

*Prikazi bolesnika/
Case reports*

ODREĐIVANJE CITALOPRAMA U *POST MORTEM* MATERIJALU KORIŠĆENJEM METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE SA PDA I MS DETEKCIJOM. *Prikaz slučaja*

DETERMINATION OF CITALOPRAM IN *POST MORTEM* SAMPLES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD WITH PDA AND MS DETECTION. *Case report*

Correspondence to:

Dipl. bioh. **Gordana Brajković**,
Specijalista toksikološke hemije
Vojnomedicinska akademija,
Centar za kontrolu trovanja, Beograd
Telefon: +381-11-3609481

E-mail: gocab@panet.rs

Gordana Brajković, Dragana Rančić, Nadica
Marinković, Vesna Kilibarda

Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Abstract

Key words:

Citalopram; toxicology-chemical analysis; liquid chromatography; mass and UV spectrometry.

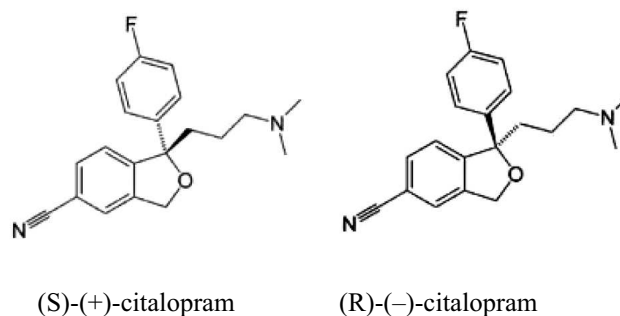
Ključne reči:

Citalopram; toksikološko-hemijska analiza; tečna; hromatografija; masena i UV spektrometrija.

Citalopram is highly selective serotonin reuptake inhibitor widely used in the treatment of depression. The paper describes the case report of poisoning drugs and alcohol 58-year-old woman with a fatal outcome. Toxicology-chemical analysis of blood, urine, gastric contents, body tissue samples, and of thick white fluid sample proved the presence of drugs citalopram, lorazepam, ibuprofen, which was determined by liquid chromatography coupled with diode-array detection (DAD) and confirmed technique of liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS), where data are collected either in full-scan ES+ mode at m/z 100-500, and the presence of alcohol by headspace gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). Citalopram was isolated using a liquid-liquid extraction with chloroform at pH 9.0 with satisfactory extraction recoveries. Separation was achieved on the Symmetry® C8 column with mobile phase acetonitrile: dihydrogen sodium phosphate 50 mM pH 3.6 in the gradient mode, and XTerra® RP18 column with a mobile phase: 5 mM ammonium formate (pH 3.5): acetonitrile with 0,1% formic acid. The method is validated blood and linear in the range of 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0.99$). Limit of detection was 25 ng/mL and limit of quantification was 50 ng/mL. Development of specific methods for their determination citalopram is of great interest in clinical and forensic toxicology.

UVOD

Citalopram je antidepresiv takozvane „druge generacije“ lekova, koji ima široki terapijski potencijal u lečenju depresije, bola i zavisnosti. Iz klase je selektivnih inhibitora serotonina (SSRI). On ima FDA odobrenje za lečenje kliničke depresije i brojnih anksioznih oboljenja. Citalopram ima jedan stereocentar, za koji se 4-fluoro fenilna grupa i N,N-dimetil-3-metil propilna grupa vezuju. Usled hiralnosti molekula postoje dve enantiomerne forme. One se nazivaju S-(+)-citalopram i R-(-)-citalopram (sl 1.). Samo S-(+)-citalopram enantiomer ima željeno antidepresivno dejstvo.(1)



Slika 1. Strukturna formula citaloprama

Citalopram-((RS)-1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3 dihidroisobenzofuran-5-karbonitril) se prodaje kao recemska smesa koja se sastoji iz S-(+)-citaloprama i R-(-)-citaloprama u obliku bromovodonika ili oksalatne soli.

