

Ποσοτικός προσδιορισμός δοξορουβικίνης σε ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού

Quantitative determination of doxorubicin in the serum of breast cancer patients

Χαράλαμπος Αντωνάκας
Μεταπτυχιακός φοιτητής
ΠΜΣ Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
harisantonakas13@gmail.com

Νικόλαος Δόγκας
Υποψήφιος Διδάκτορας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ndogkas@uniwa.gr

Πέτρος Καρκαλούσος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
petef@uniwa.gr

Μαρία Τράπαλη
Λέκτορας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
ymania@uniwa.gr

Εγκρίθηκε τον Ιούνιο του 2025

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η δοξορουβικίνη αποτελεί για πολλά χρόνια φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση ενός μεγάλο εύρους κακοηθειών, όπως του καρκίνου του μαστού, που επηρεάζει εκατομμύρια γυναίκες ετησίως. Η αποτελεσματικότητα της δοξορουβικίνης έναντι του καρκίνου του μαστού περιορίζεται σημαντικά από την εμφάνιση απειλητικής για τη ζωή καρδιοτοξικότητας, που εξαρτάται από τη δόση του φαρμάκου. Για τον προσδιορισμό αυτής της σοβαρής παρενέργειας, είναι απαραίτητη η κατανόηση του μηχανισμού δράσης και του προσδιορισμού της συγκέντρωσής της στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς. Αυτή η απαίτηση μπορεί να ικανοποιηθεί με τη μέθοδο Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS).

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ: Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος LC-MS σε δείγματα έξι ασθενών με καρκίνο του μαστού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η δοξορουβικίνη ανιχνεύτηκε και ποσοτικοποιήθηκε στον ορό των ασθενών, με τιμές υψηλότερες από τις τιμές της βιβλιογραφίας. Η ευαισθησία της μεθόδου δεν ήταν επαρκής για την ανίχνευσή της σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα του φαρμάκου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ: Παρόλο που η μέθοδος LC-MS μονού τετραπόλου δε διαθέτει την απαραίτητη ευαισθησία για να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει αξιόπιστα τη συγκέντρωση δοξορουβικίνης στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού, αποτελεί φτηνή και αξιόπιστη μέθοδο σε εφαρμογές όπου η μέθοδος συγκέντρωσης των δειγμάτων είναι μεγαλύτερη, όπως στα

σκευάσματα φαρμακοβιομηχανίας, αλλά και στον προσδιορισμό άλλων μορίων σε βιολογικά υγρά με υψηλή συγκέντρωση.

Λέξεις κλειδιά: Δοξορουβικίνη, Καρκίνος του μαστού, Καρδιοτοξικότητα, Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας

SUMMARY

INTRODUCTION: Doxorubicin has been the drug of choice for many years in the treatment of a wide range of malignancies, such as breast cancer, which affects millions of women each year. The efficacy of doxorubicin against breast cancer is significantly limited by the occurrence of life-threatening cardiotoxicity that is dose-dependent. To limit this serious side effect, it is necessary to understand the mechanism of action as well as its concentration in biological fluids and tissues. This requirement can be met with the Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) method.

MATERIAL-METHOD: The LC-MS method was used in samples of 6 patients with breast cancer.

RESULTS: Doxorubicin was detected and quantified in the patients' serum, with values higher than those in the literature. The sensitivity of the method was not sufficient for the detection of DOX in patients with low levels of the drug.

DISCUSSION: Although the simple LC-MS method does not have the necessary sensitivity to reliably detect and quantify the concentration of Doxorubicin in the serum of breast cancer patients, it is a cheap and reliable method in applications where the average concentration of the samples is higher, such as in

Antonakas C, Dogkas N, Karkalousos P, Trapali M. Quantitative Determination of doxorubicin in the serum of breast cancer patients. J Med Sci, 2025; Jul (3):20-24

pharmaceutical formulations, but also in the determination of other molecules in biological fluids with high concentration.

