



DETERMINATION OF CITALOPRAM AND ITS ENANTIOMERS BY MEANS OF CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

Jagoda MAJCHERCZYK¹, Maksymilian KULZA²

¹ *Department of Analytical Chemistry, Jagiellonian University, Kraków, Poland*

² *Laboratory of Environmental Research, Department of Toxicology, University of Medical Sciences, Poznań, Poland*

Abstract

This paper presents a review of the most popular chromatographic techniques which are used for determination of citalopram (CIT) and its metabolites in biological specimens. These techniques have been divided according to their enantioselective properties. Examples of their applications in routine analysis of clinical and post-mortem material are presented as well. This work also covers a description of chemical and pharmacological properties of citalopram.

Key words

Citalopram; Enantiomers; Selective serotonin reuptake inhibitors.

Received 24 November 2009; accepted 25 February 2010

1. Introduction

Citalopram is an antidepressive drug belonging to the group of selective serotonin reuptake inhibitors SSRI [7]. It is mainly used in the pharmacotherapy of depression and anxiety disorders. The drug is classified as a new generation antidepressant and is increasingly supplanting conventional tricyclic antidepressant drugs (TCA), which have been used for years. This is mainly caused by the fact that SSRI drugs are characterized by low toxicity, good tolerance and a relatively small number of adverse side-effects. Citalopram, like all SSRI drugs, has a chiral structure. The presence of a chiral centre in the structure, which is an asymmetric carbon atom means that citalopram occurs as a pair of optical isomers: S-citalopram and R-citalopram. It is one of the structural features which has found practical application due to the fact that particular forms of citalopram may show differences in their pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles, con-

sequently causing them to act in different ways and have different effects.

According to the literature data concerning this topic, S-citalopram shows at least 40 times greater ability to inhibit serotonin reuptake (5-HT) than R-citalopram and twice as much as a racemic mixture [4, 23]. Currently, the S-enantiomer of citalopram (escitalopram) is the most selective serotonin reuptake inhibitor. Escitalopram's impact on the serotonin transporter is partly reversed by the R form due to the interaction with the allosteric centre in a serotonin transporter. Comparing characteristics of the two enantiomers, it should be noted that R-citalopram's affinity to the serotonin neuromediator ($K_i = 36$ nmol/l) is much lower than that of S-citalopram ($K_i = 1.1$ nmol/l) [21].

Clinical studies have shown antagonistic reactions between these isomers as well. Comparison of the activity of both forms of citalopram in the frontal lobe of the cortex in rats showed that the R-form of citalopram not only inhibits the reuptake of 5-HT to a small extent but also decrease the activity of the other form of the

drug [19]. Similar studies, performed on ovum cells of frogs which were transferred by the human serotonin transporter gene, as well as on mouse cortex, confirmed the inhibition of activity of the S-form by the R-form [26]. This inhibition is probably caused by the interaction with the 5-HT transporter and is observed only for the S-citalopram enantiomer.

Furthermore, comparing the two forms, it was noted that the rate of metabolic transformation of S-citalopram is much greater than that of R-citalopram [13]. After administration of a drug dosage with the ratio 1:1 (S-citalopram:R-citalopram) and equilibration, the ratio of enantiomers' concentration in the brain and serum was 1:3 (S:R).

2. Methods of determination of citalopram in biological specimens

Many methods which enable both qualitative and quantitative analysis of citalopram and its metabolites (dimethylcitalopram DCIT, didemethylcitalopram – DDCIT and N-oxide citalopram – CIT-NO) in biological material have been described in the available literature. Amongst them the most frequently used are: high performance liquid chromatography (HPLC) with various types of detection: UV [17, 20], fluorescence [3], diode array [1, 27], mass spectrometry [11], as well as gas chromatography (GC) [28] and capillary electrophoresis (CE) [24].

For simultaneous determination of citalopram and its main metabolite – DCIT in serum, an HPLC-UV system was applied [20]. Analytes together with the internal standard (citalopram with substitution of fluorine atom by chlorine atom in the phenyl ring) were extracted by means of liquid-liquid extraction with a mixture of heptane and isoamyl alcohol (98:2 v/v). The sample was injected onto the HPLC column. The separation was carried out on a C18 column using acetonitrile with phosphate buffer (pH = 2.5) with addition of tetraethylamine, as a mobile phase.

The elution was isocratic and absorption was measured at wavelength = 240 nm. The limits of detection were 2 and 3 ng/ml for citalopram and its metabolite, respectively.

Determination of citalopram in human plasma by means of HPLC with fluorescence detection was proposed by Bagheri et al. [3]. After extraction of analytes from the matrix by means of solvent microextraction with back-extraction (SME/BE), the sample was submitted to chromatographic separation on a C18 column, in isocratic conditions and with a mixture of acetonitrile and ammonium formate (50:50 v/v), which

was used as a mobile phase. Acquisition was carried out at the wavelengths = 245 nm for excitement (absorption) and = 295 nm for emission. The developed technique resulted in limits of detection of 0.3 and 0.8 ng/ml, respectively.

The HPLC technique with diode array detection was applied for determination of citalopram and dimethylcitalopram in serum [1]. The analytes together with the internal standard (clomipramine) were extracted with a solid phase extraction system. Extracted analytes after solvent evaporation and reconstitution in the mobile phase (mixture of acetonitrile with phosphoric buffer pH = 4.7 (40:100 v/v)) were separated on a C18 column. Detection was performed at = 220 nm. The achieved limits of detection were 4.9 ng/ml for citalopram and 3.9 for the metabolite.