Hrana ne utiče na apsorbciju iz gastro-intestinalnog trakta. Pik maksimalne koncentracije u plazmi dostiže se posle 4 sata. Veći deo leka se izlučuje nepromenjen, a oko 10% leka podleže metabolizmu u jetri pod dejstvom citohrom P450 i to CYP3A4 i CYP2C19 gde se demetiluje u N-desmetil citalopram (DCT), a ovaj u N,N-didesmetil citalopram (DDCT), oksiduje u citalopram-N-oksidi, a deaminacijom prelazi u deamino propionsku kiselinu. Metaboliti su manje farmakološki aktivni. Citalopram i njegovi metaboliti se ekskretuju urinom (oko 80% od unesene doze), a manji deo fecesom (oko 10%), i to kao nepromenjeni citalopram, DCT, DDCT i u obliku glukuronida. Poluvreme eliminacije za citalopram je 35 sati. Bioraspoloživost leka je 80% u odnosu na intravensku dozu.^(1,2,3,4) Distribucija se odvija vezivanjem za proteine plazme sa oko 80%. Početna doza koja se preporučuje je 20 mg/dan, sa punom dozom 40 mg/dan.^(3,4,5) Terapijska koncentracija u krvi je od 20-200 ng/mL.⁽¹⁾ Treba ga koristiti oprezno sa drugim lekovima koji deluju na CNS. Ako se koristi sa inhibitorima MAO može doći do smrtonosne reakcije. Rizik od krvarenja može biti povećan ako se koristi uporedo sa aspirinom, varfarinom i drugim lekovima koji utiču na koagulaciju i funkciju trombocita. Ukoliko se kombinuje sa drugim lekovima iz klase SSSR može doći do Serotonin sindroma. Tokom ranog tretmana ovim lekom povećan je rizik od pokušaja suicida. Drugi neželjeni efekti su apatija, konfuzija, pospanost, nesanicnost, slabost, uznemirenost, amnezija, anksioznost, smanjen libido, vrtoglavica, umor, poremećaji koncentracije, povećana depresija, migrene.⁽⁶⁾ Zabeležen je i porast holesterola, LDL holesterola posle upotrebe citaloprama

Simptomi predoziranja citalopramom samog ili u kombinaciji sa drugim lekovima i alkoholom su vrtoglavica, znojenje, mučnina, povraćanje, drhtavica, pospanost, sinusna tahikardija, amnezija, konfuzija, konvulzije, koma.

Mehanizam delovanja citaloprama kao antidepresiva je povezano sa potenciranjem serotonergičke aktivnosti u CNS usled inhibicije ponovnog preuzimanja serotonina u presinaptičkim neuronima, povećavajući na taj način intrasynaptički nivo serotonina. Ima nizak afinitet za 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, dopamin D₁ i D₂, A₁, A₂, adrenergičke, histaminske H₁, muskarinske, holinergičke, benzodiazepinske, opioidne i GABA (gama aminobuterna kiselina) receptore. Metaboliti citaloprama DCT i DDCT imaju antikoagulantno dejstvo produžavajući vreme krvarenja.^(8,9)

Prikaz slučaja

Ženski leš, životnog doba 58 godina, pronađen u svom stanu, na podu. Uz leš je dostavljena plastična bočica od 0,5 L u kojoj se nalazilo oko 100 mL guste, bele tečnosti.

Spoljašnjim pregledom leša ustanovljen je krvni podliv gornje trećine desne ušne školjke. Nisu ustanovljene druge povrede. Vidljiva zamazanost prednje strane vrata i gornjeg dela grudnjačinog predela beličastim, praškastim sadržajem.

Unutrašnji obdukcioni nalaz pokazuje krvni podliv poglavine u desnom slepoočnom predelu. Svi organi mnogokrvi, a patohistološke promene su ustanovljene na mozgu, jetri i gušterači. Na mozgu je uočljiv edem, a mikroskopski sitna, sveža krvarenja. Jetra je makroskopski manje jasne građe, difuzno žučkasta, a histološki je ustanovljena masna izmenjenost jetre. Gušterača je takođe manje jasne građe, mrljasto crvenkasta, a mikroskopski se uočavaju područja svežeg krvarenja.

Toksikološkom hemijskom analizom ustanovljeno je prisustvo etanola i lekova (citalopram, lorazepam i ibuprofen). Na osnovu obdukcionog nalaza i toksikološko hemijske analize dato je mišljenje da je smrt nastupila usled trovanja lekovima (citalopram, lorazepam i ibuprofen) u kombinaciji sa alkoholom etanolom (1,42%).

MATERIJAL I METODE

Uzorci krvi, urina, želudačnog sadržaja i tkiva organa pokojne, dostavljeni su od Instituta za patologiju i sudsku medicinu. Biološki uzorci čuvaju se do analize na temperaturi od -20°C. Hloroform, amonijak, acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Darmstadt, Nemačka, a standard citalopram- hidrobromid od *Sigma-Aldrich*. Reagensi mobilne faze: natrijum dihidrogen fosfat koji su korišćeni za analizu dobijeni su od *Sigma-Aldrich*, p.a. Citalopram je određen tehnikom tečne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara. Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza: acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 doteran sa H₃PO₄ (20%). Mobilna faza je filtrirana i degazirana preko membranskog filtra; kolona Symmetry[®] C8 4,6x250 mm Waters sa predkolonom Sentry Guard Symmetry[®] C18, temperatura kolone: 30°C, brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min gradijent: PDA detektor: λ = 240,0 nm; retenciono vreme za citalopram: Rt ≈ 14,01.