Key words: Doxorubicin, Breast cancer, LC-MS, Liquid Chromatography, Mass spectrometry

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δεκαετία του 50 αποτέλεσε μια σημαντική χρονική περίοδο για την ανακάλυψη αντικαρκινικών ουσιών από μικροοργανισμούς. Από το μύκητα του είδους *Streptomyces peucetius* απομονώθηκε ένα αντιβιοτικό που εμφάνιζε δράση έναντι σε όγκους ποντικών, η δαουνορουμικίνη (1). Χρησιμοποιήθηκε αποτελεσματικά στην οξεία λευχαιμία και το λέμφωμα (2), όμως μέχρι το 1967 αναγνωρίστηκε ότι η ουσία αυτή μπορούσε να προκαλέσει θανατηφόρο καρδιακή τοξικότητα. Ακολούθησαν γενετικές τροποποιήσεις του μύκητα και κατά συνέπεια της παραγόμενης δραστικής ουσίας, και έτσι προέκυψε η αδριαμικίνη, ή αλλιώς δοξορουβικίνη. Η δοξορουβικίνη χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα σε μια σειρά νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένης της οξείας λευχαιμίας, του κακοήθους λεμφώματος και του καρκίνου του μαστού (3,4). Αν και οι λεπτομερείς μοριακοί μηχανισμοί της δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί πλήρως, η DOX θεωρείται γενικά ότι ασκεί την επίδρασή της μέσω της παρεμβολής της (intercalation) στο μόριο του DNA, η οποία τελικά οδηγεί σε λειτουργική βλάβη του DNA και στη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ή ROS) (5). Η δράση αυτή όμως συσχετίζεται και με παρενέργειες, όπως την καρδιοτοξικότητα, που αποτελεί μια σοβαρή επιπλοκή της χορήγησής της, ενώ συχνά παρατηρείται ανάπτυξη αντοχής στη θεραπεία και επανεμφάνιση της νόσου. Μέχρι σήμερα, ο έλεγχος επιπέδων (TDM) της DOX στον ορό ασθενών έχει πραγματοποιηθεί από ηλεκτροχημικούς αισθητήρες, φασματοφωτομετρική μέθοδο, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φασματοσκοπία μάζας/φασματοσκοπία μάζας (LC-MS/MS), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography ή HPLC), φασματοσκοπία Raman με ενίσχυση επιφάνειας (SERS) συνδεδεμένη με πολύπλοκο μικρορευστομηχανικό σύστημα (6). Η εξατομίκευση της δοσολογίας κυτταροτοξικών φαρμάκων όπως της δοξορουβικίνης, θα μπορούσε να είναι εφικτή και με τη μέθοδο Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS), όπου ανάλογα με τα επίπεδα της στον ορό του ασθενή θα μπορούσαν να περιοριστούν σημαντικά τα επικίνδυνα για τη ζωή περιστατικά καρδιοτοξικότητας, ειδικά σε ευάλωτες ομάδες, όπως παιδιά. Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα νέων φορέων του φαρμάκου Doxorubicin (DOX), όπως τους λιποσωμιακούς φορείς, στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης του φαρμάκου, αλλά και στην έρευνα των μηχανισμών ανάπτυξης αντοχής των καρκινικών κυττάρων σε αυτήν. Σκοπός λοιπόν αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου LC-MS με το οποίο θα ανιχνευτούν ποιοτικά και ποσοτικά τα επίπεδα δοξορουβικίνης στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού.

II. ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΣ

Έγινε συλλογή ορών 6 ασθενών με καρκίνο του μαστού. Η ομάδα των ασθενών περιλάμβανε γυναίκες ηλικιών 45-62 ετών που λάμβαναν 60mg/m² Δοξορουβικίνης ανά 3 εβδομάδες, για 8 μήνες συνολικής θεραπείας, στο αντικαρκινικό νοσοκομείο Πειραιά <<ΜΕΤΑΞΑ>>. Η δειγματοληψία έγινε 1 εβδομάδα μετά από το ενδιάμεσο σημείο της θεραπείας (4 μήνες). Ο προσδιορισμός των επιπέδων ορού της δοξορουβικίνης έγινε με το σύστημα LC-MS 2020 της Shimadzu. Το σύστημα αποτελείται από το χρωματογράφο LC-2050C LT και το φασματογράφο μονού τετραπόλου LC-MS 2020. Πριν τοποθετηθούν τα δείγματα στον αναλυτή, γίνεται αφαίρεση των πρωτεϊνών με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 3 λεπτά. Στη μέθοδο LC-MS είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα αυτό αποτελεί συνδυασμό των ακόλουθων διαλυμάτων Α και Β, μετά από ανάμειξή τους σε αναλογία 65:35.

