

## **Sertralina – metody izolacji i analizy ilościowej w materiale biologicznym**

### **Sertraline – isolation methods and quantitation in biological material**

Ewelina Dziurkowska, Marek Wesołowski

Katedra i Zakład Chemii Analitycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

#### **Summary**

Sertraline (SRT) is a modern and relatively safe selective serotonin reuptake inhibitor often used in the treatment of depression. Monitoring the body levels of this drug and its active metabolite, N-desmethylsertraline (DSRT), permits optimizing the dosage and personalizing the treatment, especially in the case of severe adverse reactions or lack of response to the applied therapy. The determination of SRT and DSRT in diagnostic material, i.e., blood, plasma, urine and saliva, and also in biological material from deceased persons, requires a variety of sensitive and reliable analytical methods to determine both the total drug level (blood) as well as the level of the unbound form (saliva and urine). This paper presents a detailed literature review of the methods of SRT and DSRT isolation from biological material and analytical techniques used for their determination. These include extractive procedures such as solid phase extraction and microextraction as well as liquid-liquid extraction. We pay particular attention to the parameters taken into account during optimization of extraction, i.e., the effect of pH, type of solvent and composition of the solvents mixture, on washing various types of sorbents (hydrophobic, hydrophilic-lipophilic and ion exchange) and elution of analytes. We show the advantages and disadvantages of the extraction techniques in terms of efficiency and precision of extraction. We also discuss protein precipitation as one of the more recent methods of sample purification. In our presentation of the final determination techniques, i.e., HPLC, LC and GC, we focus on the type of detector (UV, nitric-phosphate, MS) as the basic factor determining the sensitivity, expressed as the limits of detection and quantification achieved by a given method.

**Słowa kluczowe:** sertralina, oczyszczanie próbek, analiza ilościowa

**Key words:** sertraline, sample purification, quantitative analysis

## Wstęp

Depresja to jedna z najczęściej występujących chorób na świecie. Opisywana jest jako stan obniżonego nastroju trwający co najmniej dwa tygodnie. Towarzyszą mu smutek, przygnębienie, brak energii, niechęć do działania, zaburzenia snu, przy jednoczesnym ciągłym zmęczeniu oraz unikaniu kontaktów społecznych. Częstymi konsekwencjami depresji są samookaleczenia i samobójstwa. Według Centers for Disease Control and Prevention do grupy najczęściej przepisywanych leków w Stanach Zjednoczonych należą także leki przeciwdepresyjne. Głównym celem ich stosowania jest polepszenie nastroju, a także normalizacja rytmu dobowego – w konsekwencji zaś poprawa jakości życia. Podział leków przeciwdepresyjnych uwarunkowany jest mechanizmem ich działania oraz przynależnością do poszczególnych generacji. Większość z nich działa przez zwiększenie stężenia monoamin, głównie serotoniny, noradrenaliny i dopaminy w przestrzeni synaptycznej. Mogą one również wpływać bezpośrednio na receptory, przekaźniki drugiego rzędu oraz procesy transkrypcji w jądrze komórkowym [1].

Jedną z najważniejszych grup leków przeciwdepresyjnych są selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors – SSRI), a należą do niej m.in. sertralina (SRT), fluoksetyna, paroksetyna, fluwoksamina, citalopram i jego enancjomer – escitalopram [2]. Główny mechanizm działania SRT to hamowanie transportera serotoniny znajdującego się w błonie presynaptycznej aksonu. Odpowiada on za wychwyt zwrotny tego neuroprzekaźnika. Dodatkowo SRT wykazuje słabe powinowactwo do receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych oraz w niewielkim stopniu hamuje transporter dopaminy [1, 2].

### Właściwości farmakologiczne sertraliny

Po podaniu doustnym SRT w znacznym stopniu podlega efektowi pierwszego przejścia. W wyniku N-demetylacji powstaje jej aktywny metabolit, N-demetylosertralina (DSRT). Kolejnymi etapami są deaminacja oksydacyjna, redukcja, hydroksylacja i sprzęganie z kwasem glukuronowym. Okres półtrwania SRT wynosi 26 h, natomiast DSRT pomiędzy 62 a 104 h [3]. Za metabolizm obu związków odpowiedzialnych jest pięć izoenzymów – CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 oraz CYP3A4.