The method which was proposed by Juan et al. enabled simultaneous analysis of fluoxetine, citalopram and venlafaxine in plasma [11]. Solid phase extraction was used for isolation of these drugs. The extracts were analysed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The separation was carried out on a C18 column with a mixture of ammonium buffer and acetonitrile (35:65, v/v) used as a mobile phase. Electrospray was used as an ionization source. This method allowed detection of citalopram at a concentration of 0.3 ng/ml.

Analysis of 13 new generation antidepressants (including citalopram) and their metabolites in plasma was performed by Wille et al. [28]. The analytes were extracted with solid phase extraction and the samples were analysed by means of high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). For the separation of analytes by high performance liquid chromatography, a C18 column was used. Analysis was carried out with gradient elution of the mobile phase – a mixture of phosphate buffer at pH = 2.5 and acetonitrile. The measurements were carried out at = 220 nm. Chromatographic separation in the other method (GC-MS) was done on a FOUR VF-5ms column. The sample was injected into the injector which was maintained at 300°C. Electron impact mode was applied for detection. The mass spectrometer operated in the single ion monitoring mode (SIM). Satisfactory results were achieved by both methods. Method precision (*CV*) for citalopram was 97% for HPLC-DAD (only therapeutic concentrations were checked) and from 71% (high concentrations) to 101% (low concentrations) for gas chromatography coupled to mass spectrometry.

3. Determination methods of citalopram's enantiomers in biological specimens

Due to the chiral structure of citalopram, this drug can be analysed by means of enantioselective methods, i.e. separation of the optical isomers and their subsequent qualitative and quantitative analysis. To achieve this, mainly chromatographic and electrophoretic methods are used. The process of separation of isomers is carried out on a modified column filled with chiral selector (more frequently in HPLC) or by addition of chiral selectors to the separating buffer (more frequently in CE).

Chiral stationary phase containing a macrocyclic antibiotic – vancomicine, which was covalently bonded with silica gel, was used for analysis of citalopram in plasma [29]. The analytes were extracted by liquid-liquid extraction and separated on a Chirobiotic V column. The mobile phase consisted of a mixture of methanol, triethylamine and acetic acid (400:0, 15:0.2). Acquisition was performed at $\lambda = 240$ nm. The limit of quantification for enantiomers of CIT, DCIT and DDCIT was 5 ng/ml, whilst the average limit of detection was 2 ng/ml. The same type of column was used for separation of enantiomers of citalopram and its N-demethyl derivatives in human plasma [12]. In order to isolate the analytes from the biological matrix, liquid-liquid extraction was applied. The mobile phase consisted of a mixture of methanol, acetic acid and triethylamine (99.9:0.055:0.060). Detection of analytes was performed with the fluorometric method. The limit of quantification for both enantiomers CIT and DCIT was 5 ng/ml, whilst for the enantiomers of DDCIT it was 7.5 ng/ml.

Separation of the enantiomers of citalopram was also performed by application of a chiral Cyclobond column with modified filling – made of cyclodextrins. The enantiomers of citalopram and its enantiomeric metabolites were determined in human serum and urine [25]. The analytes were isolated by liquid-liquid extraction, then determination was carried out on a chiral column filled with derivatised β -cyclodextrin. The mobile phase consisted of a mixture of citric acid buffer (pH = 6.0) and 30–40 % methanol. The elution was monitored by fluorescence detection at $\lambda = 240$ nm for excitement and $\lambda = 296$ nm for emission. The limits of detection in both matrices were 5.0; 2.1 and 1.1 ng/ml for CIT, DCIT and DDCIT, respectively.

Another example of the application of a modified Cyclobond column is chromatographic analysis with fluorimetric detection of citalopram's enantiomers and its N-demethylated metabolites in plasma [22]. In order to extract the analytes from biological material,

liquid-liquid extraction was performed. Chromatographic analysis was carried out on two types of columns which differed in cyclodextrin modifications (acetylated β -Cyclobond and Cyclobond 2000). Elution of analytes was achieved with two types of mobile phase which differed slightly, namely: mixtures of acetonitrile, methanol, diethylamine and acidified buffer (pH = 6.1)

The results of the analyses were similar. Final validation was performed for the acetylated β -Cyclobond column. The limit of detection for particular enantiomers was 3 ng/ml. The concentration of R-CIT in all samples was higher than that of the S-CIT enantiomer, and the S/R ratio was 0.56. For DCIT enantiomers, S/R was 0.72.

A cyclodextrin based column was also used in the analysis of citalopram and its metabolites in rats' serum and brain [14]. Analytes were extracted by solid phase extraction and the evaporated extract was reconstituted in 100 μ l of the mobile phase, which was a mixture of methanol and citrate buffer with addition of triethylamine (pH = 6.3). Fluorescence detection was applied at $\lambda = 240$ nm (excitement) and $\lambda = 300$ nm (emission). The analysis resulted in separation of citalopram enantiomers, with limits of detection at 0.6 ng/ml for particular isomers.

Another example of separation of citalopram enantiomers was based on application of HPLC with a chiral AGP column. This column contains β -1-glycoprotein acid deposited on a silica gel, as a chiral selector. S- and R-CIT in human plasma were separated [8]. The analytes were extracted from plasma with 2% butanol in n-hexane. The mobile phase consisted of a mixture of hexane acid with phosphate buffer (pH = 6.5). The analytes were eluted from the column and the analytical wavelength $\lambda = 240$ nm was monitored. The determined limit of quantification for R-CIT was 2.3 ng/ml, and 2.55 ng/ml for S-CIT. The limit of detection for both enantiomers was 1.5 ng/ml.

Due to the low limits of detection, good separation and small costs, capillary electrophoresis plays a significant role in the separation of chiral compounds. In the analysis of biological samples having complex matrices, it is often an alternative to HPLC.