Διάλυμα Α: 0,1% τριφθοροξικό οξύ (trifluoro acetic acid/TFA).

Διάλυμα Β: ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και τριφθοροξικό οξύ (800:200:1 v/v/v).

Το τελικό διάλυμα προστίθεται στο φυγοκεντρημένο δείγμα με τελική αραιώση 1:2.

Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου C18 με διαστάσεις 150 x 4,6 mm και μέγεθος μορίων στο εσωτερικό της στήλης 5 μm. Η ρύθμιση των βασικών παραμέτρων της υγρής χρωματογραφίας έγιναν με βάση το ακόλουθο πρόγραμμα:

- ισοκρατική έκλουση (χρησιμοποιήθηκε ένα μόνο διάλυμα κινητής φάσης),
- θερμοκρασία φούρνου: 35°C,
- ταχύτητα ροής: 0,5 mL/min,
- όγκος δείγματος: 20 μL,
- χρόνος ροής: 12 λεπτά.

Μετά από το διαχωρισμό και την έκλουση του δείγματος από τη χρωματογραφική στήλη, το δείγμα μετατρέπεται σε ιόντα με τη βοήθεια ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, τα οποία διαχωρίζονται και ανιχνεύονται με βάση το λόγο mass/charge (m/z). Η μέθοδος ιονισμού που μετατρέπει το δείγμα σε αέρια ιόντα είναι γνωστή ως Electrospray Ionization (ESI). Η δοξορουβικίνη σε αυτή τη μέθοδο ανιχνεύτηκε ως θετικά φορτισμένο ιόν με λόγο m/z 544. Έγινε επίσης ταυτόχρονη ανάλυση του λόγου m/z = 543. Η θετική φόρτιση του δείγματος κατά την ανάλυσή του απαιτεί επίσης μια πηγή πρωτονίων, τα οποία προέρχονται από το τριφθοροξικό οξύ του ρυθμιστικού διαλύματος.

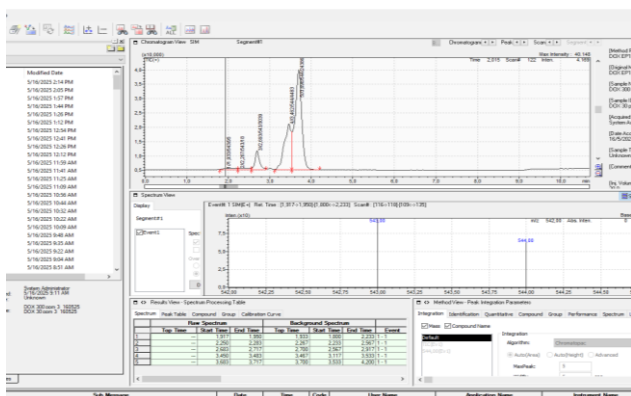
Η δοξορουβικίνη εξέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη και ανιχνεύεται σε συγκεκριμένο χρόνο σε σταθερές πειραματικές συνθήκες. Η ανάλυση των δεδομένων της LC-MS έγινε με το λογισμικό ανάλυσης LabSolutions της Shimadzu. Στο λογισμικό αυτό οριοθετείται αρχικά η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC ή Area under the

Antonakas C, Dogkas N, Karkalousos P, Trapali M. Quantitative Determination of doxorubicin in the serum of breast cancer patients. J Med Sci, 2025; Jul (3):20-24