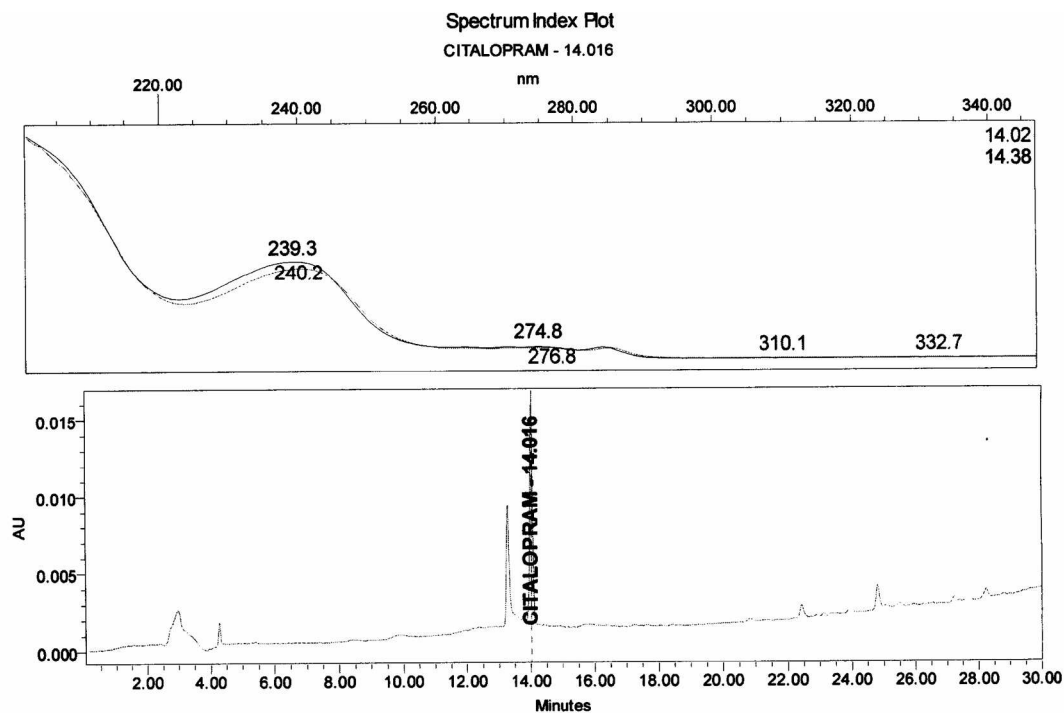
Određivanje citaloprama vršeno je i tečnom hromatografijom sa maseno-spektrometrijskim detektorom LC-MS. Hromatografski uslovi za LC-MS: Tečno-maseni hromatograf Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Kolona XTerra[®] RP18 3,5 μm 2,1 mm x 150 mm, temperatura kolone 20°C. Mobilna faza: Komponenta A: 5 mM amonijum formijat pH 3,5 doteran sa mravljom kiselinom. Komponenta B: acetonitril sa 0,1% mravljom kiselinom. Autoempler: temperatura 20°C, dužina analize 26 min. Temperatura izvora 125°C, temperatura desolvatacije 430°C; Protok gasa: desolvatacioni 400L/h, konusni 50L/h.

Protok mobilne faze: 0,2 mL/min, gradijent; Napon na kapilari 4 kV. Maseni spektrometrijski detektor je optimiziran i podešen na pozitivan mod ES⁺, opseg masa od 100-500, scan time 1. retenciono vreme za citalopram: Rt ≈ 13,99.

Uzorci krvi, urina i želudačnog sadržaja, uzeti prilikom obdukcije, u zapremini 5 ml zaalkalisani su sa 100 μL NH₄OH (pH 9,0) i ekstrahovani sa tri puta većom zapreminom hloroforma. Posle ekstrakcije suvi ostatak rekonstituisan je u mobilnoj fazi i analiziran HPLC-PDA-MS metodom.

Uzorci tkiva organa su homogenizovani i pripremani su po modifikovanoj Stasovoj metodi. Ekstrahovani su hloroformom pri pH 9. Suvi ekstrakt rekonstituisan je u 1 mL mobilne faze i hromatografisan. Određivanje koncentracije vršeno je poređenjem površine pikova analiziranih jedinjenja sa odgovarajućim pikovima plazme opterećenih standardnim rastvorima poznate koncentracije.

Izolovanje citaloprama može se raditi i na Oasis[®] HLB ketridžima metodom čvrsto-fazne ekstrakcije u kiselolj ili neutralnoj sredini. Prinos ekstrakcije u oba slučaja je visok od 80-100%, a priprema brza i jednostavna što je od velikog značaja u urgentnoj toksikologiji.