The most frequently used selectors in citalopram enantiomers separation by capillary electrophoresis are cyclodextrins (CD). Application of CD in this field has been described in many publications. An example is the studies carried out by Berzas et al. [5]. They carried out separation of citalopram and its metabolites' enantiomers (DCIT, DDCIT, CIT-NO) in human urine by application of the chiral selector carboxymethyl- β -cyclodextrin with addition of hydrophilic polymer HPMC

(hydroxypropylmethylcellulose polymer). Addition of HPMC improved the separation of the enantiomers in the applied conditions of analysis. Chiral separator (0.2% w/v CM- β -CD) with addition of HPMC (0.05% w/v) was added to the phosphate buffer (pH = 5). Extraction of the drug from human urine was carried out with the solid phase extraction technique. The separation was carried out in the normal polarity system at 28 kV voltage and 20°C, on a silica column, with DAD detection. The acquired wavelength was $\lambda = 205$ nm. Satisfactory separation of enantiomers of citalopram and its demethyl metabolites as well as N-oxide citalopram was achieved. Validation parameters were as follows: limits of detection were 70.5 ng/ml (S-CIT), 102 ng/ml (R-CIT), 23 ng/ml (R-DCIT), 69 ng/ml (R-DDCIT) and 81.5 ng/ml (S-DCIT/DDCIT); limits of quantification were 230 ng/ml (S-CIT), 340 ng/ml (R-CIT), 80 ng/ml (R-DCIT), 230 ng/ml (R-DDCIT) and 270 ng/ml (S-DCIT/DDCIT). Separation of the enantiomers of citalopram and its active metabolite dimethylcitalopram was achieved by application of a chiral selector as mentioned above, namely 1% β -cyclodextrin sulphate (S- β -CD) [2]. 12% acetonitrile was used as an additive to 25 mM phosphoric buffer. The medicine was extracted from human plasma by utilizing liquid phase microextraction (LPME). The sample was injected into a capillary covered with 0.1% polyvinyl alcohol. Absorbance measurement was carried out at 200 nm. Satisfactory separation of enantiomers of citalopram and its active metabolite was achieved. The limits of quantification were 5.2 ng/ml (S-CIT), 4.4 ng/ml (R-CIT), 11.2 ng/ml (S-DCIT and R-DCIT). Limits of detection for the particular compounds were: 1.6 ng/ml (S-CIT), 1.4 ng/ml (R-CIT), 3.4 ng/ml (S-DCIT), 2.7 ng/ml (R-DCIT).

4. Determination of citalopram and its enantiomers in post-mortem material

Despite the low acute toxicity of SSRIs mentioned at the beginning of this work, there are many examples of determination of citalopram in post-mortem material in the scientific literature. In most cases this drug is not the main cause of death.

The work of Jenkins et al. is an example of determination of citalopram in post-mortem biological specimens [10]. They analysed different types of biological material (blood, urine, vitreous humour, cerebrospinal fluid) collected from 22 corpses during autopsies. Citalopram was extracted by liquid-liquid extraction and then analysed by GC with a nitrogen phosphorus detector (NPD). GC-MS was used for confirmation of the

results. The first of these techniques was used to determine the limit of detection and quantification, which were 10 and 20 ng/ml, respectively. In all 22 cases blood samples collected from the heart were analysed, in which citalopram concentrations ranged from 90 to 1640 ng/ml. Only 6 concentration results were within the therapeutic range (20–200 ng/ml) [18]; most results were found to be in the toxic range. The drug concentration in other body fluids and tissues showed the same tendency. Nevertheless, it was not determined unequivocally whether citalopram was the cause of death or not in any of these cases.

Acute intoxication by olanzapine and citalopram was the cause of death of a 40 year old female patient who took these drugs [9]. Biological fluids and body tissues were analysed by the same analytical procedure and conditions of measurement (described earlier). The concentration of citalopram in cardiac blood was two times higher (3350 ng/ml), olanzapine several times higher (1380 ng/ml) than concentrations reported by other authors in fatal cases. Moreover, analysis of other biological material showed the presences of citalopram in bones.

In another cited paper, it was demonstrated that citalopram contributed to the cause of death of a 41 year old female, causing serotonin syndrome together with moclobemide (an antidepressant classed as an atypical monoamine oxidase A inhibitor – MAO) [6]. Collected blood and urine samples were analysed by means of HPLC-DAD, GC-NPD and GC-MS. The results of the analysis confirmed exceeding of therapeutic levels of citalopram in blood (4470 ng/ml), its main metabolite DCIT (420 ng/ml) and moclobemide (5620 ng/ml). Additionally, the study did not show post-mortem redistribution of the quantified drugs.

Post-mortem redistribution of citalopram and its metabolites (DCIT, DDCIT) was studied by Kugelberg et al. [15, 16]. The studies, performed on rats, showed that 24 hours after death the concentration of the drug and its derivatives increases 3–4 times. Moreover, chiral analysis revealed that the concentration ratio between the enantiomers of CIT, DCIT and DDCIT does not change after death but post-mortem redistribution takes place to a similar extent in the case of both citalopram and its metabolites.

5. Summary

This review of methods used to determine citalopram in biological specimens and ones that are being developed confirms the popularity of this medicine. This trend is due to the fact that the drug belongs to

a new generation of medicines, whose use seems to be significantly safer than the TCAs used up till now. Techniques being developed enable qualitative and quantitative analysis of particular enantiomers at the level of several nanograms. Furthermore, research on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and adverse effects are constantly being carried out. Hopefully, this will lead to possibilities of lowering drug dosage, reducing toxicity connected to the presence of inactive stereoisomers or avoiding many harmful interactions, thus improving the effectiveness of the therapy and life comfort of the patient.

