

12
2ef



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION
DE METOPROLOL."

Trabajo Monográfico de Actualización
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a
MARIA IRMA BALDERAS BRAVO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

Capítulos	Pág.
Objetivo	1
Resumen	2
I. Introducción	3
II. Generalidades	5
Monografía del Metoprolol	21
III. Métodos Analíticos	34
Cromatografía Líquida de Alta Resolución	37
Cromatografía de Gases	56
Espectrofotometría de Masas	68
Cromatografía de Capa Fina	78
Espectroscopía de Fluorescencia	85
IV. Recomendaciones	93
V. Bibliografía	96

OBJETIVO.

Realizar una revisión bibliográfica del Metoprolol, que marque sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como las acciones adversas en su administración, su control analítico y pruebas que aseguren la - - calidad del producto.

RESUMEN.

En el presente trabajo se lleva a cabo una revisión bibliográfica en la que se resumen las propiedades físicas, químicas y farmacológicas del Metoprolol (Cap. II), así como sus usos y compuestos derivados, se presenta un bosquejo cronológico y estudio exhaustivo de los métodos analíticos para su determinación, así como la información básica para su control de calidad (Cap. III).

Se establecen las causas por las cuales se eligen - cada uno de los métodos para las diferentes determinaciones, tomando en cuenta las fuentes de obtención de las - muestras, el tratamiento apropiado para cada una de - ellas y la relación de su estructura química con sus metabolitos, desde el punto de vista de su acción farmacológica.

I

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION.

El Metoprolol, se encuentra clasificado entre los - agentes bloqueadores de los receptores Beta₁ adrenérgicos selectivos, ofrece características especiales de bronco-- protección y vasoprotección, esto es, afecta en una pro-- porción mucho menor el tono vascular periférico y el de - la musculatura bronquial, controla de manera selectiva - los estímulos adrenérgicos protegiendo eficazmente al co-- razón, éstas propiedades farmacológicas hacen que repre-- sente un nuevo tipo de cardioprotector, especialmente - - adecuado para el tratamiento de la hipertensión arterial.

Presenta menor frecuencia de efectos adversos y su - acción es más prolongada.

Respecto a este tema es poca la información que se - encuentra en los libros de consulta, principalmente en lo que se refiere a los aspectos farmacológicos y métodos - analíticos para su determinación, mismos que constituyen-- los objetivos primarios a desarrollar en el presente estu-- dio monográfico, bajo el plan que se indica en el contex-- to.

II

GENERALIDADES

GENERALIDADES.

Muchas sustancias activas de diferente estructura y mecanismo de acción, interfieren en la función del sistema nervioso simpático.

Varias de estas sustancias son sumamente valiosas en la medicina clínica, especialmente para el control de la hipertensión y los desórdenes cardíacos. (14).

Existen bloqueadores de los receptores adrenérgicos o colinérgicos de acuerdo a la transferencia química, los agentes bloqueadores no previenen la medición de la respuesta, éstos sólo previenen el acceso de los mediadores a los receptores.

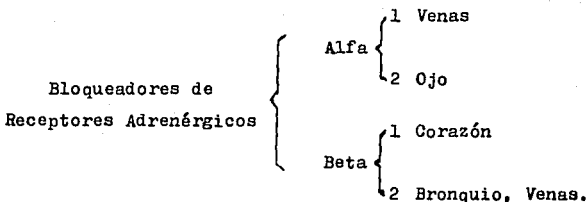
Posiblemente los bloqueadores tienen una afinidad por la estructura química del receptor, formando una combinación química con dicho receptor ocupando el sitio, donde se encuentra normalmente el transmisor, como la sensibilidad farmacológica de los receptores adrenérgicos varía considerablemente, estos agentes pueden interferir selectivamente en las diferentes respuestas, que están normalmente mediadas por el sistema nervioso simpático.

La reacción entre el bloqueador, receptor y transmisor, puede o no estar en equilibrio.

Si la reacción está en equilibrio, el efecto del bloqueador puede estar sobre más transmisor o más fármaco, este tipo de reacción se llama COMPETITIVA. (Fig. 1)

Si la reacción no está en equilibrio, el efecto no se lleva fácilmente por el intercambio de más transmisor o más fármaco, ésta reacción es llamada NO COMPETITIVA. - - (Fig. 2).

Según Ahlquist y Levy en 1959, (14) los bloqueadores de receptores adrenérgicos se clasifican en:



Agentes bloqueadores Alfa-adrenérgicos.

Estos bloqueadores se unen selectivamente a la clase Alfa de receptores adrenérgicos y así interfieren en la capacidad de las aminas simpaticomiméticas para iniciar acciones en éstos sitios.

Existen prominentes diferencias en la capacidad relativa de los agentes bloqueadores Alfa-adrenérgicos para antagonizar los efectos de las aminas simpaticomiméticas en los dos subtipos de alfa-receptores.

El bloqueo Alfa-adrenérgico se debe a una acción directa de estas sustancias activas sobre alfa-receptores y es independiente de cualquier efecto sobre las neuronas adrenérgicas y de los mecanismos básicos de respuesta de las células efectoras, más allá de las terminales nerviosas (postsinápticamente), bloqueando la acción vasoconstrictora de la epinefrina o de la norepinefrina.

El bloqueo Alfa-adrenérgico, se ha empleado o sugerido como tratamiento en estados muy diferentes; ejemplo: la fenoxibenzamina, es unas 100 veces más potente para bloquear receptores alfa₁, que, para los receptores alfa₂ modulando la liberación neuronal de transmisor; al contrario, la yohimbina es un bloqueador selectivo alfa₂, impidiendo los efectos antihipertensivos de la clonidina (14).

Es muy posible que la aplicación clínica de estas sustancias activas esté siempre severamente limitada, por el hecho de que las vías simpáticas eferentes que operan mediante receptores Alfa-adrenérgicos son fundamentales para los reflejos cardiovasculares, que permiten al hombre funcionar como bípedo, y a menudo es difícil, calcular los beneficios terapéuticos del bloqueo, tomando en cuenta las desventajas de interrumpir esta función regulatoria esencial.

Sin embargo se han establecido en algunos casos lo siguiente.

Las respuestas clínicas más favorables al bloqueo Alfa-adrenérgico, se dan cuando existe un gran componente de vasoconstricción adrenérgica: Síndrome de Raynaud y acrocianosis. Son estados menos comunes y peligrosos que la enfermedad arterial oclusiva.

Además se ha demostrado que el bloqueo Alfa-adrenérgico es beneficioso en la insuficiencia cardíaca con edema pulmonar, y en infarto agudo del miocardio donde el dolor puede acentuar la vasoconstricción. (14).

Agentes bloqueadores de los receptores Beta-adrenérgicos.

Los agentes bloqueadores de los receptores Beta-adrenérgicos han sido objeto de gran interés en la última década por su utilidad en el tratamiento de trastornos cardiovasculares, que incluyen: hipertensión, angina pectoris y arritmias cardíacas.

La primera sustancia activa que produjo un bloqueo selectivo probado de receptores Beta-adrenérgicos fué, el dicloroisoproterenol (DCI), (1858); el Propranolol fué el primer antagonista Beta-adrenérgico que se usó ampliamente en la clínica.

Entre los agentes bloqueadores de los receptores Beta-adrenérgicos relativamente, no selectivos figuran: propranolol, alprenolol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, sotalol y timolol.

Entre los agentes bloqueadores Beta₁-adrenérgicos - selectivos están: metoprolol, atenolol, acebutolol y tola molol. Es importante mencionar que la selectividad de los bloqueadores beta₁ no es absoluta; dosis mayores de estos compuestos inhiben a todos los receptores Beta-adrenérgicos.

Casi todos los agentes bloqueadores de los receptores Beta-adrenérgicos más efectivos, pueden considerarse derivados del agonista del receptor beta, isoproterenol.

La semejanza estructural entre los agonistas de los receptores beta y los antagonistas de los mismos, es más estrecha que en el caso de sustancias que actúan en los - receptores alfa. La cadena lateral con un sustituyente - isopropilo o más voluminoso en la amina parece favorecer la interacción con los receptores beta. La naturaleza de los sustituyentes del anillo aromático determina si el - efecto es principalmente de activación o de bloqueo.

Estos sustituyentes afectan también la cardioselecti- vidad. El hidroxilo alifático parece ser esencial para la actividad, da a la molécula actividad óptica y las formas levóginas de agonistas y antagonistas beta-adrenérgicos - son mucho más potentes que las formas dextróginas.

Esta diferencia es útil para distinguir los efectos del bloqueo de beta-receptores de los de otras acciones - farmacológicas de la molécula.

Gran parte de la farmacología del bloqueo beta-adrenérgico puede deducirse del conocimiento de las funciones desempeñadas por los receptores correspondientes.

Agentes bloqueadores Beta-adrenérgicos no selectivos; el propranolol, es uno de estos; los efectos más importantes de las sustancias bloqueadoras Beta-adrenérgicas se ejercen sobre el sistema cardiovascular, debido principalmente a acciones sobre el corazón. Los efectos cardíacos del bloqueo Beta-adrenérgico se reflejan a menudo en cambios de la excreción de sodio. El cuadro diurno normal se invierte, como en los pacientes con moderada insuficiencia del miocardio, y hay un lento ajuste a un nuevo estado basal o de equilibrio con aumento del sodio total del organismo y del volumen líquido extracelular.

Estos efectos son más evidentes en pacientes con alguna insuficiencia preexistente del miocardio. Estos son por lo tanto resultados probablemente de cambios hemodinámicos intrarenales que forman parte de la adaptación al menor gasto cardíaco. La magnitud del efecto parece ser paralela a la dependencia del corazón con respecto a la estimulación adrenérgica para mantener una función adecuada.

Los agentes bloqueadores Beta-adrenérgicos pueden modificar considerablemente el metabolismo de los hidratos de carbono y las grasas.

Casi todos los efectos de las catecolaminas en el metabolismo de los hidratos de carbono y las grasas están mediados por receptores beta y cambios de actividad de -- adenilato ciclase, con una consiguiente producción de - 3',5' monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico).

Los agentes bloqueadores adrenérgicos que inhiben - las respuestas metabólicas actúan sobre esta secuencia de eventos.

Los principales peligros de la terapéutica con sus-- tancias bloqueadoras Beta-adrenérgicas tienen relación - con el bloqueo perse. La depresión cardíaca seria, no es común, pero la insuficiencia cardíaca puede desarrollarse súbita o lentamente, por lo general en pacientes - corazones están severamente comprometidos por enfermedad o por otras sustancias (anestésicos).

La administración de un bloqueador Beta-adrenérgico, hace a los pacientes, susceptibles a un síndrome de reti-- ro, que puede deberse a supersensibilidad de los recepto-- res Beta-adrenérgicos (debida a su vez hipotéticamente, a cambios adaptativos del número de receptores).

Algunos pacientes pueden experimentar una severa exa - cerbación de los ataques anginosos y se ha producido in-- farto del miocardio. Otro peligro importante del bloqueo Beta-adrenérgico es el aumento de resistencia de la vía - aérea, que puede ser de riesgo mortal; en los asmáticos - (26).

El Metoprolol se administra a menudo combinado con otras sustancias de acción antihipertensiva, angina de pecho, postinfarto, y arritmias cardiacas.

Los bloqueadores Beta-adrenérgicos (Metoprolol), protegen al corazón, disminuyendo la presión arterial, teniendo como consecuencia una reducción en el consumo de oxígeno, protegiendo de ésta manera al miocardio de las descargas adrenérgicas durante el ejercicio ó durante los períodos de estrés.

Esta propiedad farmacológica y algunas otras, nos llevan a escribir más adelante, una breve reseña de la fisiología del corazón y a definir, algunos de los transtornos más comunes de éste.

El corazón es un órgano muscular hueco, centro del aparato circulatorio. Constituido por una red de conductos, que transportan la sangre desde el corazón hasta los diversos tejidos del cuerpo y después regresan al mismo.

El corazón se localiza de manera oblicuo entre los pulmones y forma parte del mediastino. Al corazón lo envuelve y fija en su sitio, el pericardio, estructura -- ingeniosa cuya finalidad es la de mantener al corazón en su posición mediastínica, al mismo tiempo que le da libertad de movimiento suficiente para que lleve a cabo -- sus funciones.

La pared del corazón se divide en tres capas: El Epicardio, el Miocardio y el Endocardio.

El Epicardio, es la parte delgada, transparente y más externa de la pared cardiaca, consiste de tejido - seroso y mesotélio.

