ARISTIDE VIGEVANI (*)

L'analisi strumentale nel controllo del farmaco (**)

L'attività analitica svolge un ruolo fondamentale in tutte le fasi della realizzazione di un farmaco: nella ricerca e nello sviluppo di una nuova entità chimica, nello studio delle sue forme farmaceutiche ed infine nel controllo della sua produzione industriale. Per quanto riguarda le applicazioni delle tecniche analitiche strumentali nella ricerca e nello sviluppo di nuovi farmaci si devono ottenere informazioni dettagliate su alcuni punti fondamentali che riguardano:

1) identità e struttura chimica;
2) omogeneità e purezza (inclusa la caratterizzazione dello stato solido);
3) metodi di determinazione quantitativa;
4) studi di stabilità.

Tutti questi aspetti (ad eccezione della determinazione di struttura) vengono esaminati anche nell'ambito delle analisi di controllo di qualità e confluiscono nei così detti documenti di « Chemistry » da fornire alle autorità sanitarie per ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione clinica e la registrazione.

Il punto 1) rappresenta indubbiamente uno dei compiti più gratificanti per chi ha la possibilità di occuparsene avendo a disposizione la strumentazione adeguata. Tuttavia, anche oggi, per molecole di una certa complessità strutturale possono non essere sufficienti i metodi strumentali e bisogna ricorrere a tecniche chimiche di degradazione selettiva. In alcuni casi, se si dispone di sostanze che formano cristalli di dimensioni opportune, può essere necessario ricorrere alla diffrattometria di raggi X, che è tuttora l'unica tecnica in grado di determinare la struttura di proteine, anche se i recenti progressi della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) e della spettrometria di massa ne hanno fatto mezzi molto utili nell'esame di sostanze con pesi molecolari fino a 12.000-15.000 dalton.

(*) Farmitalia Carlo Erba, Ricerca e Sviluppo, Milano.

(**) Convegno su « La Chimica per la tutela della salute pubblica » e celebrazione del centenario della nascita del socio Domenico Marotta. Roma, 14-15 Dicembre 1987.

Per quanto riguarda i punti 2) e 3) si ha il predominio delle tecniche cromatografiche, insieme ai metodi spettrofotometrici, potenziometrici e di analisi termica. Per determinare la purezza di un principio attivo è utile basarsi anche sulla valutazione quantitativa del contenuto delle impurezze e sulla loro natura. A questo proposito è nota la grande importanza che le autorità sanitarie dei paesi a legislazione più evoluta attribuiscono alla costanza del profilo delle impurezze tra i lotti di farmaco usati per le prove farmaco-tossicologiche e quelli usati in clinica. Bisogna quindi verificare questi dati con il massimo rigore. In questo campo ha assunto una preminente importanza la cromatografia liquida a prestazioni elevate (HPLC). Come esempio, ricordo che la FDA, già dal 1984, ha ammesso la sostituzione del saggio di tossicità per alcuni farmaci antitumorali, tra cui la doxorubicina, con l'analisi HPLC, più accurata e riproducibile [1]. Quindi l'analisi HPLC potrebbe essere usata come unico metodo analitico; infatti essa costituisce il saggio d'identificazione (misura del tempo di ritenzione in confronto a quello di uno standard) e permette la determinazione del contenuto di impurezze e del titolo in confronto ad uno standard di riferimento a titolo noto. Questo però deve essere evitato, perché può essere incauto basare tutta la caratterizzazione analitica su di un solo metodo. La caratterizzazione analitica, per essere probante, deve risultare dall'esame comparativo di vari saggi che, insieme, contribuiscono al quadro complessivo delle caratteristiche di una sostanza. Così l'identità, determinata in base al tempo di ritenzione HPLC deve essere convalidata da quella ottenuta mediante le tecniche spettroscopiche; la natura e il livello delle impurezze, ottenute mediante HPLC devono essere convalidate mediante l'uso di altri metodi cromatografici, come cromatografia su strato sottile (TLC, con determinazione quantitativa densitometrica), cromatografia su carta, elettroforesi o analisi termica; il titolo, determinato mediante HPLC contro standard, deve essere paragonato a quello ottenuto spettrofotometricamente o potenziometricamente. In definitiva è essenziale l'uso combinato delle varie tecniche analitiche strumentali.

Come risulta da quanto è stato detto finora, parlare di chimica analitica oggi significa parlare di chimica analitica strumentale: a questo proposito è utile ricordare che i vantaggi delle tecniche strumentali, rispetto a quelle tradizionali, consistono nel fatto che le informazioni analitiche vengono ottenute con maggiore rapidità e che il tipo di informazione fornito dall'analisi strumentale è difficilmente ottenibile, o addirittura impossibile ottenere con le tecniche tradizionali.

Negli ultimi anni sono stati compiuti ulteriori e decisivi progressi sia in termini di affermazione di nuove tecniche che di miglioramento di quelle già note; faccio solo pochi esempi: la cromatografia liquida a prestazioni elevate (HPLC) si è diffusa sempre di più, essendo risultata indispensabile grazie alla sua versatilità in tutte le fasi di ricerca e di sviluppo farmaceutici; si sta diffondendo la cromatografia ionica che permette la determinazione di tracce di ioni organici ed inorganici, si sono ulteriormente potenziate tecniche già affermate come la spettrometria di massa (con nuove tecniche di ionizzazione blanda e con l'accoppiamento con la cromatografia liquida), e come la spettroscopia di risonanza magne-

tica nucleare (con le tecniche bidimensionali, basate su innumerevoli tipi di sequenze d'impulsi); si è realizzato un vasto uso di computer dedicati, che non si limitano alla funzione di integratori, ma eseguono diagnosi sulle condizioni operative degli strumenti e ne ottimizzano i parametri strumentali; si è arrivati alla gestione computerizzata dei dati del laboratorio di controllo qualità in modo da seguire l'iter dei campioni dall'accettazione fino alla memorizzazione del risultato analitico finale ed all'emissione del certificato d'analisi; sono disponibili campionatori automatici e « robot » per preparare i campioni per l'analisi ed eseguire semplici operazioni analitiche. Questa strumentazione è molto costosa, come costosa ne è la gestione, la manutenzione e, sopra tutto, l'addestramento del personale in grado di utilizzarlo. Inoltre il sempre più rapido progresso tecnico rende sempre più rapidamente obsolete le apparecchiature, perciò deve essere esercitata la massima cura nella loro scelta: infatti è d'importanza fondamentale scegliere apparecchiature adatte e, una volta acquistate, utilizzarle nel modo più completo. D'altra parte, il risparmio di tempo e la qualità e quantità delle informazioni ottenute hanno un peso determinante nell'assicurare il successo nell'attuale situazione di esasperata competizione scientifica e tecnologica.

Un altro aspetto da tenere presente è costituito dai recenti sviluppi nella tecnologia del DNA ricombinante (biotecnologia) per ottenere sostanze dotate di attività farmacologica. La caratterizzazione delle sostanze così ottenute, accanto alle tecniche cromatografiche (HPLC ed elettroforesi) richiede tecniche biologiche, biochimiche ed immunologiche per determinare l'attività specifica e verificare l'innocuità (safety) delle sostanze; inoltre è estremamente importante la determinazione delle impurezze, infatti bisogna escludere la presenza di tracce di contaminanti come pirogeni, endotossine, virus, micoplasmi, proteine mutate, proteine derivanti dalle cellule ospitanti, e così via [2]. Anche in questo campo c'è spazio per ulteriori possibili applicazioni delle tecniche analitiche strumentali, come, ad esempio [2]:

— maggior uso di analisi HPLC per sostituire misure di attività mediante saggi biologici *in vivo*;

— mappatura peptidica mediante HPLC/spettrometria di massa invece che mediante elettroforesi su gel o HPLC;

— analisi automatizzata della composizione e sequenza di carboidrati nelle glicoproteine, per le quali sono possibili molteplici isomeri;

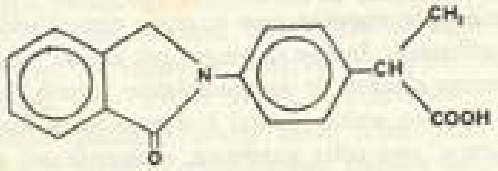
— spettrometri NMR più sensibili per verificare la struttura e la purezza delle proteine a livelli di picogrammi/ml;

— spettrometri di massa con ionizzazione a disassorbimento di plasma (^{252}Cf) per esaminare sostanze a più elevato peso molecolare (il limite attuale è 12.000-15.000 dalton);

— maggior grado di automazione per tutte le tecniche routinarie di biologia molecolare.

