace per la quantificazione di 10 chemioterapici antiblastici. Gli analiti includono: 5-fluorouracile, gemcitabina, doxorubicina, epirubicina, ifosfamide, ciclofosfamide, etoposide, paclitaxel, metotrexato e docetaxel.

Il metodo di campionamento scelto prevede l'utilizzo di substrati come wipe di tessuto non tessuto (TNT), di 7,5x7,5 cm, che venivano inumiditi al momento del campionamento con 1 mL di soluzione specifica (*wiping solution*). Durante l'ottimizzazione, sono state condotte 4 prove utilizzando e combinando diverse soluzioni, tra cui:

- Soluzioni tampone composte da una soluzione acida di acido formico (HCOOH) a concentrazione scalare, da 0.1% a 0.01%, in miscela con una soluzione di ammonio formiato a concentrazioni diverse (da 5 mM a 2,65 mM);
- Solventi organici, come l'isopropanolo (IPA) e l'acetonitrile (CH₃CN) in combinazione con i buffer acquosi.

Le diverse prove hanno previsto valori di pH differenti tra loro (es. pH 3,5 e 4,5). Tra i criteri utilizzati per la scelta finale vi erano l'efficienza di recupero degli analiti, la riproducibilità dei risultati e la compatibilità con le tecniche analitiche successive, in accordo con quanto riportato dalla letteratura. Il 5-fluorouracile, altamente polare, si dissolve in acqua (40).

La *wiping solution* ottimizzata è composta dalla soluzione tampone (30%), isopropanolo (60%) e CH₃CN (10%). La soluzione tampone è stata preparata nel seguente modo:

- 100 µL di HCOOH in 1 L di H₂O (0,01%);
- 0,3 g di HCOONH₄ in 1 L di H₂O (5 mM).

9.2. Descrizione delle caratteristiche chimico-fisiche dei composti e loro caratterizzazione in spettrometria di massa in triplo quadrupolo

Il tempo di ritenzione cromatografica è correlato al valore del Log P di ogni composto oggetto di analisi.

Il pKa rappresenta le caratteristiche acido/base. Il valore di pKa è stato preso in esame per studiare la composizione della fase mobile cromatografica secondo quanto riportato da C. R. Mallet et al. (41), si definisce come regola base che la fase mobile dovrebbe essere tamponata in un intervallo di pH definito da ± 2 rispetto al pKa dell'analita. Nel nostro studio essendo 10 gli analiti target con valori di pKa molto differenti tra loro (si riportano i dati pKa in Tabella 2) si è deciso di ottimizzare il pH della soluzione acquosa della fase mobile a pH 4.0, in quanto il $\text{pKa} \pm 2$ per ogni analita è approssimativamente incluso nell'intervallo di pH 4 e 6, ad eccezione di paclitaxel e docetaxel. Tuttavia, per questi due composti la risposta in MRM è stata sempre riproducibile, pertanto non si è ulteriormente ottimizzata la scelta della fase mobile. Si prevede un ulteriore studio in futuro utilizzando tampone formiato stabilizzato a pH 5.5-6.

Tabella 2

analita	Composto	formula	MW	pKa	Log P
1	5-FLUOROURACILE	$\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2\text{O}_2$	132	8.02	-0.89
2	GEMCITABINA	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_4$	263	3.6	-1.4
3	METOTREXATO	$\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{NO}_{14}$	454	4,7	-1.85
4	DOXORUBICINA	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$	543	8.2	1.27
5	EPIRUBICINA	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$	543	9,93 (gruppo amminico)	1,85
6	IFOSFAMIDE	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{O}_2\text{N}_2\text{P}$	260	1,44	0,86
7	CICLOFOSFAMIDE	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{O}_2\text{N}_2\text{P}$	260	2,84	0,8
8	ETOPOSIDE	$\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$	588	9,8	0.60
9	PACLITAXEL	$\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$	853	11,90	3.0
10	DOCETAXEL	$\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{NO}_{14}$	808	11,20	2.4
Standard interni					
11	5-FU- ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$	$\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2\text{O}_2$	132	8.0	-0.89
12	TROFOSFAMIDE	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$	322	-0,46	0.98
13	EPIDAUNORUBICINA	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{10}$	529	7,85	1.83

Tabella 2: Caratteristiche chimico-fisiche dei 10 analiti e dei 3 Standard interni

Note:

- MW = Peso Molecolare (Molecular Weight).
- pKa = Costante di dissociazione acida.
- Log P = Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua.
- I valori di pKa sono stati presi da fonti affidabili:
 - Per 5-FU, Gemcitabina, Doxorubicina, Epirubicina, Etoposide, Metotrexato, ISTD 5-FU-¹³C, ¹⁵N₂, Epidaunorubicina: **PubChem** (National Center for Biotechnology Information, NCBI).
 - Per Ifosfamide, Ciclofosfamide, Paclitaxel, Docetaxel, ISTD Trofosfamide: **Chemical Book**.
- I valori di logP sono stati presi dal database DrugBank.

10. Risultati

In questa sezione vengono presentati i risultati sperimentali relativi allo sviluppo e alla validazione del metodo.

Sono stati ottimizzati inizialmente i parametri strumentali della spettrometria di massa e sono state scelte le transizioni m/z dei singoli analiti per la loro quantificazione in *multiple ion monitoring* (MRM).

Le soluzioni standard sono state infuse nel sistema Agilent Q1-Q3 per ottenere la seguente tabella 3 che riporta anche i voltaggi necessari per ottenere la frammentazione e la collisione in cella Q2:

Tabella 3

analita	Tempo di ritenzione (min)	Transizioni	Dwell (ms)	Frag (V)	CE (V)	Cell Acc (V)	Polarity
5-FLUOROURACILE	1.9	129 -> 42	200	100	17	4	Negative
GEMCITABINA	4.2	264.1 -> 112	200	85	17	4	Positive
METOTREXATO	5.6	455.1 -> 308	200	125	17	4	Positive
DOXORUBICINA	7.6	544 -> 397	200	85	10	4	Positive
EPIDOURUBICINA	7.6	544 -> 130	200	60	13	4	Positive
IFOSFAMIDE	7.8	261 -> 92	200	155	25	4	Positive
CICLOFOSFAMIDE	7.9	261 -> 140	200	160	21	4	Positive
ETOPOSIDE	8.3	589.1 -> 229	200	125	17	4	Positive
PACLITAXEL	11.4	854.3 -> 286.1	200	104	13	4	Positive
DOCETAXEL	11.2	808.4 -> 527.2	200	70	5	4	Positive
Standard interni							
5-FU- ¹³ C, ¹⁵ N ₂	1.9	131 -> 43	200	80	17	4	Negative
TROFOSFAMIDE	9.8	323 -> 154	200	170	25	4	Positive
EPIDAUNORUBICINA	8.2	528.2 -> 321.1	200	75	14	4	Positive

Tabella 3: Tempi di ritenzione, Transizioni e Voltaggi di Frammentazione

I parametri della sorgente ESI riportati nella tabella 4 sottostante sono invece comuni a tutti i composti e quindi ottimizzati al meglio per ottenere gli spettri di *daughter ion*:

Tabella 4

Parametro	Valore (+)	Valore (-)
Gas Temp (°C)	200	200
Gas Flow (l/min)	5	5
Nebulizer (psi)	45	45
Sheath Gas Temp (°C)	150	150
Sheath Gas Flow (l/min)	11	11
Capillary (V)	3500	3500
Nozzle Voltage/Charging (V)	500	500

Tabella 4: Parametri ottimizzati della Sorgente ESI per spettri di Daughter Ion

In questa tabella 5 sono riportati gli ioni addotti a protone $[MH]^+$, $[MH]^-$, o addotti allo ione ammonio $[M+NH_4]^+$, selezionati nel Q1 per ottenere nel Q3 gli spettri di massa massa riportati di seguito.

Tabella 5

Nome composto	Formula	MW	$[MH]^+$	$[MH]^-$	$[M+NH_4]^+$
5-FLUOROURACILE	$C_4H_3FN_2O_2$	132		131	
GEMCITABINA	$C_9H_{11}F_2N_3O_4$	263	264		
METOTREXATO	$C_{43}H_{53}NO_{14}$	454	455		
DOXORUBICINA	$C_{27}H_{29}NO_{11}$	543	544		
EPIRUBICINA	$C_{27}H_{29}NO_{11}$	543	544		
IFOSFAMIDE	$C_7H_{15}Cl_2O_2N_2P$	260	261		
CICLOFOSFAMIDE	$C_7H_{15}Cl_2O_2N_2P$	260	261		
ETOPOSIDE	$C_{29}H_{32}O_{13}$	588	589		606
PACLITAXEL	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	853	854		
DOCETAXEL	$C_{43}H_{53}NO_{14}$	808	809		
5-FU- ^{13}C , $^{15}N_2$	$C_4H_3FN_2O_2$	132		131	
TROFOSFAMIDE	$C_9H_{18}Cl_3N_2O_2P$	322	323		
EPIDAUNORUBICINA	$C_{27}H_{29}NO_{10}$	529	530		

Tabella 5: Ioni Addotti ($[MH]^+$, $[MH]^-$, $[M+NH_4]^+$) Selezionati nel Q1 per la Spettrometria di Massa MS/MS

10.1. Spettri di massa massa per i singoli composti

I dati di spettrometria di massa sono stati acquisiti per tutti i 10 farmaci antiblastici e i 3 standard interni, identificando le transizioni m/z dello ione parentale e degli ioni frammento. Per ogni analita, sono stati selezionati gli ioni principali, rappresentati dall'addotto protonato $[M+H]^+$, deprotonato $[M-H]^-$ o dall'addotto con ammonio $[M+NH_4]^+$, in base alla loro migliore risposta in spettrometria di massa. L'analisi è stata condotta in modalità negativa (ESI-) per il 5-fluorouracile e in modalità positiva (ESI+) per tutti gli altri analiti. Nelle figure seguenti sono riportati gli spettri di massa-massa per ciascun analita, evidenziando le transizioni più rappresentative utilizzate per la loro identificazione e quantificazione.

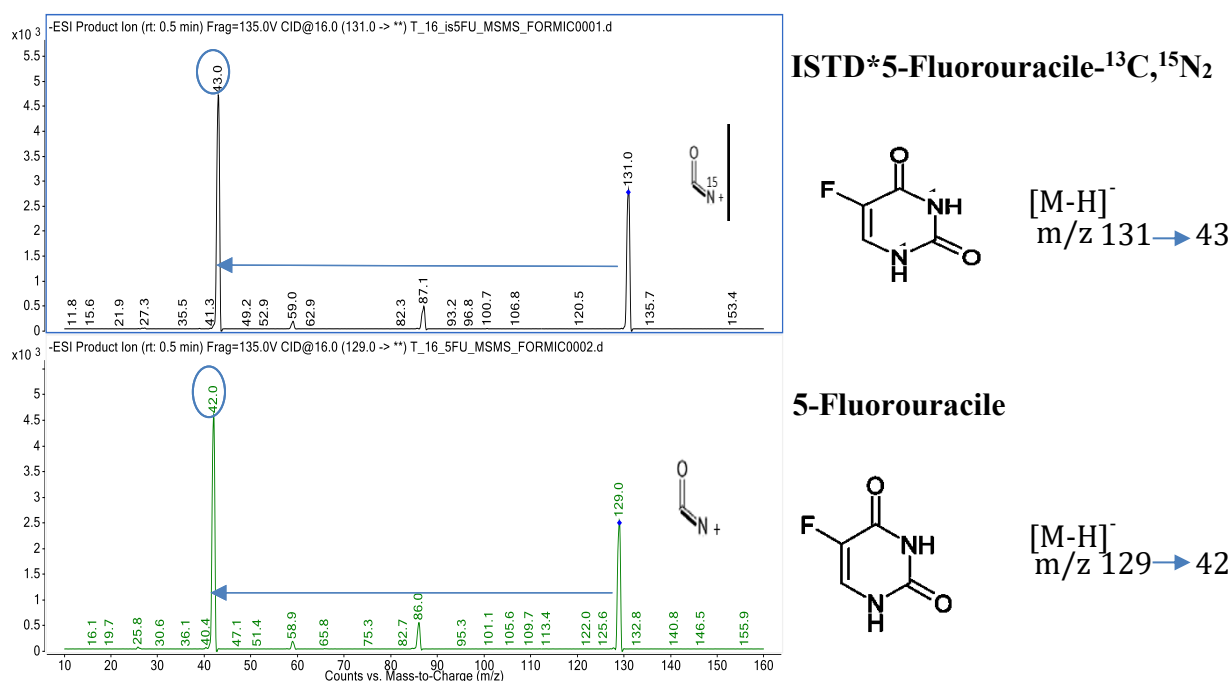


Figura 5: Spettri MS/MS per 5-Fluorouracile e 5-Fluorouracile-¹³C,¹⁵N₂

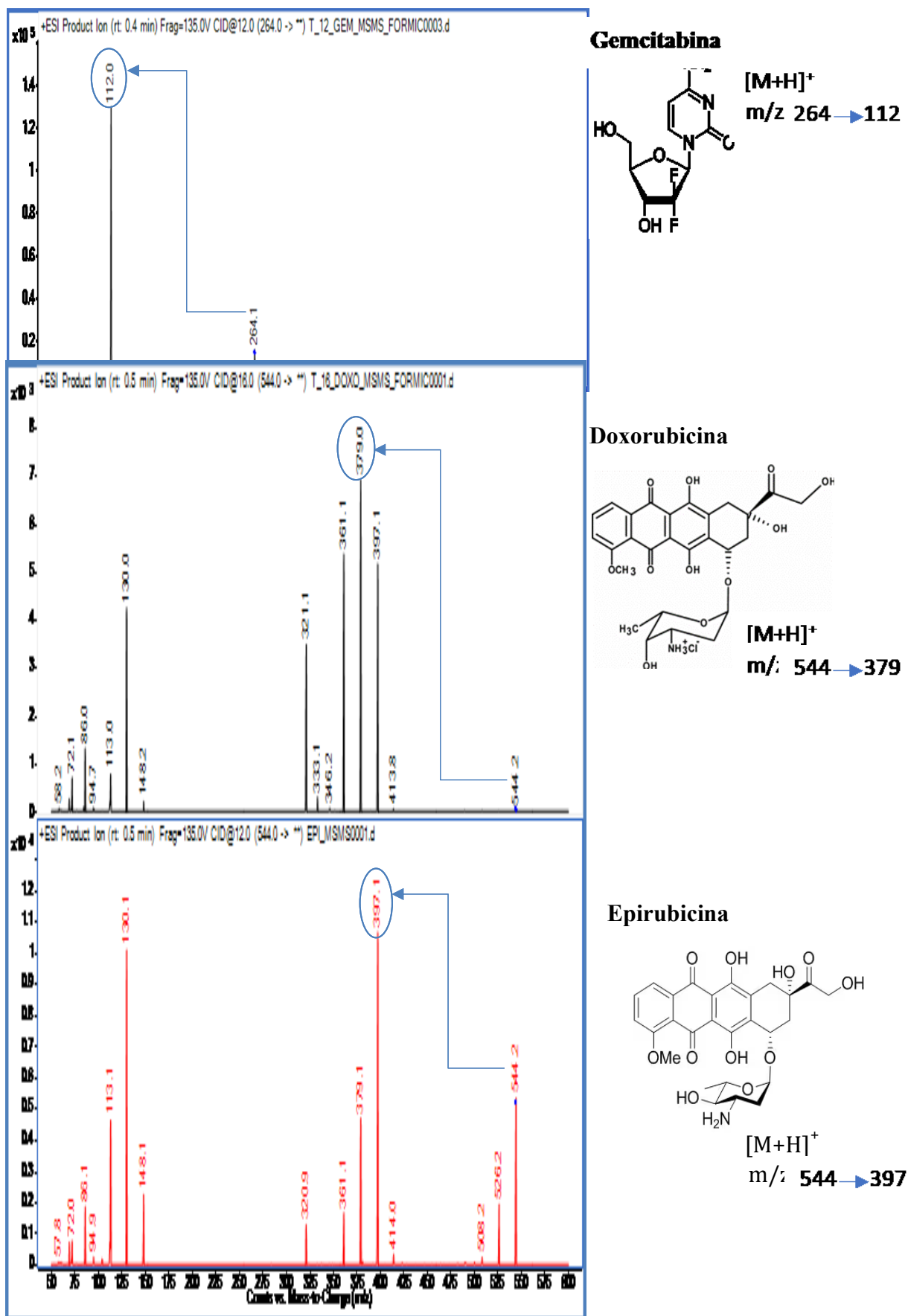
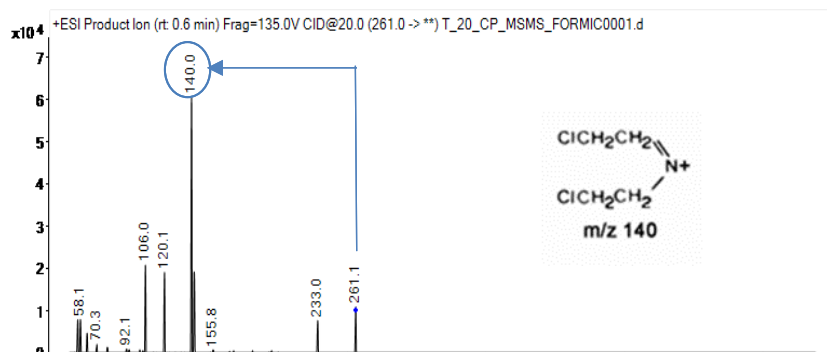
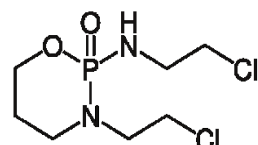


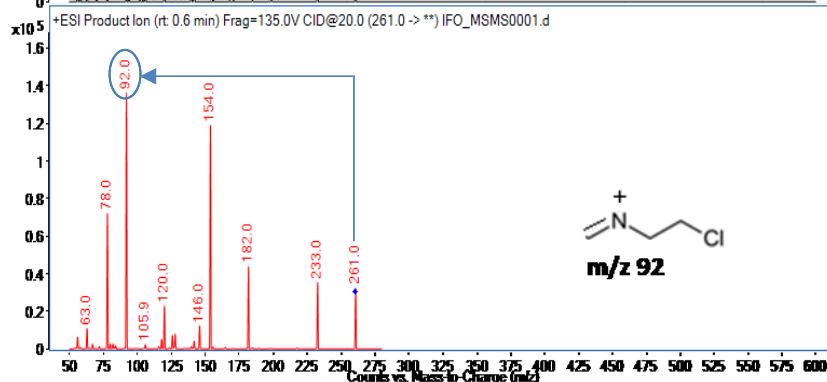
Figura 6: Spettri MS/MS per Gemcitabina, Doxorubicina, Epirubicina