El Miocardio o tejido muscular cardiaco, constituye la mayor parte de la masa del corazón. Sus fibras son in voluntarias estriadas y ramificadas y están dispuestas - en forma de haces de fibras entrelazadas.

Es el tejido que se encarga de la contracción cardiaca. El flujo de sangre que penetra por numerosos vasos al miocardio, recibe el nombre de circulación coronaria.

El endocardio, es la capa delgada de endotelio, que está sobre puesta a otras, igualmente delgada de tejido conectivo. Reviste la cara interna del miocardio y cubre las válvulas del corazón y los tendones que las mantienen abiertas. Es continuación del revestimiento endotelial de los grandes vasos del corazón.

El interior del corazón, está dividido en cuatro ca vidades, que reciben la sangre circulante. Las dos superiores, son las aurículas izquierda y derecha y las dos inferiores son los ventrículos derecho e izquierdo.

La sangre fluye al corazón desde las venas cavas - inferior y superior así como del seno coronario, a la -

aurícula derecha; por la válvula tricúspide al ventrículo derecho; por el tronco pulmonar a los pulmones; por las venas pulmonares a la aurícula izquierda por la válvula bicúspide al ventrículo izquierdo y sale del corazón - - hacia la aorta.

La circulación coronaria o cardiaca transporta sangre oxigenada por el sistema arterial del miocardio, la sangre desoxigenada, regresa a la aurícula derecha por medio del seno coronario.

Las complicaciones de los trastornos de este sistema, son la angina de pecho y el infarto del miocardio.

El ciclo cardiaco, consiste en la sístole (contracción) y diástole (relajación) de ambas aurículas, más la sístole y diástole de ambos ventrículos, seguidos de una breve pausa.

La sangre fluye por el corazón de un área de mayor presión a otra en que es menor.

Las fases del ciclo cardiaco son:

- a) Sístole auricular
- b) Diástole auricular
- c) Sístole ventricular
- d) Diástole ventricular

El movimiento de la sangre por el corazón, esta regulado por la apertura y cierre de las válvulas, así como - la relajación y contracción del miocardio.

El gasto cardiaco, es el volumen de sangre que se expulsa del ventriculo izquierdo hacia la aorta por minuto.

Algunos factores que influyen en la frecuencia cardiaca, incluyen a sustancias químicas (Adrenalina, Sodio y Potasio), temperatura, emociones, género y edad.

El registro de los cambios eléctricos que ocurren durante el ciclo cardiaco es el electrocardiograma (ECG).

El electrocardiograma normal consiste en onda P, que corresponde a la diseminación del impulso desde el nodo sinoauricular por las aurículas; complejo QRS (diseminación del impulso por los ventrículos) y onda T (repolarización ventricular).

El intervalo P-R corresponde al tiempo de conducción desde el inicio de la excitación auricular hasta el de la excitación ventricular.

El segmento S-T representa el tiempo que hay entre el término de la diseminación del impulso por los ventrículos y la repolarización de los mismos.

El electrocardiograma es una herramienta invaluable en el diagnóstico de ritmos y patrones de conducción cardiacos anormales: confirmación de que continúa la vida fetal, identificación de la presencia de varios fetos y vigilancia de la recuperación de ataques cardiacos.

Diagnóstico de cardiopatías.

El diagnóstico de cardiopatías puede ser intracorporal o extracorporal.

Una técnica intracorporal es el cateterismo cardiovascular, con que se miden las presiones y concentraciones de oxígeno, funcionamiento ventricular y gasto cardiaco, - además de localizar lesiones, inyectar enzimas que disuelvan coágulos y dilatar los vasos coronarios.

Una nueva técnica extracorporal es la ecocardiografía, en que se transforman ondas sonoras en imágenes con que se detecta la presencia de líquido alrededor del corazón, y - se evalúan los efectos de las arteriopatías coronarias.

Trastornos.

La arteriopatía coronaria es un padecimiento en que - el miocardio recibe un volumen deficiente de sangre como - resultado de aterosclerosis, arterioespasmo coronario o -- presencia de trombos o émbolos. Suele tratarse con farmaco terapia o intervenciones quirúrgicas.

Los defectos cardiacos congénitos incluyen coartación de la aorta, conducto arterioso permeable, defectos septales (de los tabiques) estenosis valvular y tetralogía de - Fallot.

Las arritmias dan por resultado bloqueo cardiaco, - - aleteo y fibrilación.

La insuficiencia cardiaca congestiva surge cuando el corazón no satisface las necesidades de oxígeno corporales.

El cor pulmonale consiste en la hipertrofia ventricular derecha consecutiva a hipertensión pulmonar.

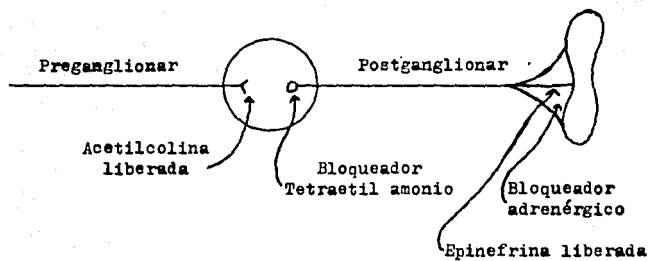


Fig. 1. Sitio de acción de agentes bloqueadores.

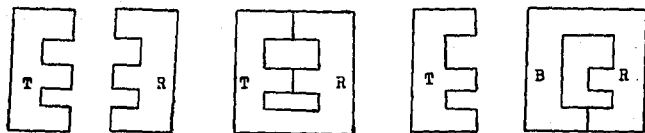


Fig. 2. Diagrama de Interacción entre el, Transmisor (T), Receptor (R) y Bloqueador (B).

MONOGRAFIA

DEL METOPROLOL

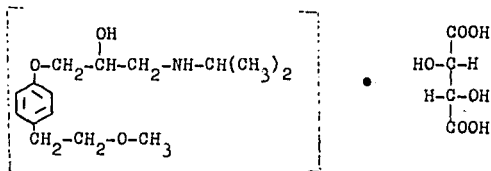
Metoprolol.

Nombres químicos y sinónimos:

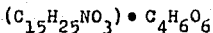
1-4(2-Metoxietil) fenoxi -3-(1- metiletil) amino-2-propanol
 (+)-1-(isopropilamino)-3-[4-(2-metoxietil)-fenoxi]-2-propanol
 tartrato de (+) -1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3[-(1-metiletil)
 amino]-2- propanol.

Beloc, Betaloc; Lopresor; Seloken; Proken M; Ritmolol.

Fórmula desarrollada:



Fórmula molecular:



Peso molecular:

684.8

Descripción:

Polvo blanco, inodoro ó casi inodoro.

pKa:

9.7

Temperatura de fusión:

Alrededor de 120 °

Solubilidad:

Disolvente	Término Descriptivo	Partes del Disolvente requerido por una parte de soluto.
Agua	Muy soluble	Menos de 1
Cloroformo	Soluble	De 10 a 30
Cloruro de Metilo	Soluble	De 10 a 30
Etanol	Soluble	De 10 a 30
Acetona	Ligeramente soluble	De 100 a 1000
Benceno	Casi insoluble	De 10000 a más
Eter	Casi insoluble	De 10000 a más

Ensayos de Identidad:

Pruebas de color; reacción de Liebermann (coloración rosa-café); reacción de Mandelin (coloración rosa-café); reacción de Marquis (coloración rosa). (51).

Espectro de Absorción Infrarroja:

Pesar con precisión una cantidad del patrón de referencia equivalente a 10 mg de Tartrato de Metoprolol, -- transferir a un embudo de separación, agregar 25 ml de agua, 4 ml de la solución de hidróxido de amonio (1:3) y extraer con 20 ml de cloroformo, filtrar la capa orgánica a través de sulfato de sodio anhidro previamente lavado con cloroformo. Evaporar a sequedad y refrigerar para congelar el residuo.

La dispersión en bromuro de potasio del residuo obtenido, presenta los siguientes máximos: 1510, 1245, 1108, 1028, 1175, 810 cm^{-1} . (ver figura 1). (51).

Espectro de Absorción Ultravioleta:

Pesar con precisión una cantidad del patrón de referencia equivalente a 25 mg de Tartrato de Metoprolol, -- transferir a un matraz volumétrico de 25ml, disolver y llevar a volumen con la solución de ácido clorhídrico (0.1 N) y mezclar.

Transferir a un embudo de separación una alícuota de 10 ml de la muestra, 10 ml de la solución de ácido clorhídrico (0.1 N) y 2 ml de la solución de hidróxido de sodio (2.5 N), extraer con 3 porciones de 25 ml cada una de cloroformo, pasar cada extracto a través de lana de vidrio previamente lavada con cloroformo, coleccionar los extractos en un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con cloroformo y mezclar.

Esta solución exhibe un máximo a 274 nm ($\lambda_{\text{máx}} = 52$) y presenta una inflexión cerca de 280 nm. (51).

Cromatografía en capa fina:

Sistema TA- con un R_f de 49; sistema TB- con un R_f de 08; sistema TC- con un R_f de 08. (52).

Cromatografía de Gases:

Sistema GA - RI 2010. (52).

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución:

El tiempo de retención relativo, obtenido en el cromatograma para la preparación de referencia, corresponde al obtenido para la preparación de la muestra para la valoración del Tartrato de Metoprolol; el cual es de aproximadamente 0.8 . (46, 51, 52).

Espectrofotometría de Masas:

Picos principales m/z 72, 30, 107, 56, 45, 41, 44, 43. (52).

Rotación óptica:

+ 6.5° a + 10.5°, determinada a 20°, (solución - 200 mg/10 ml).

Determinación de pH:

6.0 a 7.0 (solución 1 %).

Pérdida por secado:

No más de 0.5%, secar 4 horas al vacío a 60°C.

Residuo de la Ignición:

No más de 0.1 %.

Metales Pesados:

Método I. No más de 10 ppm.

Determinación de Arsénico:

Método I. No más de 2 ppm.

Substancias Relacionadas:

La suma de las impurezas en el cromatograma, no es mayor del 1.0 % .

Valoración:

Disolver alrededor de 280 mg de la muestra en 20 ml de ácido acético glacial y titular con solución 0.1 N de ácido perclórico. Determinar potenciométricamente el punto final, utilizando un electrodo de vidrio o uno de calomel conteniendo ácido acético glacial, saturado con cloruro de Litio. Hacer la determinación de un blanco y las correcciones necesarias. Cada ml de solución 0.1 N - de ácido perclórico equivale a 34.24 mg de $(C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6$.

Especificaciones:

No menos del 99.0 % y no más del 101.0 % de Tartrato de Metoprolol, calculado en base seca.

Absorción; Distribución y Excreción:

Después de la administración oral, tiene una biodisponibilidad cerca del 50 %, la cual sufre metabolismo de primer paso en el hígado.

Cerca del 95 % de la dosis es excretada en la orina después de 48 hrs. de la administración; en donde alrededor del 65 % de la dosis se excreta como el metabolito, inactivo 4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi) del ácido fenil acético y alrededor del 10 % como 2-hidroxi-3- 4-(2-metoxietil) fenoxi del ác. propiónico. Al igual que otros dos metabolitos activos son excretados también: el α -hidroximetoprolol y O-dimetilmetoprolol en cantidades equivalentes al 10 % y menor del 1 % de la dosis respectivamente. Así mismo menos del 10 % de la dosis del medicamento se excreta inalterada.

Mecanismo de Acción:

Inhibe de modo selectivo y reversible la transmisión de los estímulos a los receptores cardiacos B_1 . -- Carece de actividad simpaticomimética intrínseca que baja la tensión arterial se desconoce que cauce trastornos electrolíticos, regula la frecuencia del pulso en caso de taquicardias supraventriculares, aleteo auricular y de extrasístoles ventriculares.

Su efecto antirrítmico se basa en que inhibe el automatismo de las células marcapasos y alarga el tiempo de conducción auriculoventricular. Disminuye la mortalidad en pacientes con infarto del miocardio supuesto o confirmado. (8).

Usos terapéuticos:

El Metoprolol es un eficaz antihipertensivo en la enfermedad leve o moderada, en el tratamiento de insuficiencia coronaria aguda, crónica, angina de pecho e infarto del miocardio, algunas arritmias cardíacas, tratamiento profiláctico de la migraña.

Dosis y Preparaciones:

Oral: Para angina, 50 mg 3 ó 4 veces al día, la administración cada 12 hs. puede ser efectiva en algunos pacientes con angina estable. Se puede continuar con la administración sublingual de nitratos de acción prolongada, si es necesario, durante la terapia con metoprolol.