Vengono presentate alcune applicazioni, eseguite presso i nostri laboratori, delle tecniche strumentali nella caratterizzazione di farmaci o di potenziali farmaci.

Prima di parlare della spettroscopia NMR e della spettrometria di massa, che sono senza dubbio le più sofisticate di tali tecniche, vorrei soffermarmi brevemente sull'analisi termica differenziale (calorimetria differenziale esplorativa) e sulla sua utilità per determinare i diagrammi binari di fase di miscele di enantiomeri. In generale questa tecnica viene utilizzata nella determinazione di purezza e nello studio di forme cristalline: essa è stata utilizzata da noi anche per determinare la composizione di miscele di enantiomeri dell'indoprofene [3].



un antiinfiammatorio non steroideo, di cui l'enantiomero S, destrorotatorio, è responsabile dell'attività farmacologica. Così, in base al comportamento alla fusione dei due enantiomeri puri, del racemato e di miscele a composizione intermedia è stato possibile costruire il diagramma di fase in cui il punto di fusione del racemato è più elevato di quelli degli enantiomeri puri [3] (Fig. 1). Da notare i minimi delle soluzioni solide con composizione percentuale 12.5/87.5. Si ha così un metodo rapido e sensibile per determinare la purezza ottica, accanto alla tecnica HPLC che però richiede la derivatizzazione con un agente chirale che deve essere a sua volta di elevata purezza ottica, oppure necessita dell'uso di una fase mobile chirale o di una fase stazionaria chirale.

E' inutile puntualizzare l'importanza della risonanza magnetica nucleare nella risoluzione dei problemi strutturistici e stereochimici: infatti questa tecnica possiede la caratteristica unica di fornire segnali virtualmente separati per i singoli nuclei magnetici non-equivalenti di ogni molecola.

L'applicazione delle tecniche bidimensionali (2D-NMR) ha ulteriormente incrementato la già notevole potenzialità dell'NMR. Sono disponibili numerosi tipi di sequenza d'impulsi di cui darò alcuni esempi. L'esperimento « omo-nucleare 2D-J » correla il chemical shift di un nucleo (in questo caso un protone) con le sue costanti di accoppiamento omo-nucleare. Nella parte superiore della Figura 2 si vede la zona spettrale a campo più elevato di un derivato antraciclinico [4] per cui bisognava stabilire l'orientazione degli ossidrili nelle posizioni 3' e 4' dello zucchero. La usuale tecnica del disaccoppiamento selettivo non può essere applicata poiché a 200 MHz i segnali H-3' ed H-5' sono parzialmente sovrapposti e l'H-4' è nascosto dal sistema AB del metilene in 10. Il problema viene risolto dall'esperimento « omo-nucleare 2D-J ». Nella parte inferiore della Figura 2 si vede il « contour plot » ossia lo spettro bidimensionale: i picchi in F_1 [J(H-H)] sono allineati sotto i rispettivi valori di « chemical shift » riportati sull'asse F_2. E' una rappresentazione suggestiva ma non immediatamente interpretabile. Le strutture dei picchi che interessano si vedono meglio prendendo

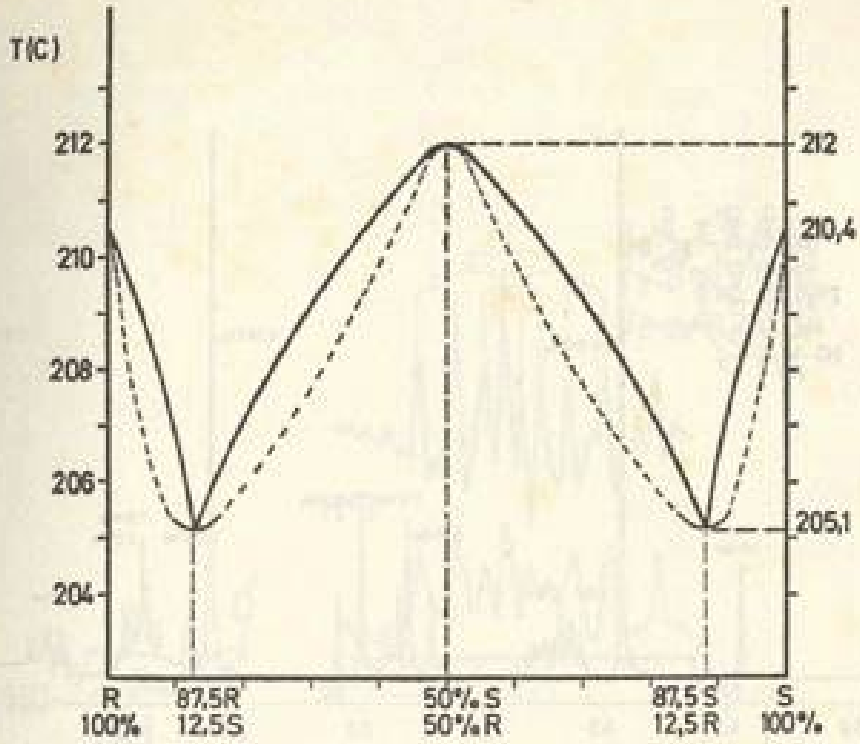


Fig. 1 - Diagramma di fase degli enantiomeri dell'indoprofene.

delle sezioni ai valori di frequenza F_2, cioè ai valori di « chemical shift » dei protoni 3' e 5' (Figura 3). La differenza tra la traccia superiore e l'inferiore è dovuta solo a manipolazioni matematiche dei dati acquisiti nell'esperimento bidimensionale. Così la traccia superiore ha un disturbo più elevato ma anche una maggiore risoluzione. Su questi multipletti si misurano i valori delle costanti di accoppiamento per H-3' e per H-5' che permettono di attribuire le orientazioni indicate dei sostituenti 3', 4' e 5'.

Un altro esempio riguarda l'esperimento NOE-2D (Noesy) che ha permesso di assegnare la corretta stereochimica a due derivati antraciclinici con lo zucchero furanosico: lo spettro di massa ed i dati NMR indicano che le sostanze differiscono solo per la stereochimica in 3'. Le costanti di accoppiamento vicinali non sono utili perché negli anelli pentaatomici le costanti vicinali *cis* e *trans* hanno valori analoghi. Si è quindi effettuato un esperimento di Noesy: come è noto l'effetto NOE si esercita tra nuclei vicini nello spazio (distanza ≤ 5 Å) indipendentemente dal numero di legami tra di loro. In figura 4, su entrambi gli assi, orizzontale e verticale, si ha lo spettro protonico mentre simmetricamente rispetto alla diagonale, che mostra ancora lo spettro protonico come « contour plot » sono disposti i picchi di correlazione tra i segnali dei protoni vicini nello spazio. Come si vede, in questo isomero si ha un picco di correlazione tra il