SRT w osoczu jest związana z białkami w 98%, a jej najwyższe stężenie po przyjęciu doustnym obserwowane jest po upływie od 4,5 do 8,5 h. Usuwana jest z organizmu zarówno z moczem, jak i z kałem. W obu przypadkach wydalana jest w około 40% w postaci metabolitów, a ponadto od 12 do 14% SRT wydalane jest z moczem w postaci niezmienionej.

Główny metabolit SRT, DSRT, wykazuje niskie powinowactwo do receptora serotoninowego, w związku z tym nie przypisuje się mu efektów klinicznych. Jednak jego stężenie może być wyznacznikiem szybkości metabolizmu SRT oraz jej interakcji z innymi lekami, do której dochodzi przy jednoczesnym stosowaniu SRT z lekami przeciwzakrzepowymi, niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi oraz  $\beta$ -blokerami. Ponadto niższy poziom w osoczu SRT i DSRT obserwuje się zazwyczaj u osób palących

tytoń. Z kolei u osób starszych ich stężenie jest wyższe [4]. Monitorowanie stężenia leku zalecane jest w wypadku stosowania SRT u dzieci oraz młodzieży w związku z większym prawdopodobieństwem wystąpienia samookaleczeń i zachowań suicydalnych [5].

Ze względu na brak interakcji SRT z pokarmem może być ona podawana niezależnie od spożywanych posiłków. Dawkowanie rozpoczyna się zwykle od 50 mg/d, a następnie dawkę zwiększa się stopniowo aż do 200 mg/d [3]. Do najczęściej występujących działań niepożądanych, które pojawiają się u co najmniej 10% pacjentów leczonych SRT, należą te wynikające z jej działania na OUN. Wśród nich można wyróżnić bezsenność, bóle i zawroty głowy, a także zmęczenie i senność. Równie często mogą pojawić się zaburzenia gastroenterologiczne, takie jak nudności, biegunka, niestrawność czy brak łaknienia. Najniebezpieczniejszym jednak efektem ubocznym jest tzw. zespół serotoninowy, który wynika z nadmiernego nagromadzenia się serotoniny w mózgu. Objawia się on sztywnością mięśni, hipertermią, drgawkami klonicznymi, zaburzeniami rytmu serca, pobudzeniem, omamami, majaczeniem, a w kolejnym etapie śpiączką. Jest to stan poważny i bezpośrednio zagrażający życiu pacjenta. W razie jego wystąpienia należy bezzwłocznie odstawić leki oraz podać preparat z grupy antagonistów receptorów serotoninowych i środki zwiotczające mięśnie [3].

Ze względu na przenikanie SRT przez łożysko nie zaleca się jej stosowania w trakcie ciąży, choć brak jest jednoznacznych wyników badań potwierdzających działanie teratogenne tego środka. Ponadto zaobserwowano, że przyjmowanie SRT w 3. trymestrze ciąży może skutkować zespołem odstawiennym u noworodka. Wśród pojawiających się wówczas objawów stwierdzono niedociśnienie lub nadciśnienie, bezdech, sinicę, drgawki, wahania temperatury ciała, hipoglikemię, trudności z przyjmowaniem pokarmu, wzmożone napięcie mięśniowe, jak również duszności i przetrwałe nadciśnienie płucne [3]. Wyniki nielicznych badań dotyczących stosowania SRT w trakcie ciąży wskazują, że jej stężenie w osoczu kobiet w 3. trymestrze było o 68% wyższe niż w wypadku kobiet niebędących w ciąży. Podobnie podwyższone było stężenie DSRT. Natomiast stosunek SRT do DSRT u kobiet w ciąży był nieznacznie niższy [6]. Kolejne badania miały na celu skorelowanie stężenia SRT w surowicy krwi kobiet w trakcie porodu, a także w płynie owodniowym oraz krwi pępowinowej z dawką dobową leku. Stwierdzono korelację pomiędzy stężeniem SRT w płynie owodniowym a stosowaną dawką leku. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy poziomem SRT w surowicy oraz płynie owodniowym i krwi pępowinowej ani pomiędzy stężeniem leku w płynie owodniowym i krwi pępowinowej [7].