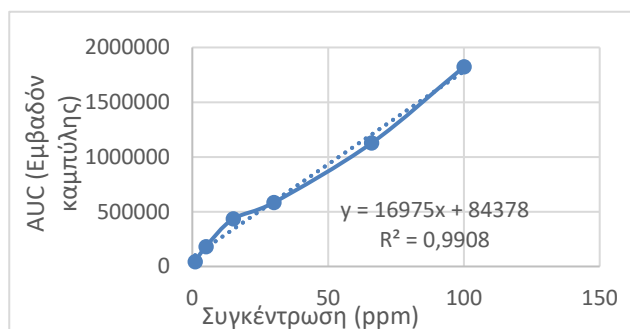
Curve) που αντιστοιχεί στη δοξορουβικίνη. Η μετατροπή του εμβαδού της καμπύλης της DOX σε συγκέντρωση έγινε με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με δείγματα γνωστής συγκέντρωσης 100, 66, 30, 15, 5 και 1 ppm. Τα πρότυπα δείγματα προήλθαν από διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος φαρμακευτικής δοξορουβικίνης. Μετά από κάθε run του αναλυτή, ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων στο λογισμικό LabSolutions του αναλυτή. Στο σχήμα Ι απεικονίζεται το γράφημα που συσχετίζει τα ιόντα που ανίχνευσε ο φασματογράφος, για λόγους m/z 544 και 543, σε συνάρτηση με το χρόνο. Στον πίνακα του σχήματος ΙΙ παρουσιάζονται σημαντικά δεδομένα της ανάλυσης, όπως τους χρόνους στους οποίους ανιχνεύτηκε κορυφή καθώς και το εμβαδόν τους, που είναι απαραίτητο για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης. Με τη βοήθεια του λογισμικού γίνεται επιλογή της κορυφής η οποία αντιστοιχεί στο μόριο ή χημική ένωση που πρέπει να προσδιοριστεί.

ΙΙΙ. ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το σύστημα LC-MS απεικονίζει το σήμα των ιόντων DOX ως καμπύλη σήματος/χρόνο. Για τη μετατροπή του εμβαδού της καμπύλης της δοξορουβικίνης σε συγκέντρωση, δημιουργήθηκε η ακόλουθη πρότυπη καμπύλη με δείγματα γνωστής συγκέντρωσης δοξορουβικίνης 100, 66, 30, 15, 5 και 1 ppm. Τα διαλύματα αυτά προέκυψαν από διαδοχική αραιώση της πρότυπης DOX.



Σχήμα 1: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος DOX.

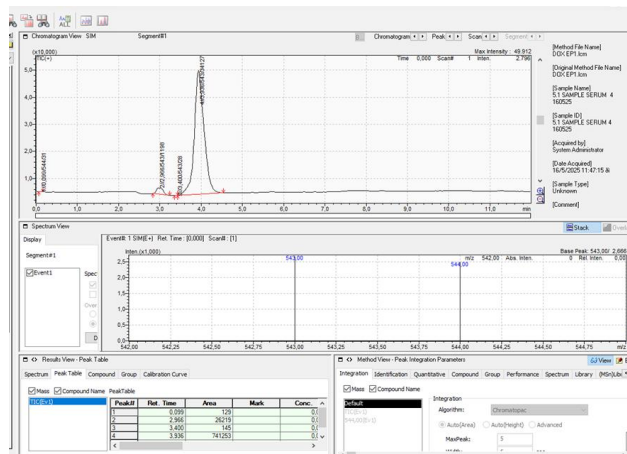


Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη δοξορουβικίνης συγκεντρώσεων 1 - 100 ppm.

Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε με βάση αυτό τον τύπο, που περιλαμβάνει την κλίση της ευθείας και την τυπική απόκλιση: $LOD = (3,3 \text{ STD})/S$ όπου S η κλίση της ευθείας και STD η τυπική απόκλιση.

Το όριο ποσοτικοποίησης προκύπτει αντίστοιχα από τη σχέση $LOD = (10 \text{ STD})/S$. Από τους υπολογισμούς προκύπτει $LOD = 0,12 \text{ ppm}$ και $LOQ = 0,36 \text{ ppm}$.

Έχοντας υπολογίσει την εξίσωση $y = 16975x + 84378$ από την πρότυπη καμπύλη δοξορουβικίνης, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση των δειγμάτων αντικαθιστώντας την άγνωστη τιμή y με το εμβαδόν της κορυφής από το κάθε δείγμα.