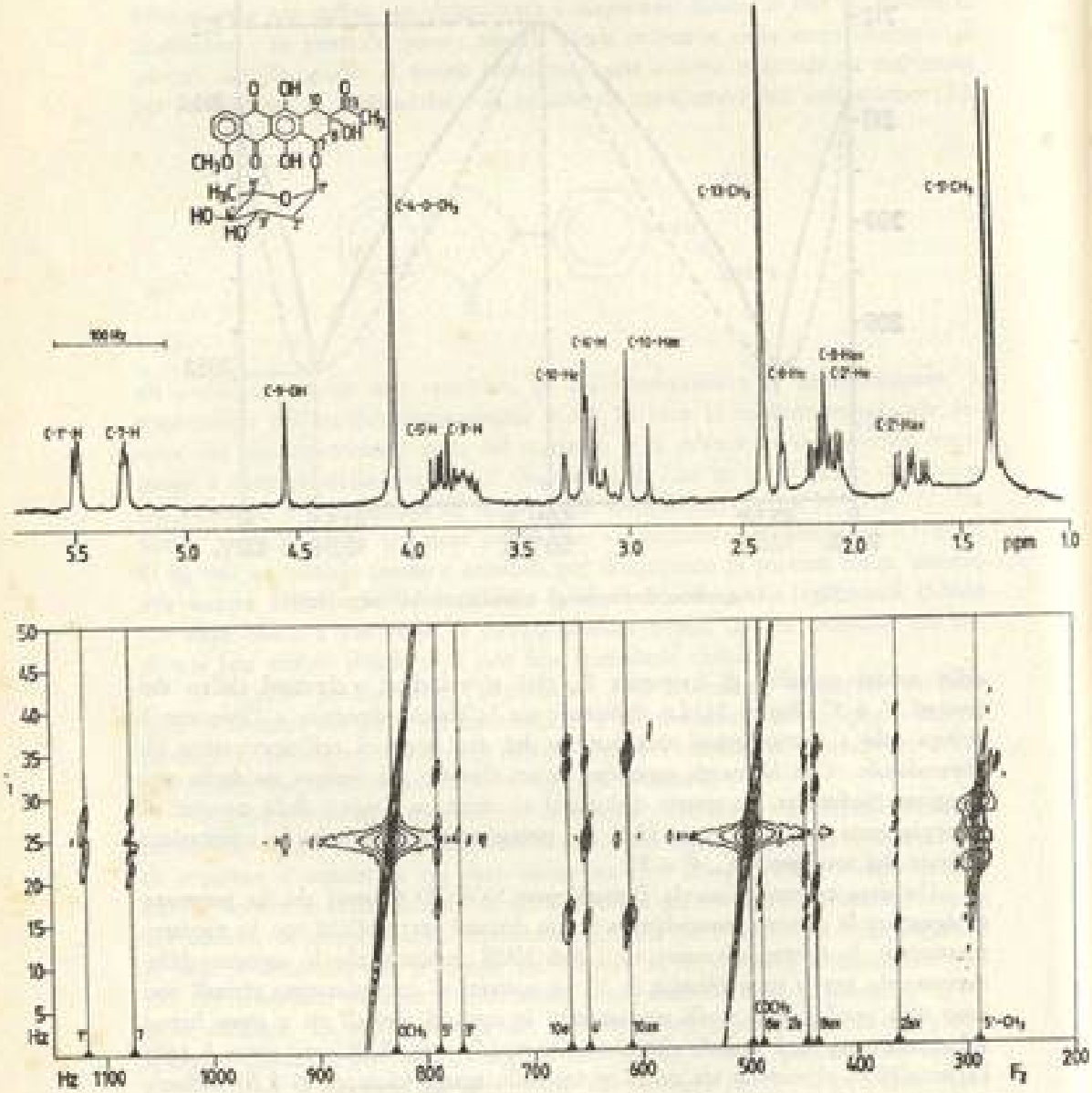


Fig. 2 - Esperimento NMR « omo-nucleare 2D-J » eseguito su un derivato antraciclinico [7-0-(2,6-dideossi-α-L-*arabino*-esopiranosil) daunomicinone].

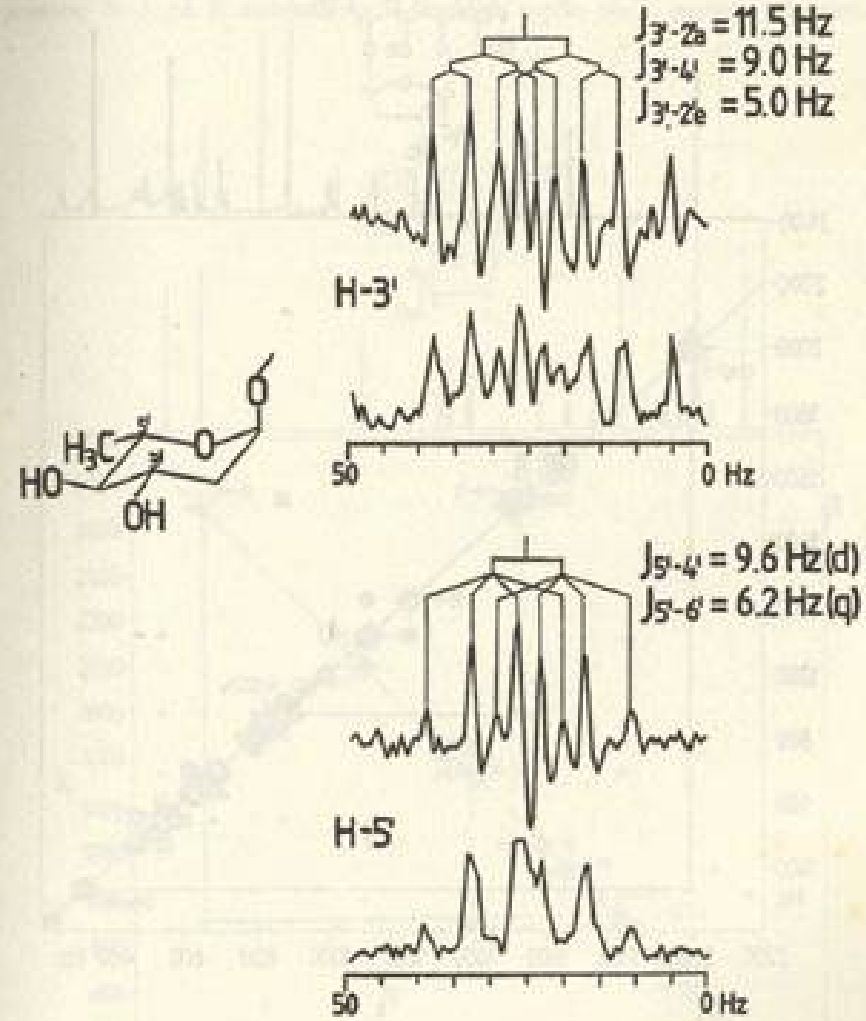


Fig. 3 - Multipletti protonici ottenuti mediante l'esperimento « omo-nucleare 2D-J ».