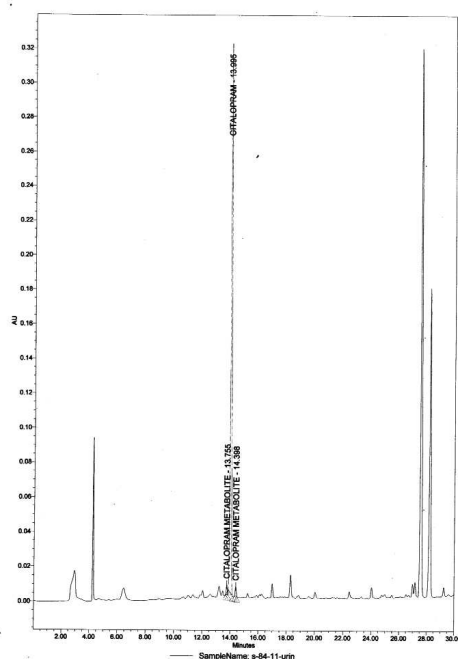
Slika 2. Hromatogram i UV spektar std citaloprama

REZULTATI

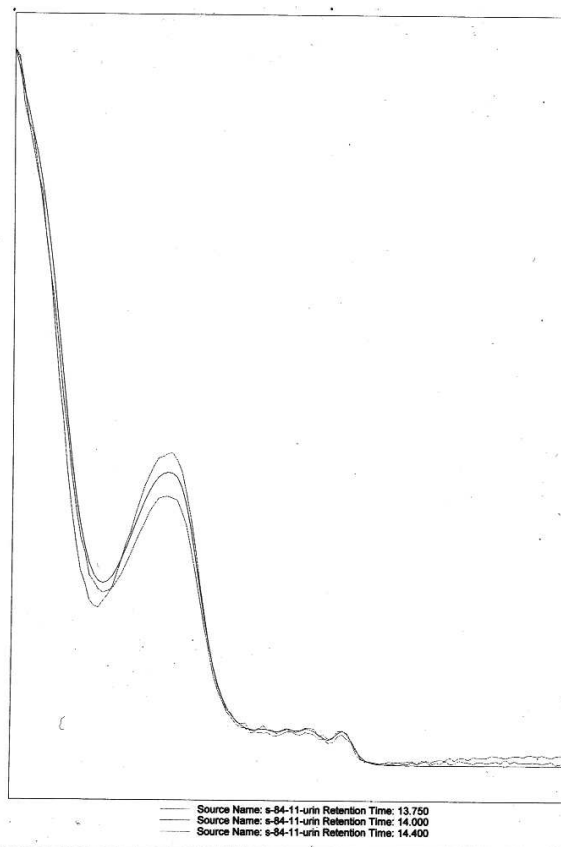
Uvedene su metode HPLC/PDA-MS za dokazivanje i određivanje citaloprama u biološkom materijalu.

Na slici 2 prikazani su hromatogram i UV spektar standarda citaloprama koji se poklapa sa UV spektrom iz biblioteke spektara.

Na slikama 3, 4, 5, prikazani su hromatogrami i UV spektri citaloprama i njegovih metabolita u uzorku urina i uzorku tkiva organa bubrega. U ovim uzorcima pretpostavlja se da je detektovano i prisustvo njegovih metabolita DCT i DDCT (kojih nema u UV toksikološkoj biblioteci spektara), a zbog slične hemijske strukture, imaju veoma slične UV spektre sa citalopramom.