Para profilaxis a largo plazo posterior al infarto agudo del miocardio 100 mg cada 12 hs. Para pacientes quienes recibieron metoprolol intravenoso durante la terapia, en la fase aguda del infarto del miocardio, la terapia oral puede iniciarse 15 min. después de la última dosis intravenosa; inicialmente 25 ó 50 mg se -----

administran oralmente cada 6 hs. durante dos días, seguida de una dosis de mantenimiento con 100 mg cada 12 hs.

Intravenosa: Para el tratamiento temprano del infarto agudo del miocardio, inicialmente se administrarán 3 inyecciones de 5 mg durante intervalos de 2 min. cada una. Deberá monitorearse la presión sanguínea, el bombeo del corazón y realizarse un ECG.

Las Preparaciones que contienen Tartrato de Metoprolol de uso común, están enlistadas en la Tabla I.

Toxicidad:

El tiempo de vida media en plasma del metoprolol es de 2 a 7 hs. con un promedio de 3 hs.; el α -hidroximetoprolol de 4 a 12 hs. con una media de 6 hs.

El volumen de distribución es aproximadamente 4 l/Kg.

La Liberación en plasma, es cerca de 13 ml/min/Kg. La distribución en sangre, específicamente en plasma presenta un volumen de 0.77.

La unión a proteínas en plasma es alrededor del 12 %.

La sobredosificación puede causar hipotensión y bradicardia intensa, en cuyo caso se administrará sulfato de atropina (intravenosamente) y si el efecto es insuficiente, se emplearán sustancias hipertensoras.

Contraindicaciones:

El Metoprolol no deberá utilizarse si se presentan: un bloqueo atrio ventricular de segundo y tercer grados, bloqueo de rama, bradicardia pronunciada, insuficiencia-cardíaca refractaria a la digitalización, choque cardiogénico, (los bloqueadores no deberán prescribirse a embarazadas, mientras no se disponga de experiencia suficiente), obstrucción bronquial, insuficiencia arterial periférica severa y retardo en la conducción A-V.

No deberá combinarse con antagonistas del calcio - (31), pues puede originarse bradicardia, hipotensión e - incluso paro cardíaco.

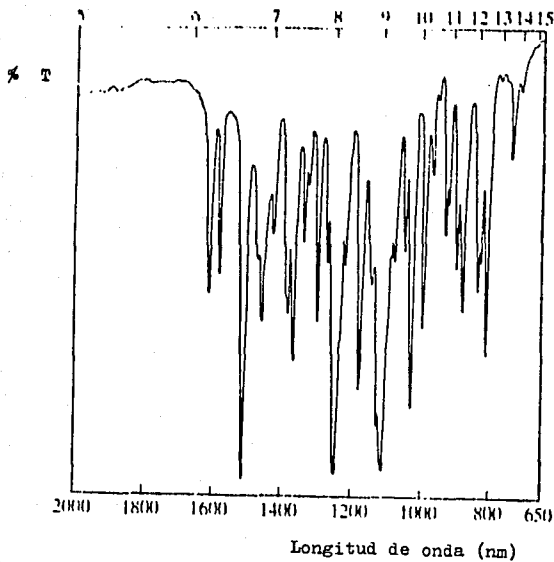


Fig. 1. Espectro de Absorción Infrarroja. Dispersión en bromuro de potasio del residuo tratado, cuyos máximos son principalmente: 1510, 1245, 1108, 1028, 1175, 810 cm^{-1} . (51).

MEDICAMENTOS REPORTADOS EN EL DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS (43), QUE CONTIENEN TARTRATO DE METOPROLOL.

NOMBRE DEL PRODUCTO	FORMA FARMACEUTICA	FORMULA	USO TERAPEUTICO	LABORATORIO
LOPRESOR 100	Comprimidos	100 mg.	Beta-Bloqueador Cardioselectivo	Ciba-Geigy Mexicana, S.A. de C.V.
PROKEN M	Comprimidos	100 mg.	Bloqueador B-Adrenérgico	Kendrick, S.A.
RITMOLOL	Comprimidos	100 mg.	Bloqueador B-Adrenérgico	Crysepharma, S.A. de C.V.
SELOKEN	Comprimidos	100 mg.	Bloqueador B-Adrenérgico	Astra Chemicals, S.A. - División -- Astra Farmacéutica.

III

METODOS ANALITICOS

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

CROMATOGRAFIA DE GASES

ESPECTROFOTOMETRIA DE MASAS

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

A continuación se presentan los diferentes métodos - analíticos empleados para la determinación del Metoprolol, haciendo un énfasis en las características de cada uno de ellos así como las investigaciones realizadas para las diferentes muestras tratadas, con el fin de identificar y/o cuantificar dicha sustancia, así como sus metabolitos.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las ramas más nuevas de la química analítica cuyo crecimiento ha sido muy rápido y su potencial es enorme. Es un método que sirve para separar mezclas químicas (principalmente orgánicas) en sus componentes individuales.

Para poder llevar a cabo la separación de una muestra-problema por HPLC, el primer paso a seguir es disolver - dicha muestra en un disolvente apropiado, el cual en forma ideal debería ser idéntico a la fase móvil. A continuación la muestra se introduce por medio de un mecanismo inyector en la parte superior de la columna. La muestra se mueve dentro de la columna por un flujo continuo de fase móvil que es impulsado por una bomba. Algunos componentes de la muestra viajan por la columna más lentamente que otros; los componentes que tienen más afinidad por la columna, tardan más en salir de la misma.

Comunmente un detector ultravioleta o de índice de refracción monitorea a los componentes cuando salen de la columna. Por último el detector transmite señales a un mecanismo de registro que grafica los datos. El cromatograma obtenido puede proporcionarnos información tanto cualitativa como cuantitativa en relación a la muestra.

En la figura 1 se muestran los componentes básicos que integran un sistema de HPLC.

Con el paso de los años se han presentado modificaciones o cambios en los componentes que integran un sistema de HPLC.

Por ejemplo la tendencia actual es reducir el volumen de desplazamiento del pistón de la bomba (100-400 mcl), que a su vez proporciona un volumen constante de fase móvil contra -- presiones de hasta 5000 psi.

En el caso de los inyectores de septo o los de flujo dis continuo, han sido remplazados casi por completo por los -- inyectores de válvula que tienen capacidad de manejar volúmenes variables de inyección.

El detector de absorción ultravioleta con longitud de - onda fija (254 nm) se ha convertido en el detector de mayor - uso, ya que responde a muchos compuestos, además es confiable, fácil de usar y tiene una buena relación señal/ruido. Los detectores fluorescentes y ultravioletas de longitud de onda va riable también son muy populares, mientras que el detector de índice de refracción a pesar de ser el más universal, es difí cil de usar.

En realidad, la separación de los componentes ocurre, - físicamente en la columna, la cual está empacada con pequeñas partículas sólidas llamadas material de empaque o resinas.

Actualmente llaman mucho la atención los materiales de - empaque, ya sea para diversificar los tipos moleculares con - afinidad, como para aumentar la estabilidad de las partículas en la columna. En la figura 2 se muestra el diagrama de una - columna empacada.

El mayor potencial de la cromatografía líquida en comparación con la cromatografía de gases se debe a dos factores primordialmente.

El primero es que más moléculas pueden disolverse, a diferencia de las que pueden ser volatilizadas y aún retener su estructura molecular original.

Es decir, la cromatografía líquida es una técnica más suave que la cromatografía de gases y menos factible de dañar las moléculas delicadas.

La segunda gran ventaja de la cromatografía líquida es que puede manejar una gran variedad de moléculas; ionizadas y no ionizadas, de muy alto peso molecular, biológicamente activas (enzimas), entre otras.

En la Tabla 1 se enlistan los diferentes tipos de separación por cromatografía líquida, incluyendo algunas características.

En resumen, la cromatografía líquida es una innovación de la química analítica, útil para el químico orgánico y el biólogo. El campo de la química es muy extenso, ya que va desde la industria hasta la biomedicina. En la Tabla 2 se muestran algunas de las áreas de aplicación donde la cromatografía líquida es un arma analítica vital.

La aplicación de la técnica de cromatografía líquida de alta presión, (H.P.L.C.), a través de los años ha llevado a establecer su uso para separar y cuantificar los diversos compuestos.

Así de éste modo, J. Hermansson y colaboradores, (13,43) desarrollaron un método por H.L.P.C. que permite la separación y cuantificación de las formas (R) y (S) del Metoprolol (fig. 3), así como de sus derivados diastereoméricos con ayuda del reactivo N-Trifluoroacetil-L-prolina ó L-leucina.

Para cuantificar las formas R y S del Metoprolol, se llevó a cabo la determinación de las concentraciones plasmáticas de las muestras obtenidas de los sujetos a los que se les aplicó una dosis conocida del medicamento, ésto dió por resultado curvas del tipo de la figura 4.

O.Gyllenhaal y K.J. Hoffmann, (22), llevaron a cabo la determinación de un método el cual consiste en la preparación de oxazolidonas del Metoprolol, con fosgeno, controlando el pH de una muestra de orina. Observando que la influencia del pH en la preparación del Metabolito I del metoprolol, a partir de fosgeno origina una amplia diferencia en las alturas de los picos correspondientes, éstos resultados se presentan en la Tabla 3, a continuación.

La estrategia es el bloqueo de grupos funcionales en el lado de la cadena del amino propanol, por la formación de oxazolidinonas para así obtener compuestos ácidos o neutros, los cuales reaccionan con el fosgeno, como se muestra en la figura 5.

A su vez la Tabla 4 muestra el aislamiento del metoprolol y metabolitos de la fase acuosa, posterior a la ciclización con fosgeno.

Basándose en el estudio anterior G. Pflugmann y col. (38) realizaron una modificación el método, la cual consistió en el empleo del reactivo N-Trifluoroacetil-L-prolil y del anhídrido simétrico del Ter-butoxicarbonil-L-leucina, logrando así determinar simultáneamente la presencia de las formas (R) y (S) del metoprolol, en dos voluntarios sanos, a quienes se les aplicó una dosis comercial de Tartrato de Metoprolol conocida. Los porcentajes de la excreción urinaria se muestran en la Tabla 5.

Por último, se presenta un método por H.P.L.C., desarrollado por M.S. Lennard y colaboradores (28,45), el cual establece una relación entre la concentración del plasma V.S. la acción de respuesta de la oxidación del fenotipo del debrisoquine y la farmacocinética, metabolismo y acción Beta-bloqueadora del metoprolol.

Se determinaron las concentraciones en plasma y orina del metoprolol, α -hidroximetoprolol, ác. -4-(2-hidroxi-3-isopropilamino-propoxi)-fenil acético (H 117-04), enantiómeros del metoprolol por éste método, ver figuras 6 y 7.

La contribución de la oxidación del fenotipo del debrisoquine para la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de los Beta-bloqueadores, involucra rutas metabólicas como la α - Hidroxilación y la O-Dealquilación, ver figura 8.

La eliminación de los Beta-bloqueadores en el hombre, implica varias rutas metabólicas, que se emplean para dicho efecto, a continuación se presentan en la Tabla 6.

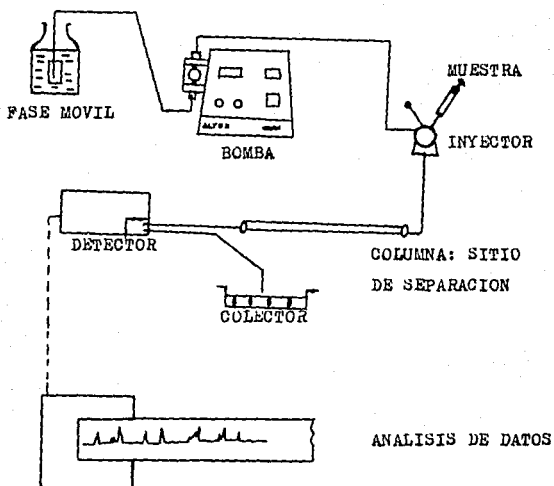


Fig. 1. Componentes básicos que integran un sistema de H.P.L.C. (29).

TABLA No. 1 TIPOS DE CROMATOGRAFIA EN HPLC

TIPO DE SEPARACION	MECANISMO	MOLECULAS QUE SE SEPARAN (algunos ejemplos)	SOLVENTES UTILIZADOS (algunos ejemplos)
Cromatografía de exclusión	Separa moléculas por tamaños. Las más grandes eluyen primero.	Desde proteínas y Carbohidratos hasta metacrilatos y neopreno.	Tolueno Dioxano Acetona, H ₂ O
FASE NORMAL	Cromatografía líquido-sólido	Adsorción.- Separa en base a polaridad. La menos polar eluye primero.	Orgánicos no ionizables (hexano)
	Cromatografía líquido-líquido (Bonded-Phase)	Partición del soluto entre 2 solvente inmiscibles. "Fase estacionaria más polar".	Polar no polar (Aqua-acetonitrilo).
	Cromatografía líquido-líquido (fase reversa).	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. "Fase móvil más polar".	Aqua con modificadores orgánicos. (Metanol)
	Cromatografía por intercambio iónico.	Iones de la muestra se intercambian con un contra-ión.	Aminoácidos Nucleótidos
			Diversos Buffers orgánicos.