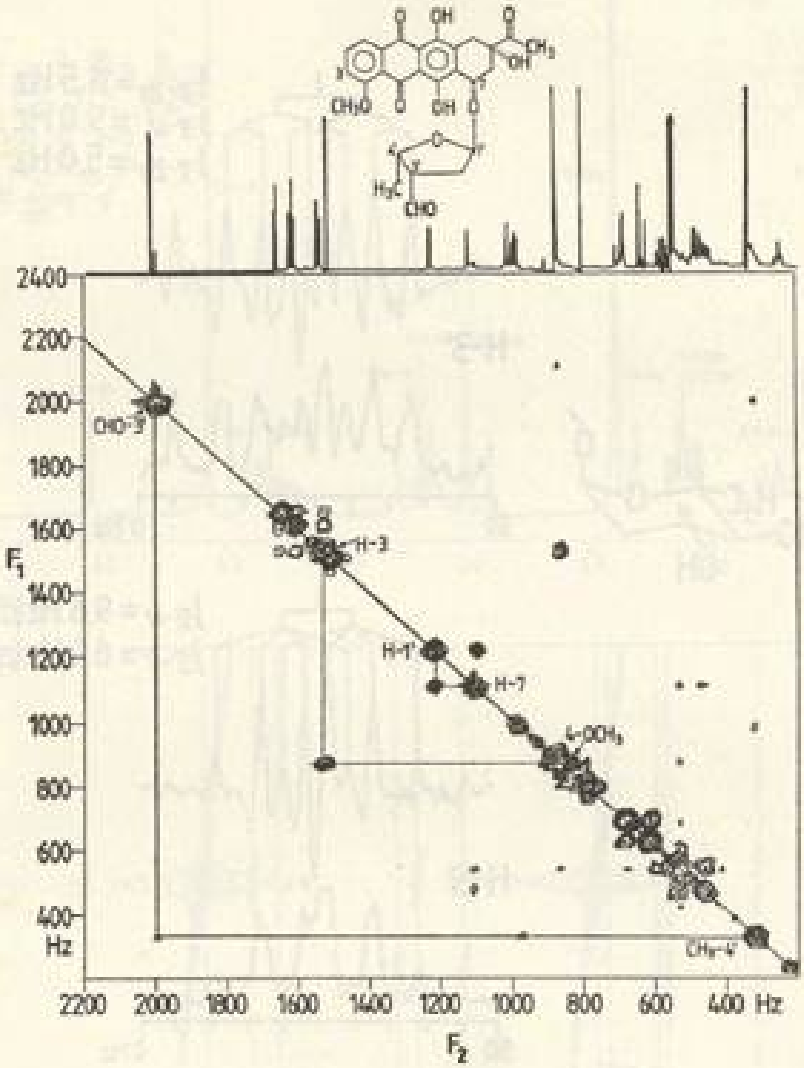


Fig. 4 - Esperimento NMR « NOE-2D » eseguito su 7-O-(2,3,5-trideossi-3-C-formil-α-L-*treo*-pentofuranosil) daunomicinone

metile in 4' ed il protone formilico in 3', il che indica che essi sono *cis*: infatti la loro distanza è tale da far sì che essi interagiscano durante il processo di rilassamento mediante un meccanismo dipolo-dipolo. Si hanno anche altri picchi di correlazione molto chiari, ad es. quello tra l'H-3 dell'aglicone ed il metossile *orto* in 4 e quello tra il protone anomerico 1' e quello in posizione 7 dell'aglicone. Per l'altro isomero (Figura 5) si notano ancora i picchi di correlazione tra il protone in 3 ed il metossile in 4, nonché quello tra il protone anomerico e

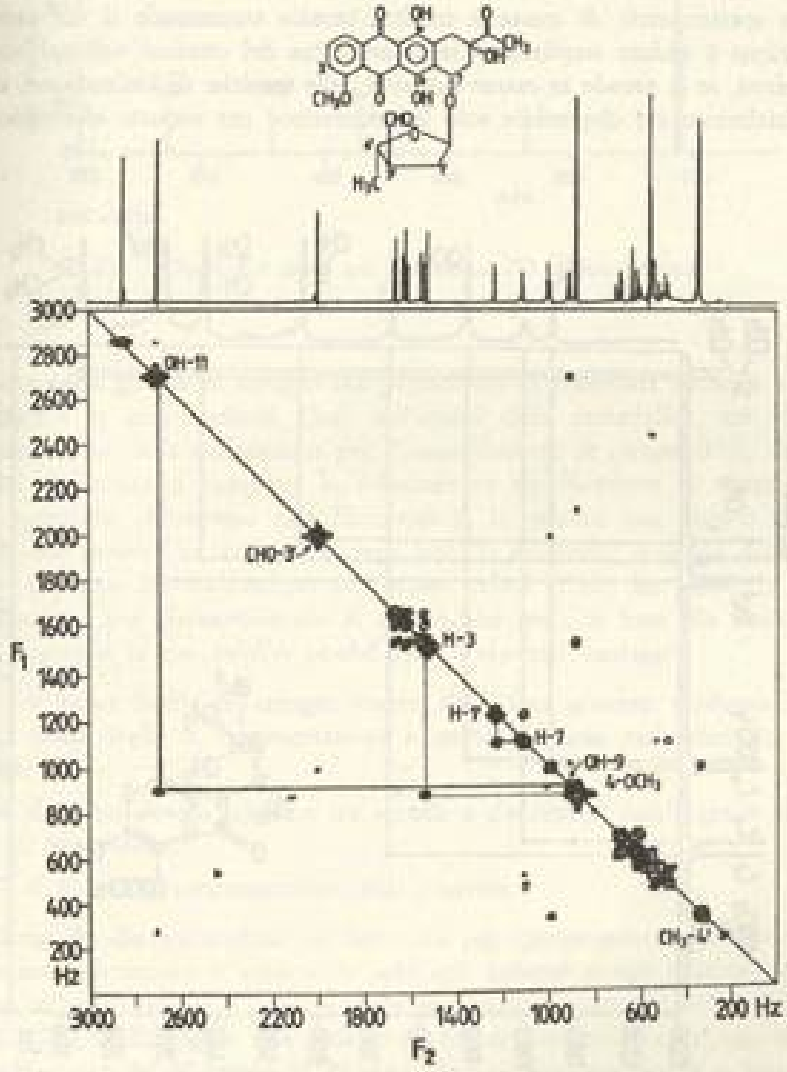


Fig. 5 - Esperimento NMR «NOE-2D» eseguito su 7-0-(2,3,5-tridesossi-3-C-formil-α-L-*eritro*-pentofuranosil) daunomicinone.

l'H in 7. Manca invece il picco di correlazione tra il metile in 4' ed il protone formilico 3', ora troppo lontani per contribuire al reciproco rilassamento dei rispettivi protoni, che sono quindi *trans*.

Vediamo infine (Figura 6) un esempio di HETCOR (correlazione eteronucleare) per un derivato β-lattamico [5]. Anche in questo caso si ottiene uno spettro bidimensionale con gli spettri dei protoni e dei carboni sui due assi F_1 ed F_2. La presenza dei picchi di correlazione permette di correlare tra di loro i segnali dei protoni e degli atomi di carbonio direttamente legati tra loro rendendo agevole l'attribuzione di tutti i segnali.

La spettrometria di massa è un'altra tecnica strumentale il cui campo di applicazione è andato ampliandosi in conseguenza dei continui sviluppi strumentali. Infatti, se si prende in esame l'aspetto delle tecniche di ionizzazione, si vede che inizialmente era disponibile solo la ionizzazione per impatto elettronico; ora