Slika 3. Hromatogram citaloprama i njegovih metabolita iz uzorka urina

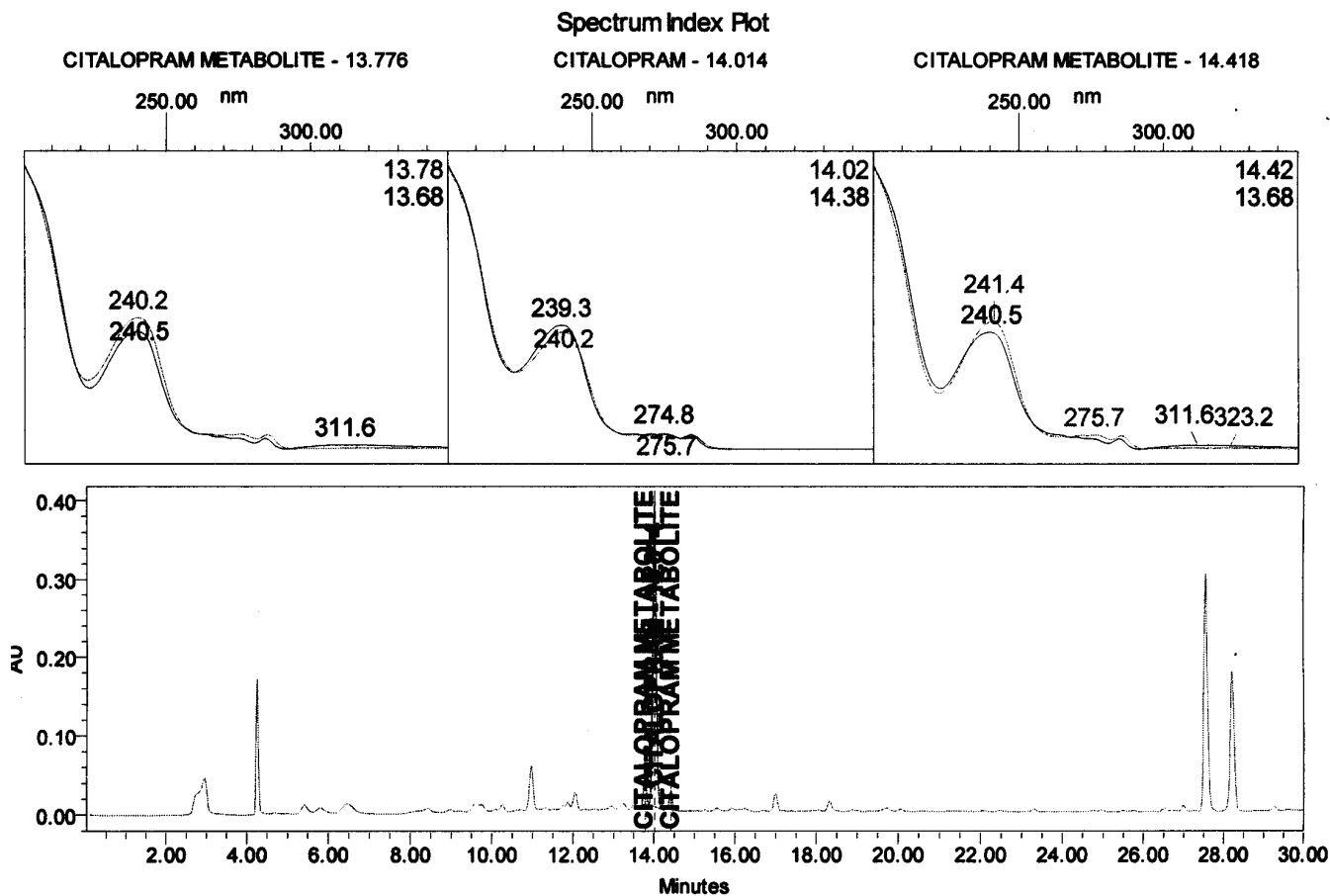


Slika 4. UV spektri citaloprama i njegovih metabolita iz uzorka urina

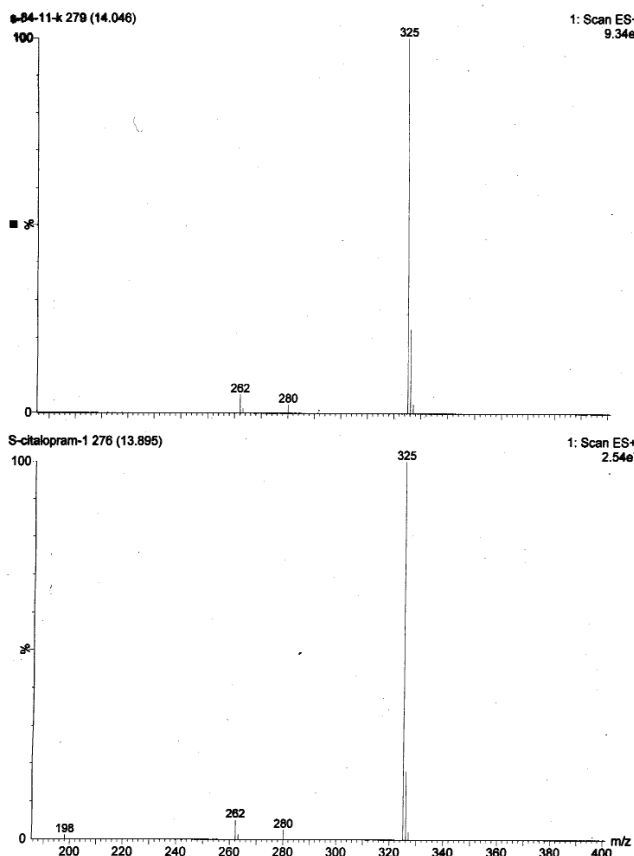
Na slikama 6-7 prikazani su uporedni hromatogrami i MS spektri citaloprama u uzorku krvi i standardu selektovani na jon 325 nakon hromatografisanja na LC-MS-u.

Metoda je validovana i linearna u rasponu 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL sa prinosom od 64,5 – 81,2%.