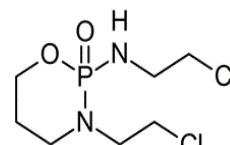
Ciclofosfamida



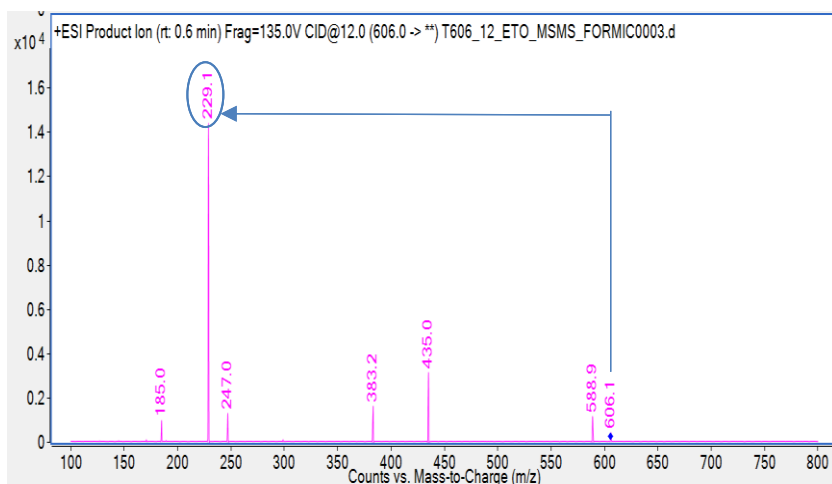
$[M+H]^+$
m/z 261 → 140



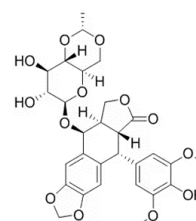
Ifosfamida



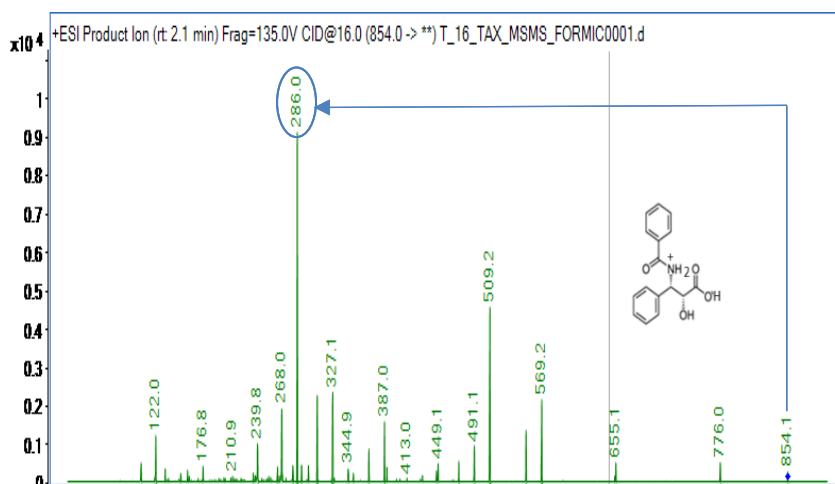
$[M+H]^+$
m/z 261 → 92



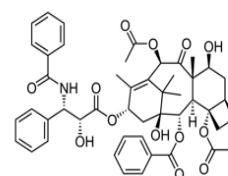
Etoposide



$[M+NH_4]^+$
m/z 606 → 229

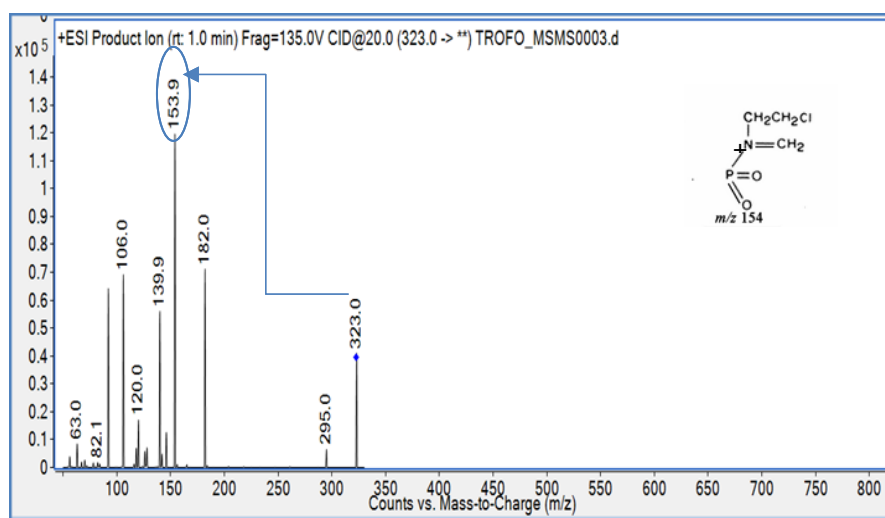


Paclitaxel



$[M+H]^+$
m/z 854 → 286

Figura 7: Spettri MS/MS per Ciclofosfamida, Ifosfamida, Etoposide, Paclitaxel



ISTD* Trofosfamide

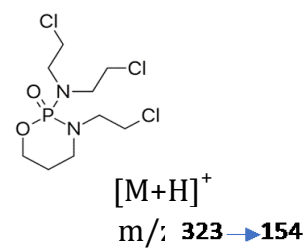


Figura 8: : Spettri MS/MS per trofosfamide

11. Parametri di validazione del metodo

In questa sezione vengono riportati i risultati inerenti alla procedura di validazione del metodo:

- Valutazione della linearità mediante l'analisi delle risposte strumentali in funzione delle concentrazioni standard preparate.
- Preparazione delle curve di calibrazione in matrice wipe (Set C). I dati relativi a questo set, riportati nella tabella (Tabella n°11), consentono di ottenere il limite inferiore di rilevabilità (LOD) e il limite inferiore di quantificazione (LOQ). Verranno anche dettati i grafici delle curve di calibrazione per ciascun analita, con le equazioni delle rette di regressione lineare e i relativi coefficienti di determinazione (R^2).
- Determinazione della precisione e accuratezza mediante utilizzo dei quality controls (QCs). Sono stati utilizzati 3 QCs quali, low, medium and high QCs per definire la precisione intra-interday a 3 livelli di concentrazione.
- Calcolo del recupero per ciascun analita per valutare l'efficienza globale del metodo. In questo caso è stato preparato il Set A (curva in solvente) e i dati sono stati messi a confronto con i risultati del set C, in quanto dalla letteratura si evince che l'effetto matrice è trascurabile (40)

Successivamente, viene descritta la parte inerente alla cromatografia e quindi riportati i profili cromatografici scegliendo un campione rappresentativo (esempio QC2) per i due Set A e Set C. Questi profili evidenziano la capacità risolutiva della colonna UPLC cromatografica scelta per sviluppare il metodo analitico quantitativo.

11.1. Preparazione del campione

La preparazione del campione è stata effettuata a partire dai composti puri. Alcuni sono forniti in fiala (mL) solubilizzati in CH₃CN alla concentrazione di 1000 µg/mL (5-fluorouracile, gemcitabina, ifosfamide, ciclofosfamide e trofosfamide). Altri sono forniti in polvere e quindi successivamente pesati (doxorubicina, epirubicina, etoposide, paclitaxel, metotrexato, docetaxel, 5-fluorouracile-¹³C, ¹⁵N₂, epidaunorubicina). Questi composti puri sono conservati in frigorifero a 4°C. Il dettaglio viene riportato nella tabella 6 sottostante.

Tabella 6

Analita in fiala (CH₃CN)	Concentrazione	formula
5-Fluorouracile	1000 micg/mL	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂
Gemcitabina	1000 micg/mL	C ₉ H ₁₁ F ₂ N ₃ O ₄
Ifosfamide	1000 micg/mL	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ N ₂ P
Ciclofosfamide	1000 micg/mL	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ N ₂ P
Trofosfamide ISTD	1000 micg/mL	C ₉ H ₁₈ Cl ₃ N ₂ O ₂ P
Analita in polvere	quantità mg	formula
Metotrexato	1000	C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄
Doxorubicina	25	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁
Epirubicina	10	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁
Etoposide	100	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃
Paclitaxel	25	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄
Docetaxel	5	C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄
5-FU- ¹³ C ¹⁵ N ₂ ISTD	5	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂
Epidaunorubicina ISTD	5	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₀

Tabella 6: Analiti utilizzati e commercializzati in fiale e/o composti in polvere

11.2. Preparazione delle Standard Stock Solutions (SSSs) per i 10 analiti e i 3 Standard Interni

Le SSSs sono state preparate alla concentrazione di 100.000 ng/mL per i seguenti analiti (5-fluorouracile, gemcitabina, doxorubicina, epirubicina, ifosfamide e ciclofosfamide) e per i due standard interni (trofosfamide ed epidaunorubicina) e di 1.000.000 ng/mL per i 4 analiti rimanenti (etoposide, paclitaxel, metotrexato e docetaxel) e per il 5-Fluorouracil-¹³C, ¹⁵N₂.

Le fiale sono state direttamente trasferite in matracci, le polveri sono state pesate con una bilancia analitica per ottenere la concentrazione finale.

Queste 13 **standard stock solutions** sono conservate in freezer a -20°C.

Il dettaglio viene riportato nella tabella 7 sottostante.

Tabella 7

Composto	Concentrazione delle SSSs in MeOH nel matraccio volumetrico ambrato (10 mL) (precisione $\pm 0,4$ mL)	Conservazione
5-FU	100.000 ng/mL	-20°C
Gemcitabina	100.000 ng/mL	-20°C
Doxorubicina	100.000 ng/mL	-20°C
Epirubicina	100.000 ng/mL	-20°C
Ifosfamida	100.000 ng/mL	-20°C
Ciclofosfamida	100.000 ng/mL	-20°C
Metotrexato	1000.000 ng/mL	-20°C
Etoposide	1000.000 ng/mL	-20°C
Paclitaxel	1000.000 ng/mL	-20°C
Docetaxel	1000.000 ng/mL	-20°C
Composto	Concentrazione delle SSSs in MeOH nel matraccio volumetrico ambrato (10 mL), precisione $\pm 0,4$ mL	Conservazione
5-FU- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ ISTD	1000.000 ng/mL	-20°C
Trofosfamida ISTD	100.000 ng/mL	-20°C
Epidaurorubicina ISTD	100.000 ng/mL	-20°C

Tabella 7: Standard Stock Solutions (SSSs) per i 10 Analiti e i 3 Standard Interni

11.3. Preparazione della Standard Stock Solution SSA1: Mix dei 10 Farmaci Antiblastici

Poiché non è commercialmente disponibili lo standard mix dei chemioterapici antiblastici, è necessario preparare questa miscela di composti che di seguito verrà chiamata SSA1.

La miscela standard mix è stata preparata a 3 livelli di concentrazione differenti e pari a :

- 10.000 ng/mL per il 5-fluorouracile, il paclitaxel, il docetaxel e il metotrexato.
- 4.000 ng/mL per la doxorubicina, l'epirubicina e l'etoposide.
- 1.000 ng/mL per la gemcitabina, la ciclofosfamida e l'ifosfamida

La SSA1 è conservata in freezer a -20°C. Il dettaglio viene riportato nella tabella 8 sottostante.

Tabella 8

MIX 10: SSA1	Concentrazione delle SSSs in CH ₃ CN nel matraccio volumetrico ambrato (10 mL) (precisione $\pm 0,4$ mL)	Conservazione
5-FU, PTX, DOCE, MTX	10.000 ng/mL	-20°C
GEM, CP, IF	1000 ng/mL	
DOX, EPI, ETO	4000 ng/mL	

Tabella 8: *Standard Stock Solution (SSA1)*

11.4. Preparazione delle Working Standard Solutions (WSSs): ISmix (Mix degli Standard Interni) e SSA2 (Mix dei 10 Farmaci Antiblastici)

È stata preparata una **working standard solution (WSSs)** denominata **ISmix**, contenente il mix dei 3 standard interni (5-Fluorouracil-¹³C, ¹⁵N₂, trofosfamida ed epidaunorubicina) a 3 livelli di concentrazione differenti e pari a :

- 50.000 ng/mL per il 5-Fluorouracil-¹³C, ¹⁵N₂.
- 5.000 ng/mL per la trofosfamida.
- 2.500 ng/mL per l'epidaunorubicina.

La soluzione ISmix viene preparata al momento dell'uso.

È stata preparata un'altra **working standard solution (WSSs)** denominata SSA2, contenente il mix dei 10 chemioterapici antiblastici a 3 livelli di concentrazione differenti e pari a :

- 500 ng/mL per il 5-fluorouracile, il paclitaxel, il docetaxel e il metotrexato.
- 200 ng/mL per la doxorubicina, l'epirubicina e l'etoposide.
- 50 ng/mL per la gemcitabina, la ciclofosfamida e l'ifosfamida.

La soluzione SSA2 viene preparata al momento dell'uso. Il dettaglio per la preparazione di queste due soluzioni (ISmix e SSA2) è riportato nella tabella 9 sottostante.

Tabella 9

MIX STANDARD: ISmix	Concentrazione delle WSSs in CH₃CN nel matraccio volumetrico ambrato (10 mL) (precisione ±0,4 mL)	Conservazione
5-FU C15N2 ISTD	50.000 ng/mL	Preparata al momento dell'uso
Trofesamide ISTD	5.000 ng/mL	
Epidaunorubicina ISTD	2.500 ng/mL	
MIX 10: SSA2	Concentrazione delle WSSs in CH₃CN nel matraccio volumetrico ambrato (10 mL) (precisione ±0,4 mL)	Conservazione
5-FU, PTX, DOCE, MTX	500 ng/mL	Preparata al momento dell'uso
GEM, CP, IF	50 ng/mL	
DOX, EPI, ETO	200 ng/mL	

Tabella 9: *Working Standard Solutions* ISmix e SSA2

11.5. Curve di Calibrazione:

11.5.1. Linearità

Secondo le linee guida ICH, la linearità rappresenta la capacità del metodo di fornire risultati proporzionali alla concentrazione dell'analita, mentre l'intervallo stabilisce i limiti operativi del metodo, coprendo le concentrazioni comprese tra il minimo e il massimo accettabili.

Sono stati utilizzati 7 punti per costruire la curva di calibrazione (L1-L7):

- **Per il 5-Fluorouracile (5-FU), il paclitaxel (TAX), il metotrexato (MTX) e il docetaxel (DOCE)**, le curve di calibrazione sono comprese tra 10-600 ng assoluti con QC1, QC2 e QC3 rispettivamente pari a 30, 200, 400 ng.
- **Per la ciclofosfamide (CP), l'ifosfamide (IF) e la gemcitabina (GEM)**, le curve di calibrazione sono comprese tra 1-60 ng assoluti con QC1, QC2 e QC3 rispettivamente pari a 3, 20, 40 ng.
- **Per la doxorubicina (DOXO), l'epirubicina (EPI) e l'etoposide (ETO)**, le curve di calibrazione sono comprese tra 4-240 ng assoluti con QC1, QC2 e QC3 rispettivamente pari a 12, 80, 160 ng.

Questa curva di calibrazione a sette punti (L1-L7) è stata utilizzata per preparare due **SET** di curve di calibrazione, secondo il metodo di Matuszewski (42):

- **SET A** (curva in solvente);
- **SET C** (curva su matrice wipe)

11.6. Preparazione della curva di calibrazione in solvente e in matrice

La curva di calibrazione in solvente (Set A) è stata preparata mediante l'aggiunta della “*desorption solution*”, della soluzione mix degli analiti (SSA2) e del mix degli standard interni (ISmix).

Per la preparazione della curva di calibrazione in matrice (Set C), è stato inserito in una *Falcon*, un *wipe* di tessuto non tessuto (TNT) di dimensioni 7,5x7,5 cm. Successivamente, sono stati effettuati gli spike con la soluzione mix degli analiti (**SSA2**), corrispondenti a ciascun punto della curva, e con la soluzione mix degli standard interni (**ISmix**).

La procedura di desorbimento utilizza un volume noto (8 mL) di *desorption solution* che viene posta nella falcon da 50 mL, successivamente sottoposta a vortex.

Il campione, dopo essere stato a contatto con la *desorption solution* per 30 minuti, si agita manualmente con una bacchetta di vetro per favorire il rilascio degli analiti. Si centrifuga e un'aliquota pari ad 1mL viene prelevato, filtrato e trasferito nel vial dell'autocampionatore.

Le tabelle riportate di seguito indicano che è stata seguita una procedura semplificata di calcolo che ha premesso di utilizzare le stesse soluzioni standard per i due set A e C. Inoltre, riportano i volumi aggiunti di queste soluzioni. I dettagli relativi alla preparazione della soluzione di desorption (DES), menzionata nelle tabelle, sono descritti nel paragrafo 11.12.

Tabella 10

Analiti	Levels	Standard calibration curve: microlitri SSA2	microL ISmix: ISTD	Desorption solution DES	Standard calibration curve	
		uL			Conc.ng/mL	ng assoluti
5-FU, TAX, MTX, DOCE	L1	20	40	8	1,25	10
	L2	40	40	8	2,5	20
	QC1	60	40	8	3,75	30
	L3	120	40	8	7,5	60
	L4	200	40	8	12,5	100
	QC2	400	40	8	25	200
	L5	600	40	8	37,5	300
	QC3	800	40	8	50	400
	L6	1000	40	8	62,5	500
	L7	1200	40	8	75	600
CP, IF, GEM	L1	20	40	8	0,13	1
	L2	40	40	8	0,25	2
	QC1	60	40	8	0,38	3
	L3	120	40	8	0,75	6
	L4	200	40	8	1,25	10
	QC2	400	40	8	2,50	20
	L5	600	40	8	3,75	30
	QC3	800	40	8	5,00	40
	L6	1000	40	8	6,25	50
	L7	1200	40	8	7,50	60
DOXO, EPI, ETO	L1	20	40	8	0,50	4
	L2	40	40	8	1,00	8
	QC1	60	40	8	1,50	12
	L3	120	40	8	3,00	24
	L4	200	40	8	5,00	40
	QC2	400	40	8	10,00	80
	L5	600	40	8	15,00	120
	QC3	800	40	8	20,00	160
	L6	1000	40	8	25,00	200
	L7	1200	40	8	30,00	240

Tabella 10: Curva di Calibrazione in Solvente (Set A)

Tabella 11

Analiti	Levels	Standard calibration curve: microlitri SSA2	microl ISmix: ISTD	Desorption solution DES	Standard calibration curve	
		uL	uL	mL	Conc.ng/mL	ng assoluti
5-FU, TAX, MTX, DOCE	L1	20	40	8	1,25	10
	L2	40	40	8	2,5	20
	QC1	60	40	8	3,75	30
	L3	120	40	8	7,5	60
	L4	200	40	8	12,5	100
	QC2	400	40	8	25	200
	L5	600	40	8	37,5	300
	QC3	800	40	8	50	400
	L6	1000	40	8	62,5	500
	L7	1200	40	8	75	600
CP, IF, GEM	L1	20	40	8	0,13	1
	L2	40	40	8	0,25	2
	QC1	60	40	8	0,38	3
	L3	120	40	8	0,75	6
	L4	200	40	8	1,25	10
	QC2	400	40	8	2,50	20
	L5	600	40	8	3,75	30
	QC3	800	40	8	5,00	40
	L6	1000	40	8	6,25	50
	L7	1200	40	8	7,50	60
DOXO, EPI, ETO	L1	20	40	8	0,50	4
	L2	40	40	8	1,00	8
	QC1	60	40	8	1,50	12
	L3	120	40	8	3,00	24
	L4	200	40	8	5,00	40
	QC2	400	40	8	10,00	80
	L5	600	40	8	15,00	120
	QC3	800	40	8	20,00	160
	L6	1000	40	8	25,00	200
	L7	1200	40	8	30,00	240

Tabella 11: Curva di Calibrazione in matrice (Set C)

11.7. Curve di Calibrazione nel Set C per i 10 Analiti

Di seguito sono riportate le curve di calibrazione per ciascuno dei 10 analiti studiati, derivate dal Set C (matrice wipe). Per ogni analita sono presentate tre curve di calibrazione, ottenute utilizzando i sette livelli di concentrazione (L1-L7), espressi in nanogrammi assoluti, con i rispettivi parametri di regressione lineare. Le tre curve rappresentano le analisi eseguite in tre giorni differenti.