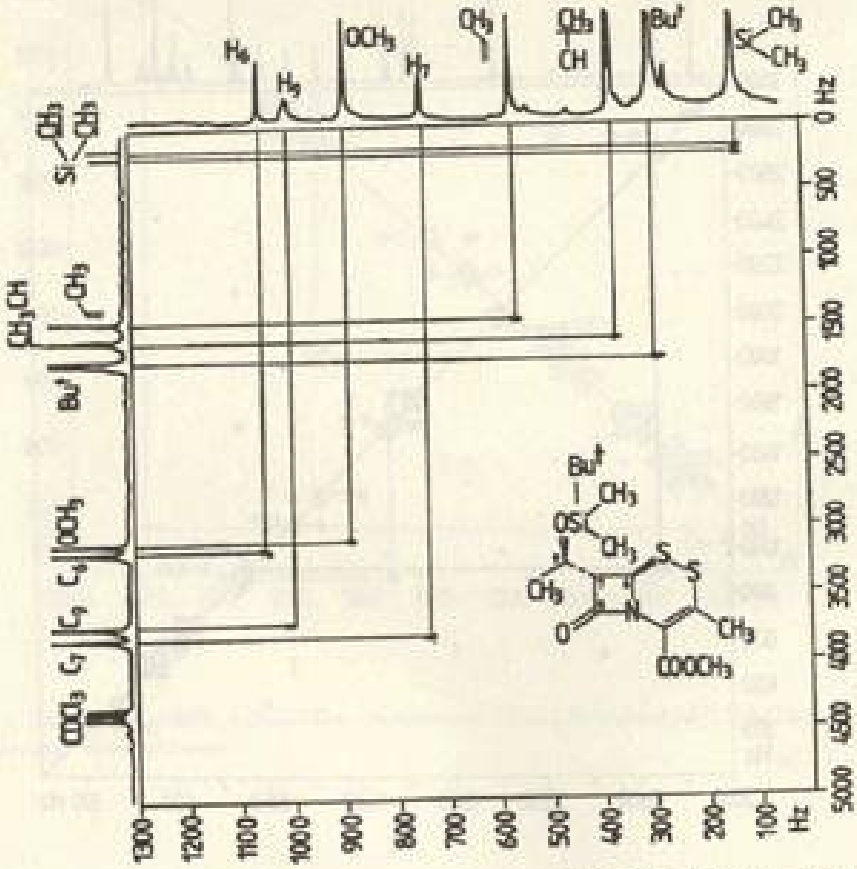


Fig. 6 - Esperimento NMR « HETCOR » eseguito su metil (6R,7S)-7 - [1(R)-((*tert*-butildimetilsilil)ossi)-etil]-3-metil-2 - tiacefem-4-carbossilato.

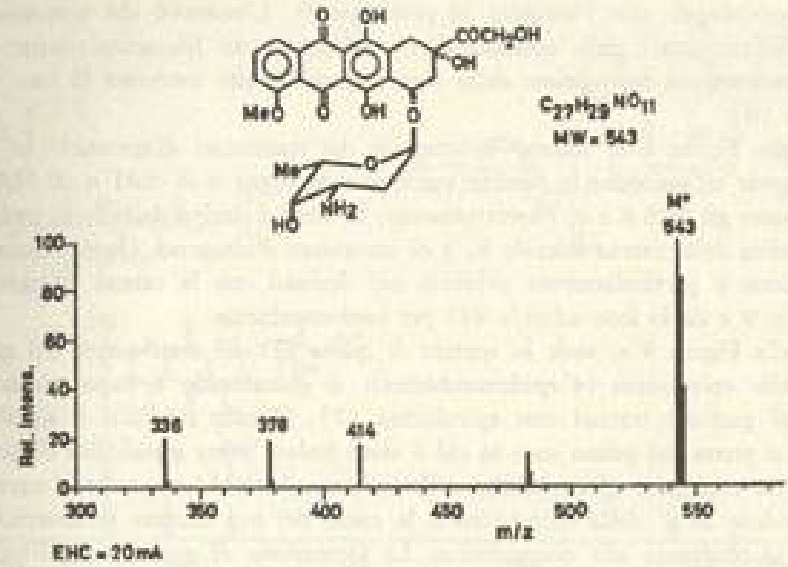


Fig. 7 - Spettro di massa con ionizzazione FD di doxorubicina.

si ha una vasta gamma di tecniche che permettono di esaminare anche le sostanze più polari e le meno volatili. Così, nell'analisi delle antracicline, noi abbiamo fatto ampio uso della ionizzazione per disassorbimento di campo (FD), che consiste nel depositare il campione in soluzione su un filamento di tungsteno ad ampia superficie. Attraverso tale filamento si fa passare una intensa corrente elettrica che provoca la formazione degli ioni. Il successivo sviluppo della ionizzazione mediante bombardamento con atomi veloci (FAB) ha messo in ombra la ionizzazione per disassorbimento di campo, che però, in base alla nostra esperienza, mantiene la sua validità perché offre i seguenti vantaggi:

— il basso livello di energia interna degli ioni generati mediante FD dà luogo a bassi livelli di frammentazione e quindi ad ioni molecolari di elevata intensità;

— si ha un elevato rapporto tra segnale e disturbo di fondo grazie al basso valore di quest'ultimo;

— si ha scarsa contaminazione della sorgente.

Tornando alle antracicline, và detto che per queste sostanze la ionizzazione per impatto elettronico è applicabile solo agli agliconi o agli zuccheri separati, ma non all'intera molecola a causa della sua labilità termica e della sua scarsa volatilità [6]. Nella Figura 7 si vede lo spettro di doxorubicina con una corrente di riscaldamento del filamento di 20 mA; oltre al picco molecolare si hanno picchi ad m/z 414 (aglicone), 378 (7,9-bisanidroadriamicinone: l'aglicone completamente aromatizzato con la catena glicoloilica in posizione 9) e 336 dalton (l'agli-

cone aromatizzato con l'ossidrile in posizione 9). L'intensità dei frammenti aumenta all'aumentare della corrente di riscaldamento del filamento, mentre si ha una concomitante diminuzione dello ione molecolare che conferma la loro origine termica [6].

Nella Figura 8 si vedono le strutture dei frammenti diagnostici: lo ione *a* corrisponde all'aglicone; le perdite successive di acqua e di R_5H o di H_2O e di R_4H danno gli ioni *b* e *c*, rispettivamente; lo ione *d* deriva dallo ione molecolare per perdita della catena laterale R_4 e di un atomo d'idrogeno. Quest'ultima frammentazione è particolarmente evidente nei derivati con la catena laterale glicoloilica in 9 e dà lo ione ad m/z 483 per la doxorubicina.

Nella Figura 9 si vede lo spettro di massa FD del metil-estere del glucuronide della epirubicina (4'-epidoxorubicina): il glucuronide è stato isolato dalle urine di pazienti trattati con epirubicina [7]. Questo risultato è significativo perché si tratta del primo caso in cui è stato isolato come metabolita di un'antraciclina un coniugato glucuronidico all'amminozucchero. L'orientazione equatoriale dell'ossidrile in 4' della epirubicina è la causa del suo diverso andamento metabolico in confronto alla doxorubicina. La formazione di quantità significative di glucuronati (è stato isolato anche il glucuronato della 13-diidro-epirubicina) rappresenta un meccanismo di detossificazione tipico della epirubicina, che corri-

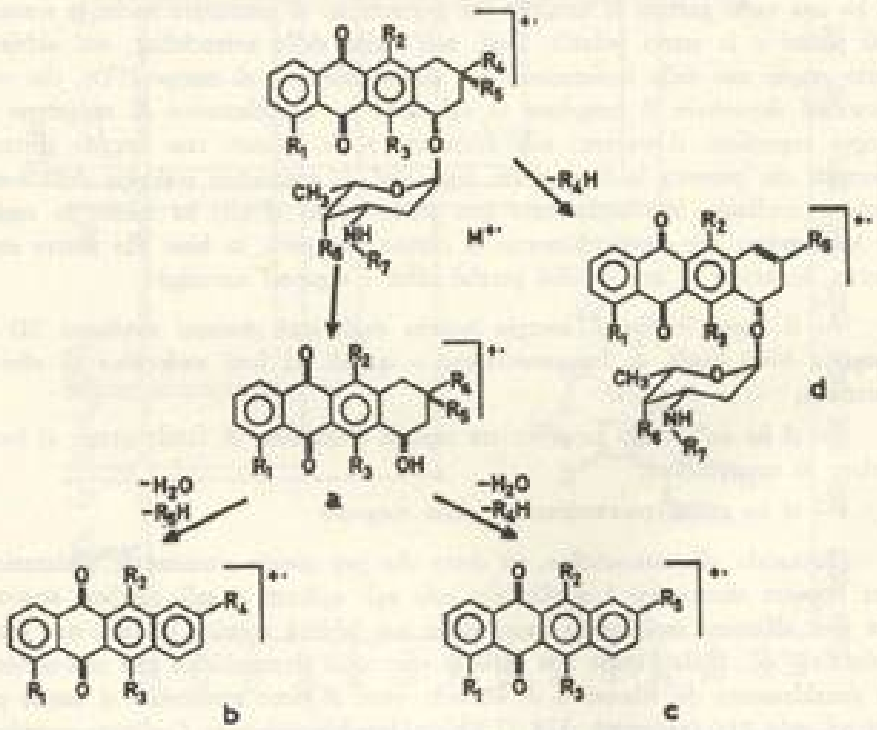


Fig. 8 - Schema di frammentazione della antracicline mediante ionizzazione FD.