Factores necesarios en
una columna con alta
eficiencia

- 1) Empaque uniforme
- 2) Flujo continuo
- 3) Tubo de diámetro uniforme
- 4) Dispersión mínima de la muestra

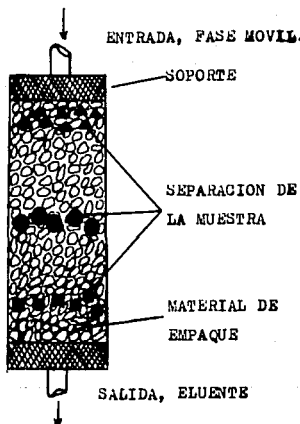


Fig. 2. Diagrama de una columna empacada.

TABLA No. 2. Areas de aplicación de H.P.L.C.

- 1.- Farmacéutica: investigación y control de calidad.
 - 2.- Clínica: monitoreo de drogas, marcadores de enfermedad, situaciones de emergencia.
 - 3.- Estudios forenses.
 - 4.- Pesticidas: investigación y control de calidad.
 - 5.- Investigación bioquímica.
 - 6.- Alimentos y bebidas.
 - 7.- Universidad: investigación y enseñanza.
 - 8.- Polímeros/Plásticos.
 - 9.- Agencias Gubernamentales.
-

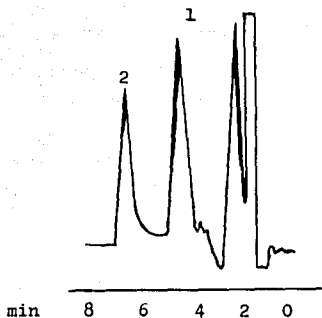


Fig. 3. Separación de los isómeros (R) y (S) del Metoprolol así como sus derivados diastereoméricos. Donde: 1= (S)-Metoprolol-L-Leucina; 2= (R)-Metoprolol-L-Leucina.

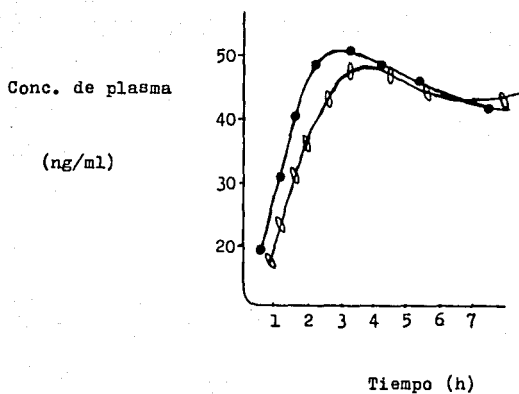


Fig. 4. Concentración en plasma V.S. Tiempo, de (R)-Metoprolol (○) y (S)-Metoprolol (●).

TABLA 3

INFLUENCIA DEL pH EN LA PREPARACION DEL METABOLITO I, CON FOSGENO, UTILIZANDO H.P.L.C.

pH inicial de la sol. sin - reaccionar.	pH final de la sol. de reacción - con fosgeno.	Altura del pico (nm)	
		Derivado (n=2)	Metabolito I sin reaccio- nar.
7.0	n.m. ^{**}	6.0	275
8.1	7.3	12	293
9.4	7.4	29	273
11.0	10.4	77	n.m.
11.7	11.0	120	n.m.
12.5	11.7	101	n.m.
12.6*	9.7	96	n.m.

* = Solución de NaOH 0.10 M.

** = Sin control.

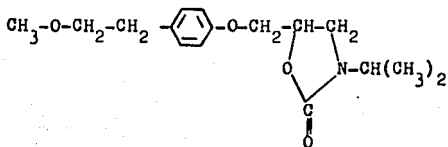
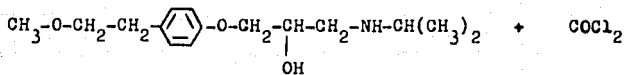


Fig. 5. Reacción del Metoprolol con fosgeno.

TABLA 4

RESULTADOS DEL AISLAMIENTO DEL METOPROLOL Y METABOLITOS,
DE LA FASE ACUOSA.

Fase Orgánica	Vorg/Vacuosa	<u>Recobro de la fase orgánica (%)</u>			
		M II	O-Dimetilme- toprolol.	α -Hidroxi metoprolol.	M I
Diclorometano	2:1	63	95	95	95
Eter dietílico	2:1	89	78	63	79
Diclorometano- éter dietílico (3:2)	2:1	95	95	95	95

TABLA 5

EXCRECION URINARIA DE LOS ENANTIOMEROS R y S DEL METOPROLOL.

Compuesto	Enantiómero	Excreción urinaria (%)	
		Voluntario 1	Voluntario 2
Metoprolol	R -(+)	2.79	0.92
	S -(-)	2.99	1.17
	Proporción R/S	0.93	0.79

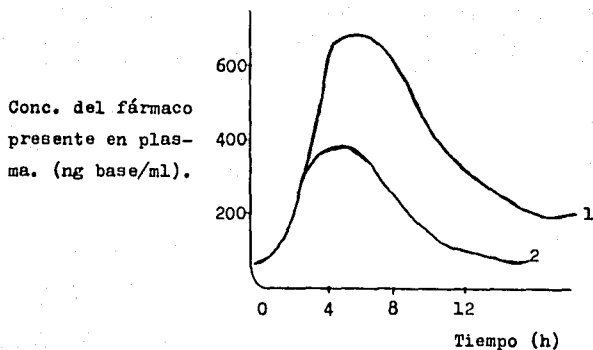


Fig. 6. Muestra las curvas de la Conc. del fármaco en plasma V.S. el Tiempo de vida media de eliminación en pacientes a quienes se les aplicó una dosis terapéutica de Tartrato de Metoprolol. En donde las curvas -- 1 y 2 corresponden cada uno de los pacientes tratados.

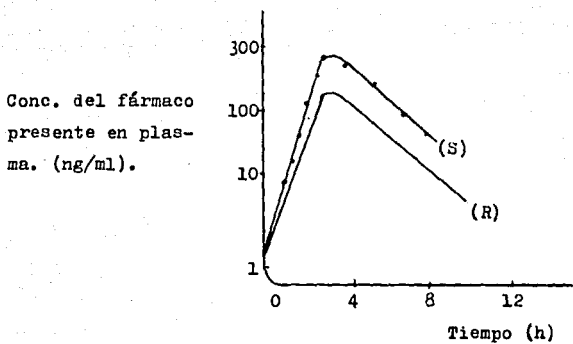


Fig. 7. Muestra las curvas del Log_{10} de la Conc. en plasma V.S. el Tiempo de eliminación, de los enantiómeros (S) y (R) del Metoprolol.

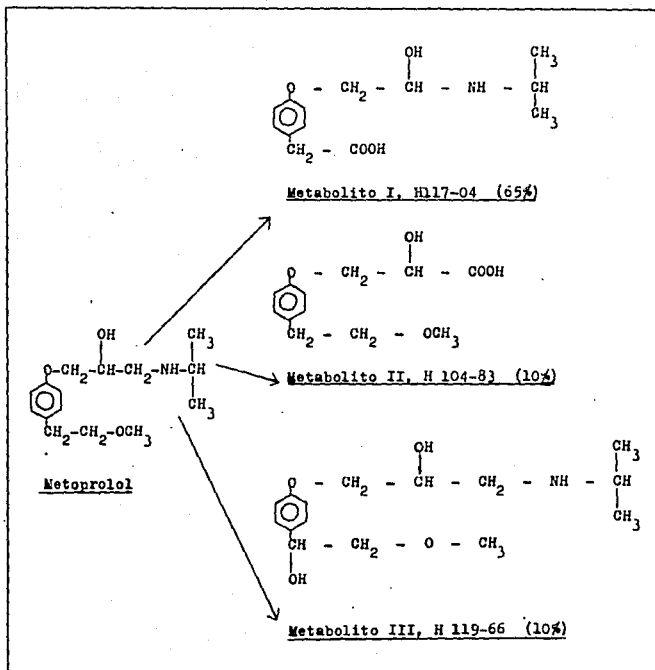


Fig.8. Rutas del Metabolismo del Metoprolol.

TABLA 6

ELIMINACION DE BETA-BLOQUEADORES EN EL HOMBRE.

COMPUESTO	% METABOLIZADO	MEJOR RUTA
Penbutolol	90	Conjugación/oxidación
Propranolol	95	Oxidación
Alprenolol	95	Oxidación
Oxprenolol	95	Oxidación
Bufuralol	95	Oxidación
Timolol	80	Oxidación
Tolamolol	90	Oxidación
METOPROLOL	95	Oxidación
Acebutolol	65-85	Acetilación
Pindolol	65	Conjugación/oxidación
Nadolol	0	} Renal
Sotanolol	0	
Atenolol	0	
Practolol	0	

CROMATOGRAFIA DE GASES

Cuando en un sistema cromatográfico se utiliza un gas como fase móvil, la técnica se llama cromatografía de gases (CG). La cual se realiza siempre en columna ya que la fase móvil tiene que estar encerrada. En la cromatografía gas líquido (CGL), la fase estacionaria es un líquido y el proceso es una forma de cromatografía de partición; en la cromatografía gas-sólido (CGS), una superficie sólida es la fase estacionaria, por tanto, se trata de una cromatografía de adsorción.

Los principios de CG se basan en que, los solutos se desplazan, a través del sistema cromatográfico a velocidades determinadas por sus afinidades por la fase estacionaria. La resolución es función de las velocidades diferenciales de desplazamiento de zonas que tienden a separar sus centros, y de los procesos de anchura de zonas que tienden a juntarlas, en CG, la fase móvil (el gas portador) es un gas inerte; por tanto el coeficiente de distribución está determinado únicamente por la afinidad del soluto por la fase estacionaria.

En CG, el soluto sólo puede moverse a través de la columna cuando se halla en estado gaseoso. Considérese así mismo la relación de la presión de vapor del soluto a la concentración de soluto en un disolvente líquido (que en la CG es la fase estacionaria).

Un cromatograma de CG típico es la representación de la respuesta registrada (que es función de la concentración de soluto en el eluato) en función del tiempo (o distancia en el papel del registro gráfico). Una diferencia práctica importante entre la CG y la CL es que, en la primera, la fase móvil es compresible. Esto significa que existe caída de presión a través de la columna y, por consiguiente, que la velocidad de flujo de gas varía a lo largo de la columna.

Debe corregirse por este efecto el volumen de retención. El volumen de retención corregido, se usa ampliamente como medida de volumen de retención, y puesto que está relacionado con el coeficiente de partición del soluto, es útil para identificar compuestos, la reproductibilidad de cualquiera de los parámetros de retención depende de la reproductibilidad de las condiciones cromatográficas.

Cabe servirse de varios tipos de detectores. El detector de conductividad térmica (CT), se basa en el principio de que el calor perdido por un hilo caliente situado en un gas que se mueve a determinada velocidad depende de la naturaleza del gas.

Con el detector de ionización de llama (DIL), se alimenta la corriente efluente con una pequeña llama de hidrógeno. Se calientan en la llama los solutos en el eluato, con lo que en este proceso se producen iones.

Se coloca la llama entre dos electrodos, a través de los cuales se aplica una diferencia de potencial. La corriente mantenida entre estos dos electrodos por la llama es proporcional a la concentración de compuesto orgánico en el eluato; se amplifica y registra la señal eléctrica al igual que con la célula de conductividad térmica.

El detector de captura electrónica (DCE), también se basa en el proceso de ionización, pero preferentemente se ioniza el gas portador en lugar del soluto.

Se han desarrollado otros detectores que son particularmente sensibles a los compuestos de fósforo.

El espectrómetro de masas (EM) puede servir como detector en cromatografía de gases. Esta combinación CG-EM suministra un poderoso medio para identificar compuestos, pues la CG asegura que el compuesto se separe de especies estrechamente relacionadas y el EM da un espectro único de la sustancia.