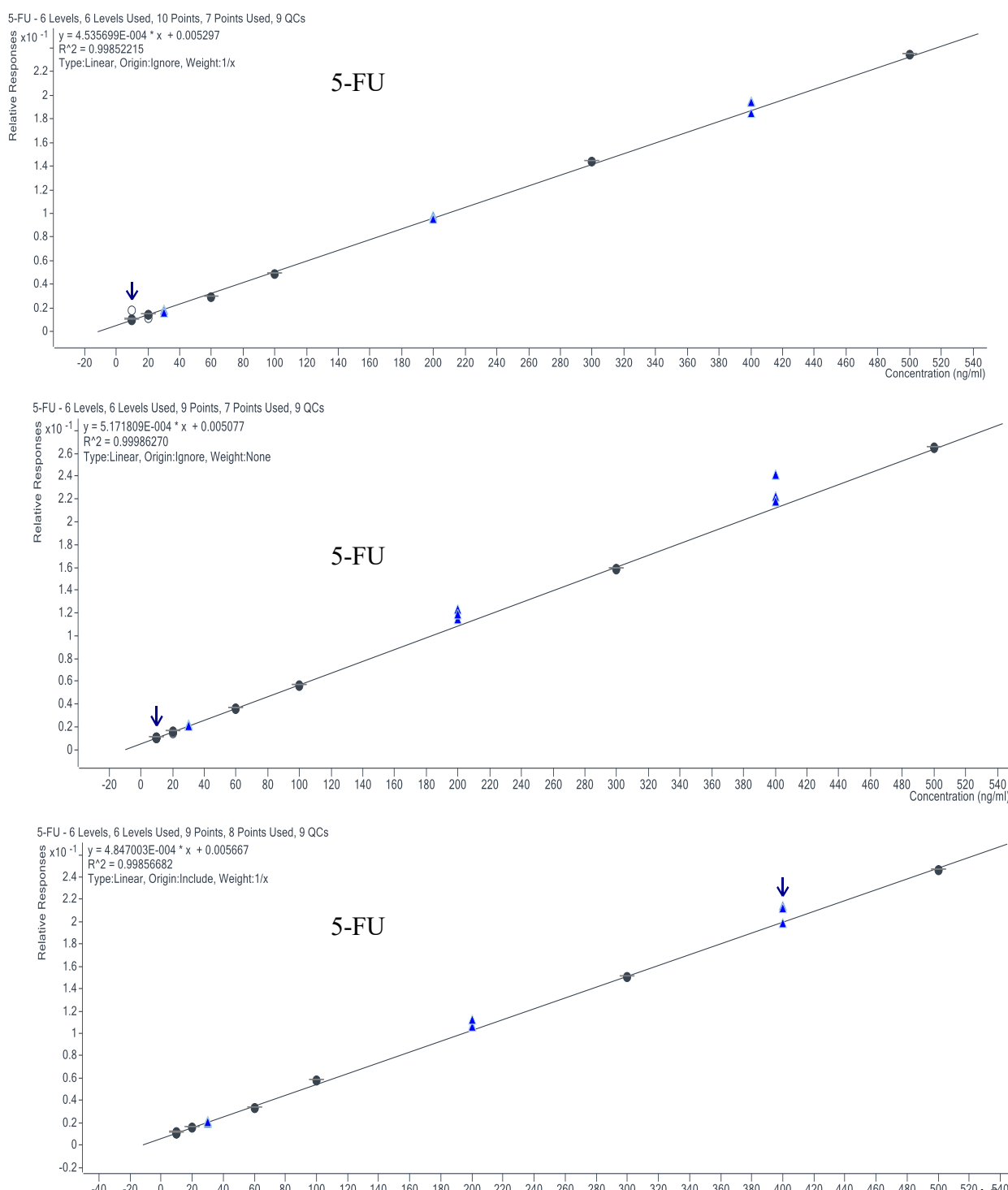


Figura 9: Curve di calibrazione del 5-Fluorouracile (5-FU)

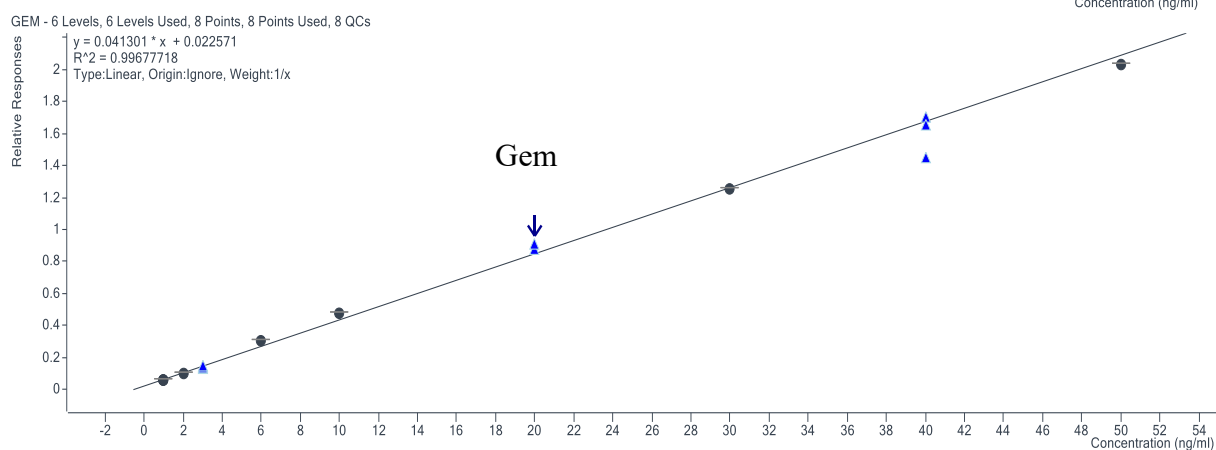
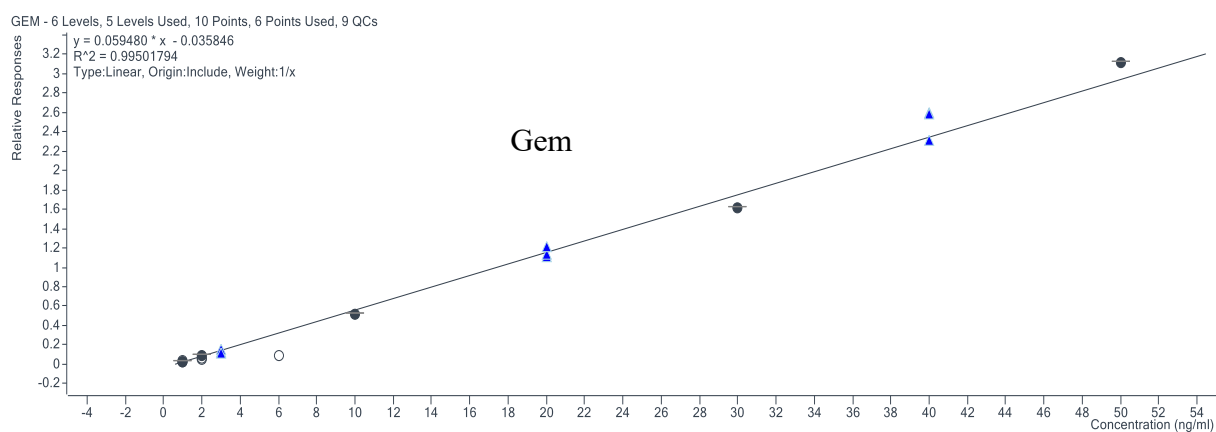
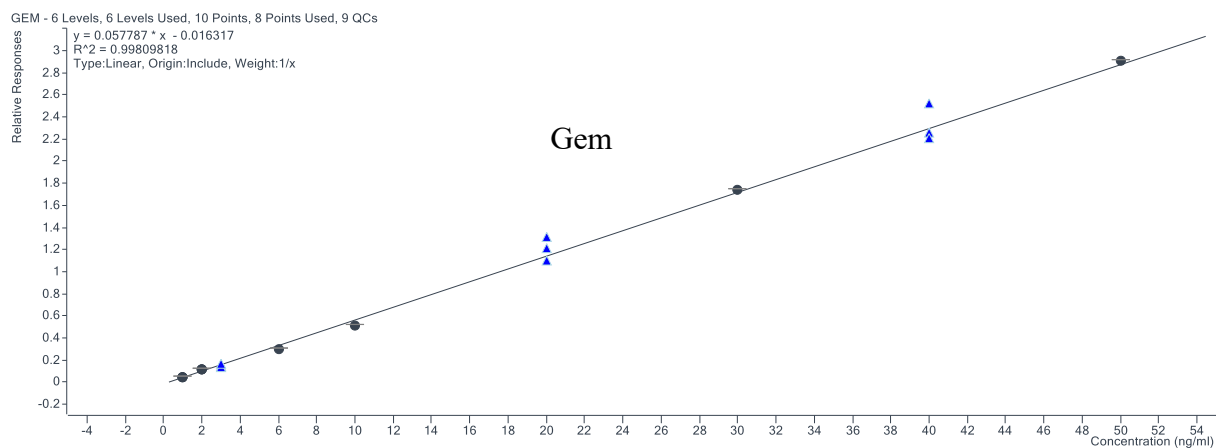


Figura 10: Curve di Calibrazione della Gemcitabina

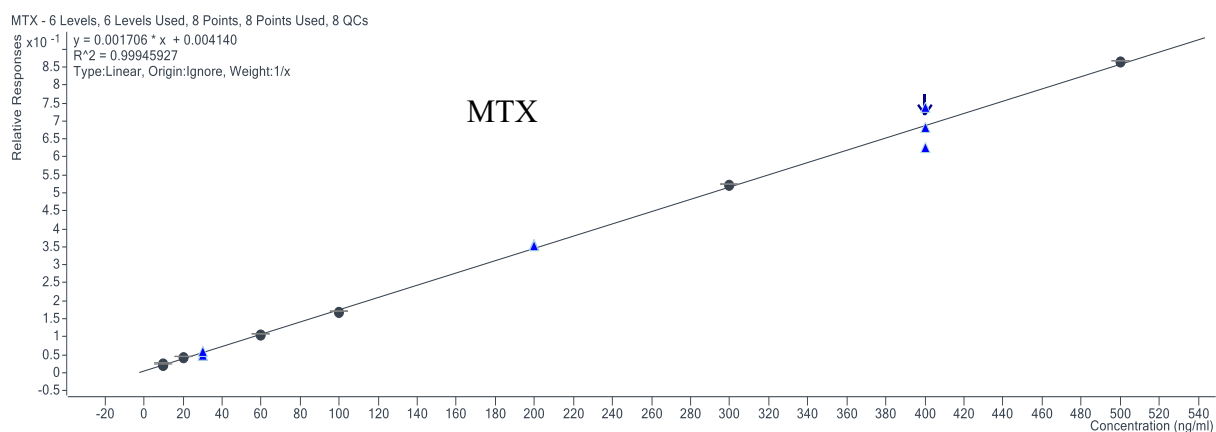
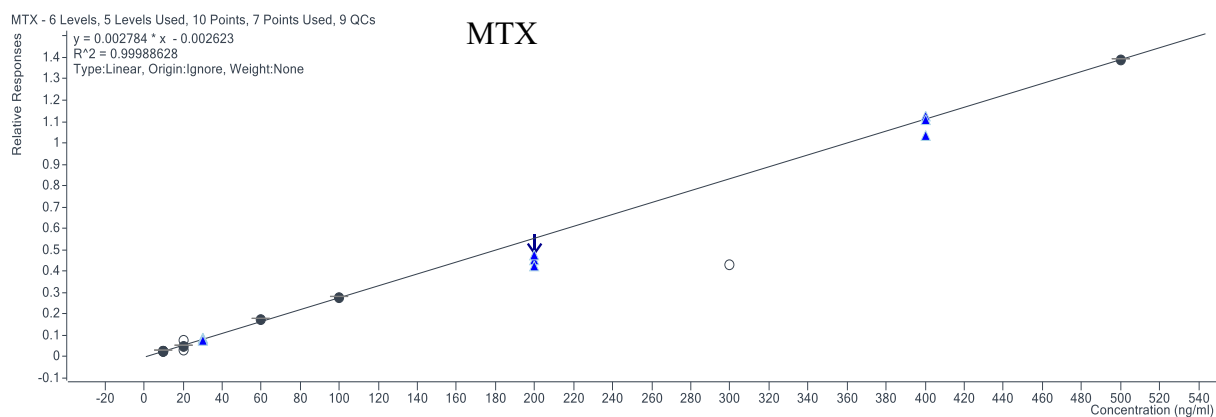
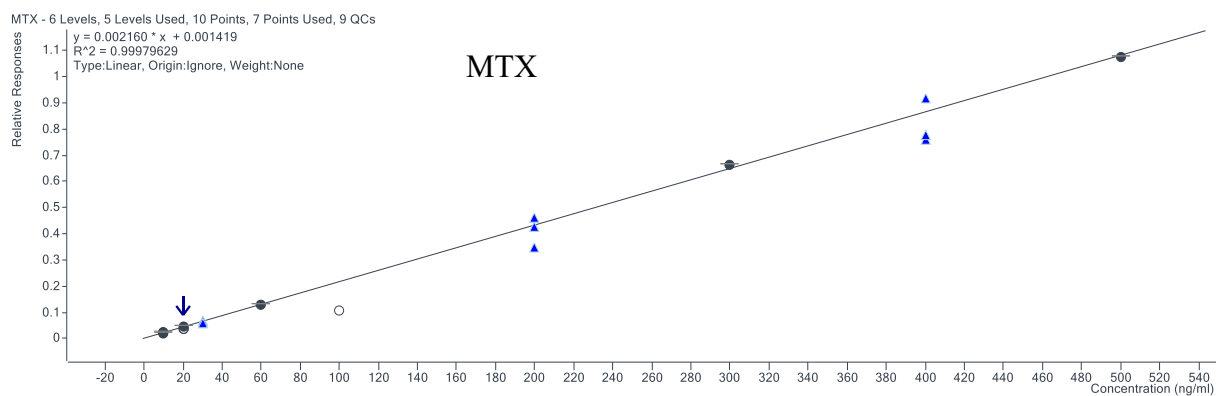


Figura 11: Curve di Calibrazione del Metotrexato

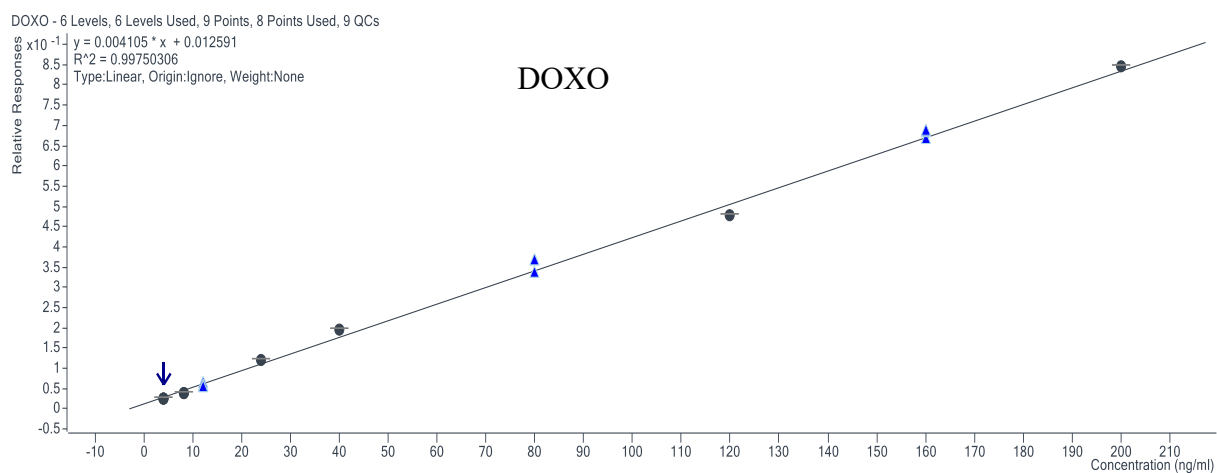
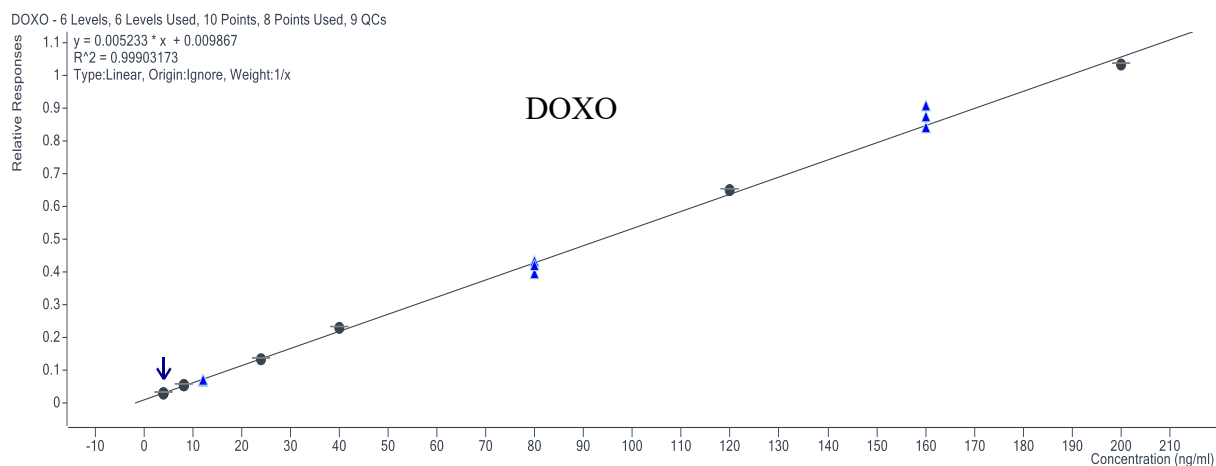
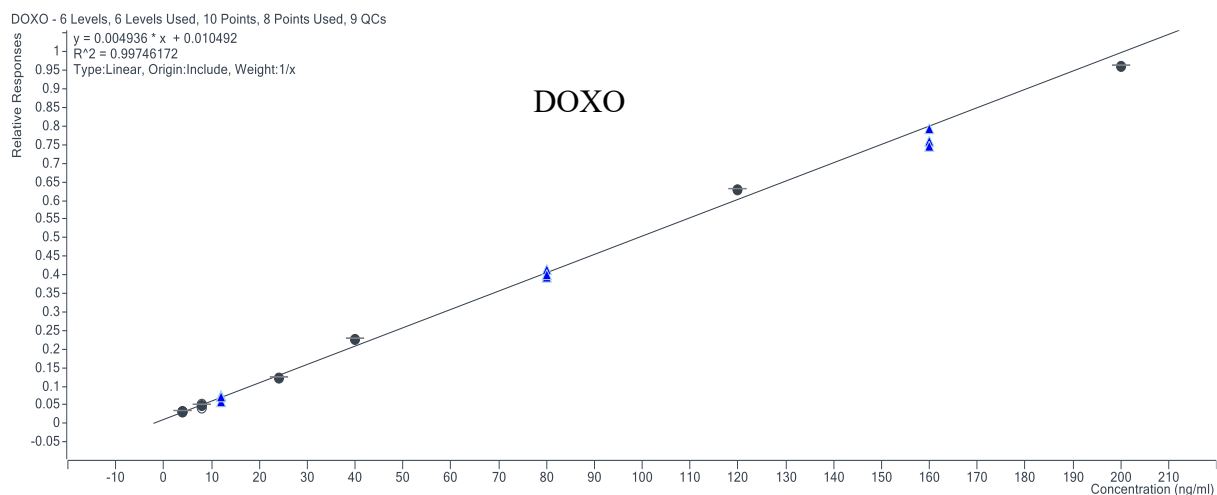