References

1. Akerman K. K., Jolkkonen J., Huttunen H. [et al.], High-performance liquid chromatography method for analyzing citalopram and desmethylcitalopram from human serum, *Therapeutic Drug Monitoring* 1998, 20, 25–29.
2. Andersen S., Grønhaug Halvorsen T., Pedersen-Bjergaard S. [et al.], Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid phase microextraction, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003, 33, 263–273.
3. Bagheri H., Khalilian F., Babanezhad E. [et al.], Modified solvent microextraction with back extraction combined with liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of citalopram in human plasma, *Analytica Chimica Acta* 2008, 610, 211–216.
4. Baumann P., Zullino D. F., Eap C. B., Enantiomers' potential in psychopharmacology – A critical analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram, *European Neuropsychopharmacology* 2002, 12, 433–444.
5. Berzas Nevado J. J., Guiberteau Cabanillas C., Villasenor Llerena M.J. [et al.], Enantiomeric screening of racemic citalopram and metabolites in human urine by entangled polymer solution capillary electrophoresis, An innovative robustness/ruggedness study, *Electrophoresis* 2006, 27, 905–917.
6. Dams R., Benijts T. H. P., Lambert W. E. [et al.], A fatal case of serotonin syndrome after combined moclobemide-citalopram intoxication, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, 25, 147–151.
7. Garside D., Selective serotonin reuptake inhibitors are diverse group, *Clinical and Toxicology News* 2005, 5, 1–8.
8. Haupt D., Determination of citalopram enantiomers in human plasma by liquid chromatographic separation on a chiral-AGP column, *Journal of Chromatography B* 1996, 574, 299–305.
9. Horak E. L., Jenkins A. J., Postmortem tissue distribution of olanzapine and citalopram in a drug intoxication, *Journal of Forensic Sciences* 2005, 50, 679–681.
10. Jenkins A. J., Gubanich, K., Disposition of citalopram in biological specimens from postmortem cases, *Journal of Forensic Sciences* 2002, 47, 159–164.
11. Juan H., Zhiling Z., Huande L., Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI), *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005, 820, 33–39.
12. Kosel M., Eap C. B., Amey M. [et al.], Analysis of the enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites using chiral liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 1998, 719, 234–238.
13. Kugelberg F. C., Apelqvist, G., Carlsson, B. [et al.], In vivo steady-state pharmacokinetic outcome following clinical and toxic doses of racemic citalopram to rats, *British Journal of Pharmacology* 2001, 132, 1683–1690.
14. Kugelberg F. C., Carlsson B., Ahlner J. [et al.], Stereoselective single-dose kinetics of citalopram and its metabolites in rats, *Chirality* 2003, 15, 622–629.
15. Kugelberg F. C., Druid H., Carlsson B. [et al.], Postmortem redistribution of the enantiomers of citalopram and its metabolites: An experimental study in rats, *Journal of Analytical Toxicology* 2004, 28, 631–637.
16. Kugelberg F. C., Kingbäck M., Carlsson B. [et al.], Early-phase postmortem redistribution of the enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites in rats, *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 29, 223–228.
17. Malfará W. R., Bertucci C., Costa Queiroz M. E. [et al.], Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 44, 955–962.
18. Moffat A. C., Oselton M. D., Widdop B. [et al.], Clarke's analysis of drug and poisons, Pharmaceutical Press, London, Chicago 2004.
19. Mørk A., Kreilgaard M., Sánchez C., The R-enantiomer of citalopram counteracts escitalopram-induced increase in extracellular 5-HT in the frontal cortex of freely moving rats, *Neuropharmacology* 2003, 45, 167–173.
20. Olesen O. V., Linnet K., Simplified high-performance liquid chromatographic method for the determination of citalopram and desmethylcitalopram in serum without interference from commonly used psychotropic drugs and their metabolites, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 1996, 675, 83–88.
21. Owens M. J., Knight D. L., Nemeroff C. B., Second-generation SSRIs: Human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine, *Biological Psychiatry* 2001, 50, 345–350.
22. Rochat B., Amey M., Baumann P., Analysis of enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites in plasma of depressive patients using chiral reverse-phase liquid chromatography, *Therapeutic Drug Monitoring* 1995, 17, 273–279.

23. Sanchez C., Bergqvist P. B. F., Brennum L. T. [et al.], Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities, *Psychopharmacology* 2002, 167, 353–362.
24. Satana E., Uysal U. D., Göder N. [et al.], Capillary electrophoretic determination of citalopram in pharmaceutical tablets and serum, *Chromatographia* 2006, 64, 317–320.
25. Sidhu J., Priskorn M., Poulsen M., Steady – state pharmacokinetics of the enantiomers of citalopram and its metabolites in humans, *Chirality* 1997, 9, 686–692.
26. Stórustovu S. Í., Sánchez C., Pörzgen P. [et al.], R-citalopram functionally antagonises escitalopram in vivo and in vitro: Evidence for kinetic interaction at the serotonin transporter, *British Journal of Pharmacology* 2004, 142, 172–180.
27. Unceta N., Gómez-Caballero A., Sánchez A. [et al.], Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 46, 763–770.
28. Wille S. M. R., Maudens K. E., Van Peteghem C. H. [et al.], Development of a solid phase extraction for 13 “new” generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis, *Journal of Chromatography A* 2005, 1098, 19–29.
29. Zheng Z., Jamour M., Klotz U., Stereoselective HPLC-assay for citalopram and its metabolite, *Therapeutic Drug Monitoring* 2000, 22, 219–224.