### **Cel monitorowania stężenia sertraliny**

Mimo iż SRT jest lekiem nowoczesnym i stosunkowo bezpiecznym, jej częste stosowanie, w tym u dzieci, wymaga opracowania odpowiednich procedur analitycznych umożliwiających kontrolę poziomu leku w organizmie. Biorąc z kolei pod uwagę znaczną zmienność zarówno wewnątrzsobniczą, jak i międzysobniczą w stężeniu SRT w organizmie, wskazane jest najczęściej jednoczesne oznaczenie poziomu jej głównego metabolitu, DSRT. Wynika to z tego, iż wahania stężenia SRT oraz DSRT

podczas stosowania tej samej dawki leku mogą różnić się międzyosobniczo nawet o ponad 50%, natomiast w wypadku określenia stosunku SRT/DSRT różnica ta zmniejsza się do 20% [8]. Jednoczesne oznaczenie obu związków pozwala również na monitorowanie interakcji SRT z innymi lekami, co jest szczególnie istotne, biorąc pod uwagę, że jest ona metabolizowana przez pięć izoenzymów. Ponadto SRT wykazuje słabą inhibicję czterech izoenzymów CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9 oraz CYP2D6. Dlatego też należy zwrócić uwagę na poziom SRT podczas jej podawania w dawce powyżej 150 mg/d jednocześnie z lekami metabolizowanymi przez wspomniane izoenzymy [9].

Izoenzym CYP2C19 jest hamowany przez inhibitory pompy protonowej (*Proton-Pump Inhibitors* – PPI), leki często stosowane w chorobach układu pokarmowego. Badania nad jednoczesnym przyjmowaniem PPI oraz SSRI wykazały, że esomeprazol powoduje znaczący (o 38,5%) wzrost stężenia SRT w osoczu [10]. Było to szczególnie widoczne u osób starszych, które przekroczyły 80. r.ż. Obniżenie dawki SRT jest również wskazane w wypadku osób, u których stwierdzono mutację izoenzymu CYP2C19, tj. osób wolno metabolizujących [11]. Ustalono, że po podaniu pojedynczej dawki zdrowym ochotnikom pole powierzchni pod krzywą AUC u osób wolno metabolizujących było o 41% większe niż w wypadku osób intensywnie metabolizujących. Podobne obserwacje poczyniono, analizując zawartość SRT i DSRT w osoczu 211 pacjentów w wieku 8–20 lat przyjmujących lek w średniej dawce 50 mg/d. U większości pacjentów wolniejszy metabolizm wynikał ze zmiany genetycznej w allelu kodującym aktywność izoenzymu CYP2D6 [12].

Zmiany aktywności izoenzymów CYP2C19 oraz CYP2D6 odnotowano też w trakcie ciąży. Wpływ hormonów znacząco upośledza pracę pierwszego z nich, ponadto zwiększony przepływ krwi przez nerki może skutkować zmianą farmakokinetyki SRT, co najczęściej wiąże się z potrzebą zmiany dawkowania leku, szczególnie w 3. trymestrze ciąży [13].

Metody oznaczania SRT i jej metabolitu w różnym materiale biologicznym są wykorzystywane w celu monitorowania poziomu leku. Często używa się ich również, aby potwierdzić lub wykluczyć obecność danej substancji. Dlatego też metody analityczne po zwalidowaniu służą do oznaczenia SRT i innych badanych związków w próbkach pochodzących zarówno od osób poddanych terapii SRT [4, 14–17], jak i od osób zdrowych [18, 19]. W niektórych przypadkach metody zostały użyte do potwierdzenia ich selektywności i wykluczenia interakcji międzylekowych podczas izolacji analitu i oznaczania chromatograficznego [4, 20]. Ważnym zastosowaniem opracowanych metod jest także analiza toksykologiczna, pozwalająca określić przyczyny śmierci [21].