Figura 12: Curve di Calibrazione della Doxorubicina

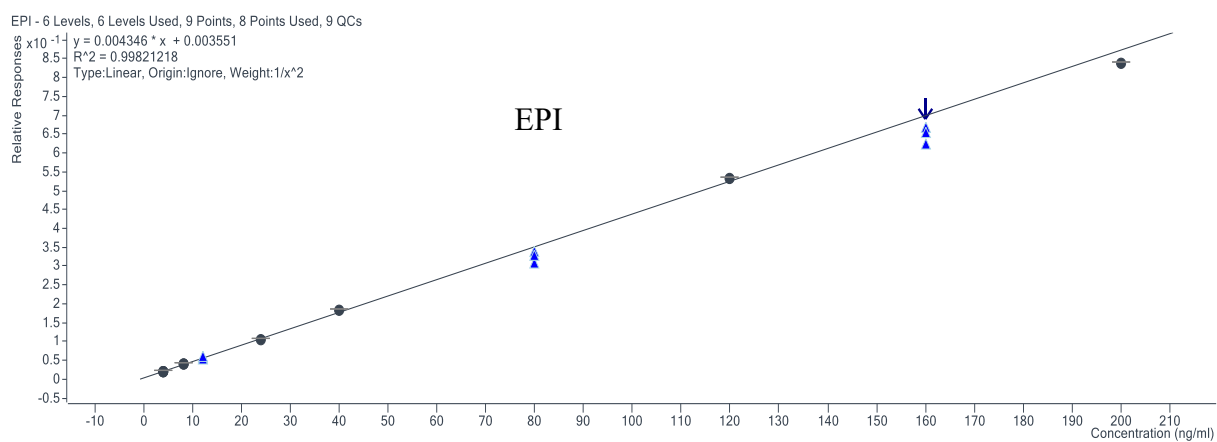
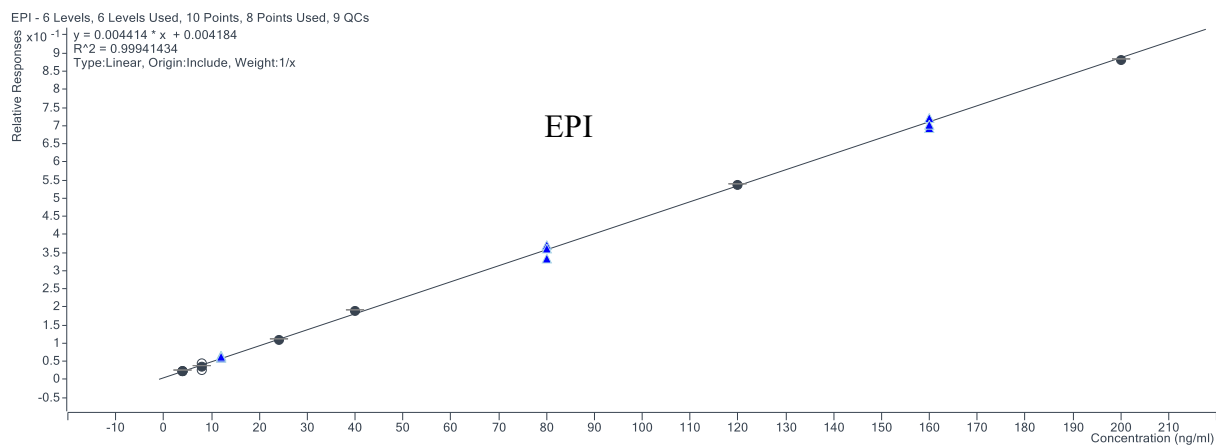
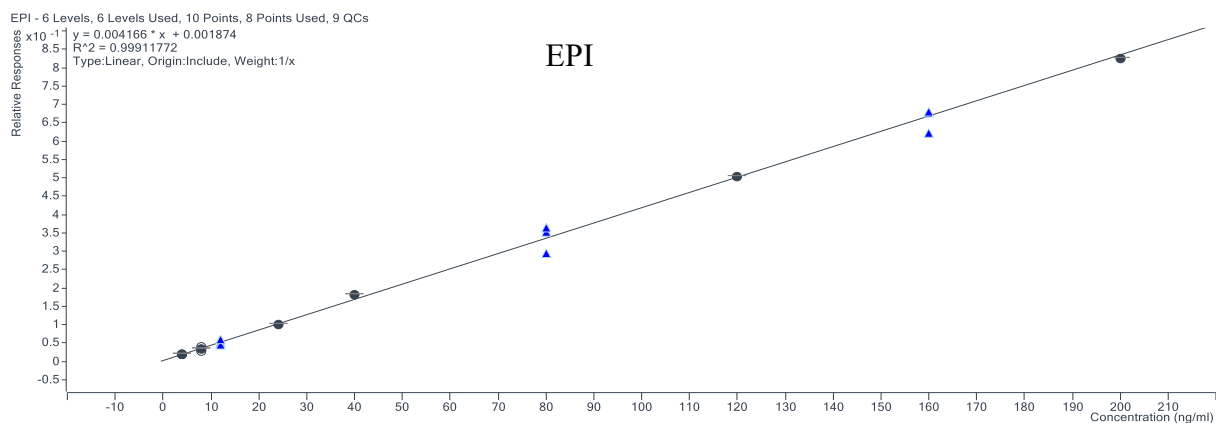


Figura 13: Curve di calibrazione dell'epirubicina

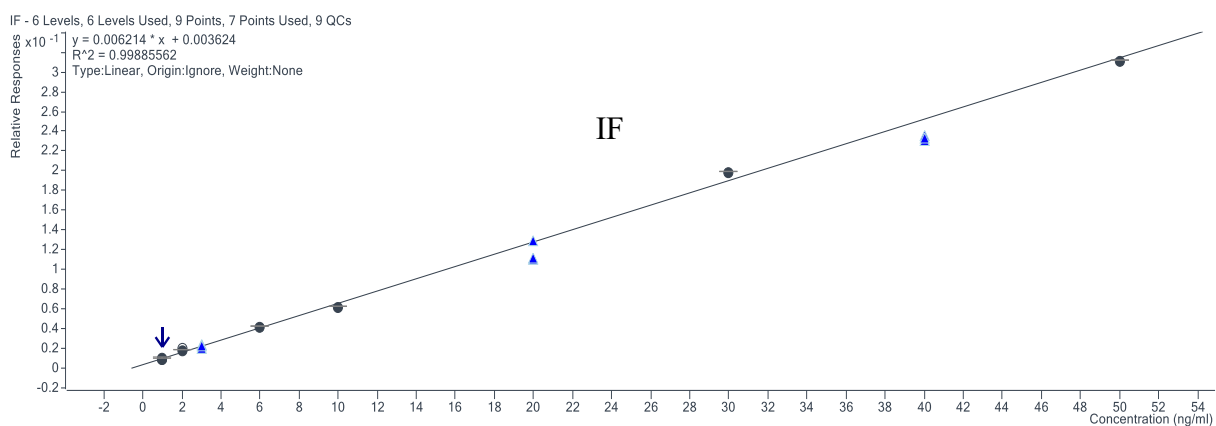
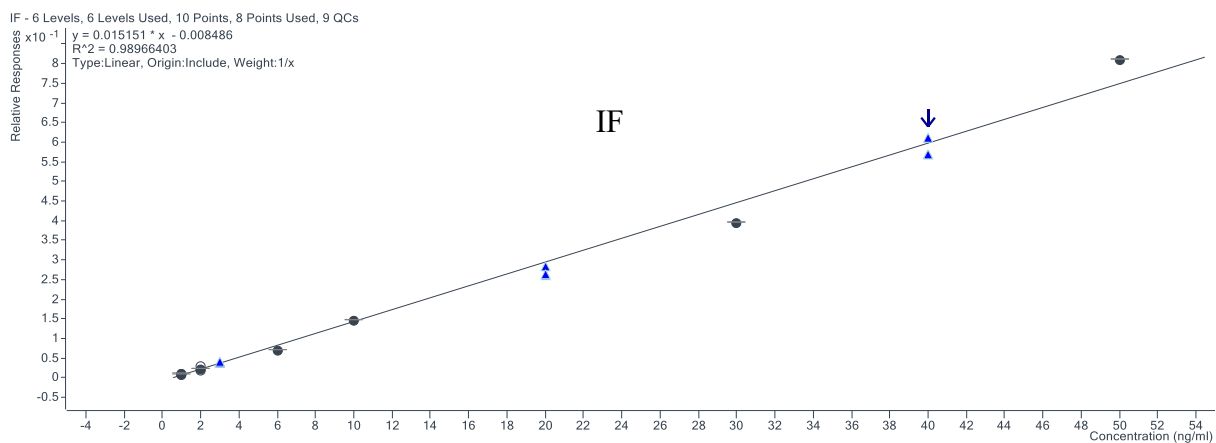
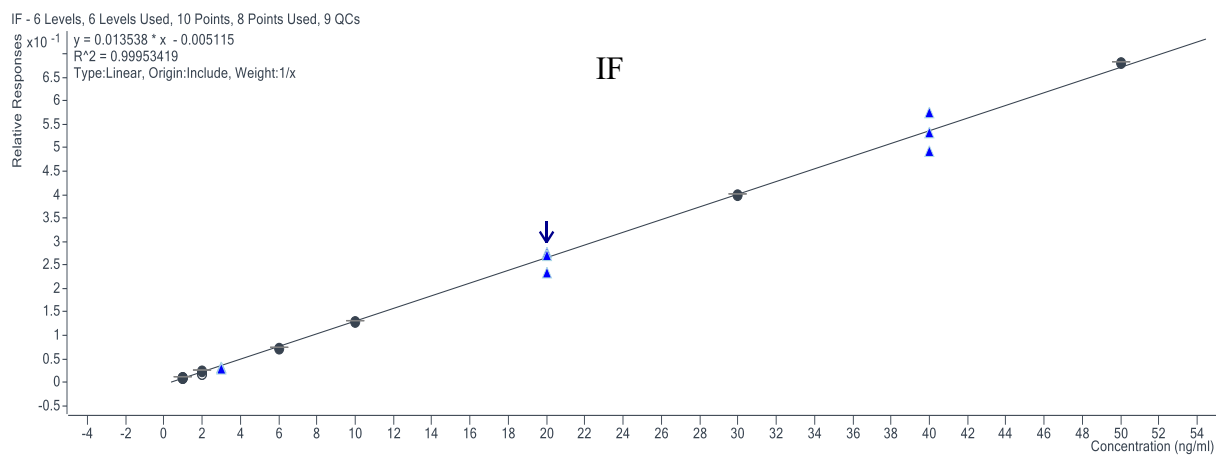


Figura 14: Curve di calibrazione dell'ifosfamide

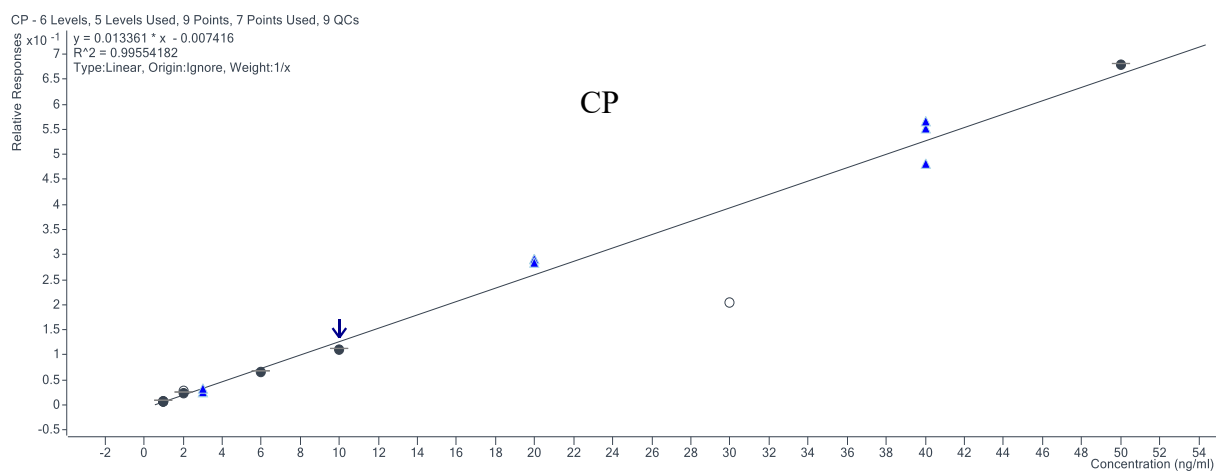
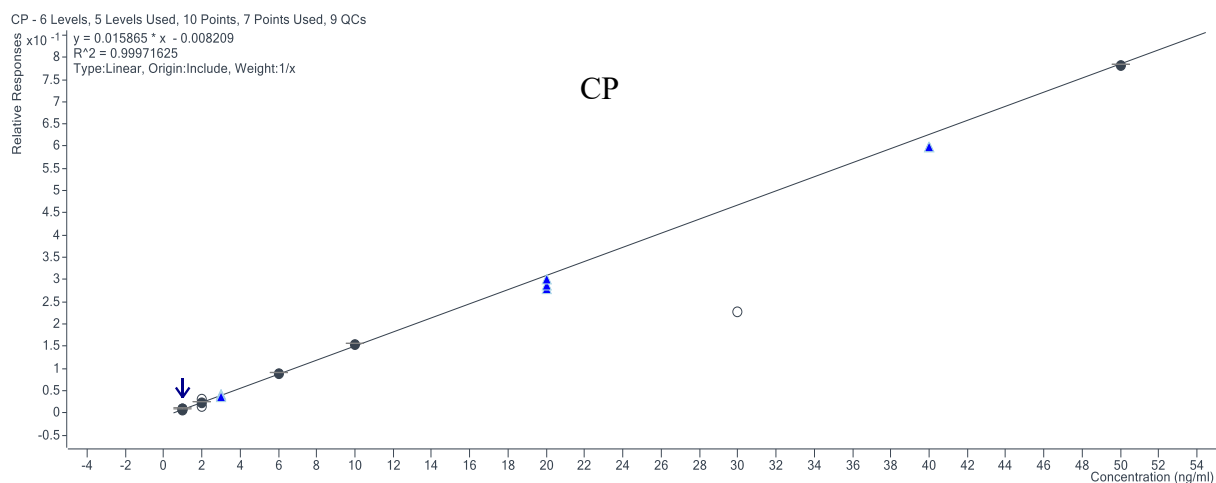
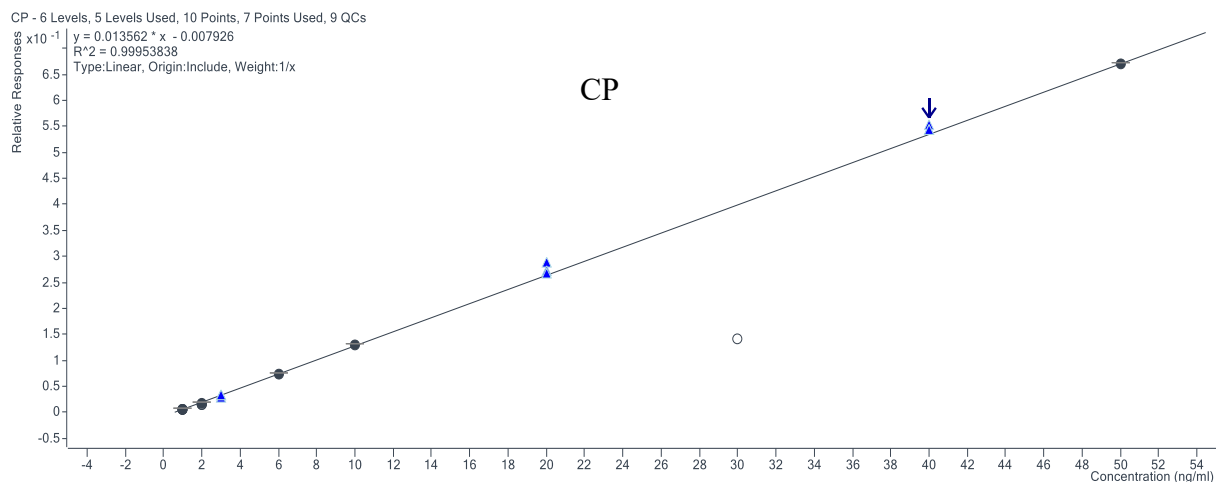