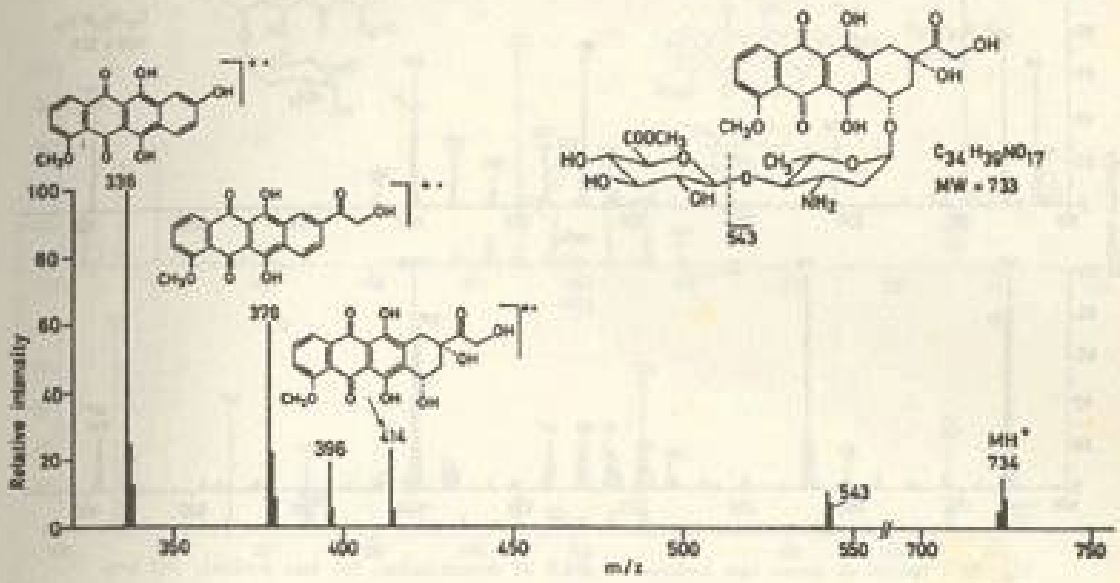


Fig. 9 - Spettro di massa con ionizzazione FD dell'estere metilico della 4'-O-(β-D-glucuronil)-epirubicina.

sponde infatti alla minore tossicità osservata nel corso della sperimentazione clinica.

Data l'importanza recentemente assunta dalla ionizzazione FAB che consiste nell'energizzare il campione, in soluzione o sospensione di glicerolo con atomi neutri di Xenon, abbiamo applicato questa tecnica alle antracicline. Nella parte superiore della Figura 10 si ha lo spettro di massa degli ioni positivi di daunorubicina: lo ione molecolare $M^{+\cdot}$ è assente e lo ione MH^+ non è molto intenso; l'andamento della frammentazione (Figura 11) mostra variazioni significative rispetto a quella FD. Infatti in questo caso i frammenti agliconici generalmente non conservano l'atomo di ossigeno al C-7, originando gli ioni *e* ed *f*, che perdono successivamente la catena laterale oppure una molecola d'acqua per dare gli ioni *e*1, *e*2, *f*1 ed *f*2. Nella regione delle masse inferiori si hanno altri utili picchi derivanti dalla daunosammina: quello ad m/z 148 corrisponde allo zucchero protonato; perdite successive di H_2O ed NH_3 danno gli ioni 130 e 113. Nello spettro di massa FAB ad ioni negativi, di cui si vede come esempio quello della doxorubicina (Figura 12), lo ione molecolare M^- ha intensità simile a quello dello ione MH^+ nello spettro degli ioni positivi; d'altra parte la frammentazione è alquanto ridotta e sono presenti solo ioni intensi corrispondenti all'aglicone senza un atomo di ossigeno (m/z 398) e senza una molecola d'H_2O (m/z 396). Mancano frammenti glucidici e la zona a masse inferiori è dominata dai picchi del glicerolo e da quelli d'interazione del glicerolo con gli ioni cloruro derivanti dall'acido cloridrico delle antracicline (m/z 127, 129, 219 e 221). Sia negli spettri

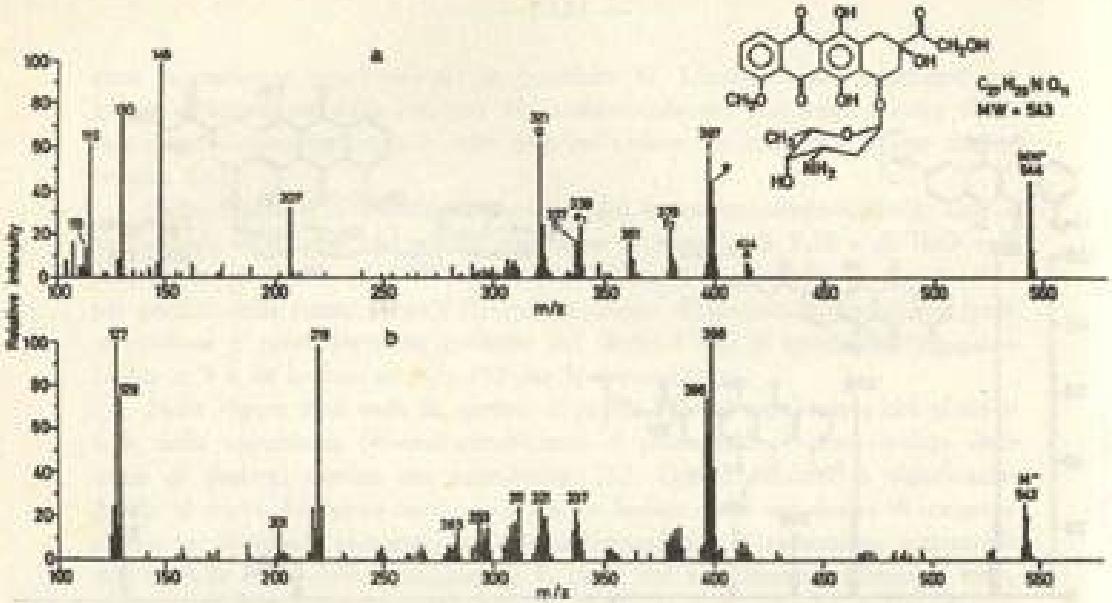


Fig. 10 - Spettri di massa con ionizzazione FAB di doxorubicina; (a) ioni positivi; (b) ioni negativi.

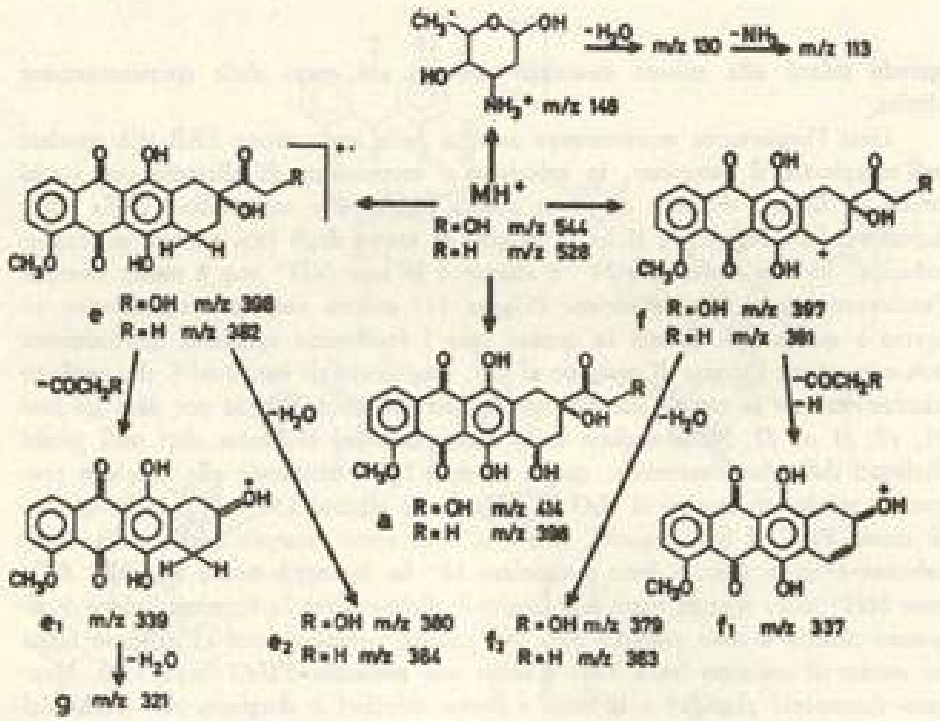


Fig. 11 - Schema di frammentazione delle antracicline mediante ionizzazione FAB.