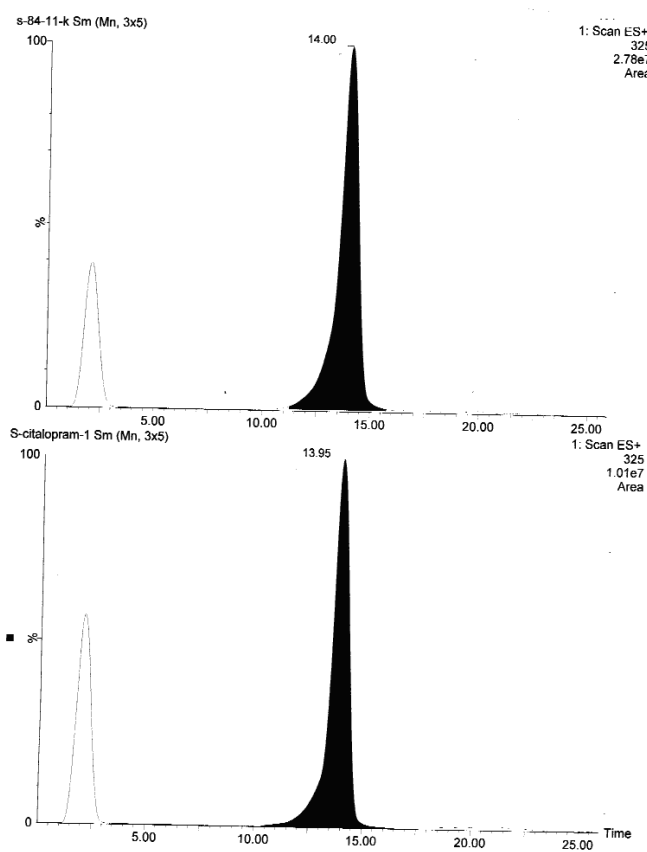
Kalibracione krive za citalopram su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, sa srednjim vrednostima površine pikova za svaku koncentraciju, korišćenjem programa Excel 5. Istim programom su izračunati koeficijenti korelacije (r) i jednačina prave $y = a \pm bx$.



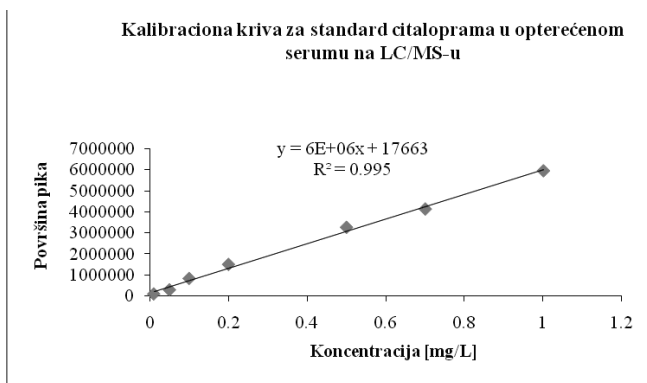
Slika 5. Hromatogram i UV spektri citaloprama i njegovih metabolita iz uzorka tkiva organa bubrega



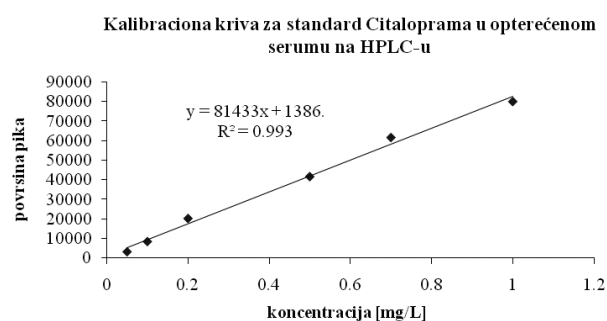
Slika 6. Maseni spektar citaloprama u standardu i uzorku krvi



Slika 7. Hromatogram citaloprama u standardu i uzorku krvi na LC-MS-u



Slika 8. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećeni serum standardnim rastvorima citaloprama na LC-MS-u



Slika 9. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećeni serum standardnim rastvorima citaloprama na HPLC-u

Na slikama 8-9 prikazane su kalibracione krive citaloprama na HPLC i LC-MS.

Primenom HPLC-PDA metode, izvršena je analiza uzoraka krvi, urina, želudačnog sadržaja i tkiva organa i utvrđeno prisustvo citaloprama u kombinaciji sa drugim lekovima. Rezultati dobijeni analizom uzoraka tkiva organa i bioloških tečnosti prikazani su u tabeli 1.

U dostavljenom uzorku sadržaja tečnosti iz flašice, koja je nađena pored leša, takođe je dokazano prisustvo lekova citaloprama, lorazepam i ibuprofena.

Primenom metode gasne hromatografije (GC) sa plamenom jonizacionim detektorom (FID) – “head-space” tehnika, dokazano je prisustvo etil alkohola i to u krvi (1,42 %), urinu (2,65 %); želudačnom sadržaju (2,17 %).

DISKUSIJA

U prikazanom slučaju toksikološko-hemijskom analizom krvi, urina, želudačnog sadržaja i uzoraka tkiva organa dokazano je prisustvo lekova citaloprama, lorazepam, ibuprofena i alkohola. Zaključeno je da je smrt nastupila usled trovanja lekovima u kombinaciji sa alkoholom etanolom.