Oznaczenie poziomu leku w organizmie może być również wykorzystane w tzw. terapii monitorowanej (*Therapeutic Drug Monitoring* – TDM). Zwykle jej celem jest indywidualizacja terapii pacjenta i taki dobór dawki, aby wzmocnić działanie leku oraz zminimalizować działania toksyczne. Jest to szczególnie istotne w wypadku substancji o wąskim indeksie terapeutycznym. Ważnym aspektem TDM jest ograniczenie kosztów leczenia pacjenta, w szczególności gdy przyjmuje on leki nowoczesne, najczęściej droższe od preparatów starszej generacji. Jeśli chodzi o SSRI, w tym również SRT, TDM powinna być stosowana, gdy stan zdrowia pacjenta się nie poprawia pomimo właściwie prowadzonej terapii. Badania wskazują, że u około 50% pacjentów po

podaniu pojedynczej dawki leku nie obserwuje się optymalnego stężenia substancji czynnej w osoczu [22].

Obniżenie kosztów leczenia depresji jest jednym z priorytetów TDM. Wyniki badań wskazują, że u pacjentów, których stan zdrowia uległ poprawie po wdrożonej terapii, udało się je obniżyć o 39% w stosunku do pacjentów niereagujących na leczenie. Przyczyniło się to również do poprawy jakości ich życia [23]. Ponadto wprowadzenie TDM do leczenia depresji u osób starszych preparatami z grupy SSRI skutkowało obniżeniem kosztów terapii o 10,2%, wynikającym głównie z niższych dawek przepisywanych leków [24].

Dodatkowo w wypadku terapii lekami z grupy SSRI TDM powinna być stosowana u pacjentów powyżej 60. r.ż. ze względu na podwyższony poziom leku we krwi, często przekraczający jego stężenie terapeutyczne [25]. Dane statystyczne wskazują jednak, że TDM jest stosowana o 15% rzadziej u pacjentów z tej grupy wiekowej niż u osób poniżej 60. r.ż. W im bardziej zaawansowanym wieku byli pacjenci, tym różnica ta była większa, tak że u pacjentów powyżej 90. r.ż. TDM była prowadzona trzykrotnie rzadziej niż w wypadku osób do 60. r.ż., co pozostaje w niezgodzie z podstawowymi założeniami terapii monitorowanej.

Zastosowanie TDM u dzieci i młodzieży w wieku 8–18 lat umożliwiło wyznaczenie liniowej zależności pomiędzy dawką leku a stężeniem SRT we krwi, a także pomiędzy znormalizowaną dawką dostosowaną do masy ciała pacjenta a poziomem leku w organizmie [26]. Nie stwierdzono natomiast w tej grupie wiekowej zależności pomiędzy stężeniem SRT w osoczu a działaniem terapeutycznym, wiekiem, płcią lub paleniem papierosów. Zauważono natomiast, że w wypadku pacjentów stosujących SRT nasilenie działań niepożądanych było proporcjonalne do stężenia leku w osoczu i znacznie częściej występowało przy prowadzeniu terapii skojarzonej.

Wiek oraz płeć pacjentów dorosłych, a w szczególności tych po 60. r.ż., ma znaczący wpływ na stężenie SRT w osoczu [27]. Potwierdziły to badania wskazujące dużą zmienność osobniczą poziomu leku w osoczu. Z tego względu skorygowano stężenie SRT w osoczu, dzieląc je przez dawkę dzienną leku. Zaobserwowano wówczas, że u kobiet po 60. r.ż. widoczna jest silna korelacja pomiędzy dawką SRT a jej stężeniem w osoczu.

Indywidualizacja terapii i obniżenie kosztów leczenia należą do podstawowych celów TDM, realizowanych przez oznaczanie poziomu SRT i DSRT w organizmie. Przy jednoczesnym przyjmowaniu kilku leków monitoring poziomu SRT w osoczu pozwala wykryć interakcję pomiędzy nimi. Jest to szczególnie ważne, gdy pacjent cierpi na kilka schorzeń, a każde z nich wymaga odpowiedniej terapii. Podawane leki nie tylko wzajemnie wpływają na swój metabolizm, ale także mogą wzmacniać efekty niepożądane. Jednym z takich działań jest obniżenie aktywności pseudocholesterazy przez SRT. Mniejsza aktywność tego enzymu może skutkować znacznym wydłużeniem czasu działania niektórych preparatów, np. miwakurium, leku zwiotczającego mięśnie poprzecznie prążkowane [28]. Wykazano też, że podczas jednoczesnego stosowania SRT i metadonu SRT może przyczyniać się do niewielkiego wzrostu stężenia opioиду w surowicy krwi w pierwszych sześciu tygodniach leczenia [29]. Wskazane jest wówczas monitorowanie stężenia metadonu ze względu na jego obniżony w tych warunkach metabolizm.