Corresponding author

Jagoda Majcherczyk
Uniwersytet Jagielloński
Zakład Chemii Analitycznej
ul. Ingardena 3
PL 30-060 Kraków
e-mail: jagoda.majcherczyk@gmail.com

OZNACZANIE CITALOPRAMU I JEGO ENANCJOMERÓW ZA POMOCĄ TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH

1. Wstęp

Citalopram jest lekiem przeciwdepresyjnym należącym do grupy inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny (ang. selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) [7]. Stosuje się go głównie w farmakoterapii depresji oraz przy zaburzeniach lękowych. Zaliczany do grupy leków przeciwdepresyjnych nowej generacji, coraz częściej wypiera stosowane od lat klasyczne trójpierscieniowe leki przeciwdepresyjne (ang. tricyclic antidepressant, TCA). Dzieje się tak głównie dlatego, iż leki należące do grupy SSRI cechują się małą toksycznością, dobrą tolerancją przez organizm oraz stosunkowo małą liczbą efektów niepożądanych.

Citalopram, jak wszystkie leki należące do grupy SSRI, posiada budowę chiralną. Obecność w strukturze tzw. centrum chiralności, które stanowi asymetryczny atom węgla, sprawia, że citalopram występuje w postaci pary izomerów optycznych S-citalopramu i R-citalopramu. Jest to jedna z cech budowy, która znalazła zastosowanie praktyczne, ponieważ poszczególne formy citalopramu mogą wykazywać różnice w swoich profilach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. Konsekwencją tego mogą być odmienne sposoby i skutki ich działania.

Według danych zawartych w literaturze przedmiotu, S-citalopram wykazuje przynajmniej czterdziestokrotnie większą zdolność inhibicji zwrotnego wchłaniania serotoniny (5-HT) niż R-citalopram i 2 razy większą niż mieszanina racemiczna [4, 23]. Enancjomer S-citalopramu (escitalopram) jest obecnie najbardziej wybiórczym inhibitorem wychwyty zwrotnego serotoniny. Działanie escitalopramu na transporter serotoninowy jest częściowo odwracane przez formę R dzięki interakcji z miejscem allosterycznym transportera serotoninowego. Porównując właściwości obydwu enancjomerów, warto zauważyć, iż powinowactwo do neuromediatora serotoninowego R-citalopramu ($K_i = 36 \text{ nmol/l}$) jest dużo mniejsze niż S-citalopramu ($K_i = 1,1 \text{ nmol/l}$) [21].

Badania kliniczne wykazały również reakcje antagonyistyczne pomiędzy izomerami. Porównanie aktywności obydwu form citalopramu w czołowym płacie kory mózgowej szczurów wykazało, iż forma R-citalopramu nie tylko w małym stopniu hamuje wychwyty zwrotny 5-HT, lecz również zmniejsza aktywność drugiej formy leku [19]. Podobne badania prowadzone na komórkach jajowych żab transferowanych genem ludzkiego transportera serotoniny oraz na korze mózgowej myszy potwierdziły zmniejszenie aktywności działania formy S przez formę R [26]. Hamowanie to powodowane jest najprawdopodobniej in-

terakcją z transporterem 5-HT i obserwuje się je tylko dla enancjomeru S-citalopramu.

Ponadto, porównując obie formy leku, zauważono, iż szybkość przemian metabolicznych S-citalopramu jest znacznie większa niż R-citalopramu [13]. Po podaniu dawki leku w stosunku 1:1 (S-citalopram:R-citalopram) i ustaleniu się stanu równowagi, stosunek stężeń enancjomerów w mózgu i surowicy wynosił 1:3 (S:R).

2. Metody oznaczania citalopramu w materiale biologicznym

W dostępnym piśmiennictwie opisano wiele metod pozwalających na analizę zarówno jakościową, jak i ilościową citalopramu i jego metabolitów (dimetylocitalopram – DCIT, didemetylocitalopram – DDCIT oraz N-tlenek citalopramu – CIT-NO) w materiale biologicznym. Wśród nich do najczęściej spotykanych należy wysoko-sprawną chromatografię cieczową (HPLC) z zastosowaniem między innymi detektorów: UV [17, 20], fluorescencyjnych [3], diodowych [1, 27] detektora mas [11], a także chromatografię gazową (GC) [28] i elektroforeza kapilarna (CE) [24].

Do równoczesnego oznaczenia citalopramu i jego głównego metabolitu – DCIT w surowicy zastosowano układ HPLC z detektorem UV [20]. Anality wraz ze standardem wewnętrznym (citalopram, w którym atom fluoru w pierścieniu fenyłowym podstawiono atomem chloru) ekstrahowano za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz, używając jako rozpuszczalnika ekstrahującego mieszaninę heptanu z alkoholem izoamylowym (98:2 v/v). Przygotowaną próbkę wprowadzano na kolumnę HPLC. Rozdzielenia dokonano na kolumnie C18 przy zastosowaniu mieszaniny acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH = 2,5 z dodatkiem tetraetyloaminy jako fazy ruchomej. Elucję prowadzono w warunkach izokratycznych, a absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 240 \text{ nm}$. Otrzymane granice oznaczalności wynosiły odpowiednio 2 i 3 ng/ml dla citalopramu i jego metabolitu.

Oznaczanie citalopramu w osoczu ludzkim metodą HPLC z detektorem fluorescencyjnym zaproponował Bagheri i in. [3]. Po ekstrakcji analitu z matrycy za pomocą mikroekstrakcji rozpuszczalnikowej z reekstrakcją (SME/BE) przygotowaną próbkę poddano rozdzielaniu chromatograficznemu na kolumnie C18, w warunkach izokratycznych, wykorzystując jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitrylu z mrówczanem amonu (50:50 v/v). Pomiar prowadzono przy długościach fali $\lambda = 245 \text{ nm}$ dla wzbudzenia i $\lambda = 295 \text{ nm}$ dla emisji. Opracowana

technika pozwoliła na uzyskanie granic wykrywalności i oznaczalności odpowiednio 0,3 i 0,8 ng/ml.