De los detectores descritos, el de CT y el de EM son de uso general pues responden a todos los compuestos; el DIL, a todos los compuestos orgánicos; y el CDE, sólo a las moléculas o átomos electronegativos. El detector de CT responde, de manera aproximada, a cantidades de muestra del orden del microgramo, el EM y el DIL, a nanogramos y el DCE, a picogramos.

La parte más importante del cromatógrafo de gases es la columna, que influye en la retención.

En CG se emplean dos tipos de columnas: columnas ensabladas análogas a las de CLL, en que la fase estacionaria líquida se adsorbe en la superficie de un soporte sólido; y columnas capilares, donde la fase estacionaria cubre la pared interior de la propia columna. Si la separación requiere mucho tiempo, a menudo se logran los mejores resultados incrementando gradualmente la temperatura de la columna durante el curso de la separación. Con ésta técnica de temperatura programada CG, se altera el coeficiente de partición de manera paulatina para que se eluyan las zonas muy retardadas antes de que lo hicieran en la isoterma CG. Disminuyen sus tiempos de retención y se estrechan los picos.

Análisis cuantitativos. La CG es, ante todo, un método de resolución de mezclas de compuestos, pero el cromatograma resultante también contiene datos que permiten hacer una determinación cuantitativa y ahora el análisis cuantitativo por CG se ha convertido en un procedimiento habitual. El hecho clave es que, en el cromatograma, el área bajo el pico es proporcional a la cantidad de soluto contenida en la zona eluida. Un análisis cuantitativo comporta la medida de esta área y el establecimiento de la proporcionalidad.

Aplicaciones. Las características sobresalientes de la CG son su gran sensibilidad y especificidad.

A menudo, la separación de miembro de series homólogas es un problema corriente, y pueden separarse muchas substancias isoméricas. Basta con microgramos de muestra para el análisis, debido a la alta sensibilidad de los detectores. De hecho son especialmente deseables muestras muy pequeñas porque suministran zonas estrechas y así permiten utilizar por completo el alto poder de resolución, de ese método. Como es obvio, los compuestos bastante volátiles son las muestras idóneas para la cromatografía de gases, además de que se manejan fácilmente. Esto no obsta para que también se haya aplicado a sólidos de alto punto de fusión, que ordinariamente no son volátiles. El problema de la CG de compuestos no volátiles, consiste en convertirlos en derivados más volátiles. Esto comporta la transformación de grupos muy polares, tales como -OH, -COOH y -NH₂, en grupos menos polares como -OCOR y -NHCOR.

En CG, otro derivado importante es el sililo, que se refiere al grupo (CH₃)₃Si-. Cabe reemplazar el hidrógeno activo de -OH, -COOH, -NH₂, -SH, etc., por el grupo sililo, con lo que se obtienen derivados más volátiles. Se utilizan varios agentes sililantes, de fórmula general (CH₃)₃Si-X, donde X es un buen grupo saliente.

Tomando como fundamento lo anterior, Olle Gyllenhaal y colaboradores (22,24,25), emplearon un método por CG para separar los enantiómeros y metabolitos del Metoprolol,

utilizando al Dicloruro de Carbono (fosgeno) para la formación de un derivado oxazolidónico y un número de análogos los cuales están reportados en la Tabla 7.

La preparación de los diferentes sustituyentes n-alquilo, para la formación de oxazolidonas del metoprolol y un número de compuestos análogos del mismo, fueron cromatografiados. Los factores de separación se dan en la Tabla 8, donde se observa que dichos sustituyentes tienen poca influencia sobre la resolución enantiomérica de los derivados; al analizar los datos obtenidos del factor de separación lo que no ocurre con la oxazolidona cíclica, la cuales de gran importancia. (24).

Los resultados obtenidos de dichas separaciones originan los siguientes cromatogramas:


Figura 9, cromatograma de metoprolol y sus metabolitos, - obtenido después de la reacción con el fosgeno, extracción y trimetilsililación. Las condiciones experimentales se - dan en la referencia (22).

Figura 10, muestra los cromatogramas obtenidos para el -- Metabolito II del metoprolol, presente en las muestras de orina analizadas, donde la velocidad de la carta es diez - veces mayor en la región en la cual eluye el Metabolito II y la atenuación disminuye al doble, (22), lo que hace que se obtenga una buena resolución de dicho compuesto.

La Figura 11, en la que se encuentran los cromatogramas del Metoprolol y sus Metabolitos, obtenidos de un individuo a quien se le aplicó una dosis comercial de Tartrato de Metoprolol, como puede observarse el cromatograma (a), corresponde a la fracción 0-6 horas, posterior a la aplicación, y el cromatograma (b) el que a su vez corresponde al blanco de orina del mismo individuo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que algunos de los Beta-bloqueadores que fueron excretados en orina y metabolizados por completo, así como sus formas conjugadas, pudieron ser analizadas por CG, debido a que las concentraciones del fármaco son mayores que en las muestras obtenidas de plasma. Para lo cual se mejoraron las características cromatográficas mediante la formación de derivados oxazolidónicos y reacciones de trimetilsililación del metoprolol, análogos y metabolitos del mismo.

TABLA 7

ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS			
R-  -OCH ₂ [*] CH(OH)(CH ₂) _n NHR'			
Compuesto	R	n	**R'
Metoprolol	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	1	iso-C ₃ H ₇
Metoprolol α- Hidroxilado (H 119/66)	CH(OH)CH ₂ OCH ₃	1	iso-C ₃ H ₇
Metoprolol ácido (H 117/04)	CH ₂ COOH	1	iso-C ₃ H ₇

C* = átomo de carbono asimétrico.

**R' = grupo saliente.

TABLA 8

SEPARACION DE ENANTIOMEROS DEL METOPROLOL Y ANALOGOS			
Compuesto	R'	α	t_R (min)
H 100/11	CH ₃	1.030	37
H 173/09	C ₂ H ₅	1.031	41
H 117/78	n-C ₃ H ₇	1.026	53
Metoprolol	iso-C ₃ H ₇	1.032	44
H 105/29	ter-C ₄ H ₉	1.028	38

R' = grupo saliente.

t_R = tiempo de retención en minutos.

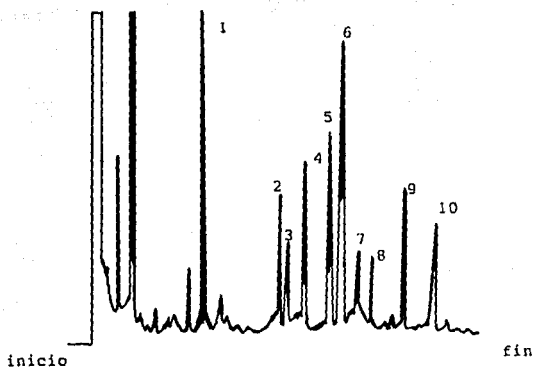


Fig. 9. Cromatograma de Metoprolol y sus Metabolitos, donde; 1= Metabolito II; 2 = Metabolito V; 3 = Metoprolol; 4 = Metabolito IV; 5 = O-dimetilmetoprolol; 6 = Propanolol (compuesto de referencia); 7 = α -hidroximetoprolol; 8 = Metabolito I; 9 = Metabolito VI; 10 = Metabolito VII.

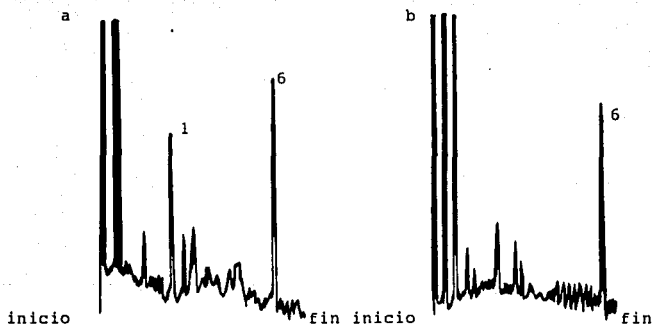


Fig. 10 Cromatogramas del Metabolito II del Metoprolol, donde:
a= muestra; b= balnco de orina, identificaci3n de los picos:
1= Metabolito II y 6= Propranolol (compuesto de referencia).

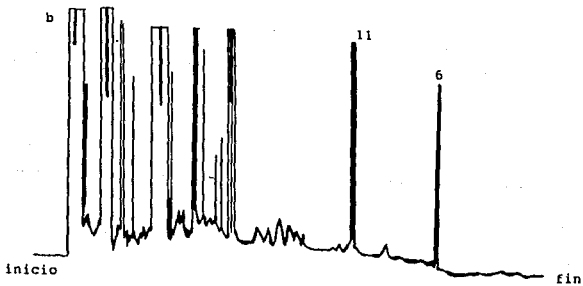
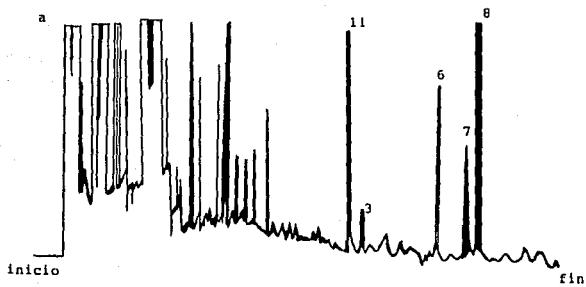


Fig. 11. Cromatogramas del Metoprolol y sus Metabolitos, identificación de los picos, como en Fig.9 , 11= Estándar Interno I.

ESPECTROFOTOMETRIA DE MASAS

La espectrofotometría de masas (EM) es una técnica, - que se utiliza en análisis orgánico, en especial para identificar y determinar estructuras, ésto se logra con un aparato llamado espectrofotómetro de masas, el cual ejerce - tres funciones:

- 1.- Produce una fuente de iones de la sustancia muestra.
- 2.- Clasifica estos iones de acuerdo con su relación masa-carga.
- 3.- Registra la abundancia relativa de cada especie de ión.

La mayoría de los espectrofotómetros de masas comer--ciales disponen de un clasificador magnético para separar--un haz de iones de acuerdo con sus relaciones m/e , donde: m es la masa en unidades de masa atómica (uma) y e repre--senta la unidad de carga eléctrica.

Esta clasificación, o dispersión, se basa en el prin--cipio de que un ión introducido en un campo magnético des--cribe una trayectoria curva, cuyo radio depende de m/e , o más exactamente, de mv/e , donde v es la velocidad del ión.

También cuentan con detectores multiplicadores de --electrones. El haz iónico procedente del analizador magné--tico choca con una superficie electrónica sensibilizada - que inmediatamente emite electrones secundarios. Estos --electrones se aceleran a otro electrodo, con la consecuente multiplicación de emisión de electrones se recogen en el -

electrodo final y se mide la corriente resultante. Se logran obtener así factores de amplificación de 10^7 ; por tanto se trata de una forma sensible de detección. Su respuesta es rápida.

Un espectro de masas es una representación de la intensidad de corriente iónica, por esto cabe presentar los datos en forma de tabla. Por lo general los datos brutos se normalizan convirtiendo, todas las intensidades en intensidades relativas o basándose en el porcentaje; es decir, al pico más intenso en el espectro (el pico-base) se le asigna el valor 100, y las intensidades de los demás picos se expresan con relación a éste.

La resolución, o poder de resolución, de un espectrómetro de masas es su capacidad para separar dos haces de iones de similares valores de m/e . Cada haz iónico tendrá una anchura finita, determinada por las características del instrumento, especialmente por la amplitud de la fuente iónica. También está involucrada la anchura de rendija, puesto que si dos haces adyacentes inciden simultáneamente sobre la rendija, se registrarán juntos.

En términos generales, los espectrómetros de masas se clasifican o catalogan en las siguientes clases de acuerdo a su resolución:

- Resolución baja $R < 200$
- Resolución media $R = 500 - 5000$
- Resolución alta $R > 10,000$

En el espectro de masas, la identificación del ión molecular da inmediatamente la masa molecular del compuesto muestra. Las moléculas que contienen los isótopos menos abundantes originan iones isotópicos, cuya posición e intensidad en el espectro de masas depende de la fórmula del compuesto y de la abundancia relativa de los isótopos. Los iones moleculares e isotópicos originan algunos de los picos vistos en un espectro de masas típico, pero la mayoría de los picos se deben a fragmentos iónicos, que surgen de roturas de enlace en el ión molecular, después de formado, pero antes de que en el analizador magnético. Se puede racionalizar el espectro de masas de un compuesto orgánico en términos de procesos de fragmentación, que son estrechamente similares a las reacciones que se desarrollan en solución.

La interpretación de un espectro de masas, en donde por lo general, se buscan datos sobre la estructura de un compuesto, a menudo se conoce la composición elemental.