Koncentracija citaloprama je u krvi (2092,3 ng/mL) imala je toksičnu vrednost. Citalopram je određen i u urinu (9994,0 ng/mL), želudačnom sadržaju (18810,6 ng/mL), jetri i žučnoj kesi (283,7 ng/g), bubregu (1200,8 ng/g), mozgu (921,3 ng/g). U ovim uzorcima detektovano je i prisustvo njegovih metabolita.

Primena tehnike tečne hromatografije sa PDA i MS detekcijom je od velikog značaja u urgentnim i sudsko-medicinskim analizama. Metoda je validovana i linearna u

rasponu od 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL sa prinosom od 64,5 – 81,2%.

U radovima su prikazane čvrsto-fazne, kao i tečno-tečne pripreme uzoraka bioloških tečnosti i tkiva organa na citalopram i metabolite uz istovremenu detekciju različitih antidepresiva. Primenjene su tehnike: HPLC sa fluorescentnom detekcijom, HPLC sa UV detekcijom, sa masenom spektrometrijom, gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom. Savremene metode kao što je metoda UPLC sa tandem masenom spektrometrijom ili LC-ESI-MS/MS pokazuju izrazitu osetljivost, preciznost, linearnost, skraćanje vremena analize i zanemarljiv uticaj rastvarača kao i uticaj bazne linije seruma.^(10,11,12,13,14,15,16,17,18,20)

Interesantan je rad koji govori o određivanju citaloprama i njegovih metabolita u kosi i noktima metodom tečne hromatografije u kombinaciji sa elektrosprej jonizacijom sa masenom spektrometrijom (LC-ESI-MS). Utvrđeno je kod osoba koje su primale terapiju bar godinu dana da su uzorci bili pozitivni na ove komponente i 4, 6, 9, 15 meseci nakon prekida terapije. Vrednosti u kosi za citalopram kretale su se od 1,04-8,69 ng/mg, a za desmetilcitalopram 0,07-1,27 ng/mg dok su vrednosti u noktima za citalopram iznosile 0,40-10,49 ng/mg a za desmetilcitalopram 0,32-3,70 ng/mg.⁽¹⁹⁾

ZAKLJUČAK

Određivanje koncentracije citaloprama u uzorcima je značajno u urgentnoj toksikologiji zbog mogućih trovanja, jer tokom ranog tretmana ovim lekom povećan je rizik od pokušaja samoubistva, zatim praćenja terapije posebno u kombinaciji sa drugim lekovima, zbog mogućih brojnih neželjenih efekata, kao i u sudskoj medicini. Postupak pripreme je jednostavan a detekcija na HPLC-MS-PDA je precizna i specifična kojom se mogu pratiti terapijske i toksične koncentracije. Ova tehnika je razvijena za screening toksikološki značajnih jedinjenja u biološkom materijalu. Zahvaljujući biblioteci spektara koju poseduje, primenjuje se kao screening tehnika za istovremenu identifikaciju velikog broja toksikološki značajnih jedinjenja.

Uzorak	Citalopram [ng/mL]	Metaboliti citaloprama [ng/g]	Lorazepam [ng/mL]	Ibuprofen [ng/mL]
Krv	2092,3	detektovan	188,7	2720,0
Urin	9994,0	detektovan	50,3	5973,0
Želudačni sadržaj	18810,6	detektovan	2157,9	76440,2
Mozak	921,3	detektovan	9,8	19,1
Jetra	283,7	detektovan	0,1	5,5
Bubreg	1200,8	detektovan	0,6	119,2

Tabela 1: Koncentracija lekova citaloprama, lorazepam i ibuprofena u biološkim uzorcima

Apstrakt

Citalopram je visoko selektivni inhibitor ponovnog preuzimanja serotonina i u širokoj je upotrebi u lečenju depresije. U radu je opisan prikaz slučaja trovanja lekovima i alkoholom, žene 58 godina, sa smrtnim ishodom. Toksikološko-hemijskom analizom krvi, urina, želudačnog sadržaja, uzoraka tkiva organa i uzorka guste bele tečnosti dokazano je prisustvo lekova citaloprama, lorazepam, ibuprofena koji su određeni tehnikom tečne hromatografije sa UV detektorom koji apsorbuje u UV oblasti od 190-400 nm (HPLC-PDA) i tehnikom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS) gde su podaci prikupljeni u pozitivnom režimu ES+, opseg masa m/z 100-500. Prisustvo alkohola dokazano je primenom metode "head-space" gasne hromatografije sa plameno jonizacionim detektorom (GC-FID). Citalopram je izolovan tečno-tečnom ekstrakcijom u hloroformu pri pH 9,0 sa zadovoljavajućim prinosom ekstrakcije. Razdvajanje je postignuto na koloni Symmetry® C8 sa mobilnom fazom acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 i u gradijent modu i na koloni XTerra® RP18 sa mobilnom fazom: 5 mM amonijumformijat (pH 3,5) : acetonitril sa 0,1% mravljom kiselinom. Metoda je validovana u krvi i linearna je u rasponu 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL. Od velikog je značaja razvoj specifičnih metoda za određivanje citaloprama u kliničkoj i forenzičkoj toksikologiji