Figura 15: Curve di calibrazione della Ciclofosfamide

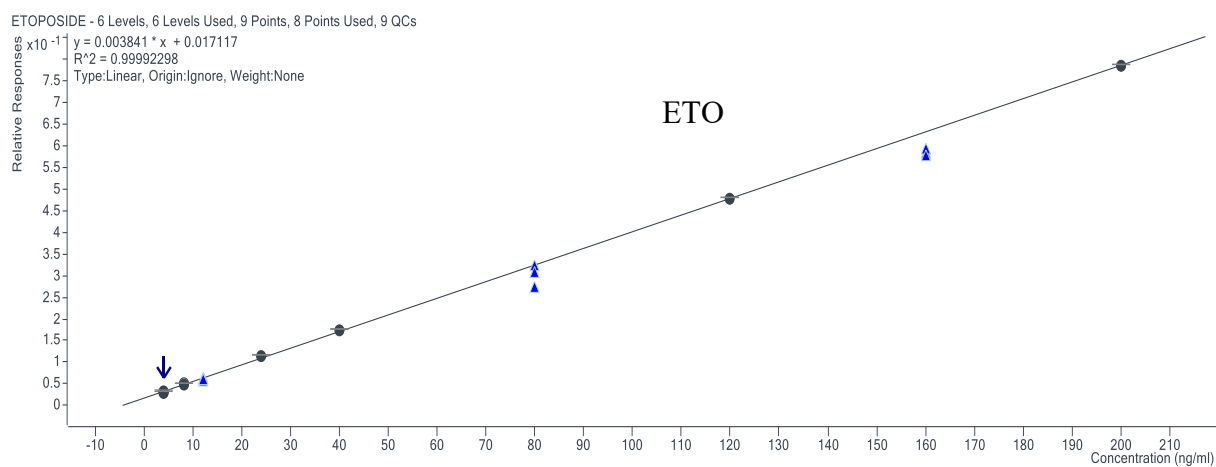
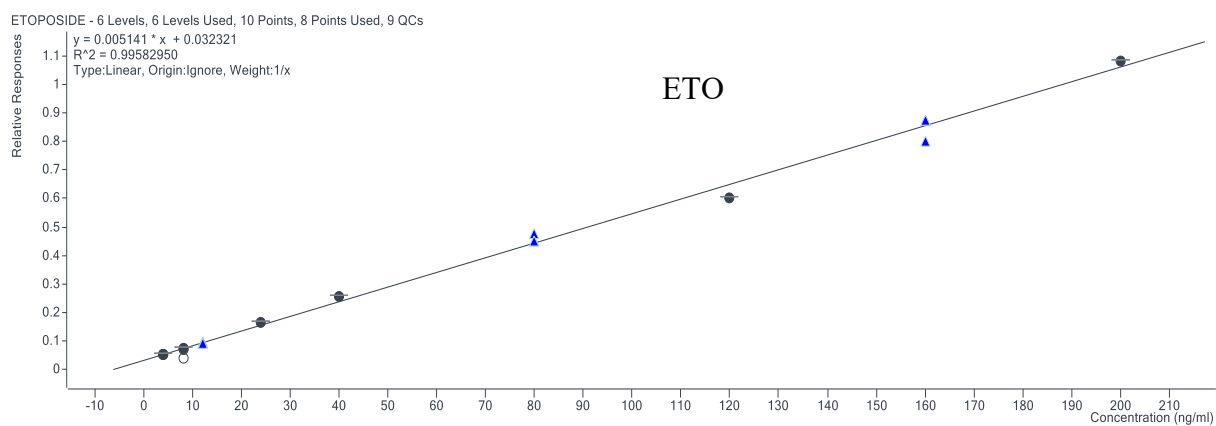
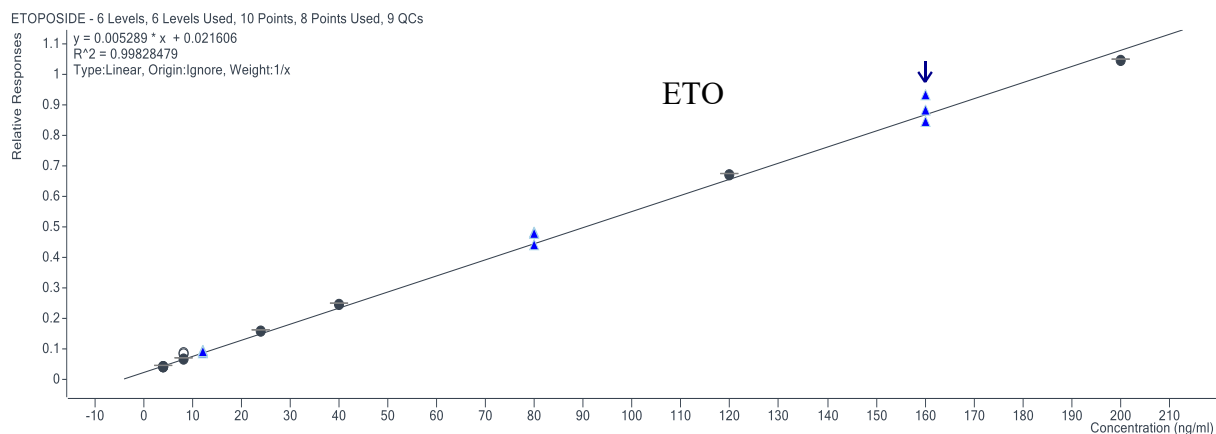


Figura 16: Curve di calibrazione dell'etoposide

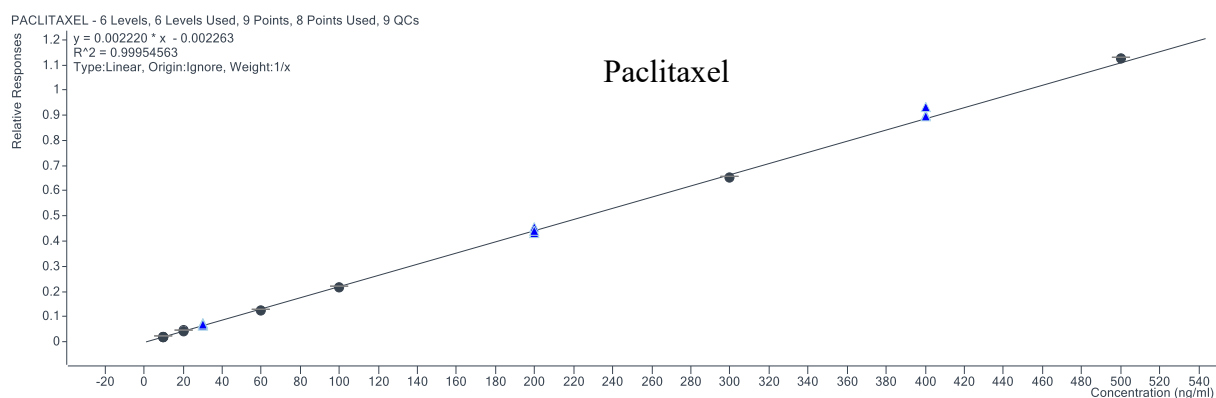
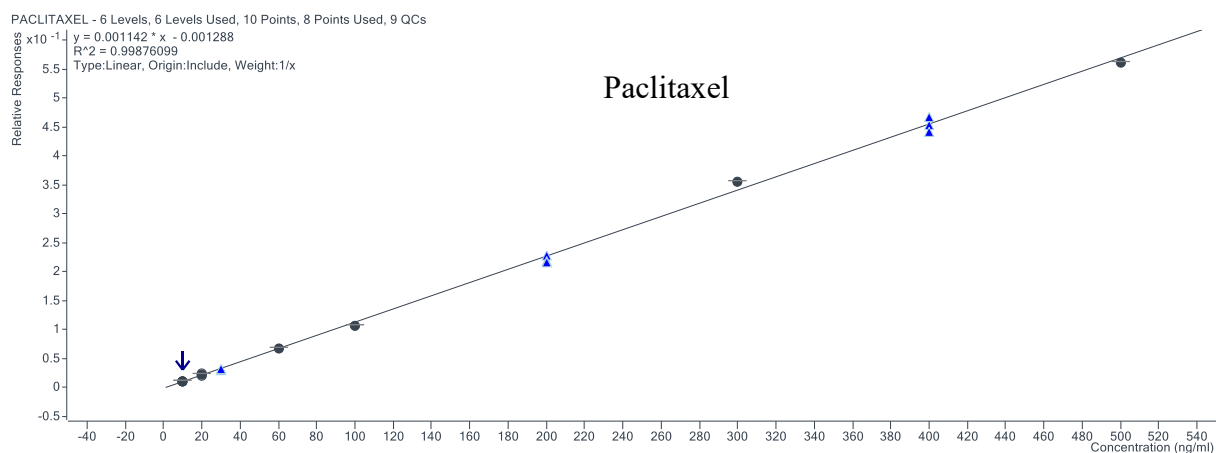
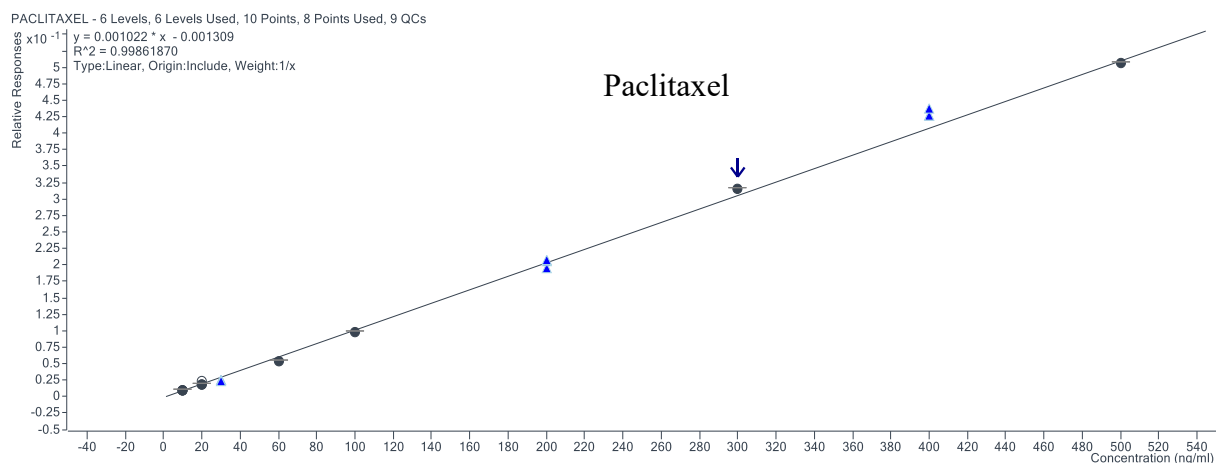


Figura 17: Curve di calibrazione del Paclitaxel

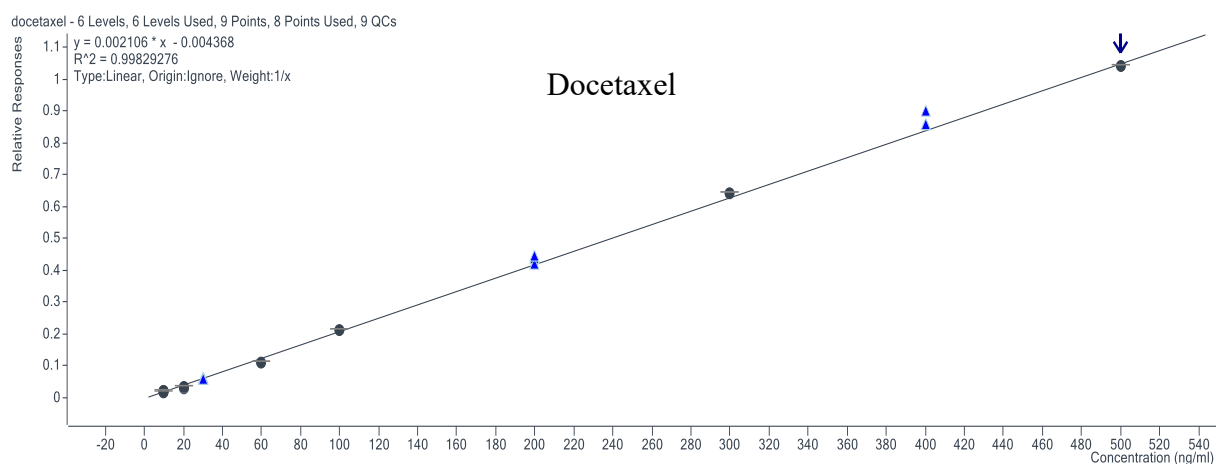
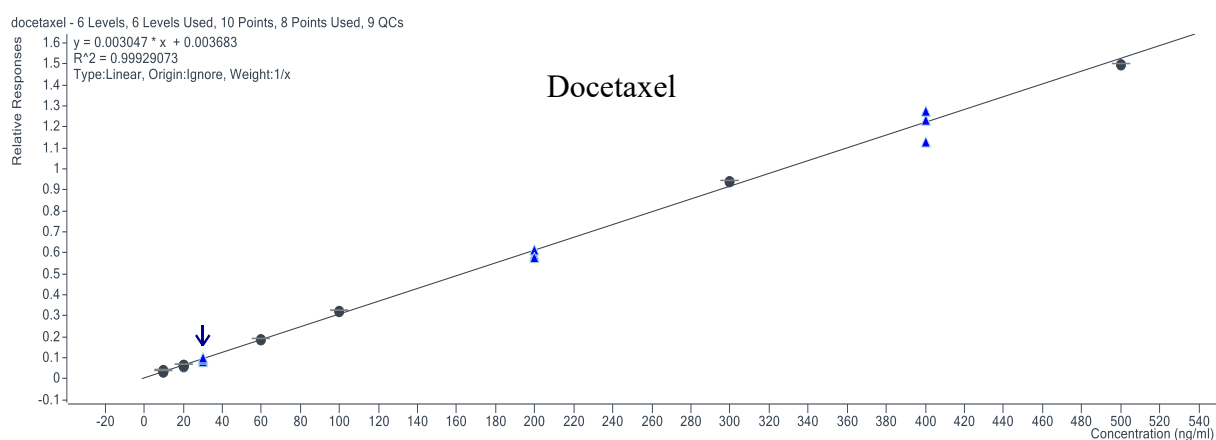
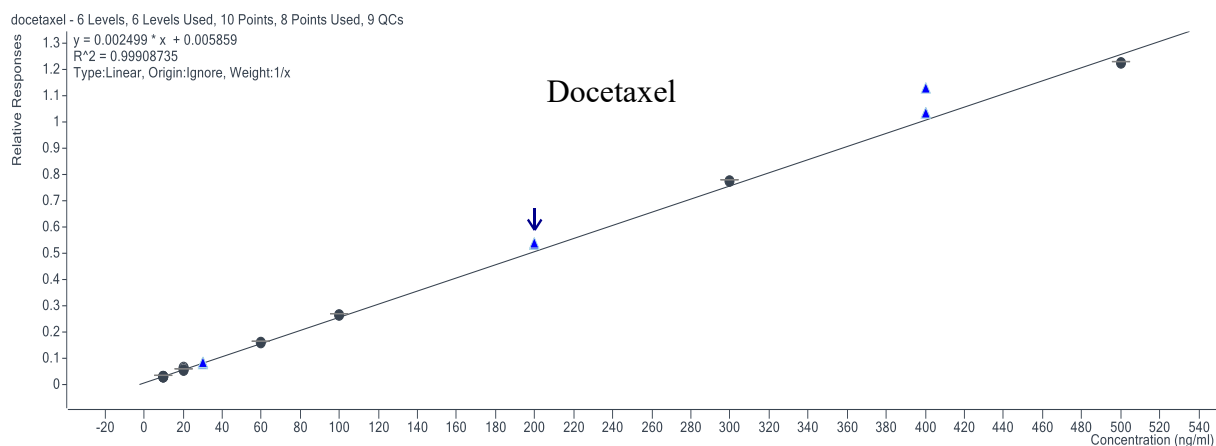


Figura 18: Curve di calibrazione del Docetaxel

11.8. Determinazione dei LOD e LOQ per i 10 Analiti studiati:

Come già riportato nel paragrafo numero 6, le linee guida ICH identificano parametri chiave per la validazione, tra cui:

- **Limite di Rilevamento (LOD):** Il limite di rilevamento è definito come la quantità minima di analita che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata, in un campione. Questo parametro è importante per determinare la sensibilità del metodo e la sua capacità di identificare tracce di sostanze.
- **Limite di Quantificazione (LOQ):** Il limite di quantificazione è la quantità minima di analita che può essere quantificata con precisione e accuratezza accettabili. Il LOQ è fondamentale per garantire l'affidabilità delle misurazioni da utilizzarsi per scopi analitici

Questi due parametri sono stati determinati seguendo le formule riportate nelle linee guida ICH:

Il LOD = $3.3 \text{ ds (b) / media (a)}$ e Il LOQ = $10 \text{ ds (b) / media (a)}$

- ds (b) è la deviazione standard dell'intercetta
- media (a) è la media della pendenza

Per il calcolo della ds (b) e della media (a), sono stati utilizzati i valori dell'intercetta e della pendenza delle curve di calibrazione nel set C per i 10 analiti presentate nel paragrafo precedente.

In Tabella 12 si riassumono i principali parametri delle curve di calibrazione, incluso R^2 , il **coefficiente di determinazione**, che varia da un minimo di **0.98** (per ifosfamide *day 2*) a un massimo di **0.99** (per tutti gli altri analiti, inclusa l'ifosfamide *day 1* e *day 3*)

Le rette di regressione permettono di estrapolare il LOD/LOQ per ciascun analita in base a quanto riportato sopra e descritto dalle linee guida ICH.

Si può osservare (Tabella 12) che i valori di **LOD** e **LOQ**, espressi in nanogrammi assoluti, variano rispettivamente da **0,09 a 2,05** e da **0,28 a 6,21**.

In particolare, il **LOD e il LOQ più bassi** sono stati ottenuti per la **ciclofosfamide (0,09 ng e 0,28 ng)**, mentre i valori più alti sono stati riscontrati per il **5-Fluorouracile (2,05 ng e 6,21 ng)**. Questo indica che la ciclofosfamide presenta un'elevata sensibilità analitica con il metodo utilizzato.

Nel caso della valutazione dei livelli di contaminazione su superfici, si tiene conto dell'area campionata e il **LOD** e il **LOQ** possono essere espressi in **ng/cm²**. Per convertire i valori di **LOD/LOQ** in **ng/cm²**, si utilizza la formula riportata nell'articolo di Pretty (43)

$$[8 \text{ mL (X ng/mL)}] / 100 \text{ cm}^2 = 0.08 \text{ Xng/cm}^2$$

Dove in questo caso:

- 8 mL è il volume totale di solvente utilizzato per l'estrazione
- 100 cm² è l'area della superficie campionata con il wipe
(dalla letteratura recente si evince che l'area campionata più rappresentativa corrisponde a 400/900 cm²)
- X ng/mL è il limite di rilevamento strumentale, assegnato come una concentrazione nel solvente estratto.