Primero se examinará el espectro para determinar la presencia de un pico obvio de ión molecular. Esto da el peso molecular hasta la unidad más cercana. La espectrometría de masas de alta resolución puede aportar la fórmula empírica. La abundancia del ión molecular informa acerca de su estabilidad.

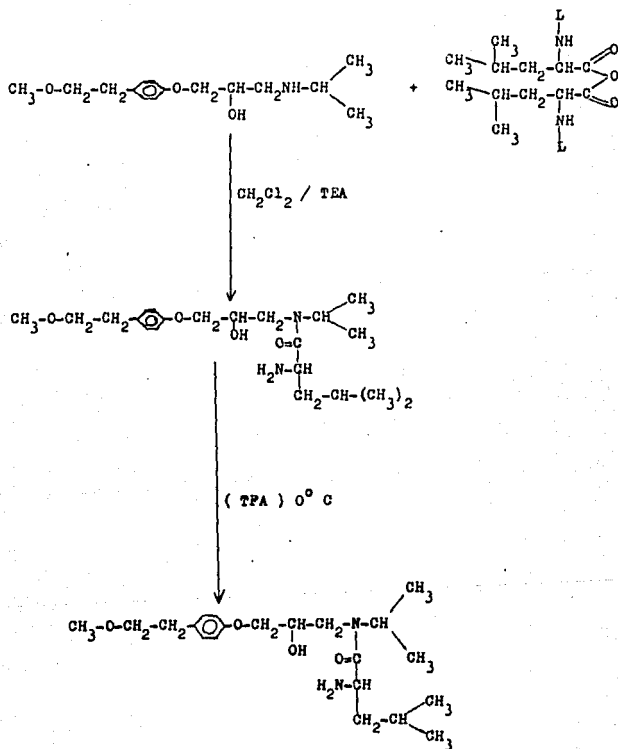
Si m/e es par para el ión molecular, contiene un número par de átomos de nitrógeno; si es impar, presenta un número impar de átomos de nitrógeno.

También se puede utilizar el espectro de masas como -- prueba confirmadora de identidad, es la " huella dactilar -- del compuesto ", por comparación del espectro de masas del -- compuesto muestra y el de una muestra auténtica. El espectro de masas de un compuesto es único; y quizá el elemento de -- prueba más sencillo y poderoso para establecer su identidad. Una gran aplicación de la EM es como detector en cromatografía de gases.

Debido a la ayuda que proporciona la EM para la identificación, de compuestos, Jörgen Hermansson y Christer Von -- Bahr (13), establecieron un método para identificar la presencia del Metoprolol y de algunos de sus metabolitos, así -- como de sus derivados, mediante la reacción de un anhídrido-simétrico de la leucina (ver reacción 1), para formar los -- derivados diastereoméricos del metoprolol, con ayuda de la -- trietilamina (TEA), empleada como catalizador en dicha reacción, obteniéndose así los resultados que se enlistan en la Tabla 9. Como ya se había mencionado, en el desarrollo de la técnica, es conveniente presentar los datos del espectro de masas, en forma tabular.

Algunos de los espectros de masas que se logró obtener por medio del método desarrollado por J. Hermansson y C. Von

Bahr se muestran en las figuras 12, 13 y 14. En las que se definen las estructuras y composición elemental de los compuestos, con lo que se logra confirmar su identidad.



Reacción 1. Reacción del Metoprolol con un anhídrido simétrico del aminoácido Leucina (L).

TABLA 9

DATOS DEL ESPECTRO DE MASAS DEL METOPROLOL, METABOLITOS Y DERIVADOS.

Compuesto	Trimetilsalil		Oxazolidona	Intensidad Relativa %					
	éter	éster		50 (212)	100	L-45	L-15	m ⁺ (m/z)	
Metabolito II	X	X		100		8	10	3(334)	
Estándar Interno I			X	100	33	18		15(293)	
Letoprolol			X	100	65	90		28(293)	
Propranolol			X	100	43	5	5	78(285)	
O-Dimetilmetoprolol	X		X	25	100	12	1	22	8(351)
α-Hidroxi metoprolol	X		X	20	75		100	3	-(331)
Metabolito I		X	X	18	100		5	5	4(365)
Estándar Interno II		X	X	81	100	18	14	22	22(397)

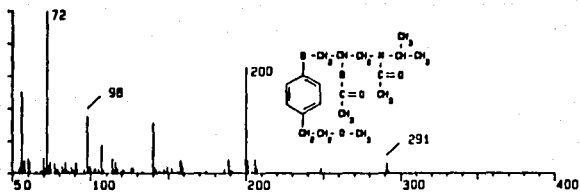


Fig. 12. Espectro de masas del Metoprolol.

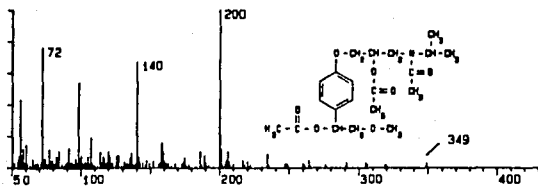


Fig. 13. Espectro de masas del Metoprolol-M (hidroxietil-)



Fig. 14. Espectro de masas del Metoprolol-H₂O ac.

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

La cromatografía de capa fina es una forma de cromatografía de adsorción en la que el adsorbente se difunde en una - capa fina sobre una placa de vidrio; se suele colocar la capa en el lugar apropiado, mediante sujeción química. Aunque la CCF se realiza generalmente como método cromatográfico de adsorción, es preferentemente factible efectuar cromatografía en capa fina de partición. Probablemente hay muchos sistemas-solventes que originan un efecto combinado de partición-adsorción durante la separación.

Hay en el mercado placas con muchos tipos de adsorbentes. La alúmina y el gel de sílice son los adsorbentes más útiles-

Puede incorporarse un agente ligante (sulfato de calcio). El tamaño de partícula del adsorbente es más pequeño que el de los materiales de columna y ésta característica de grano fino de los adsorbentes indica la gran sensibilidad de la CCF. Para la fase móvil sirve cualquiera de los solventes o mezclas de ellos ya estudiados como reveladores de columna, y los mismos principios siguen la selección del líquido de revelado. En la CCF, el revelado se efectúa por la técnica ascendente. Completado el revelado, se secan las placas al aire antes del examen de las zonas desplazadas. A continuación se revelan las manchas por un método físico o químico apropiado. La iluminación con luz ultravioleta está particularmente indicada para compuestos fluorescentes. Los compuestos no fluorescentes se localizan por incorporación de una sustancia fluorescente a la masa adsorbente. Completando el revelado, aparecerán las manchas oscurecidas contra un fondo fluorescente.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

79

Se calculan de la manera usual los valores de R_f . El R_f de capa fina es comparable si se controlan las condiciones cromatográficas. El grosor y la uniformidad de la capa son factores importantes en la determinación de la reproducibilidad. Siempre es mejor cromatografiar en la misma placa -- muestras conocidas junto con la desconocida, para compensar las variaciones que existan por factores incontrolados.

Se efectúa el análisis cuantitativo del material de las manchas separadas del cromatograma de capa fina, rascando la capa adsorbente que contiene la mancha de la placa. Se separa el soluto adsorbido del disolvente y se determina por un método analítico sensible, espectrofotometría o fluorometría, por lo general.

Una ventaja considerable de la CCF, es que la muestra permanece concentrada en una zona más pequeña y, por consiguiente, es posible detectar una muestra más pequeña. Otra ventaja, es su rapidez de revelado, que sólo requiere minutos.

La principal aplicación de la CCF consiste en detectar e identificar compuestos en mezclas complejas. La correspondencia de los valores de R_f de una especie auténtica y de la substancia desconocida, es un criterio de identidad. Si los R_f coinciden de nuevo cuando se altera el sistema solvente, se suele considerar fortalecida la prueba cromatográfica -- aunque se aconseja precaución al establecer la identidad únicamente sobre tal prueba. La CCF es un poderoso método para detectar impurezas (50).

Basándose en este principio, G. Gübitz, G. Pflugmann y colaboradores, (18,38), desarrollaron una técnica por Cromatografía de Capa Fina (CCF) la cual hace posible una rápida determinación de los derivados enantioméricos de agentes -- Beta-bloqueadores, entre los cuales se encuentra el Metoprolol, a partir de muestras de orina y con la ayuda del reactivo Cloruro-S-(+)-benoxoprofeno, el cual fué utilizado para detectar dichos compuestos por ser un reactivo quiral con propiedad fluorescente adecuado.

El empleo de la técnica de CCF para la determinación e identificación de algunos Beta-bloqueadores, aplicada de forma continua y tratando de lograr la reproducibilidad en los resultados es de gran ayuda como se muestra en la Fig. 15.

En la figura anterior puede observarse, que todos los compuestos estudiados tienen buena resolución sobre las placas de silica gel utilizadas. Debido a esto es posible determinar los valores de R_f de una especie auténtica y de la sustancia desconocida.

Se puede observar que las formas R-(+), tienen siempre mayores valores de R_f que los isómeros S(-), de acuerdo a los datos obtenidos del análisis correspondiente, cuyos resultados se resumen en la Tabla 10.

Los cromatogramas de los compuestos investigados se muestran en la Fig. 16, los cuales fueron obtenidos después de la extracción de los mismos, a partir de muestras de orina (2hr. después de la administración oral de una preparación comercial) y posterior a la reacción con el reactivo Cloruro-S-(+)-benoxoprofeno, con un límite de detección del orden de nanogramos por pico, sin existir interferencias de metabolitos --

con los enantiómeros. Para lograr ésto se utilizó un método analítico sensible, espectrofotométrico, el cual auxilia en éstos casos de una manera específica a la técnica empleada en la separación de los agentes Beta-bloqueadores estudiados.

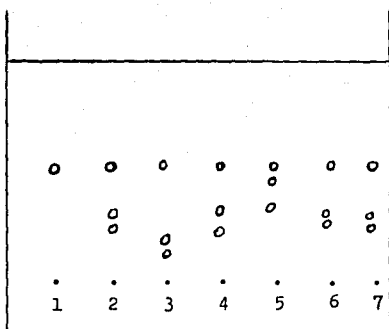


Fig. 15. Cromatografía en Capa Fina de Agentes Beta-bloqueadores. Localización: 1=blanco; 2=bunitrolol; 3=metoprolol; 4=alprenolol; 5=propranolol; 6=oxprenolol; 7=pindolol. Condiciones fase móvil: benceno: éter:acetona (88:10:5).

TABLA 10

COMPUESTO	R_f	
	R	S
Bunitrolol	0.42	0.37
Metoprolol	0.32	0.27
Alprenolol	0.41	0.33
Propranolol	0.51	0.42
Oxprenolol	0.37	0.32
Pindolol	0.56	-
Blanco		

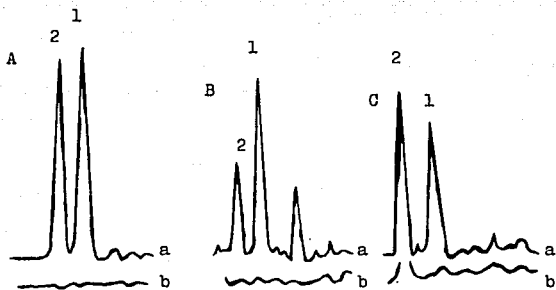


Fig. 16. Cromatogramas de Capa Fina, del Metoprolol (A); Oxprenolol (B); y Propranolol (C). Donde los picos: 1= enantiómero R-(+), 2=enantiómero S-(-), curvas: a= 0-2 hr. de muestra; b= blanco de orina.

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Teoría de la fluorescencia.

El análisis por fluorescencia es un método analítico estrechamente relacionado con la espectrofotometría.

Se puede excitar una molécula desde su estado electrónico fundamental hasta un estado electrónico excitado por absorción de energía en forma de luz visible o ultravioleta. Muchas moléculas son capaces de emitir esta energía -- como radiación, con lo cual vuelven al estado fundamental.

La radiación emitida se conoce como fluorescencia. El espectro de absorción electrónico (de una molécula capaz de sufrir fluorescencia) también se conoce como su espectro de excitación.

La mayoría de las moléculas pierden menos energía por emisión que la que ganaron por absorción, por lo que el espectro de fluorescencia aparece a mayores longitudes de onda que el espectro de excitación.

Para que una molécula presente fluorescencia es menor que dicha molécula excitada vuelva al estado fundamental mediante una transición radiactiva.

Una condición necesaria para la fluorescencia es, que la molécula tenga fuerte absorción. Las estructuras aromáticas, heterocíclicas, y altamente conjugadas, todas las cuales originan intensa absorción, son, por consiguiente, apropiadas para conferir propiedades fluorescentes a una molécula.