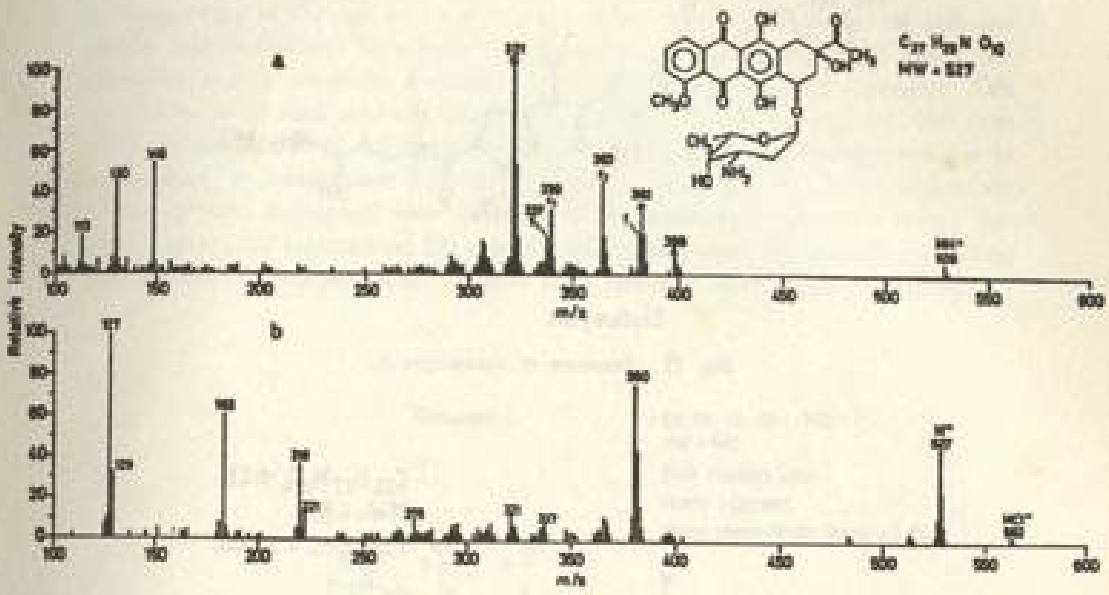
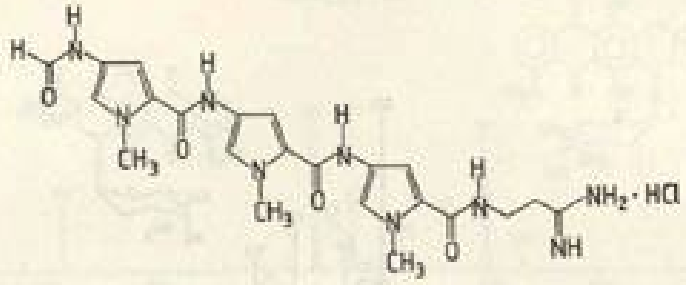


Fig. 12 - Spettri di massa con ionizzazione FAB di daunorubicina; (a) ioni positivi; (b) ioni negativi.

a ioni positivi che negativi la frammentazione è più estesa che in FD; perciò la ionizzazione FAB è meno adatta di quella FD per determinare i pesi molecolari delle antracicline, tuttavia fornisce utili informazioni strutturali a patto che si registrino gli spettri sia degli ioni positivi che di quelli negativi, che forniscono informazioni complementari.

Abbiamo applicato [8] varie tecniche di ionizzazione anche ai derivati della distamicina A, un oligopeptide pirrolico naturale dotato di attività antivirale, che forma complessi reversibili col DNA (affinità per le sequenze A-T) (Fig. 13). Anche in questo caso la ionizzazione per impatto elettronico non dà risultati significativi. Nel caso della ionizzazione FD della distamicina A (Figura 14) i frammenti più intensi derivano dalla perdita di NH_3 e dalla perdita della catena laterale propionammidica dello ione molecolare. Lo spettro FD è dominato da frammenti di origine termica e la labilità della molecola appare dovuta al residuo ammidinico. Lo spettro FAB degli ioni positivi (Figura 15) fornisce informazioni più chiare sul peso molecolare; infatti lo ione molecolare protonato è il picco base; inoltre lo ione $[M-NH_3]^{+\cdot}$ è assente e si ha un maggior numero di frammenti derivanti dalla rottura dei legami peptidici, come già osservato negli spettri FAB di oligopeptidi. Non si hanno effetti termici e la frammentazione ha andamento regolare.

E' stato registrato anche lo spettro DCI (desorption chemical ionization: si opera depositando su un filamento di tungsteno la soluzione metanolica della sostanza e riscaldando nella sorgente dello spettrometro di massa in presenza di un gas reagente [ammoniaca o isobutano]). In Figura 16 si vede lo spettro DCI che



Distamycin

Fig. 13 - Struttura di distamicina A.

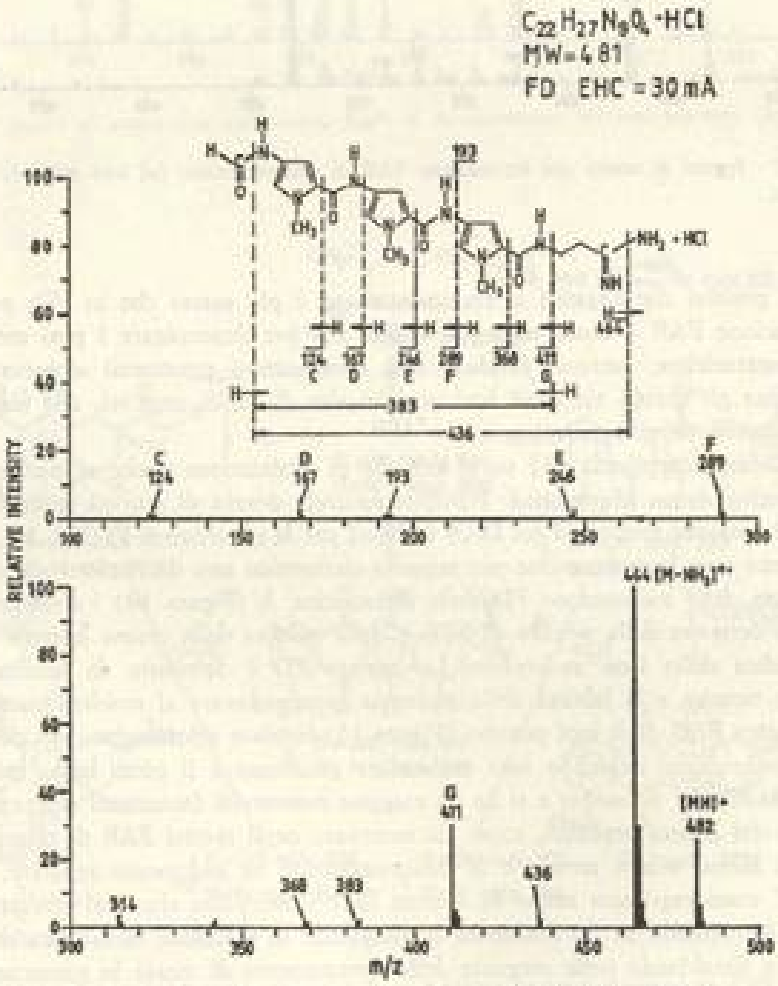


Fig. 14 - Spettro di massa con ionizzazione FD di distamicina A.