Tabella 12. Parametri delle Curve di Calibrazione, LOD e LOQ per i 10 Analiti Studati

Day	Composto	Calibration Curve	R ²	a	b	media (a)	ds (b)	LOD (ng)	LOQ (ng)
	5-FU								
Day 1		$y = 0,0004535x + 0,005297$	0,9985	0,0004535	0,005297	0,0004851	0,0003013	2,0501	6,2124
Day 2		$y = 0,000517x + 0,00507$	0,9999	0,000517	0,00507				
Day 3		$y = 0,0004847x + 0,005667$	0,9986	0,0004847	0,005667				
	GEM								
Day 1		$y = 0,0577x + 0,0163$	0,9981	0,0577	0,0163	0,05273	0,009985	0,6249	1,8937
Day 2		$y = 0,05948x + 0,03584$	0,995	0,05948	0,03584				
Day 3		$y = 0,041x + 0,0225$	0,9968	0,041	0,0225				
	DOXO								
Day 1		$y = 0,00494x + 0,01049$	0,9975	0,00494	0,01049	0,01705	0,002022	1,4054	4,2589
Day 2		$y = 0,0052x + 0,009$	0,9990	0,0052	0,009				
Day 3		$y = 0,0041x + 0,013$	0,9975	0,0041	0,013				
	EPI								
Day 1		$y = 0,004166x + 0,001874$	0,9991	0,004166	0,001874	0,004293	0,001201	0,9232	2,7977
Day 2		$y = 0,004414x + 0,004184$	0,9994	0,004414	0,004184				
Day 3		$y = 0,0043x + 0,0036$	0,9982	0,0043	0,0036				
	IF								
Day 1		$y = 0,01354x + 0,0051$	0,9995	0,01354	0,0051	0,01163	0,002413	0,6847	2,0749
Day 2		$y = 0,01515x + 0,0084$	0,9897	0,01515	0,0084				
Day 3		$y = 0,0062x + 0,0037$	0,9989	0,0062	0,0037				
	CP								
Day 1		$y = 0,01356x + 0,0079$	0,9995	0,01356	0,0079	0,01434	0,0003956	0,0910	0,2758
Day 2		$y = 0,01586x + 0,0082$	0,9997	0,01586	0,0082				
Day 3		$y = 0,01361x + 0,007416$	0,9955	0,01361	0,007416				
	ETO								
Day 1		$y = 0,0052x + 0,022$	0,9983	0,0052	0,022	0,02000	0,007638	1,2602	3,8188
Day 2		$y = 0,051x + 0,032$	0,9958	0,051	0,032				
Day 3		$y = 0,0038x + 0,017$	0,9999	0,0038	0,017				
	PTX								
Day 1		$y = 0,001022x + 0,001309$	0,9986	0,001022	0,001309	0,001461	0,0005570	1,2577	3,8113
Day 2		$y = 0,001142x + 0,001288$	0,9988	0,001142	0,001288				
Day 3		$y = 0,00222x + 0,002263$	0,9995	0,00222	0,002263				
	MTX								
Day 1		$y = 0,00216x + 0,001419$	0,9998	0,00216	0,001419	0,002215	0,001364	2,0325	6,1591
Day 2		$y = 0,00278x + 0,0026$	0,9999	0,00278	0,0026				
Day 3		$y = 0,001706x + 0,00414$	0,9994	0,001706	0,00414				
	DOCE								
Day 1		$y = 0,002499x + 0,005859$	0,9991	0,002499	0,005859	0,002551	0,001113	1,4395	4,3620
Day 2		$y = 0,003047x + 0,003683$	0,9993	0,003047	0,003683				
Day 3		$y = 0,002106x + 0,004368$	0,9983	0,002106	0,004368				

11.9. Accuratezza e Precisione

Come già riportato nel **paragrafo 6**, le linee guida ICH identificano alcuni **parametri chiave** per la validazione del metodo analitico, tra cui:

- **Accuratezza:** esprime la vicinanza tra il valore misurato e un valore di riferimento accettato. È fondamentale per garantire che i risultati analitici rappresentino correttamente la quantità dell'analita presente nel campione.
- **Precisione:** riflette la ripetibilità dei risultati sotto le stesse condizioni operative e può essere suddivisa in ripetibilità, precisione intermedia (variazioni interne al laboratorio) e riproducibilità (confronto tra laboratori)

Per validare l'accuratezza e la precisione, la **ICH Q2(R1)** consiglia un minimo di **9 determinazioni** su almeno **3 livelli di concentrazione** all'interno dell'intervallo specificato. Nel presente lavoro di tesi, sono stati calcolati **accuratezza e precisione** sul **LOQ** e sui **tre livelli di Quality control (QC1, QC2, QC3)** valutandoli su tre giorni consecutivi di analisi.

Calcolo dell'Accuratezza:

L'accuratezza è stata calcolata usando questa formula:

$$\text{Accuratezza} = \frac{\text{Quantità misurata}}{\text{Quantità teorica aggiunta}} * 100$$

Dove:

- **Quantità misurata:** valore ottenuto dall'analisi sperimentale
- **Quantità teorica aggiunta:** valore noto della quantità dell'analita presente nel campione (es. concentrazione nota aggiunta)

Il valore dell'accuratezza ottenuto dovrebbe rientrare tra **80% e 120%** affinché il metodo sia considerato valido.

Calcolo della Precisione:

La precisione è stata valutata attraverso il coefficiente di variazione CV%, calcolato con la seguente formula:

$$\text{CV\%} = \frac{\text{Scarto tipo}}{\text{Media}} * 100$$

Dove:

- Scarto tipo: deviazione standard dei dati sperimentali
- Media: valore medio dei dati sperimentali

Il CV (%) deve essere il più basso possibile, nel nostro caso, un valore di $CV\% \leq 15\%$ è considerato accettabile.

Di seguito si presentano e analizzano i dati sperimentali, insieme ai parametri statistici e ai risultati ottenuti.

11.9.1. Accuratezza e precisione (LOQ)

Per le analisi condotte sul livello L1, i risultati mostrano che, per l'accuratezza, la maggior parte degli analiti rientra nei limiti di accettabilità, compresi tra il 99,05% e il 102,37%. Tuttavia, la Gemcitabina presenta un valore significativamente inferiore (53,38%). L'Etoposide, pur avendo un valore inferiore rispetto agli altri analiti (91,88%), rientra comunque nei parametri accettabili (80%-120%).

I risultati confermano un'elevata precisione per la quasi totalità degli analiti valutati, con un intervallo di CV% compreso tra 1,71% e 7,83%. Tuttavia, la Gemcitabina mostra un valore elevato ($CV\% = 18,17\%$), superiore alla soglia del 15%.

È stato determinato sperimentalmente che l'intervallo di linearità per la gemcitabina si colloca in un range più ristretto rispetto agli altri analiti, precisamente tra 1 e 50 ng, come evidenziato dai grafici delle curve di calibrazione. In letteratura (40) è stato osservato che, per la gemcitabina, la miglior interpolazione su un intervallo più ampio si ottiene con una curva di tipo parabolico, descritta da un polinomio di secondo grado:

$$Y = ax^2 + bx + c$$

Dove:

- ax^2 è il termine quadratico,
- bx è il termine lineare,
- C è il termine indipendente

La tabella sottostante riporta i risultati di accuratezza e precisione (LOQ), insieme ai parametri statistici per i 10 analiti.

Tabella 12

DATI										
	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1
	5-FU	CP	IF	GEM	EPI	DOXO	MTX	ETO	DOCE	PTX
	(ng ass)									
1	9,8150	1,0418	1,0285	0,9787	3,9696	4,0080	8,5833	3,8083	9,4437	9,9640
2	11,1789	1,0262	1,0204	1,0080	4,0430	3,8983	9,4874	3,6081	9,4777	10,4954
3	10,1308	1,0346	1,0182	1,0583	4,1590	3,9591	10,0542	3,8496	10,1254	10,6111
4	10,9270	1,0449	1,0924	1,1338	4,0447	3,8168	10,2273	3,7821	10,4960	9,9086
5	10,2903	0,8995	1,0308	1,0547	4,1523	3,8764	10,1898	3,9653	10,0610	9,7028
6	8,7907	1,0531	1,1072	1,5534	4,1443	4,0632	10,0930	3,6135	9,2367	10,6918
7	10,8214	1,0156	0,9169	0,9563	4,0447	4,3248	9,9830	3,2894	9,3448	10,3791
8	9,7397	1,0039	0,9702	0,9262	4,1523	4,3231	10,6860	3,2193	10,8350	9,9119
9	8,8324	1,0595	0,8604	0,9392	4,1443	4,2862	9,8454	3,9416	11,4167	10,3713
valore nominale (ng ass)	10	1	1	2	4	4	10	4	10	10
STATISTICHE										
Numero dati (n.) :	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Media (Xm) :	10,058	1,020	1,005	1,068	4,095	4,062	9,905	3,675	10,049	10,226
Varianza (sr ²) :	0,740	0,002	0,006	0,038	0,005	0,040	0,348	0,072	0,568	0,128
Scarto tipo (sr) :	0,860	0,048	0,079	0,194	0,070	0,201	0,590	0,269	0,754	0,358
Coeff.variaz. percentuale (CVr %)	8,554	4,753	7,834	18,168	1,706	4,942	5,955	7,324	7,499	3,499
Accuracy %	100,585	101,991	100,502	53,381	102,372	101,544	99,055	91,881	100,485	102,262
Minimo (Min.) :	8,7907	0,8995	0,8604	0,9262	3,9696	3,8168	8,5833	3,2193	9,2367	9,7028
Massimo (Max) :	11,1789	1,0595	1,1072	1,5534	4,1590	4,3248	10,6860	3,9653	10,0610	10,6918
Intervallo (Range) :	2,3882	0,1600	0,2468	0,6272	0,1894	0,5079	2,1027	0,7460	0,8243	0,9889
Mediana :	10,1308	1,0346	1,0204	1,0080	4,1443	4,0080	10,0542	3,7821	10,0610	10,3713

Tabella 13: Accuratezza e Precisione (LOQ) e Parametri di Statistica per i 10 Analiti

11.9.2. Accuratezza e Precisione (QCs)

La valutazione dell'accuratezza e della precisione è stata effettuata sui tre livelli di *Quality Control* (QC1, QC2, QC3).

QC1

Per il livello QC1, i risultati indicano che, per l'**accuratezza**, tutti gli analiti rientrano nei limiti di accettabilità (80%-120%), con valori compresi tra 95,07% e 103,92%. In particolare, il 5-Fluorouracile, la Doxorubicina, l'Etoposide e il Docetaxel mostrano un'accuratezza ottimale, vicina al 100%.

Per la **Precisione**, Il coefficiente di variazione ($CV\% \leq 15\%$) è stato rispettato per tutti gli analiti, dimostrando una buona ripetibilità.

QC2

Per il livello QC2, i risultati indicano che, per l'**accuratezza**, tutti gli analiti rientrano nel range di accettabilità, con valori compresi tra 93,17% e 105,64%. Il Metotrexato (93,17%) presenta il valore più basso del gruppo, risultando leggermente sottostimato.

Per la **precisione**, tutti gli analiti rispettano il limite di $CV\% \leq 15\%$, con valori compresi tra 2,86% e 12,43%.

QC3

Per il livello QC3, i valori ottenuti di **accuratezza** si collocano tra 95,69% e 104,90%, confermando una buona accuratezza per tutti gli analiti.

Per la **precisione**, tutti gli analiti rientrano nei limiti di $CV\% \leq 15\%$, con valori tra 3,12% e 7,30%, dimostrando un'eccellente ripetibilità.

Le tabelle sottostanti 13 e 14 riportano i risultati di accuratezza e precisione, insieme ai parametri statistici, per i 10 analiti analizzati ai tre livelli di *Quality Control* (QC1, QC2, QC3).

Tabella 13

DATI															
	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3
	5-FU			CP			IF			GEM			EPI		
	ng assoluti														
1	29,955	204,366	418,538	2,667	21,939	41,317	2,601	17,569	42,648	2,806	21,302	39,419	11,963	70,438	161,999
2	27,164	200,789	395,312	3,081	20,619	40,615	2,676	20,869	39,497	2,701	19,407	43,912	10,081	83,798	149,046
3	24,903	197,688	415,769	3,020	20,320	40,670	2,591	20,322	34,237	3,167	22,989	38,540	13,613	86,776	162,509
4	33,830	228,060	457,758	3,133	18,114	38,213	3,132	17,727	38,107	2,814	19,309	44,169	13,679	82,683	162,109
5	33,767	212,761	420,820	2,997	18,631	38,332	3,062	19,363	38,174	3,290	19,695	39,470	12,249	80,628	156,110
6	31,444	220,241	412,283	2,766	19,544	38,249	3,292	17,910	40,927	2,646	21,007	43,954	13,450	74,630	158,340
7	32,184	210,105	429,911	2,492	22,340	41,810	3,300	17,213	36,501	2,614	20,717	40,726	12,410	77,240	153,017
8	29,544	206,658	398,964	2,520	22,349	42,893	2,635	17,290	37,381	2,856	21,519	39,408	11,734	70,115	150,157
9	30,688	220,892	427,161	2,994	21,772	36,575	3,042	20,129	37,001	3,109	20,720	34,638	13,059	74,591	142,640
valore nominale ng	30	200	400	3	20	40	3	20	40	3	20	40	12	80	160
STATISTICHE															
Numero dati	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Media (Xm)	30,387	211,284	419,613	2,852	20,625	39,853	2,926	18,710	38,275	2,889	20,741	40,471	12,471	77,878	155,103
Varianza (sr2)	8,634	102,724	338,259	0,060	2,562	4,348	0,089	2,108	6,196	0,059	1,371	9,838	1,329	35,281	47,979
Scarto tipo (sr)	2,938	10,135	18,392	0,245	1,601	2,085	0,299	1,452	2,489	0,243	1,171	3,137	1,153	5,940	6,927
Coeff.variaz. percentuale (CVr %):	9,670	4,797	4,383	8,606	7,761	5,232	10,210	7,760	6,503	8,394	5,646	7,750	9,245	7,627	4,466
Accuracy %	101,289	105,642	104,903	95,074	103,126	99,632	97,520	93,551	95,687	96,305	103,703	101,176	103,924	97,347	96,939
Minimo(Min)	24,903	197,688	395,312	2,492	18,114	36,575	2,591	17,213	34,237	2,614	19,309	34,638	10,081	70,115	142,640
Massimo (Max)	33,830	228,060	457,758	3,133	22,349	42,893	3,300	20,869	42,648	3,290	22,989	44,169	13,679	86,776	162,509
Intervallo	8,926	30,372	62,446	0,641	4,235	6,318	0,710	3,657	8,411	0,676	3,681	9,531	3,598	16,661	19,870
Mediana	30,688	210,105	418,538	2,994	20,619	40,615	3,042	17,910	38,107	2,814	20,720	39,470	12,410	77,240	156,110

Tabella 13: Accuratezza e Precisione (QCs) per 5 Analiti (5-FU, CP, IF, GEM, EPI)

Tabella 14

DATI															
	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3
	DOXO			MTX			ETO			DOCE			PTX		
	ng assoluti														
1	9.602	82.011	158.858	26.750	159.754	423.655	12.469	79.289	172.483	29.477	211.284	411.078	25.276	191.677	419.685
2	12.981	77.899	151.508	31.430	197.404	350.984	13.704	87.056	156.308	31.294	211.407	448.738	26.415	202.585	418.764
3	12.321	78.812	149.075	25.751	212.181	359.375	13.330	86.704	162.939	31.259	212.915	411.516	24.049	204.427	430.054
4	11.265	81.000	158.857	32.126	163.987	407.173	11.711	86.576	163.774	26.254	193.084	403.018	27.883	201.708	399.131
5	11.461	73.839	165.438	30.319	172.648	401.211	12.745	81.684	149.825	29.396	199.998	369.039	27.427	193.016	410.584
6	11.607	78.769	171.582	28.661	154.665	374.658	11.590	81.683	164.033	30.825	188.015	418.310	28.483	190.137	388.460
7	13.440	76.540	149.627	26.092	205.959	397.323	12.011	79.864	147.343	31.012	209.539	409.350	30.766	195.922	406.440
8	13.522	75.313	164.154	26.181	204.313	429.401	10.224	75.780	150.088	30.225	201.963	409.516	34.610	204.985	404.465
9	12.248	79.443	152.746	31.124	206.272	364.955	11.497	66.781	145.959	28.525	213.402	430.322	32.553	199.696	421.095
valore nominale (ng)	12	80	160	30	200	400	12	80	160	30	200	400	30	200	400
STATISTICHE															
Numero dati	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Media (Xm)	12.050	78.181	157.983	28.715	186.354	389.859	12.142	80.602	156.972	29.807	204.623	412.321	28.607	198.239	410.964
Varianza (sr2)	1.529	6.850	62.331	6.667	536.576	810.240	1.115	41.681	85.657	2.691	87.226	458.106	11.860	32.273	164.158
Scarto tipo (sr)	1.236	2.617	7.895	2.582	23.164	28.465	1.056	6.456	9.255	1.640	9.339	21.403	3.444	5.681	12.812
Coeff.variaz. percentuale (CVr %) :	10.262	3.348	4.997	8.992	12.430	7.301	8.698	8.010	5.896	5.503	4.564	5.191	12.038	2.866	3.118
Accuracy %	100.414	97.726	98.739	95.716	93.177	97.465	101.187	100.752	98.108	99.358	102.311	103.080	95.356	99.120	102.74
Minimo (Min)	9.602	73.839	149.075	25.751	154.665	350.984	10.224	66.781	145.959	26.254	188.015	369.039	24.049	190.137	388.460
Massimo (Max)	13.522	82.011	171.582	32.126	212.181	429.401	13.704	87.056	172.483	31.294	213.402	448.738	34.610	204.985	430.054
Intervallo	3.920	8.172	22.507	6.374	57.516	78.417	3.480	20.275	26.525	5.040	25.387	79.699	10.561	14.848	41.594
Mediana	12.248	78.769	158.857	28.661	197.404	397.323	12.011	81.683	156.308	30.225	209.539	411.078	27.883	199.696	410.584

Tabella 14: Accuratezza e Precisione (QCs) per 5 Analiti (DOXO, MTX, ETO, DOCE, PTX)

11.10. Recupero Analitico: efficienza globale del metodo

È stato calcolato il recupero per ciascun analita tramite la valutazione dell'efficienza globale del metodo *Process Efficiency* (PE), confrontando i dati del set A con quelli del Set C, poiché dalla letteratura si evince che l'effetto matrice è trascurabile (40).

È stato calcolato sul **LOQ** e sui **tre livelli di Quality control (QC1, QC2, QC3)**.

Il *Process Efficiency* (PE) considera sia gli effetti della matrice (*Matrix Effect, ME*) sia l'efficacia dell'estrazione (*Recovery, RE*) e viene calcolato con la seguente formula, derivata da due equazioni (42) :

$$\text{Eq 1: ME (\%)} = \frac{B}{A} * 100$$

$$\text{Eq 2: RE (\%)} = \frac{\text{integration ratio di } \frac{\text{analita}}{\text{ISTD}} \text{ set C}}{\text{integration ratio di } \frac{\text{analita}}{\text{ISTD}} \text{ set B}} * 100$$

Dalle equazioni 1 e 2, Il Process Efficiency si calcola come:

$$\text{PE (\%)} = \frac{C}{A} * 100 = \frac{ME * RE}{100}$$

Dove:

- A è l'area del picco dell'analita nel set A
- B è l'area del picco dell'analita nel set B
- C è l'area del picco dell'analita nel set C
- ISTD è lo standard interno
- ME (*Matrix Effect*) valuta come la matrice influisce sulla risposta dello strumento (*ion suppression* o *enhancement*)
- RE (*recovery*) misura l'efficacia dell'estrazione

Dai risultati emerge che, per il **LOQ**, la maggior parte degli analiti mostra un buon recupero (92%-119%), ad eccezione di Epirubicina-Doxorubicina (55%), Paclitaxel (56%) e Docetaxel (68%), che presentano una bassa resa estrattiva.

Per il **QC1**, la maggior parte degli analiti mostra un recupero soddisfacente. Tuttavia, Epirubicina-Doxorubicina (45%) e Paclitaxel (50%) presentano valori significativamente inferiori, suggerendo una bassa resa estrattiva. Anche il Metotrexato (77%) mostra un'efficienza inferiore rispetto agli altri analiti, indicando una possibile variabilità nel recupero.

Per il **QC2**, la maggior parte degli analiti mostra un recupero soddisfacente. Tuttavia, Epirubicina-Doxorubicina (54%) e Paclitaxel (75%) presentano valori inferiori rispetto agli altri, suggerendo una resa estrattiva non ottimale.