Technikę HPLC z użyciem detektora z matrycą diodową zastosowano do oznaczenia citalopramu i dimetylocitalopramu w surowicy [1]. Anality wraz ze standardem wewnętrznym (klomipramina) ekstrahowano za pomocą układu do ekstrakcji do fazy stałej. Wyizolowane anality po odparowaniu rozpuszczalników i rekonstrukcji w fazie ruchomej (mieszanina acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH = 4,7; 40:100 v/v) rozdzielano na kolumnie C18, natomiast do detekcji wykorzystano analityczną długość fali = 220 nm. Uzyskane granice wykrywalności wynosiły 4,9 ng/ml dla citalopramu i 3,9 ng/ml dla metabolitu.

Metoda zaproponowana przez Juana i in. pozwala na jednoczesną analizę fluoksetyny, citalopramu, paroksetyny i wenflaksyny w osoczu [11]. Do izolacji badanych leków zastosowano metodę ekstrakcji do fazy stałej, a następnie przygotowane próbki analizowano metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Rozdzielanie prowadzono na kolumnie C18, używając mieszaniny buforu amonowego z acetonitrylem (35:65, v/v) jako fazy ruchomej. Do jonizacji badanych związków zastosowano jonizację przez elektrorozpylanie. Metoda ta pozwoliła na detekcję citalopramu w stężeniu 0,3 ng/ml.

Analizę 13 leków przeciwdepresyjnych nowej generacji (w tym citalopramu) i ich metabolitów w osoczu przeprowadziła Wille i in. [28]. Anality z matrycy biologicznej wyekstrahowano za pomocą ekstrakcji do fazy stałej, a następnie próbki analizowano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem z matrycą diod (HPLC-DAD) oraz chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią mas (GC-MS). Do rozdzielania analitów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystano kolumnę C18. Analizy dokonano w warunkach gradientowych, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę buforu fosforowego o pH = 2,5 z acetonitrylem. Pomiary prowadzono przy analitycznej długości fali = 220 nm. Podstawą rozdzielania chromatograficznego w drugim układzie była kolumna FOUR VF-5ms. Próbkę nastrzykiwano do dozownika w temperaturze 300°C. Do detekcji wykorzystano spektrometrię mas z jonizacją w strumieniu elektronów. Widma rejestrowano w trybie SIM (ang. single ion monitoring). Zarówno jedną, jak i drugą techniką uzyskano zadowalające rezultaty. Powtarzalność metod (*CV*) dla citalopramu wynosiła odpowiednio: 97% dla HPLC-DAD (badano tylko stężenia terapeutyczne) oraz od 71 (wysokie stężenia) do 101% (niskie stężenia) dla chromatografii masowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

3. Metody oznaczania enancjomerów citalopramu w materiale biologicznym

Ze względu na chiralną budowę citalopramu, lek ten można analizować za pomocą metod enancjoselektywnych, co sprowadza się do rozdzielania form optycznych, a następnie ich jakościowej i ilościowej analizy. Stosuje się w tym celu głównie metody chromatograficzne i elektroforetyczne. Proces rozdzielania izomerów odbywa się poprzez zastosowanie zmodyfikowanej kolumny wypełnionej chiralnym selektorem (częściej w technice HPLC) lub dodanie do buforu separacyjnego chiralnych selektorów (częściej w technice CE).

Chiralną fazę stacjonarną zawierającą makrocycliczny antybiotyk – wankomycynę, związaną kowalencyjnie z żelem krzemionkowym, wykorzystano do analizy citalopramu w osoczu [29]. Anality z osocza wyekstrahowano w procesie ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz, a rozdzielanie dokonano na kolumnie Chirobiotic V, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę metanolu, trietyloaminy oraz kwasu octowego w stosunku 400:0,15:0,2. Detekcję prowadzono przy długości fali = 240 nm. Uzyskana granica oznaczalności dla enancjomerów CIT, DCIT oraz DDCIT wyniosła 5 ng/ml, natomiast uśredniona granica wykrywalności 2 ng/ml. Taki sam rodzaj kolumny zastosowano do rozdzielania enancjomerów citalopramu oraz jego N-demetylowanych pochodnych w osoczu ludzkim [12]. W celu oddzielenia analitów od matrycy biologicznej wykorzystano ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu, kwasu octowego oraz trietyloaminy w stosunku 99,9:0,055:0,060. Do detekcji analitów zastosowano metodę fluorymetryczną. Granica oznaczalności dla obydwu enancjomerów CIT oraz DCIT wyniosła 5 ng/ml, natomiast w przypadku enancjomerów DDCIT 7,5 ng/ml.

Rozdzielenie enancjomerów citalopramu przeprowadzono, również używając kolumny chiralnej Cyclobond oraz jej modyfikacji, której wypełnienie stanowią cyklodekstryny. Analizie poddano enancjomery citalopramu i jego enancjomeryczne metabolity w surowicy i moczu ludzkim [25]. Anality wyizolowano, stosując ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz, po czym oznaczenia prowadzono na kolumnie chiralnej wypełnionej derywatyzowaną -cyklodekstryną. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę buforu kwasu cytrynowego (pH = 6,0) z 30–40% metanolem. Wymywane substancje monitorowano, stosując detekcję fluorescencyjną przy długościach fali = 240 nm dla wzbudzenia oraz = 296 nm dla emisji. Granice wykrywalności badanych substancji w obydwu matrycach wynosiły odpowiednio: 5,0; 2,1 oraz 1,1 ng/ml dla CIT, DCIT i DDCIT.