Równoległe podawanie leków przeciwpsychotycznych z preparatami z grupy SSRI może skutkować zwiększonym prawdopodobieństwem wydłużenia odstępu QT [30]. Najbardziej narażeni na ten efekt są pacjenci wolno metabolizujący, nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy częstotliwością występowania tego działania niepożądanego a dawką leku przeciwpsychotycznego.

Na podstawie danych zamieszczonych w literaturze przedmiotu stwierdzono, że stężenie SRT we krwi po jednorazowym podaniu dawki 50 mg osobom zdrowym wynosiło  $14,10 \pm 6,49$  ng/mL [19]. Oznaczanie SRT w próbkach pochodzących z autopsji wykazało, że referencyjne stężenie terapeutyczne SRT w osoczu powinno mieścić się w granicach 6,1–76,0 ng/mL [21]. Dane pochodzące z literatury przedmiotu dowodzą, że u osób długotrwale leczonych preparatami SRT poziom leku we krwi mieści się we wspomnianym zakresie [4, 17]. Oprócz oznaczania SRT w niektórych przypadkach określa się również poziom głównego metabolitu, DSRT. Jego stężenie we krwi jest wyższe niż związku macierzystego z powodu znacznie dłuższego okresu półtrwania. Oznaczone poziomy SRT i DSRT w próbce krwi pacjenta wyniosły odpowiednio 31 i 167 ng/mL [4]. Porównano też poziom SRT w różnym materiale biologicznym, co umożliwiła poznanie dróg wydalania leku. Jedną z metod została wykorzystana do oznaczenia SRT w próbkach krwi i śliny otrzymanych od pacjentów leczonych tym lekiem. Materiał do analizy pobierano w odstępie dwóch tygodni. Stwierdzono, że stężenie leku w ślinie stanowiło mniej niż 5% jego stężenia oznaczonego we krwi. Poziom leku we krwi w pierwszym i drugim tygodniu wyniósł odpowiednio 13,1 i 27,1 ng/mL, natomiast w ślinie 0,7 oraz 1,1 ng/mL [15]. Poziom SRT w ślinie kierowców zatrzymanych przez policję mieścił się w zakresie 22–24 ng/mL [18].

Innym materiałem biologicznym, w którym określono poziom SRT u osób leczonych jej preparatami, było mleko kobiet karmiących [16, 31]. Podczas jednego z badań próbki mleka pobierano dwukrotnie, na początku oraz pod koniec karmienia. Stwierdzono, że stężenie SRT w mleku początkowym było zbliżone do poziomu w osoczu i wynosiło 29 ng/mL. Natomiast pod koniec karmienia było ono prawie dwukrotnie wyższe (46 ng/mL), co może być spowodowane wyższą zawartością tłuszczu i białka [16]. Określono również poziom SRT i jej głównego metabolitu w mleku i surowicy matki oraz surowicy karmionego przez nią dziecka. Próbkę krwi matki były pobierane po 24 h od podania leku, natomiast krew dziecka po 2–4 h od karmienia. Oba analizy były obecne w surowicy krwi matki w stężeniach pomiędzy 8 a 92 ng/mL oraz 17 i 212 ng/mL, odpowiednio dla SRT i DSRT. Także w osoczu dzieci DSRT osiągnęła wyższe stężenie. Zaobserwowano też, że we wszystkich badanych próbkach mleka była obecna zarówno SRT, jak i DSRT oraz że stężenie SRT w mleku było skorelowane z dawką preparatu [31].