Per il **QC3**, la maggior parte degli analiti mostra un buon recupero. Tuttavia, Epirubicina-Doxorubicina (56%), Paclitaxel (77%) e Docetaxel (79%) presentano valori inferiori rispetto agli altri, suggerendo una resa estrattiva meno efficiente.

I risultati di epirubicina e doxorubicina sono riportati insieme in quanto strutturalmente simili e possono interconvertirsi, rendendo difficile una quantificazione separata.

La figura 19 sottostante riporta i risultati di recupero analitico appena descritti.

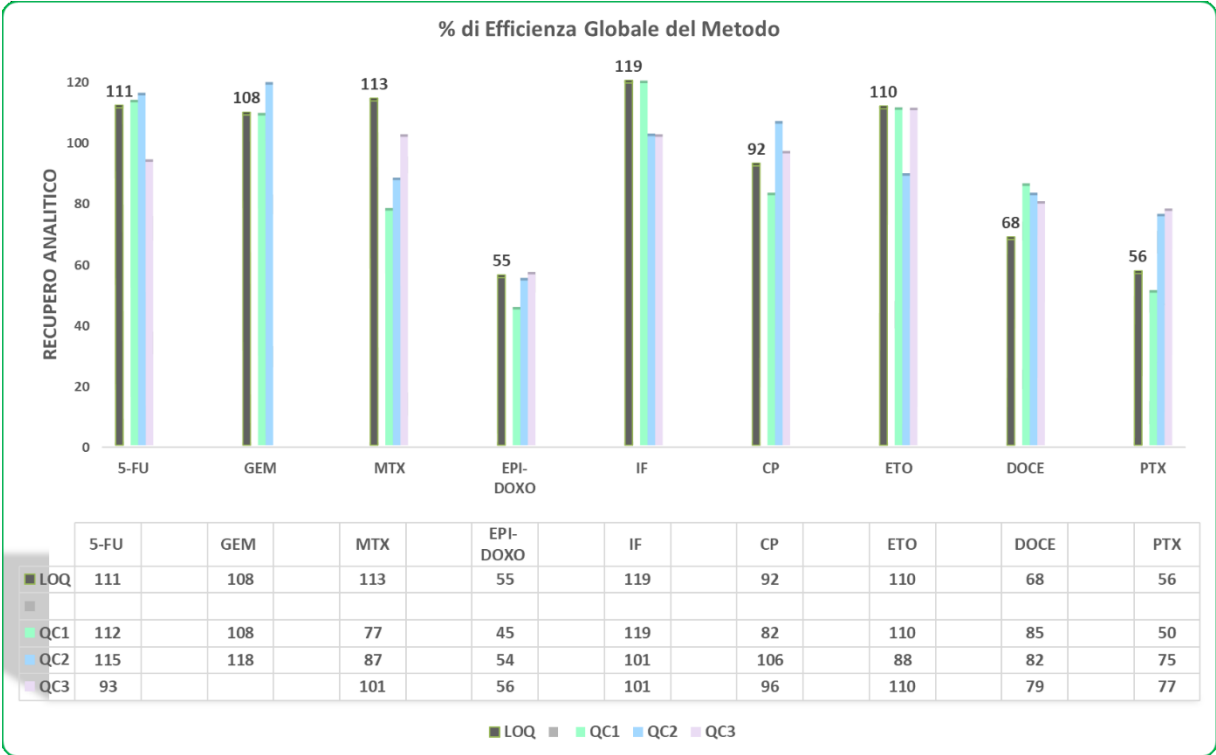


Figura 19: percentuale di Recupero per i 10 Analiti

11.11. Ottimizzazione del pH delle fasi mobili e del gradiente cromatografico in UHPLC

La colonna utilizzata è una **ACQUITY HSS T3 UPLC 1.8 μ m** che opera in fase inversa. HSS sta per "High Strength Silica", indicando che la colonna è realizzata con silice ad alta resistenza. T3 si riferisce alla fase stazionaria della colonna, che è modificata con gruppi C18 (ottadecilsilano) per migliorare la ritenzione e la separazione dei composti polari e non polari. **1.8 μ m** indica la dimensione delle particelle della fase stazionaria all'interno della colonna. Le dimensioni fisiche della colonna sono: un **diametro interno di 2.1 mm** e una **lunghezza di 100 mm**. La fase mobile è composta da due soluzioni: la fase A consiste in **acido formico 0.01% 5 mM pH 4**, mentre la fase B è **CH₃CN**.

Come è stato descritto in paragrafo 9.2, si definisce come regola base che la fase mobile dovrebbe essere tamponata in un intervallo di pH definito da ± 2 rispetto al pKa dell'analita. Nel nostro studio essendo 10 gli analiti target con valori di pKa molto differenti tra loro si è deciso di ottimizzare il pH della soluzione acquosa della fase mobile a pH 4.0, in quanto il pKa ± 2 per ogni analita è approssimativamente incluso nell'intervallo di pH 4 e 6, ad eccezione di paclitaxel e docetaxel. Tuttavia, per questi due composti la risposta in MRM è stata sempre riproducibile, pertanto non si è ulteriormente ottimizzata la scelta della fase mobile durante questa prima fase di sviluppo metodo. Si prevede, tuttavia, un ulteriore studio in futuro utilizzando tampone formiato stabilizzato a pH 5.5-6, sempre per le discusse difficoltà analitiche del 5-fluorouracile, che, essendo polare, ionizza in ambiente acquoso.

La tabella 15 sottostante descrive le condizioni di scansione per il metodo analitico utilizzato, con *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) in modalità ESI+. Si osserva che viene applicato un gradiente stabile di energia di collisione, che ottimizza la frammentazione degli ioni, garantendo una rilevazione accurata dei vari analiti.

Tabella 15

Index	Start Time (min)	Scan Type	Ion Mode	Div Valve	Delta EMV (-)	Store	Delta EMV (+)
1	0.0	MRM	ESI+Agilent Jet Stream	To MS	100.0	Yes	
2	2.8	MRM	ESI+Agilent Jet Stream	To MS		Yes	100.0
3	10.5	MRM	ESI+Agilent Jet Stream	To MS		Yes	100.0
4	14.0	MRM	ESI+Agilent Jet Stream	To Waste		No	0.0

Tabella 15: Condizioni di scansione per il metodo MRM in modalità ESI+

La tabella 16 sottostante presenta il gradiente ottimale utilizzato per ottenere la migliore separazione cromatografica dei 10 analiti riportati nella figura 21. Il gradiente parte con il 100% di fase A (acquosa) e 0% di fase B (organica, CH₃CN), e viene gradualmente modificato fino a 17 min. Al termine (18 min), la fase mobile iniziale viene ripristinata per la successiva iniezione.

Tabella 16

	Time (min)	A (%)	B (%)
1	2.00 min	100.00 %	0.00 %
2	11.00 min	30.00 %	70.00 %
3	14.00 min	10.00 %	90.00 %
4	17.00 min	10.00 %	90.00 %
5	17.10 min	90.00 %	10.00 %
6	18.00 min	90.00 %	10.00 %

Tabella 16: Gradiente cromatografico per la separazione dei 10 analiti

11.12. Studio e ottimizzazione della soluzione di desorbimento per l'estrazione degli analiti dalla matrice:

Analogamente allo studio condotto per ottimizzare la formulazione della *wiping solution*, la soluzione di desorbimento rappresenta il secondo passaggio cruciale per garantire un'estrazione quantitativa dei 10 chemioterapici antitumorali studiati.

- Il 5-fluorouracile, altamente polare, si dissolve in acqua (40)
- I taxani (come paclitaxel e docetaxel), altamente lipofili, presentano una scarsa solubilità in acqua. La loro solubilizzazione avviene preferibilmente in presenza di solventi organici, come CH₃CN. Inoltre, con l'ausilio di un pH moderatamente acido (3-5) viene garantita la stabilità chimica (44,45).
- Le antracicline (doxorubicina ed epirubicina), caratterizzate da proprietà idrofobe e idrofile (46), richiedono miscele di solventi a diverso grado di polarità per facilitare la loro estrazione / desorbimento dal wipe.

Durante il nostro studio, sono state testate diverse combinazioni di buffer e solventi organici (**prova 1**, **prova 2**, **prova 3**), riportate nella figura n°20. Le principali condizioni valutate includevano:

- Soluzioni tampone composte da una soluzione acida di acido formico (HCOOH) a concentrazione scalare, da 0.1% a 0.01%, in miscela con una soluzione di ammonio formiato a concentrazioni diverse (da 5 mM a 2,65 mM);
- Solventi organici, come l'isopropanolo (IPA) e l'acetonitrile (CH₃CN) in combinazione con i buffer acquosi.

Le combinazioni testate hanno fornito soluzioni con valori di pH inclusi tra 3,5 e 4,5.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la **prova 1** è risultata la più efficace, permettendo un'estrazione quantitativa superiore rispetto alle altre condizioni testate. Di conseguenza, la formulazione scelta per la soluzione di desorbimento, d'ora in poi indicata con il nome generico DES (*Desorption Solution*), è caratterizzata da un pH 3,5 ed è stata preparata utilizzando il seguente tampone:

- 100 µL di HCOOH in 1 L di H₂O (0,01%);
- 0,3 g di HCOONH₄ in 1 L di H₂O (5 mM).

Miscelato con CH₃CN (95:5, v/v).

Questa formulazione è stata selezionata in quanto ha garantito una migliore solubilità per i composti più polari, come il 5-fluorouracile.

I risultati dettagliati delle tre prove sperimentali e l’efficacia della soluzione ottimizzata sono riportati nella Figura sottostante 20, che mostra le percentuali di recupero ottenute per ciascun chemioterapico in funzione della formulazione utilizzata. I risultati di epirubicina e doxorubicina sono riportati insieme in quanto strutturalmente simili e possono interconvertirsi, rendendo difficile una quantificazione separata.

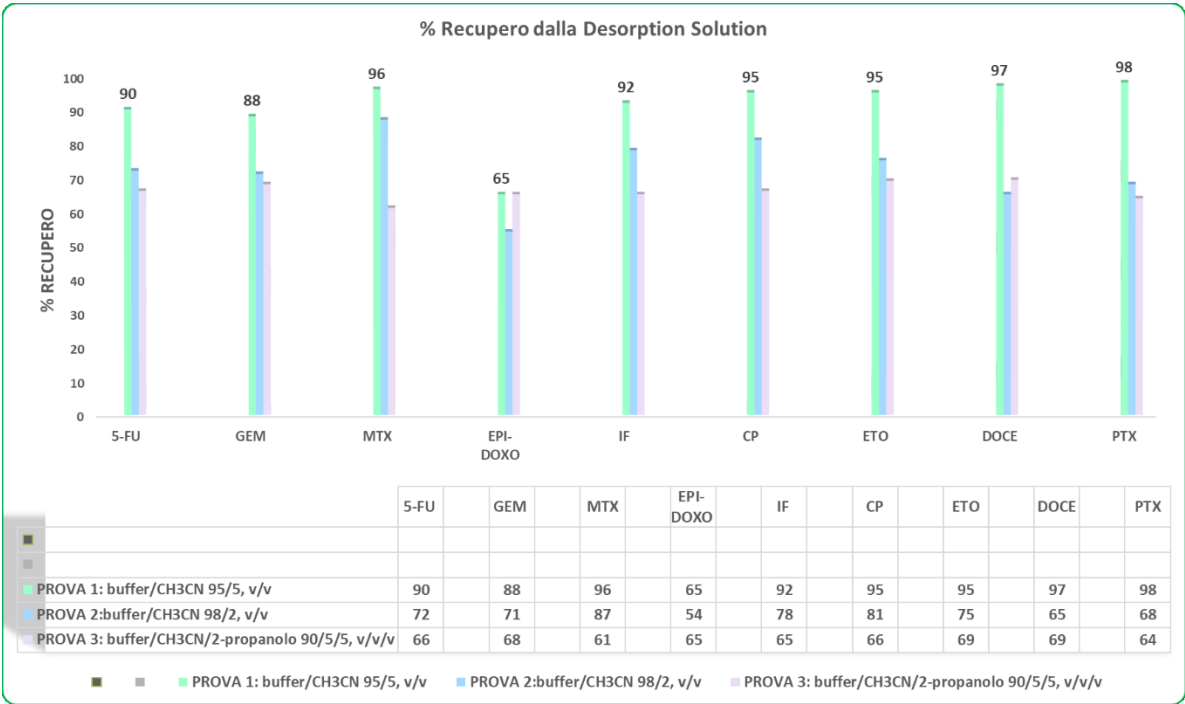
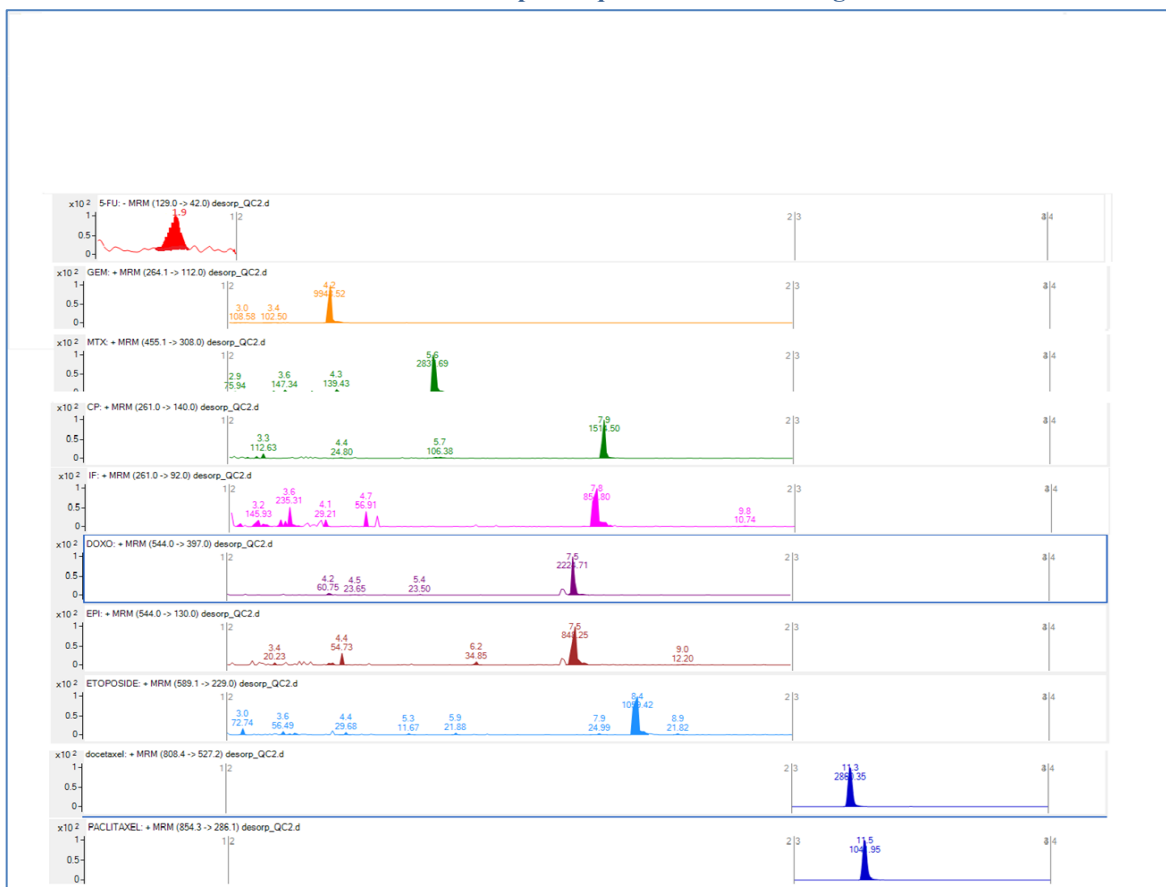


Figura 20: Percentuale di Recupero dalla “Desorption Solution” per i 10 Analiti

12. Profili Cromatografici del QC2 per i 10 Analiti e i 3 Standard Interni

Nella figura 21 sottostante, sono riportati i profili MRM-UHPLC-MS/MS dei 10 analiti e dei 3 standard interni per la quantificazione in singola analisi.

Profili MRM-UHPLC-MS/MS di 10 analiti per la quantificazione in singola analisi



Profili MRM-UHPLC-MS/MS di 3 standard interni utilizzati per la quantificazione in singola analisi

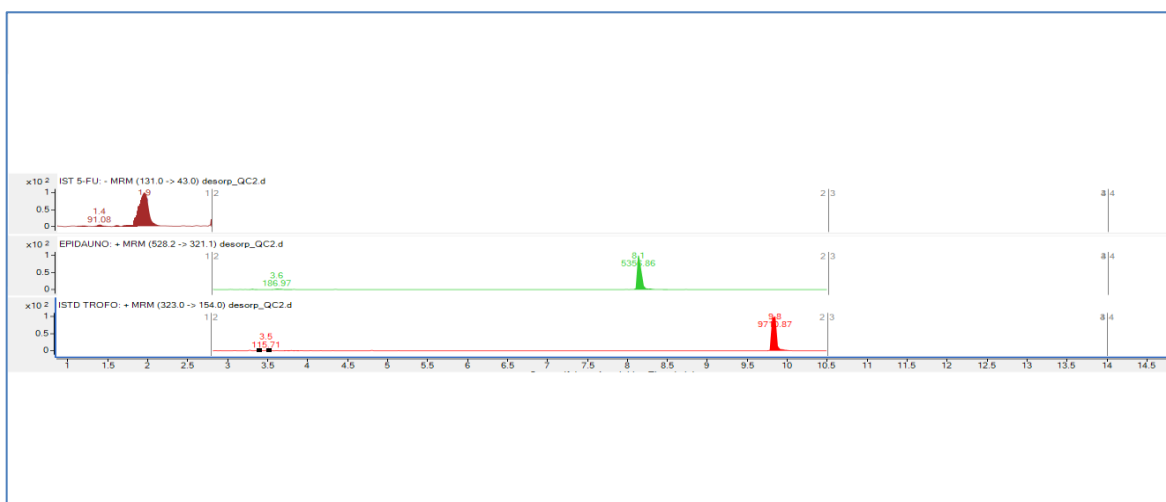


Figura 21: Profili MRM-UHPLC-MS/MS dei 10 analiti e dei 3 standard interni per la quantificazione in singola analisi

13. Applicazione del metodo analitico a campioni reali in un ospedale del Nord Italia

Il metodo sviluppato e validato durante questo studio è stato applicato a 25 campioni reali prelevati in un ospedale del Nord Italia. Ogni campione è stato analizzato per quantificare la presenza di 10 chemioterapici antitumorali, ottenendo valori di concentrazione finale espressi in ng assoluti.

Si osservano concentrazioni elevate di **5-Fluorouracile, ifosfamide e paclitaxel**, con valori massimi rispettivamente di **833,1 ng, 45,41 ng e 78,32 ng**, indicando un'elevata contaminazione di questi farmaci durante le operazioni di manipolazione. **Il metotrexato non è stato rilevato**, poiché non è stato manipolato durante il periodo di campionamento. Inoltre, i risultati di **epirubicina e doxorubicina** sono riportati insieme in quanto strutturalmente simili e possono interconvertirsi, rendendo difficile una quantificazione separata. Le loro concentrazioni risultano variabili, con valori fino a **14,346 ng**.