LITERATURA

1. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3 Edition, London, Pharmaceutical press 812-813.
2. Dalgaard L, Larsen C. Metabolism and excretion of citalopram in man: identification of O-acyl- and N-glucuronides. *Xenobiotica*. 1999 Oct;29(10):1033-41.
3. Olesen OV, Linnet K. Studies on the stereoselective metabolism of citalopram by human liver microsomes and cDNA-expressed cytochrome P450 enzymes. *Pharmacology*. 1999 Dec;59(6):298-309.
4. Kopenen H, Lepola U, Leinonen E et al. Citalopram in the treatment of obsessive-compulsive disorder: an open pilot study. *Acta Psychiatrica Scand*. 1997; 96:343-6.
5. Montgomery SA, Kasper S, Stein DJ et al. Citalopram 20 mg, 40 mg and 60 mg are all effective and well tolerated compared with placebo in obsessive-compulsive disorder. *Int Clin Psychopharmacol*. 2001; 16:75-86. [PubMed 11236072]
6. Cipram tablets abbreviated prescribing information. Middle East Medical Index. 23rd ed. CCM Middle East s.a.r.l. Athens, Greece. 2001:5.584-5.585.
7. Shirley A. Hesketh, Adrian K. Brennan, David S. Jessop and David P. Finn. Effects of chronic treatment with citalopram on cannabinoid and opioid receptor-mediated G-protein coupling in discrete rat brain regions; *Psychopharmacology*; Volume 198, Number 1, 29-36, DOI: 10.1007/s00213-007-1033-3
8. Forest Pharmaceuticals, Inc. Celexa (citalopram hydrobromide) tablets and oral solution prescribing information. St. Louis, MO; 2006 Sep.
9. Chen F, Lawrence AJ. Effect of chronic ethanol and withdrawal on the mu-opioid receptor- and 5-Hydroxytryptamine(1A) receptor-stimulated binding of [(35S)] Guanosine-5'-O-(3-thio) triphosphate in the fawn-hooded rat brain: A quantitative autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Apr;293(1):159-65.
10. Hasselström J. Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011 Jan 1;879(1):123-8. Epub 2010 Dec 1.
11. Unceta N, Goicolea MA, Barrio RJ. Analytical procedures for the determination of the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant citalopram and its metabolites. *Biomed Chromatogr*. 2011 Jan;25(1-2):238-57. doi: 10.1002/bmc.1542. Epub 2010 Nov 5
12. Demeestere K, Petrović M, Gros M, Dewulf J, Van Langenhove H, Barceló D. Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Jan;396(2):825-37. Epub 2009 Nov 19.
13. Unceta N, Ugarte A, Sánchez A, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ. Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2010 Jan 5;51(1):178-85. Epub 2009 Jul 22.
14. Bharathi DV, Jagadeesh B, Kumar SS, Lakshmi RN, Hotha KK, Naidu A, Mullangi R. Highly sensitive method for the determination of ropinirole with a lower limit of quantitation of 3.45 pg/mL in human plasma by LC-ESI-MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*. 2009 May;23(5):557-62.
15. Zheng H, Yang L, Tang WY. Determination of plasma escitalopram with liquid chromatography-mass spectrometry. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008 Nov;28(11):2044-6
16. Wille SM, De Letter EA, Piette MH, Van Overschelde LK, Van Peteghem CH, Lambert WE. Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography-mass spectrometry. *Int J Legal Med*. 2009 Nov;123(6):451-8. Epub 2008 Oct 7.
17. Bagheri H, Khalilian F, Babanezhad E, Es-haghi A, Rouini MR. Modified solvent microextraction with back extraction combined with liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of citalopram in human plasma. *Anal Chim Acta*. 2008 Mar 10;610(2):211-6. Epub 2008 Feb 7.
18. Unceta N, Gómez-Caballero A, Sánchez A, Millán S, Sampedro MC, Goicolea MA, Sallés J, Barrio RJ. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2008 Mar 13;46(4):763-70. Epub 2007 Dec 8
19. Pufal E, Sykuter M, Nowacka T, Stefanowicz A, Sliwka K. Development of a method for estimation of citalopram and desmethylcitalopram in nails and hair and its usefulness in forensic toxicology; *Arch Med Sadovej Kryminol*. 2010 Oct-Dec;60(4):216-22.
20. Chaves AR, Leandro FZ, Carris JA, Queiroz ME. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010 Aug 1;878(23):2123-9. Epub 2010 Jun 25