Antonakas C, Dogkas N, Karkalousos P, Trapali M. Quantitative Determination of doxorubicin in the serum of breast cancer patients. *J Med Sci*, 2025; Jul (3):20-24

συγκέντρωσης που διέφερε της δοξορουβικίνης κατά 1 m/z (543 αντί 544). Είναι πιθανό πως αποτελεί θραύσμα της δοξορουβικίνης που έχασε ένα πρωτόνιο, ή αντιθέτως δεν έλαβε πρωτόνιο κατά τον ιονισμό του. Η εμφάνιση αυτού του μορίου θεωρείται φυσιολογική στην LC-MS ανάλυση και δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ II

ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.

Τελική Συγκέντρωση (ppm)
37
68,6
54,6
77,4
27,6
33,4

Οι τιμές συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης του πειράματος είχαν εύρος τιμών από 27,6 - 77,4 ppm. Αυτές οι τιμές εμφανίζουν μικρότερη μεταβλητότητα σε σχέση με άλλες μελέτες που αναλύθηκαν προηγουμένως, πιθανώς λόγω μικρότερων διαφορών στο πρωτόκολλο θεραπείας των ασθενών. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 1 ppm αντιστοιχεί σε 1 µg/mL, που αποτελεί σημαντικά υψηλότερο μέγεθος από τις τιμές της βιβλιογραφίας. Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις μετρούμενες τιμές, είναι η επιμόλυνση (carry-over) από προηγούμενα δείγματα. Η δοξορουβικίνη έχει τη χαρακτηριστική φυσικοχημική ιδιότητα να παγιδεύεται σε διάφορα μέρη του αναλυτή (πχ δειγματολήπτης, σωληνώσεις) και να επιμολύνει ή αλλιώς να μεταφέρεται σε επόμενα δείγματα. Έτσι το αποτέλεσμα της κάθε μέτρησης μπορεί να είναι πλάσματικά αυξημένο ή μειωμένο. Για τον έλεγχο αυτού του φαινομένου, τα περισσότερα πρωτόκολλα τρέχουν τυφλά δείγματα ανάμεσα στα κανονικά και ελέγχουν για την ανίχνευση της δοξορουβικίνης. Για την πρόληψη του φαινομένου, όπως έγινε και στην πειραματική διαδικασία, είναι θεμιτό να επιτρέπεται στον αναλυτή να τρέχει τυφλά δείγματα κινητής φάσης ή άλλων οργανικών διαλυτών, έτσι ώστε να καθαρίζεται από περίσσεια δοξορουβικίνης. Άλλοι παράγοντες όπως η σύσταση του διαλύματος της κινητής φάσης μπορούν επίσης να προκαλέσουν πλάσματική αύξηση ή μείωση των μετρούμενων τιμών (7). Από τις μετρήσεις μας, απεδείχθη καλή επαναληπτικότητα, αλλά η ευαισθησία της μεθόδου, λόγω της σημαντικής απόκλισης στα αναμενόμενα επίπεδα των ασθενών (ng/ml αντί µg/ml), απαιτεί περαιτέρω τεχνικές βελτιώσεις ή τη χρήση HPLC-MS, MS/MS, ώστε να γίνει δυνατή η επακριβής φαρμακοκινητική ανίχνευση των πραγματικών θεραπευτικών ή καρδιοτοξικών συγκεντρώσεων της Dox. Όμως, η γραμμικότητα ήταν αποδεκτή σε συγκεντρώσεις 1-100 ppm, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο ικανή να ποσοτικοποιήσει το φάρμακο σε βιομηχανικές εφαρμογές στους ελέγχους ποιότητας των σκευασμάτων. Όσον αφορά την ανάλυση του φαρμάκου σε βιολογικά δείγματα, η μέθοδος της LC-MS/MS διαθέτει την απαραίτητη ευαισθησία και ειδικότητα για αυτό το σκοπό, είτε για την

παρακολούθηση των ασθενών, είτε για την περαιτέρω μελέτη της δοξορουβικίνης σε ερευνητικό επίπεδο (8-12).