Le superfici più contaminate includono il **pavimento antistante la cappa**, il **piano di lavoro APO** (Apoteca Chemo, un sistema robotizzato chiuso per la preparazione automatica dei campioni al fine di ridurre l'errore umano), evidenziando la necessità di maggiore attenzione e di protocolli di decontaminazione più rigorosi in queste aree.

		5-FU Results		GEM Results		MTX Results		DOXO/EP I Results		IF Results		CP Results		ETO Results		docetaxel Results		PTX Results	
Name	Posizione	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)
IIA-3990/24	piano vetro interno cappa lato sinistro	1,9	4,538	3,9	0,436	4,18	0,000	6,8	7,301	7,7	0,000	7,8	0,988	8,7	0,000	11,2	18,971	11,3	21,788
IIA-3991/24	pulsante apriporta precamera (stanza filtro)	2,1	3,725	3,9	1,551	4,18	0,000	6,8	7,811	7,7	0,000	7,6	0,000	7,9	0,000	11,2	0,000	11,5	21,609
IIA-3992/24	tavolo centrale appoggio preparazioni	1,9	2,668	4,1	0,000	4,09	0,000	7,5	14,346	7,7	0,000	7,6	0,969	8,4	0,175	10,8	18,411	11,4	0,000
IIA-3993/24	pavimento antistatiche e cappa	1,9	10,71	4,3	1,434	4,00	0,000	7,5	12,009	7,7	45,41	7,9	10,561	8,7	1,157	11,2	20,153	11,4	66,255
IIA-3994/24	maniglia armadio farmaci	1,9	5,153	4,2	0,262	3,91	0,000	8,0	8,050	7,7	2,202	7,9	0,361	8,9	0,000	11,2	18,343	11,4	23,694
IIA-3995/24	cornetta telefono fisso (sopra pellicola)	1,8	16,73	4,2	0,400	4,06	0,000	7,4	7,591	7,7	0,000	7,9	0,000	9,2	0,000	11,3	19,095	11,4	21,550
IIA-3996/24	manicotto isolatore	1,9	4,063	4,1	0,060	4,55	0,000	7,4	0,000	7,7	0,000	7,9	0,000	8,1	0,000	12,0	19,322	11,4	22,434
IIA-3997/24	tastiera citofono	1,9	2,026	4,2	0,000	4,12	0,000	7,4	8,444	7,7	0,825	7,7	0,290	8,3	0,000	11,3	0,000	11,4	21,710
IIA-3998/24	piano in acciaio di uscita cassette con i farmaci	2,0	2,185	4,1	1,888	4,06	0,000	6,9	8,662	7,9	0,544	7,9	0,000	7,8	3,839	11,0	18,708	11,4	21,702
IIA-3999/24	lettore barcode apteka	1,9	5,890	4,0	0,000	4,06	0,000	7,4	9,219	7,8	0,353	7,9	0,000	8,5	0,000	11,4	18,838	11,3	22,058
IIA-4000/24	piano vetro interno cappa lato sinistro	1,8	6,971	4,1	0,756	4,15	0,000	7,4	12,224	7,3	0,570	7,9	0,636	8,1	0,000	11,2	18,448	11,3	21,531
IIA-4001/24	pulsante apriporta precamera (stanza filtro)	1,8	0,964	4,3	0,117	4,03	0,000	7,7	8,866	7,3	0,000	7,9	0,000	8,8	0,000	11,2	18,528	11,4	21,465
IIA-4002/24	tavolo centrale appoggio preparaz	1,8	7,334	4,1	0,000	4,64	0,000	7,4	11,120	7,7	0,478	7,9	0,000	8,9	0,312	11,2	18,544	11,4	22,453

		5-FU Results		GEM Results		MTX Results		DOXO/EP I Results		IF Results		CP Results		ETO Results		docetaxel Results		PTX Results	
Name	Posizione	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)	RT	Final Conc. (ng)
IIA-4003/24	pavimentante stante cappa	1,9	10,18	4,1	0,191	4,15	0,000	7,4	12,899	7,7	38,88	7,9	20,294	8,1	0,000	11,3	18,555	11,4	78,325
IIA-4004/24	maniglia armadio farmaci	1,8	5,012	3,7	0,000	4,18	0,000	7,7	7,283	7,7	1,470	7,7	0,487	9,0	0,000	11,2	19,092	11,4	22,055
IIA-4005/24	cornetta telefono fisso (sopra pellicola)	1,9	5,908	4,1	0,288	4,06	0,000	7,4	8,256	7,8	0,265	7,7	0,000	8,3	0,000	11,2	18,518	11,5	21,928
IIA-4006/24	manicotto isolatore	1,9	5,910	4,3	0,000	4,4	0,000	7,4	0,000	7,7	0,000	7,1	0,609	8,3	12,916	11,3	18,935	11,4	22,790
IIA-4007/24	tastiera citofono	2,0	34,42	3,9	0,090	4,64	0,000	7,4	8,821	7,7	0,900	7,2	0,000	8,8	1,513	11,3	18,673	11,4	24,854
IIA-4008/24	piano in acciaio di uscita cassette con i farmaci	1,9	7,827	4,0	0,413	4,36	0,000	7,4	7,929	7,4	1,356	7,2	0,114	8,3	0,205	12,0	18,531	11,4	22,215
IIA-4009/24	lettore barcode apoteca	1,9	2,311	4,3	0,000	4,21	0,000	6,4	8,477	7,4	0,000	8,2	0,702	8,3	0,000	11,3	18,438	11,4	21,435
IIA-4010/24	piano cappa dove vengono caricati i farmaci	1,9	0,704	4,2	0,000	4,30	0,000	7,4	8,596	7,4	0,000	8,2	0,000	7,9	0,010	11,8	18,317	11,4	21,525
IIA-4011/24	piano di lavoro APO	2,0	833,1	4,1	0,000	4,18	0,000	7,4	8,678	7,4	0,629	8,6	0,126	9,2	0,318	11,2	20,092	11,4	21,421
IIA-4012/24	vetro interno APO	1,8	0,980	4,3	0,000	4,18	0,000	7,2	7,600	7,4	0,000	6,9	0,937	7,7	1,001	11,2	20,264	11,4	21,787
IIA-4013/24	maniglia apertura APO	1,8	5,296	4,1	0,141	4,12	0,000	7,4	10,871	7,4	0,408	7,9	0,000	8,2	0,000	11,2	18,823	11,4	23,437
IIA-4014/24	banco di lavoro dove appoggiano le terapie	1,9	2,194	3,8	1,573	3,88	0,000	7,4	12,460	7,7	0,511	7,9	1,603	8,1	0,000	11,2	18,749	11,4	22,442

TABELLA 17: Risultati analitici dei 25 campioni reali in diverse posizioni di campionamento

14. Conclusione

Il presente studio di tesi ha affrontato il tema del monitoraggio ambientale per la determinazione in traccia di 10 principi attivi di antitumorali (5-fluorouracile, metotrexato, gemcitabina, doxorubicina, epirubicina, ifosfamide, ciclofosfamide, etoposide, paclitaxel, e docetaxel) presenti sulle superfici in ambiente di lavoro, quale può essere la farmacia ospedaliera e l'area di somministrazione.

Il monitoraggio ambientale si articola in differenti fasi, in quanto la miscela di 10 principi attivi è composta da sostanze con caratteristiche chimico-fisiche estremamente differenti. È stata ottimizzata la strategia di campionamento per massimizzare la raccolta dei principi attivi di CA dalle superfici e la soluzione di desorbimento per la loro estrazione dalla matrice wipe.

I 10 farmaci antitumorali e i 3 standard interni sono stati caratterizzati in spettrometria di massa a triplo quadrupolo. Sono stati ottimizzati i parametri strumentali della spettrometria di massa, i parametri della sorgente ESI e sono state scelte le transizioni m/z dei singoli analiti per la loro quantificazione in *multiple ion monitoring* (MRM). Inoltre, sono stati ottenuti gli spettri di massa-massa per ciascun analita.

Per la validazione del metodo analitico, in accordo con le linee guida ICH, è stata valutata la linearità: sono state preparate le curve di calibrazione in solvente (set A) e in matrice wipe (set C), seguendo la procedura descritta. Sono stati determinati il LOD, il LOQ, la precisione, l'accuratezza e il recupero per ciascun analita.

I valori di LOD e LOQ ottenuti, espressi in nanogrammi assoluti, sono soddisfacenti e variano rispettivamente da 0,09 a 2,05 ng (LOD) e da 0,28 a 6,21 ng (LOQ). I valori più bassi sono stati ottenuti per la ciclofosfamide (0,09 ng e 0,28 ng).

Per quanto riguarda l'accuratezza e la precisione sul LOQ, tutti gli analiti rientrano nei limiti di accettabilità (accuratezza tra 80%-120% e $CV \leq 15\%$), ad eccezione della Gemcitabina. È stato determinato sperimentalmente che l'intervallo di linearità per la gemcitabina si colloca in un range meno ampio rispetto agli altri analiti. In letteratura (40) è stato osservato che, per la gemcitabina, la miglior interpolazione su un intervallo più ampio (1-60 ng) si ottiene con una curva di tipo parabolico, descritta da un polinomio di secondo grado. Per i tre livelli di *Quality*

control (QC1, QC2, QC3), tutti gli analiti confermano una buona accuratezza e una buona precisione, rientrando nei limiti di accettabilità.

È stato calcolato il recupero per ciascun analita tramite la valutazione dell'efficienza globale del metodo *Process Efficiency* (PE), poiché dalla letteratura si evince che l'effetto matrice è trascurabile (40)

La maggior parte degli analiti mostra un buon recupero (80-90%), ad eccezione di Epirubicina-Doxorubicina, Paclitaxel e Docetaxel che presentano una resa estrattiva meno efficiente (50-60%)

Per la cromatografia, la colonna più adatta alla diversità chimico-fisica degli analiti è risultata essere la ACQUITY HSS T3 UPLC 1.8 μm . È stato studiato il gradiente cromatografico per garantire una buona separazione. I profili cromatografici ottenuti evidenziano l'elevata capacità risolutiva della colonna UPLC scelta.

È stata decisa la composizione della fase mobile cromatografica, tenendo conto del pKa dei vari analiti. Si prevede, tuttavia, un ulteriore studio in futuro utilizzando tampone formiato stabilizzato a pH 5.5-6, sempre per le discusse difficoltà analitiche del 5-fluorouracile, che, essendo polare, ionizza in ambiente acquoso.

15. Bibliografia

1. Liu B, Ezeogu L, Zellmer L, Yu B, Xu N, Joshua Liao D. Protecting the normal in order to better kill the cancer. *Cancer Med.* settembre 2015;4(9):1394–403.
2. Galmarini D, Galmarini CM, Galmarini FC. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 novembre 2012;84(2):181–99.
3. Cancer Today [Internet]. [citato 4 febbraio 2025]. Disponibile su: <https://gco.iarc.who.int/today/>
4. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death [Internet]. 2024 [citato 6 febbraio 2025]. Disponibile su: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
5. Liu J, Pandya P, Afshar S. Therapeutic Advances in Oncology. *Int J Mol Sci.* gennaio 2021;22(4):2008.
6. McDonnell, PharmD, Bcop AM. Cancer Network. 2016 [citato 6 febbraio 2025]. Chemotherapeutic Agents and Their Uses, Dosages, and Toxicities. Disponibile su: <https://www.cancernetwork.com/view/chemotherapeutic-agents-and-their-uses-dosages-and-toxicities>
7. Plana D, Palmer AC, Sorger PK. Independent Drug Action in Combination Therapy: Implications for Precision Oncology. *Cancer Discov.* 1 marzo 2022;12(3):606–24.
8. Behl A, Wani ZA, Das NN, Parmar VS, Len C, Malhotra S, et al. Monoclonal antibodies in breast cancer: A critical appraisal. *Crit Rev Oncol Hematol.* marzo 2023;183:103915.
9. L'uso dei farmaci in Italia - Rapporto OsMed 2022 [Internet]. [citato 6 febbraio 2025]. Disponibile su: <https://www.aifa.gov.it/-/l-uso-dei-farmaci-in-italia-rapporto-osmed-2022>
10. Shanaah HH, Allangawi A, ALZaimoor EFH, Mohammed HA, Khan E, Khan GS. Recent advancements in the chemical sensing of anticancer alkylating agents. *Chem Pap.* novembre 2024;78(17):8941–64.
11. Ralhan R, Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin Ther Pat.* settembre 2007;17(9):1061–75.
12. Dabbish E, Scoditti S, Shehata MNI, Ritacco I, Ibrahim MAA, Shoeib T, et al. Insights on cyclophosphamide metabolism and anticancer mechanism of action: A computational study. *J Comput Chem.* 15 aprile 2024;45(10):663–70.
13. Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Al-Salami H, et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol Biol Rep.* giugno 2020;47(6):4699–708.
14. Visentin M, Zhao R, Goldman ID. The Antifolates. *Hematol Oncol Clin North Am.* giugno 2012;26(3):629–48.

15. Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *The Oncologist*. 1 dicembre 2016;21(12):1471–82.
16. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. maggio 2003;3(5):330–8.
17. Eng C, Chang GJ, Nancy You Y, Das P, Rodriguez-Bigas M, Xing Y, et al. The role of systemic chemotherapy and multidisciplinary management in improving the overall survival of patients with metastatic squamous cell carcinoma of the anal canal. *Oncotarget*. 30 novembre 2014;5(22):11133–42.
18. Valle JW, Borbath I, Khan SA, Huguet F, Gruenberger T, Arnold D. Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. settembre 2016;27:v28–37.
19. Liu Y, Fu H, Zuo L. Synergistic Cytotoxicity Effect of 5-Fluorouracil and SHP2 Inhibitor Demethylcisterol A3 on Cervical Cancer Cell. *Anticancer Agents Med Chem*. aprile 2022;22(7):1313–9.
20. Obermannová R, Alsina M, Cervantes A, Leong T, Lordick F, Nilsson M, et al. Oesophageal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. ottobre 2022;33(10):992–1004.
21. Chen YP, Ismaila N, Chua MLK, Colevas AD, Haddad R, Huang SH, et al. Chemotherapy in Combination With Radiotherapy for Definitive-Intent Treatment of Stage II-IVA Nasopharyngeal Carcinoma: CSCO and ASCO Guideline. *J Clin Oncol*. 1 marzo 2021;39(7):840–59.
22. Chang SS, Bochner BH, Chou R, Dreicer R, Kamat AM, Lerner SP, et al. Treatment of Nonmetastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: American Urological Association/American Society of Clinical Oncology/American Society for Radiation Oncology/Society of Urologic Oncology Clinical Practice Guideline Summary. *J Oncol Pract*. settembre 2017;13(9):621–5.
23. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther*. febbraio 2020;206:107447.
24. Kadoyama K, Miki I, Tamura T, Brown J, Sakaeda T, Okuno Y. Adverse Event Profiles of 5-Fluorouracil and Capecitabine: Data Mining of the Public Version of the FDA Adverse Event Reporting System, AERS, and Reproducibility of Clinical Observations. *Int J Med Sci*. 2012;9(1):33–9.
25. Sara JD, Kaur J, Khodadadi R, Rehman M, Lobo R, Chakrabarti S, et al. 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. *Ther Adv Med Oncol*. 1 gennaio 2018;10:1758835918780140.
26. Yi HJ, Hong KS, Moon N, Chung SS, Lee RA, Kim KH. Acute hyperammonemic encephalopathy after 5-fluorouracil based chemotherapy. *Ann Surg Treat Res*. 2016;90(3):179.

27. Jose N, Joel A, Selvakumar RJ, Ramireddy J, John AO, Georgy JT, et al. Diagnosis and management of 5-fluorouracil (5-FU)-induced acute leukoencephalopathy: lessons learnt from a single-Centre case series. *J Egypt Natl Cancer Inst.* dicembre 2022;34(1):22.
28. Prince GT, Cameron MC, Fathi R, Alkousakis T. Topical 5-fluorouracil in dermatologic disease. *Int J Dermatol.* ottobre 2018;57(10):1259–64.
29. Tsao AS, Papadimitrakopoulou V. Mitotic Inhibitors. *J Thorac Oncol.* novembre 2011;6(11):S1789–90.
30. Yakkala PA, Penumallu NR, Shafi S, Kamal A. Prospects of Topoisomerase Inhibitors as Promising Anti-Cancer Agents. *Pharmaceuticals.* 13 ottobre 2023;16(10):1456.
31. Mastrangelo S, Attina G, Triarico S, Romano A, Maurizi P, Ruggiero A. The DNA-topoisomerase Inhibitors in Cancer Therapy. *Biomed Pharmacol J.* 30 giugno 2022;15(2):553–62.
32. Wang XQ, Wang W, Peng M, Zhang XZ. Free radicals for cancer theranostics. *Biomaterials.* gennaio 2021;266:120474.
33. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, et al. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells.* 19 febbraio 2023;12(4):659.
34. Tuzimski T, Petruczynik A. Review of Chromatographic Methods Coupled with Modern Detection Techniques Applied in the Therapeutic Drugs Monitoring (TDM). *Molecules.* 3 settembre 2020;25(17):4026.
35. Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta.* ottobre 2011;85(5):2265–89.
36. Rathod RH, Chaudhari SR, Patil AS, Shirkhedkar AA. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future J Pharm Sci.* dicembre 2019;5(1):6.
37. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA) [Internet]. 2024 [citato 6 febbraio 2025]. Disponibile su: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
38. Guichard N, Boccard J, Rudaz S, Bonnabry P, Fleury Souverain S. Wipe-sampling procedure optimisation for the determination of 23 antineoplastic drugs used in the hospital pharmacy. *Eur J Hosp Pharm.* marzo 2021;28(2):94–9.
39. Dugheri S, Bonari A, Pompilio I, Boccalon P, Mucci N, Arcangeli G. A new approach to assessing occupational exposure to antineoplastic drugs in hospital environments. *Arch Ind Hyg Toxicol.* 1 settembre 2018;69(3):226–37.
40. Fleury-Souverain S, Maurin J, Guillarme D, Rudaz S, Bonnabry P. Development and application of a liquid chromatography coupled to mass spectrometry method for the

- simultaneous determination of 23 antineoplastic drugs at trace levels. *J Pharm Biomed Anal.* novembre 2022;221:115034.
41. Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 15 gennaio 2004;18(1):49–58.
 42. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem.* 1 luglio 2003;75(13):3019–30.
 43. Pretty JR, Connor TH, Spasojevic I, Kurtz KS, McLaurin JL, B’Hymer C, et al. Sampling and mass spectrometric analytical methods for five antineoplastic drugs in the healthcare environment. *J Oncol Pharm Pract.* marzo 2012;18(1):23–36.
 44. Joerger M. Treatment regimens of classical and newer taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol.* febbraio 2016;77(2):221–33.
 45. Sadeghi-Oroumih A, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Determination of Paclitaxel Solubility and Stability in the Presence of Injectable Excipients. *Pharm Chem J.* dicembre 2021;55(9):983–7.
 46. Mattioli R, Ilari A, Colotti B, Mosca L, Fazi F, Colotti G. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med.* ottobre 2023;93:101205.