La intensidad de la fluorescencia aumenta por la planaridad molecular que, a su vez, viene a menudo establecida por la rigidez molecular.

De muchas sustancias ionizables se sabe que una de sus formas iónicas muestra fluorescencia, pero no la otra; por lo tanto, la fluorescencia de tales compuestos depende del pH. Estos compuestos son, en realidad, indicadores ácido-base fluorescentes.

Análisis fluorescente cuantitativo. Para que una molécula presente fluorescencia debe ante todo, absorber radiación. Si la concentración de la sustancia absorbente es muy alta, es posible que las primeras capas de la solución absorban toda la luz incidente sin que apenas llegue luz a las partes más distantes de la muestra. La fluorescencia de dicha muestra no será, pues, uniforme ni tampoco proporcional a la concentración de la sustancia.

Puesto que esto es un inconveniente desde el punto de vista analítico, siempre se mantienen a niveles muy bajas las concentraciones de las soluciones de sustancias fluorescentes, para evitar la absorción de una fracción apreciable del rayo incidente.

Medida de la intensidad de fluorescencia. En la figura (17), se muestran los componentes esenciales de un fluorómetro (o fluorímetro) y su disposición en él, instrumento que se emplea para medir la intensidad de la fluorescencia, F .

Para alcanzar determinado valor de excitación, y para reducir la luz extraña, se selecciona una banda de radiación más o menos estrecha a partir de la radiación emitida por la fuente de luz.

Se efectúa esta selección mediante el filtro de excitación, que en la mayoría de los casos es un filtro de vidrio que transmite luz de la longitud de onda deseada y absorbe todas las demás radiaciones. Tales filtros pueden transmitir una banda de radiación de 50-100 nm de anchura. Los filtros son cambiables, y se dispone de una selección que permite escoger el que transmita una banda de radiación que corresponda al máximo de absorción del compuesto, pero que suprima la luz de longitudes de onda más corta y más larga.

El filtro de excitación también se conoce como filtro primario. Ahora, la luz de excitación pasa por la cubeta de la muestra. Las cubetas y los disolventes pueden ser fluorescentes y se han de escoger cuidadosamente. Las cubetas de vidrio son adecuadas para la mayor parte de los análisis, por debajo de 320 nm puede usarse el cuarzo.

La muestra emite luz fluorescente en todas direcciones. La medida de la intensidad de fluorescencia en la dirección de propagación de la radiación de excitación es extremadamente difícil, porque comporta la medida de la luz emitida respecto a una alta intensidad de fondo de luz transmitida.

Este problema se supera observando la fluorescencia en ángulo recto con el haz de excitación.

Determinada parte de la luz transmitida se puede dispersar en esta dirección y esta luz indeseable se separa - mediante el filtro de fluorescencia (filtro secundario), - que se selecciona de modo que tenga máxima transmisión en el máximo de fluorescencia.

A continuación, la fluorescencia alcanza un fototubo o fotomultiplicador, produciendo así una señal eléctrica - que se amplifica y mide con un medidor para indicar la intensidad de fluorescencia.

El instrumento descrito y representado en la figura - (17) es un fluorímetro de filtro. Puesto que incorpora -- detección fotoeléctrica de la intensidad de fluorescencia, este instrumento puede recibir el nombre de fotofluorímetro. Actualmente se dispone de instrumentos en que se han reemplazado los filtros de excitación y fluorescencia, por monocromadores, que permiten la selección de bandas de radiación muy estrechas. Estos instrumentos, que se llaman - espectrofotofluorímetros, son capaces de medir los espectros de excitación y fluorescencia.

Aplicaciones. La principal ventaja del análisis por fluorescencia es su sensibilidad. Aunque el rendimiento -- cuántico, es casi siempre menor que la unidad, se puede - forzar la intensidad de fluorescencia, F , hasta un valor - muy alto con sólo incrementar la intensidad de la radiación de excitación.

Otro factor que contribuye a esa gran sensibilidad es la excelente capacidad de rendimiento de los modernos tubos fotomultiplicadores, con los que se pueden medir con precisión muy bajas intensidades de luz emitida. Permiten medir cuantitativamente concentraciones de compuestos fluorescentes en el margen 10^{-4} a 10^{-9} M, y la representación gráfica de F es una función de c, suele ser lineal.

Aunque rara vez las cantidades de drogas presentes en las formas de dosificación son tan pequeñas como se requiere la sensibilidad de este orden, las concentraciones de drogas y metabolitos en la sangre, orina y otras muestras biológicas puede ser extremadamente baja, y el análisis por fluorescencia tiene amplia aplicación en estudios cuantitativos de velocidades y mecanismos de absorción de la droga, metabolismo y excreción. La mayoría de los compuestos de origen biológico también son fluorescentes, y, por lo tanto, son potenciales interferencias en estos ensayos. Tal vez sea necesaria la separación preliminar de estas mezclas complejas antes de proceder al ensayo por fluorescencia del componente deseado.

Jörger Hermansson y Christer Von Bahr (13), emplearon la detección fluorométrica, para la cuantificación en una forma selectiva, de los derivados diastereoméricos del Metoprolol, en plasma humano como se aprecia en la Figura (18).

La cual representa la respuesta fluorométrica relativa obtenida por la excitación a diferentes longitudes de onda.

Los derivados del alprenolol dan una máxima respuesta a la longitud de onda de 193 nm. En el desarrollo de éste estudio no se observaron interferencias de los compuestos endógenos presentes en el plasma utilizado, como se aprecia en la figura.

G. Gúbitz y S. Mihelles (18), desarrollaron un método de detección fluorescente para los derivados del metoprolol, utilizando como reactivo de preparación al R-(-)-1-(1-naftil)etil isocianato (NEIC), obteniendo una mayor absorción al U.V. y una fuerte fluorescencia mejorando, así la sensibilidad del método empleado por J. Hermansson y C. Von Bahr, con el que fué posible detectar cantidades de muestras del orden de los nanogramos de los derivados correspondientes.

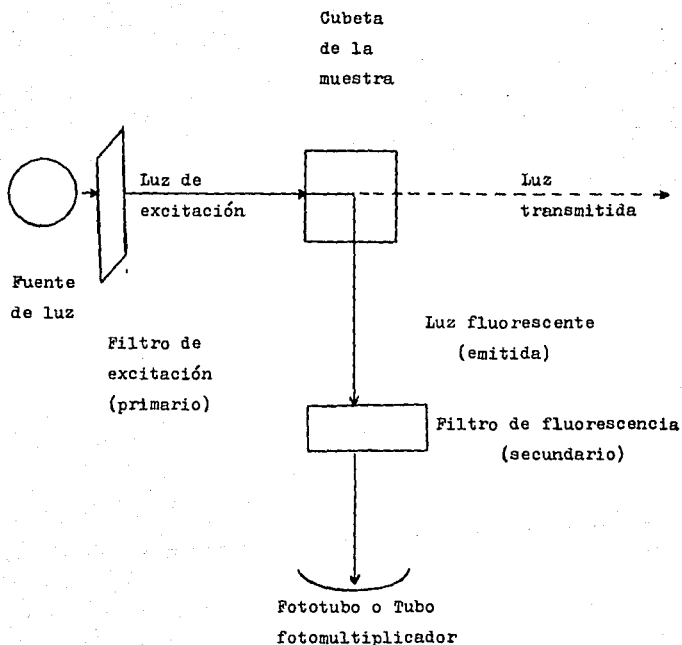


Fig. 17. Componentes de un fotofluorómetro de filtro.

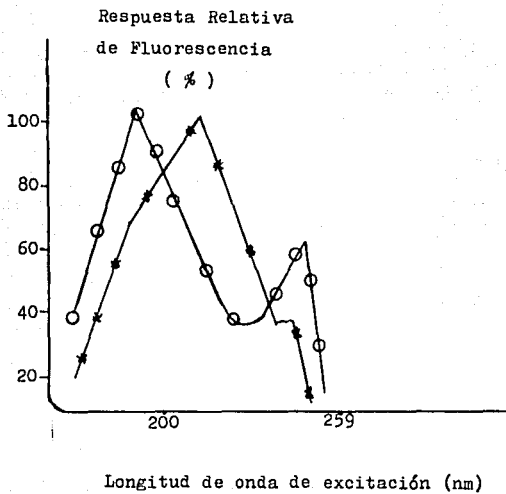


Fig. 18 Localización: (o) Metoprolol; (*) Alprenolol.

IV

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES.

En el análisis farmacéutico rutinario es importante la determinación de la identidad y pureza de las sustancias - activas y no activas, que intervienen en la fabricación de un medicamento.

Las diferentes bibliografías encontradas sobre especificaciones y métodos de prueba para el Tartrato de Metoprolol son : F.E.U.M. y la U.S.P., en las que se menciona la - valoración empleando una titulación ácido-base no acuosa, - es recomendable. Sin embargo también puede realizarse ésta-determinación por el método de H.P.L.C., si se cuenta con el equipo, ya que es ventajoso utilizarlo para determinar - la pureza de la sustancia así como posibles degradaciones - de sustancias relacionadas (NORMA, IMSS).

Dentro de los métodos extraoficiales informados en la literatura se encuentran :

La cuantificación de las formas (R) y (S) del Metoprolol por medio de H.P.L.C., con ayuda del reactivo N-Trifluoroacetil-L prolina ó L-leucina.

Otro basado en el bloqueo de grupos funcionales en el lado de la cadena del amino propanol, para la formación de oxazolidinonas, para así obtener compuestos ácidos o neutros los cuales reaccionan con el fosgeno.

Un método por Cromatografía de gases puede utilizarse para separar los enantiómeros y metabolitos del Metoprolol, utilizando un selector quiral, que ayude a la formación de

la oxazolidona cíclica, la cual hace posible la cuantificación del compuesto.

Los bloqueadores de los receptores Beta-adrenérgicos, difieren en términos de presencia o ausencia de la actividad intrínseca simpaticomimética, efecto de membrana, cardiosselectividad y la duración relativa de su potencia. Tomando en cuenta lo anterior el Metoprolol ofrece características especiales de broncoprotección y vasoprotección, resulta seguro aún en pacientes hipertensos asmáticos, y en general en padecimientos obstructivos crónicos.

Por lo anterior no es recomendable administrarse si se presentan en el musculo cardiaco, un bloqueo de rama, bradicardia pronunciada, insuficiencia cardiaca refractaria a la digitalización, no deberá combinarse con antagonistas del calcio, pues puede originarse hipotensión e incluso paro cardiaco, sin supervisión médica.

V

BIBLIOGRAFIA

1. Drill, V.A., Pharmacology in Medicine, Secon Edition, Mc. Graw Hill Book Company Inc., New York, 1958. p. 346-348.
2. Litter, M. Farmacología General, 5a. ed. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1977.
3. Kirk, D.F. and Othmer, F.D., Encyclopedia of Chemical Tecnology, 3rd. ed., Volume 2, Ed. Board, U.S.A., 1978.
4. Anderson, S.D., Bye, P.T.P, Limitation of work perfor-- mance in normal adult males in the presence of beta-adrenergic blockade. Aust. N.Z.J.Med. 92: 34477 a, 9 (5), -- 515-20 (Eng) 1979.
5. Goldstein, A., Farmacología, Ed. Limusa, México, 1979.
6. The Pharmaceutical Codex, 11th. ed., The Pharmaceutical Press, London, 1979.
7. Jackson, E.K., Campbell, W.B., Inhibition of angioten-- sion II potentiation of sympathetic nerve activity by - beta-adrenergic antagonists. Hypertension (Dallas). 92: 121671 c, 2 (1), 90-6 (Eng) 1980.

8. Haeew, D.W.G., Effects on exercise tachycardia during forty-eight hours of a series of doses of atenolol, sotalol, and metoprolol. Clin. Pharmacol. Ther. 94: 185336w, 29 (3), 295-302 (Eng) 1981.
9. Pape, J., Jervell, J., Blood pressure and pulse response to insulin-induced hypoglycemia during non-selective and selective β -blockade. Acta Med. Scand., Suppl. 645, - - 105-8 (Eng) 1981.
10. Belpaire, F.M., Bogaert, M.G., Rossenev M. Binding of β -adrenoceptor blocking drugs to human serum albumin to α_2 -acid glycoprotein and to human serum. Eur. J.Clin. Pharmacol. 22 (3), 253-6 (Eng) 1982.
11. Bernaver, W., Comparative Investigation of the effects - of metoprolol, propranolol, practolol, and varapamil in the acute phase of experimental myocardial infarction. Dlin. Wochenschr. 60 (2), 87-92, (Eng) 1982.
12. Bevan, J.A., Fundamentos de Farmacología 2a. ed. Ed. - Harla, Harper Et Raw Latinoamericana, Méx. 1982.
13. Jürgen H., Christer V.B., Determination of (R)- and (S) Alprenolol and (R)-and (S)-Metoprolol as their diastereomeric derivatives in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography. 227 (1), 113-27 (Eng) 1982.