Kolejnym przykładem zastosowania zmodyfikowanej wersji kolumny Cyclobond jest analiza chromatograficzna z detekcją fluorymetryczną enancjomerów citalopramu i jego N-demetylowanych metabolitów w osoczu [22].

W celu izolacji analitów z materiału biologicznego zastosowano ekstrakcję ciecz-ciecz. Analizę chromatograficzną przeprowadzono przy zastosowaniu dwóch rodzajów kolumn różniących się modyfikacjami cyklodekstryny (acetylowana -Cyclobond oraz Cyclobond 2000). Do elucji analitów z kolumn zastosowano fazy ruchome zbliżone składem, tj. mieszaninę acetonitrylu, metanolu, dietyloaminy oraz buforu zakwaszonego do pH = 6,1. Rezultaty obu analiz były podobne. Ostatecznie walidację przeprowadzono dla acetylowanej kolumny -Cyclobond. Uzyskano granice oznaczalności poszczególnych enancjomerów równą 3 ng/ml. Stężenie enancjomeru R-CIT w przypadku wszystkich próbek było większe od stężenia enancjomeru S-CIT, a współczynnik S/R wyniósł 0,56. Dla enancjomerów DCIT współczynnik S/R był równy 0,72.

Kolumnę na bazie cyklodekstryny zastosowano również do analizy citalopramu i jego metabolitów w surowicy i mózgu szczurów [14]. Ekstrakcji analitów dokonano metodą ekstrakcji do fazy stałej, a odparowaną do sucha próbkę rozpuszczono w 100 μ l fazy ruchomej, którą stanowiła mieszanina metanolu z buforem cytrynianowym z dodatkiem trietyloaminy o pH = 6,3. Zastosowano detekcję fluorescencyjną ze wzbudzeniem przy długości fali = 240 nm i emisją przy = 300 nm. W wyniku przeprowadzonej analizy dokonano rozdzielania enancjomerów citalopramu, otrzymując dla poszczególnych jego form granicę wykrywalności równą 0,6 ng/ml.

Kolejny przykład rozdzielania enancjomerów citalopramu opiera się na zastosowaniu metody HPLC z użyciem chiralnej kolumny AGP. Kolumna ta zawiera jako chiralny selektor osadzony na żelu krzemionkowym kwas -1-glikoproteinowy. Rozdzieleniu został poddany S- oraz R-CIT znajdujący się w osoczu ludzkim [8]. Anality wyekstrahowano z osocza za pomocą 2% butanolu w n-heksanie. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę kwasu heksanowego z buforem fosforanowym o pH = 6,5. Anality eluowano z kolumny przy analitycznej długości fali = 240 nm. Wyznaczona granica oznaczalności dla R-CIT wyniosła 2,3 ng/ml, a dla S-CIT 2,55 ng/ml. Granice wykrywalności dla obydwu enancjomerów były równe 1,5 ng/ml.

Ze względu na możliwość uzyskania niskich granic wykrywalności podczas oznaczeń, dużą rozdzielczość oraz małe koszty, elektroforeza kapilarna odgrywa znaczącą rolę w rozdzielaniu chiralnych związków. Podczas analizy próbek biologicznych o skomplikowanej matrycy jest często alternatywną metodą dla HPLC.

Najczęściej stosowanymi selektorami do rozdzielania enancjomerów citalopramu metodą elektroforezy kapilarnej są cyklodekstryny (CD). Zastosowanie CD w tej kwestii zostało opisane w wielu publikacjach. Przykładem mogą być badania wykonywane przez Berzas i in. [5]. Przeprowadzili oni rozdzielanie enancjomerów citalopramu i jego metabolitów (DCIT, DDCIT, CIT-NO) w moczu

ludzkim, stosując jako chiralny selektor karboksymetyl- -cyklodekstryny wraz z dodatkiem hydrofilowego polimeru HPMC (polimer hydroksypropylometylocelulozowy). Dodatek HPMC zdecydowanie poprawił rozdzielanie enancjomerów w warunkach prowadzonej analizy. Chiralny separator (0,2% w/v CM- -CD) wraz z dodatkiem HPMC (0,05% w/v) został dodany do buforu fosforanowego o pH = 5. Ekstrakcji leku z ludzkiego moczu dokonano za pomocą techniki ekstrakcji do fazy stałej. Rozdzielenie prowadzono w normalnym układzie polaryzowalności przy napięciu równym 28 kV i temperaturze 20°C na krzemionkowej kolumnie przy detekcji DAD. Anality rejestrowano przy długości fali = 205 nm. Uzyskano satysfakcjonujące rozdzielanie enancjomerów citalopramu oraz jego demetylowanych pochodnych, jak również N-tlenku citalopramu. W toku badań walidacyjnych metody osiągnięto dla poszczególnych enancjomerów granice wykrywalności równe: 70,5 ng/ml (S-CIT), 102 ng/ml (R-CIT), 23 ng/ml (R-DCIT), 69 ng/ml (R-DDCIT), 81,5 ng/ml (S-DCIT/DDCIT), natomiast granica oznaczalności wynosiła: 230 ng/ml (S-CIT), 340 ng/ml (R-CIT), 80 ng/ml (R-DCIT), 230 ng/ml (R-DDCIT), 270 ng/ml (S-DCIT/DDCIT).