è simile a quello FD: gli ioni a 429 e 411 dalton sono molto intensi ed indicano che la frammentazione ha origine termica. L'unica differenza è che si hanno addotti con lo ione ammonio, a causa dell'uso di ammoniaca come gas reagente. Tali addotti sono formati solo dai frammenti e non dallo ione molecolare. Nel caso della distamicina A (e dei suoi derivati), al contrario di quanto osservato per le antracicline, la ionizzazione FAB è più utile per determinare il peso molecolare perché gli ioni molecolari sono intensi e la frammentazione dovuta a effetti termici è scarsa. La ionizzazione FD e quella DCI sono invece più convenienti, grazie alla più estesa frammentazione, quando sono richieste informazioni strutturali.

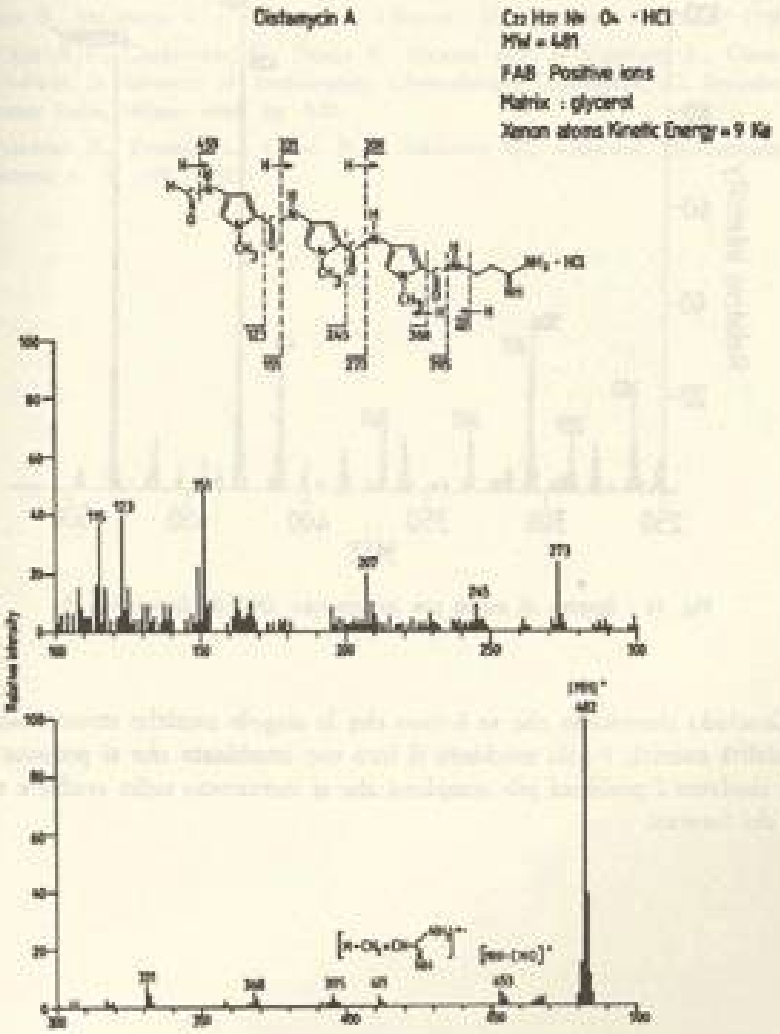


Fig. 15 - Spettro di massa con ionizzazione FAB di distamicina A.

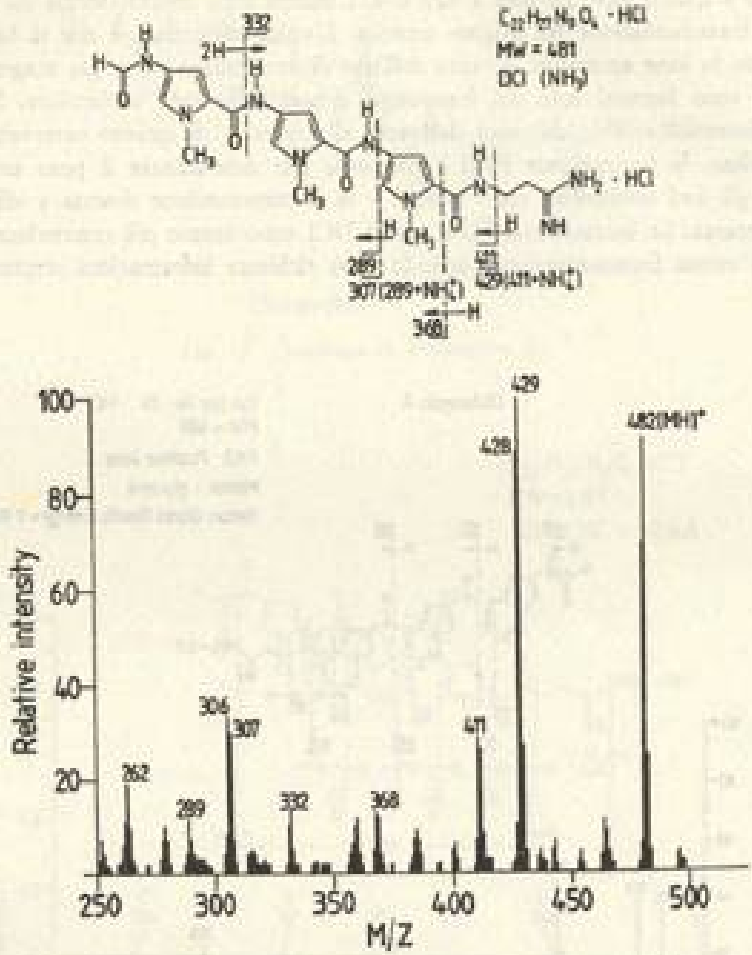


Fig. 16 - Spettro di massa con ionizzazione DCI di distamicina A.

Concludo ricordando che se è vero che le singole tecniche strumentali hanno potenzialità enormi, è solo mediante il loro uso combinato che si possono affrontare e risolvere i problemi più complessi che si incontrano nello studio e nel controllo dei farmaci.

BIBLIOGRAFIA

[1] SCRIP, N° 952, 26 novembre 1984, p. 15.

[2] Borman S., « Analyt. Chem. », *59*, 969 A (1987).

[3] Pella E. e Restelli R., « Microchim. Acta », *65* (1983).

[4] Cassinelli G., Ballabio M., Arcamone F., Casazza A.M. e Podestà A., « J. Antibiotics », *38*, 856 (1985).

[5] Perrone E., Alpegiani M., Bedeschi A., Borghi D., Giudici F. e Franceschi G., « J. Org. Chem. », *51*, 3413 (1986).

[6] Gioia B., Arlandini E. e Vigevani A., « Biomed. Mass. Spectrom. », *11*, 35 (1984).

[7] Arcamone F., Cassinelli G., Penco S., Vicario G.P. e Vigevani A., *Chemistry of Epirubicin*, in *Advances in Anthracycline Chemotherapy: Epirubicin*, (G. Bonadonna ed.) Masson Italia, Milano 1984, pp. 3-28.

[8] Arlandini E., Franzoi L., Gioia B. e Sollazzo G., « Biomed. Environment. Mass Spectrom. », *16*, 419 (1988).