### Metody ekstrakcji sertraliny z materiału biologicznego

Opracowane metody powinny umożliwić oznaczenie SRT oraz DSRT w zakresie stężeń terapeutycznych, które w wypadku SRT oznaczanej w surowicy mieszczą się w granicach 50–250 ng/mL. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że po podaniu doustnym SRT osiąga wyższe stężenie u młodych, zdrowych kobiet (średnie

stężenie 166 ng/mL) niż u młodych, zdrowych mężczyzn (118 ng/mL). Również w wypadku DSRT poziom analitu był zróżnicowany w zależności od płci (244 ng/mL u kobiet i 156 ng/mL u mężczyzn). U osób starszych stężenie SRT oraz DSRT także było wyższe u kobiet niż u mężczyzn i wyniosło odpowiednio 147 ng/mL i 135 ng/mL oraz 274 ng/mL i 237 ng/mL. Badania wykazały ponadto, że 9. dnia po zakończeniu kuracji SRT wykryto w moczu, przy czym stężenie formy niezmienionej wyniosło 0,2% [32].

Zwykle substancje biologicznie czynne oznaczane są we krwi. Pozwala to na określenie stężenia leku wolnego i związanego z białkami. Również w wypadku SRT i DSRT krew, a przede wszystkim osocze, stanowi podstawowy materiał diagnostyczny. Alternatywą w stosunku do krwi może być ślina. Umożliwia ona wyłącznie kontrolę poziomu leku niezwiązanego z białkiem – gdy dany związek jest silnie związany z białkami krwi, stężenie frakcji wolnej przenikającej do śliny jest niskie. Oznacza to, że zawartość analitu w tym materiale biologicznym może być niewystarczająca, a jego oznaczenie wręcz niemożliwe. Należy jednak pamiętać, że to właśnie frakcja niezwiązana odpowiada za działanie leku. Oznaczenie jej poziomu jest więc wskaźnikiem aktualnej aktywności leku, a także może wskazywać na interakcje z innymi stosowanymi jednocześnie preparatami. Może też świadczyć o problemach z metabolizmem leku, uszkodzeniu wątroby lub nerek.

Dane zamieszczone w literaturze przedmiotu wskazują, że wśród metod izolacji SRT i DSRT z materiału biologicznego dominują dwa typy ekstrakcji, co zilustrowano w tabeli 1. Pierwszym z nich jest ekstrakcja do fazy stałej, która wymaga użycia specjalistycznego sprzętu, ale umożliwia izolację obu związków i oczyszczenie próbek biologicznych z zastosowaniem niewielkich ilości rozpuszczalników organicznych. Drugim, równie często stosowanym sposobem izolacji jest ekstrakcja typu ciecz-ciecz. W związku z tym w niniejszej pracy dokonano przeglądu piśmiennictwa obejmującego zastosowanie obu technik ekstrakcyjnych do izolacji SRT i DSRT z materiału biologicznego.

Tabela 1. Przegląd metod wykorzystywanych do oczyszczania materiału biologicznego i oznaczania sertraliny

Materiał biologiczny	Oczyszczanie próbki	Technika analityczna	Faza stacjonarna / Faza ruchoma (v/v)	Zakres liniowości (ng/mL)	Odzysk (%)	LOQ	Lit.
SPE							
Osocze	C2	HPLC-UV	C8 / acetonitryl: bufor fosforanowy (pH 3,0) z dodatkiem trietyloaminy (35:65)	7,5–250,0	>94	7,5	[4]
	C18-BSA	LC-MS/MS	C18 / octan amonu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego: acetonitryl (90:10)	5,0–325,0	-	5,0	[35]
	HLB	LC-MS/MS	C8 / bufor octanowy: acetonitryl (20:80)	0,5–60,0	81,47	0,5	[36]
	Oasis MCX	SPE-LC-MS/MS	C18 / gradient wodorowęglan amonu (pH 10): acetonitryl	10–1000	>99	10	[14]
	Oasis MCX	HPLC-MS	C18 / gradient octan amonu (pH 8,1): acetonitryl	1–500	>78	5	[38]