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη σε ορούς ασθενών είναι προκαταρκτική και είχε ως στόχο τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου LCMS. Μολονότι η μέθοδος LC-MS τελικά μπορεί να μη διαθέτει την απαραίτητη ευαισθησία για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων Δοξορουβικίνης ασθενών, η μέθοδος LC-MS/MS έχει αποδειχθεί πως είναι ιδανική για αυτό το σκοπό. Η LC-MS μονού τετραπόλου μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα δοξορουβικίνης που έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως δείγματα που προέρχονται από ελέγχους καθαρότητας/ποιότητας φαρμακευτικών εταιριών που την παράγουν, αλλά και στον προσδιορισμό άλλων μορίων που επηρεάζουν τη δράση της, εφόσον η ευαισθησία για το μόριο στόχο επαρκεί.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(4):853. DOI: 10.4103/0973-1482.139267
2. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peuceetius* var. *caesius*. *Bio-technol Bioeng*. 1969 Nov 18;11(6):1101-10. DOI: 10.1002/bit.260110607
3. Ma P, Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review. *Nano Today*. 2013 Jun;8(3):313-31. DOI: 10.1016/j.nantod.2013.04.006
4. Agudelo D, Bourassa P, Bérubé G, Tajmir-Riahi HA. Review on the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: Structural models and antitumor activity. *J Photochem Photobiol B*. 2016 May;158:274-9. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.032
5. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011 Jul;21(7):440-6. DOI:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
6. Panikar SS, Banu N, Escobar ER, García GR, Cervantes-Martínez J, Villegas TC, et al. Stealth modified bottom up SERS substrates for label-free therapeutic drug monitoring of doxorubicin in blood serum. *Talanta [Internet]*. 2020 Oct 1 [cited 2025 Jul 8];218:121138] DOI: 10.1016/J.TALANTA.2020.121138
7. Cajka T, Hricko J, Rudl Kulhava L, Paucova M, Novakova M, Kuda O. Optimization of Mobile Phase Modifiers for Fast LC-MS-Based Untargeted Metabolomics and Lipidomics. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2023 Feb 1 [cited 2025 Jun 4];24(3):1987. DOI: 10.3390/ijms24031987
8. Seger C. Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories. *Wiener Medizinische Wochenschrift*

Antonakas C, Dogkas N, Karkalousos P, Trapali M. Quantitative Determination of doxorubicin in the serum of breast cancer patients. *J Med Sci*, 2025; Jul (3):20-24

[Internet]. 2012 Nov [cited 2025 Jun 10];162(21–22):499–504. DOI: 10.1007/s10354-012-0147-3

9. Zhang K, Zhang D, Ge Z, Qiu F. Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of free and total doxorubicin in human plasma and its clinical application for a novel doxorubicin hydrochloride liposome injection in Chinese patients with breast cancer. *Acta Chromatogr [Internet]*. 2024 Sep 2 [cited 2025 Jun 7];36(3):186–95. DOI:10.1556/1326.2023.01129
10. Mohmaed Ali MI, Nijstad AL, Boosman RJ, Crombag MRBS, Barnett S, Veal GJ, et al. A Population Pharmacokinetic Study to Evaluate Doxorubicin Exposure Across All Age Groups. *Clin Pharmacokinet [Internet]*. 2024 Dec 1 [cited 2025 Jun 6];63(12):1711–22. DOI: 10.1007/s40262-024-01445-5
11. Xie Y, Shao N, Jin Y, Zhang L, Jiang H, Xiong N, et al. Determination of non-liposomal and liposomal doxorubicin in plasma by LC–MS/MS coupled with an effective solid phase extraction: In comparison with ultrafiltration technique and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B [Internet]*. 2018 Jan 1 [cited 2025 May 31];1072:149–60. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.11.020
12. Bano N, Kainat KM, Ansari MI, Pal A, Sarkar S, Sharma PK. Identification of chemoresistance targets in doxorubicin-resistant lung adenocarcinoma cells using LC-MS/MS-based proteomics. *Journal of Chemotherapy [Internet]*. 2024 [cited 2025 May 14]; DOI:10.1080/1120009X.2024.2385267