Rozdzielenia enancjomerów citalopramu i jego aktywnego metabolitu – dimetylocitalopramu dokonano, stosując, tak jak powyżej, chiralny selektor w postaci 1% siarczanu -cyklodekstryny (S- -CD) [2]. Jako dodatek do 25 mM buforu fosforanowego zastosowano 12% acetonitryl. Lek z osocza ludzkiego wyekstrahowano, stosując mikroekstrakcję do fazy ciekłej (LPME). Próbkę nastryknięto do kapilary pokrytej roztworem 0,1% alkoholu poliwinylowego. Pomiar absorbancji prowadzono przy długości fali 200 nm. Uzyskano zadowalające rozdzielanie dla enancjomerów citalopramu i jego aktywnego metabolitu oraz granice oznaczalności równe: 5,2 ng/ml (S-CIT), 4,4 ng/ml (R-CIT), 11,2 ng/ml (S-DCIT oraz R-DCIT). Granice wykrywalności dla poszczególnych związków wynosiły: 1,6 ng/ml (S-CIT), 1,4 ng/ml (R-CIT), 3,4 ng/ml (S-DCIT), 2,7 ng/ml (R-DCIT).

4. Oznaczanie citalopramu i jego enancjomerów w materiale sekcyjnym

Pomimo małej toksyczności ostrej leków należących do grupy SSRI, a wymienionych na początku niniejszej pracy, w literaturze naukowej nie brakuje przykładów, w których citalopram oznaczany jest w materiale sekcyjnym. W większości przykładów jednak nie jest on główną przyczyną zgonów.

Przykładem oznaczania citalopramu w próbkach biologicznych pochodzenia sekcyjnego jest praca Jenkins i in. [10]. Poddali oni analizie różnorodny materiał biologiczny (krew, mocz, ciało szkliste oka, płyn mózgowo-rdzeniowy) pobrany podczas 22 sekcji zwłok. Cita-

lopram wyosobniono za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz, a następnie poddano analizie za pomocą układu GC z detektorem azotowo-fosforowym (ang. nitrogen phosphorus detector, NPD). Dodatkowo do potwierdzenia otrzymanych wyników zastosowano układ GC-MS. Pierwszą z technik wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności wynoszące odpowiednio 10 oraz 20 ng/ml. W każdym z 22 przypadków analizie poddano krew pobraną z serca, w której stężenie citalopramu wahało się od 90 do 1640 ng/ml. Tylko 6 z uzyskanych wyników znalazło się w zakresie stężeń terapeutycznych (20–200 ng/ml) [18], natomiast większość znajdowała się w zakresie stężeń toksycznych. Stężenia leku w pozostałych płynach ustrojowych i wycinkach narządów wykazywały taką samą tendencję. Jednakże w żadnym z wymienionych przypadków nie stwierdzono jednoznacznie, czy citalopram stał się przyczyną zgonu.

Ostre zatrucie olanzapiną i citalopramem było przyczyną śmierci czterdziestoletniej pacjentki zażywającej wymienione leki [9]. Pobrane płyny biologiczne i wycinki narządów poddano badaniom, stosując taką samą jak wcześniej procedurę i warunki pomiarowe. Przeprowadzona analiza wykazała, iż stężenie citalopramu we krwi pobranej z serca przekracza prawie dwukrotnie (3350 ng/ml), a olanzapiny kilkakrotnie (1380 ng/ml) stężenia wykazywane przez innych autorów w przypadku zatruc śmiertelnych. Ponadto badania pobranych do analizy innych próbek biologicznych wykazały występowanie citalopramu w kościach.

W kolejnej cytowanej pracy wykazano, że citalopram przyczynił się do zgonu czterdziestoletniej kobiety, wywołując w połączeniu z moklobemidem (lek przeciwdepresyjny należący do grupy atypowych inhibitorów monoaminooksydazy A, MAO) syndrom serotoninowy [6]. Pobrane do badań próbki krwi i moczu poddano analizie za pomocą technik HPLC-DAD, GC-NPD oraz GC-MS. Wyniki analiz potwierdziły znaczne przekroczenie zakresów stężeń terapeutycznych citalopramu we krwi (4470 ng/ml), jego głównego metabolitu DCIT (420 ng/ml) oraz moklobemidu (5620 ng/ml). Dodatkowo badania nie wykazały pośmiertnej redystrybucji oznaczanych leków.

Pośmiertną redystrybucję citalopramu i jego metabolitów (DCIT, DDCIT) badał Kugelberg i in. [15, 16]. Badania prowadzone na szczurach wykazały, iż 24 godziny po zgonie stężenie leku i jego pochodnych we krwi wzrasta około 3–4-krotnie. Ponadto analiza chiralna ujawniła, iż stosunek poszczególnych enancjomerów: CIT, DCIT i DDCIT nie ulega zmianie po zgonie, natomiast pośmiertna redystrybucja zachodzi w podobnym stopniu zarówno w przypadku citalopramu, jak i jego metabolitów.

5. Podsumowanie

Przegląd stosowanych, a także wciąż rozwijanych technik oznaczania citalopramu w materiale biologicznym świadczy o wzroście popularności tego leku. Tendencja ta wynika z faktu, iż należy on do leków nowej generacji, używanie których wydaje się znacznie bezpieczniejsze niż wykorzystywanych dotychczas w terapii TCA.

Rozwijane techniki pozwalają na analizę jakościową i ilościową poszczególnych enancjomerów na poziomie rzędu kilku nanogramów. Dodatkowo cały czas trwają badania nad ich właściwościami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi oraz oddziaływaniami z innymi lekami. Daje to w przyszłości nadzieję na redukcję dawki leku, zmniejszenie toksyczności wynikającej z obecności nieaktywnych stereoisomerów czy też uniknięcie wielu szkodliwych interakcji, a co za tym idzie, poprawę skuteczności terapii i komfortu życia pacjenta.