14. Martindale, The Extra Pharmacopeia, 28th. ed., The Pharmaceutical Press, London, 1982.
15. Mehta, A.C., High-performance liquid chromatographic determination of oxprenolol hydrochloride and metoprolol tartrate in tablets and injections. *Analyst*. 107 (1280), 1379-1382, (Eng) 1982.
16. Stecher, P.G. Editor, The Merck Index, 10 th. Ed. Merck and Co. Inc. Rahway, N.Y. 1983.
17. Wischnik, A., Schroll, A., Myocardial calcium absorption under long-term tocolysis in union with verapamil, metoprolol and magnesium. *Wiss. Inf.* 9 (3), 177-188 -- (Ger) 1983.
18. Gübitz, G. and Mihellyes, S., Optical resolution of B-blocking agents by thin-layer chromatography as diastereomeric R-(-)-1-(1-naphtyl) ethyl ureas. *Journal of chromatography*. 314, 462-6, (Eng) 1984.
19. Lindner, W., Leitner, Ch., Uray, G., Liquid Chromatographic separation of enantiomeric alkanolamines via diastereomeric tartaric acid monoesters. *Journal of Chromatography*. 316, 605-616, (Eng) 1984.
20. Mills, T. Price, W.N., *Instrumental Data for Drugs Analysis*. Vol. 1, 1st ed. U.S.A., 1984.

21. Morrison R.T. and Boyd R.N. Química Orgánica, Fondo Educativo Interamericano S.A. de C.V. Méx. 1984.
22. Gyllenhaal, O. and Hoffman, K.J., Simultaneous Determination of metoprolol and metabolites in urine by - capillary column gas chromatography as oxazolidineone and trimethylsilyl derivatives. Journal. chromatography. 309, 317-328, (Eng) 1984.
23. Fara, J.W., Myrback & Swanson, D.R., Evaluation of - oxprenolol and metoprolol Oros systems in the dog: - comparison of in vivo and in vitro drug release, and of drug absorption from duodenal and colonic infusion sites. Br. J.Clin. Pharmacol. 19 (Suppl.2), 915-955 (Eng) 1985.
24. Gyllenhaal, O., König, W.A. and Jörgen, V., Enantiomer separation of metoprolol and its analogues and - metabolites by capillary column gas chromatography - after derivatization with phosgene Journal of Chroma tography. 350 (1), 328-331 (Eng) 1985.
25. Hermansson, J., Resolution of racemic aminoalcohols- (B-blockers), amines and acids as enantiomeric derivatives using a chiral α -acid glycoprotein column. - Journal of Cromatography 325 (2), 379-384, (Eng) -- 1985.

26. Goodman, L.S. y Gilman, A., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 7a. ed., Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina, 1986.
27. Schill, G., Wainer, I.W., and Barkan, S.A., Chiral - separations of cationic and anionic drugs on an acid glycoprotein - bonded stationary phase (Enantio pac). Influence of mobile phase additives and pH on chiral resolution and retention Journal of Chromatography. 365, 73-88 (Eng) 1986.
28. Lennard, M.S., Tucker, G.T., Debrisoquine polymorphism and the metabolism and action of metoprolol, - timolol, propranolol and atenolol. Xenobiotica. 16 - (5), 435-447 (Eng) 1986.
29. Maurer, H. and Pflieger, K., Identification and differentiation of beta-blockers and their metabolites - in urine by computerized gas chromatography-mass - spectrometry. Journal of Chromatography. 382, 147-165 (Eng) 1986.
30. Nakagawa, Y., Effects of several B_1 -selective blockers on the pressor response of the adrenal-ectomized, pithed rats to electrical stimulations of the - spinal nerves. Kokyu to Junkan, 34 (11), 1173-1180 - (Japan). 1986.

31. Shen, X., Shi, B., Transmembrane potentials in bilayer lipid membrane (B2M) induced by calcium channel and -- beta-adrenergic blockers. Shengwu Huaxue Yu Shengwu - Wuli Jinzhan. (1), 37-40 (Ch) 1986.
32. Sungur, S., Fluorodensitometric determination of metoprolol tartrate after derivatization with NBD-chloride. Marmara Univ. Eczacilik Derg. 2 (2), 139-144 (Eng) -- 1986.
33. Tortora, G., J., Anagnostakos P.N., Principios de Anatomía y Fisiología Ed. Harla, 3a. ed. Méx. 1986.
34. Ahmad, S., Microdetermination of oxprenolol hydrochloride and metoprolol tartrato with ammonium metavanadate. Talanta. 34 (2), 296-298 (Eng) 1987.
35. Angeraas, V. , Jagenburg, R., Effects of beta-blocking agents on urinary excretion of 3-methylhistidine du -- experimental hyperthyroidism in rats. Eur. Surg. Res. 19 (1), 23-30 (Eng) 1987.
36. Betageri ,G.V. and Rogers, J.A. Thermodynamics of partitioning of B-blockers in the n-octanol buffer and -- liposome systems. International Journal of Pharmaceutics. 36 (2-3), 165-173, (Eng) 1987.

37. Green, P.G. Hadgraft, J., Facilitated transfer of cationic drugs across a lipoidal membrane by oleic acid and lauric acid. Int. J. Pharm. 37 (3), 251-5 - - (Eng) 1987.
38. Pflugmann, G., Spahn, H. and Murschler, E., Rapid determination of the enantiomers of metoprolol, oxprenolol and propranolol in urine. Journal of chromatography, 416 (2), 331-339, (Eng) 1987.
39. Shingbal, D.M. and Bhangle, S.R., A simple spectrophotometric method for the estimation of metoprolol tartrate in pharmaceutical dosage forms. Indian Drugs. 24 (5), 270-271 (Eng) 1987.
40. Shingbal, D.M., Sardesai, G.D., Spectrophotometric determination of metoprolol tartrate in pharmaceutical dosage forms. Indian Drugs 24 (7), 373-374 (Eng) 1987.
41. Chodosh, S., the effects of dilevalol, metoprolol and placebo on ventilatory function in asthmatics. J. cardiovasc. Pharmacol. 11 (Suppl. 2), 518-524, (Eng) 1988.
42. Dean, W.C., Noomano, M., Retention Indices by Widebore Capillary Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection. Journal of Analytical Toxicology, 12 (2), 84-88, (Eng) 1988.

43. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas P.L.M., -
34 Edición Mexicana, Ediciones P.L.M. S.A. de C.V.
1988.
44. Mizuno, A., Influence of beta-blockers on equilibrium
disturbance after alcohol ingestion. Rinsho Yakuri -
19 (2), 409-15, (Japon) 1988.
45. Qing, Y., Resolution of enantiomeric drugs of some -
B-amino alcohols as their urea derivatives by high -
performance liquid chromatography on a chiral station-
ary phase. Journal of Chromatography, 447-208-211, -
(Eng) 1988.
46. Secretaría de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos
Mexicanos, 5a. ed. Méx. 1988.
47. Stever, W., and Schindler, M., Supercritical fluid - -
chromatography with ion-pairing modifiers separation -
of enantiomeric 1, 2-aminoalcohols as diastereomeric -
ion pairs. Journal of Chromatography 447 (2), 287-
296, (Eng) 1988.
48. Strebrova, M.Y., Detection of metoprolol and chloramo -
lol in urine. Kim-Farm. Zh. 22 (6), 765-768, (Russ)
1988.
49. The United States Pharmacopeia, The National Formulary
U.S.P. XXII, Inc. U.S.A., 1989.

50. Connors, K.A., Curso de Análisis Farmacéutico, 2a edición Edit. Reverté, S.A., España, 1980.
51. NORMA, IMSS, Metoprolol, tabletas: CBM 572, Subdirección General de Abastecimiento, Vigente a partir de Febrero de 1986.
52. Clarke, E.G., Isolation and Identification of Drugs - The Pharmaceutical Press, London, England 1969.
53. International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (1982), World Health Organization Geneva, p. 196.
54. Mc Nair H.M. and Bonelli, E.J. Basic Gas Chromatography, 5 th Edition, U.S.A. 1978.
55. AMA Drug Evaluation, 2nd Edition, American Medical Association Chicago, Illinois, U.S.A. 1980.
56. USP XXI Mark Publishing Co, Easton P.A, U.S.A. 1985.
57. Yost, R.W., Ettore, L.S. y Conlon, R.D., Introducción a la Cromatografía de Gas the Perkin Elmer Corp., Chromatography Division Norwalk U.S.A. 1981.
58. Ablad, B., Ljung.B., and Sannerstedt, R. (1986): Haemodynamic effects of B-adrenoceptor blockers in hypertension, Drugs, 11 (Suppl.1): 127-134.

59. Aellig, W.H., Duration of action and plasma levels of -beta-adrenoceptor blocking drugs. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 245 (Suppl): 32-37. (1980).
60. Ahlquist, R.P. A Study of the adrenotropic receptors - Am. J. Physiol., 153:586-600 (1948)
61. Campbell, R.W.F., Murray, A. and Julian, D.G. Ventricular arrhythmias in first 12 hours of acute myocardial infarction. Br. Heart J., 46:351-357. (1981)
62. Gibson, D.G. Pharmacodynamic properties of B-adrenergic blocking drugs in man. Drugs, 7:8-38. (1984)
63. Leenen, F.H. Possible significance of the pharmacological differentiation of B-blockers for Therapy of hypertension Br. J. Clin. Pharmacol., 7 (Suppl.2):1735-1845 (1979).
64. Shand, D.G. Pharmacokinetic properties of B-adrenergic -receptor blocking drugs. Drugs, 7:39-47 (1974).
65. Hansson, B.G., Dymling, J.F., Hedeland, H., Long-term - Treatment of moderate hypertension with the beta 1-receptor blocking agent metoprolol. Eur. J.Clin. Pharmacol., 11:239-245 (1977).
66. Howe, R., Structure activity relationships of some B-adrenergic blocking agents. Biochem. Pharmacol., 12 (Suppl) 85-86, (1963)

67. Dintenfuss, L., and Lake, B., Beta blockers and blood - Viscosity. *Lancet*, 1:1026 (1976).
68. Lefkowitz, R.J., B-adrenergic receptors: recognition - and regulation. *N. Engl. J. Med.*, 295: 323-328.
69. Prichard, B.N.C., B-adrenergic receptor blockade in - hypertension, past, present and future .*Br. J. Clin. Pharmacol.*, 5:379-399 (1978).
70. Waal-Manning, H.J., Clinical Trial of metoprolol (H 93/26) in hypertension. *N.Z. Med. J.*, 82:138 (1975).
71. Gribbin, H.R., Quantitative assessment of bronchial - B-adrenoreceptor blockade in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 7:551-556 (1979).
72. Distler, A., Keim, H.J., Cordes, U., Sympathetic responsive-ness and antihypertensive effect of B-receptor blockade in essential hypertension. *Am. J. Med.* 64:446-451 (1978).
73. Antonaccio, M., *Cardiovascular Pharmacology*, Second - Edition, Raven Press, New York (1984).
74. Braunwald, E., Coronary artery spasm as a cause of - myocardial ischemia. *J. Lab. Clin. Med.*, 97:299-312 (1981).

75. Brody, M.J., Haywood, J.R., Neural mechanisms in hypertension *Annu. Rev. Physiol.*, 42:441-453 (1980).
76. Brown, A.M., Receptors under pressure. An update on - baroreceptors. *Circ. Res.* 46:1-10 (1980).
77. Folkow, B., Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol. Rev.*, 62:347-504.
78. Amer, M.S., Mechanism of action of B-blockers in hypertension. *Biochem. Pharmacol.*, 26:171-175.
79. Frohlich, E.D., the paradox of beta-adrenergic blockade in hypertension. *Circulation*, 37:417-423, (1968).
80. Neil-Deyer, G., B-Adrenoceptor blockers and the blood brain barrier. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 11:549-553 - (1981).
81. Salvetti, A., the effect of a beta-blocker on plasma renin activity of hypertensive patients. *J. Nvcl. Biol. Med.* 17:142-150, (1973).
82. Hartford, M., Cardiovascular and renal effects of -- long term antihypertensive treatment. *JAMA.* 259:2553 2557, (May 6), 1988.