*dalszy ciąg tabeli na następnej stronie*

Osocze Ślina	Oasis MCX	LC-MS/ MS	C18 / gradient mrówczan amonu (pH 3,0): acetonitryl	2–500	49–72	2	[15]
Ślina	Bond Elut Certify	GC-MS	matylosilikon / hel	-	>46,5	18,6	[34]
	Bond Elut Certify	LC-MS/ MS	C18 / gradient mrówczan amonu z dodatkiem 0,001% kwasu mrówkowego: acetonitryl	5–200	92	8,7	[37]
Mleko ludzkie	Oasis MCX	HPLC- ESI-MS	C18 / gradient octan amonu (pH 8,1): acetonitryl	5–500	>85	2	[16]
LLE							
Włosy	Metanol	LC-ESI- MS	C18 / gradient metanol, woda z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (80:20): metanol, woda z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (90:10)	-	-	-	[5]
Surowica	Heptan/ toluen-alkohol izoamylowy	GC-NPD	PTE / hel	20–400	>71,4	20	[39]
Surowica	Chlorek butylu	LC-MS	C18 / acetonitryl: methanol: octan amonu (60:20:20)	1,53–153	>90%	1,53	[10]
Krew pełna	Octan etylu- n-heptan	UHPLC- MS/MS	C18 / gradient mrówczan amonu (pH 10,2): acetonitryl	7,6–920	>82	7,6	[21]
Inne metody ekstrakcji							
Ślina	Precypitacja acetonitrylem	LC-ESI- MS	C18 / gradient metanol, woda z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (80:20): metanol, woda z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (90:10)	-	-	-	[5]
Osocze	SPME	LC-MS/ MS	C18 / gradient octan amonu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego: acetonitryl	5–325	-	0,05	[17]
	SPME	LC-UV	Lichrosphere 60 RP: Select B / bufor fosforanowy (pH 3,8): acetonitryl (57:43)	25–1200	>70	25	[40]
	SPME	LC-UV	C18 / bufor fosforanowy (pH 4,5): metanol (55:45)	10–1000	-	10	[41]
	Precypitacja acetonitrylem	LC-MS/ MS	C18 / ruchoma: octan amonu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego: acetonitryl (30:70)	0,1–50	>88	0,1	[19]
	Precypitacja acetonitrylem	LCMS/MS	C18 / octan amonu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego: acetonitryl (90:10)	2,5–405,0	-	2,5	[20]

Lit. – pozycja w piśmiennictwie

### Ekstrakcja do fazy stałej

Stosując ekstrakcję typu ciecz-ciało stałe (*Solid-Phase Extraction* – SPE), należy wziąć pod uwagę naturę analizowanych związków, tak aby odpowiednio dobrać złożę, na którym będzie odbywać się oczyszczanie próbki. Sorbent powinien



selektywnie wiązać anality oraz umożliwiać ich wymycie za pomocą odpowiednich rozpuszczalników lub ich mieszanin.

Ze względu na charakter SRT, tzn. jej lipofilowość ułatwiającą przenikanie do OUN, najczęściej do ekstrakcji wybierane są sorbenty hydrofobowe [4, 33–35] lub o właściwościach mieszanych, hydrofilowo-lipofilowych – HLB [36]. Ponadto izolację SRT z matrycy biologicznej przeprowadza się, używając również kolumnienek, które oprócz ugrupowań hydrofobowych dodatkowo zawierają modyfikację umożliwiającą wymianę jonów, dzięki czemu selektywnie wiążą na swojej powierzchni słabe zasady [14–16, 18, 34, 37, 38]. Takimi związkami są najczęściej leki działające na OUN. Kolumnienki tego typu wykazują przy tym bardzo słabe powinowactwo do związków rozpuszczalnych w wodzie, pozwalając na dokładne oczyszczenie próbki i usunięcie matrycy.

Kolumnienki z wypełnieniem hydrofobowym C2 oraz inne typy kolumnienek, m.in. z wypełnieniem HLB, C8 i C18, zostały wykorzystane przez Mandriolego i wsp. [4] do oznaczenia SRT i DSRT w osoczu. Kolumnienki z sorbentem C2 pozwoliły na dobre oczyszczenie próbek, z precyzją oznaczeń na poziomie 3,9% przy dokładności wyższej niż 90%. Ten typ kolumnienek zapewnił również dobry odzysk, który przekroczył 94%.

Odzyskiem SRT na poziomie 91–118% oraz powtarzalnością i precyzją pośrednią odpowiednio 3,6% i 7,4% odznaczała się metoda umożliwiająca jednoczesną analizę 22 substancji o działaniu przeciwdepresyjnym oraz przeciwpsychotycznym [33]. Do ich izolacji z surowicy krwi ludzkiej zastosowano kolumnienki z wypełnieniem hydrofobowym C18. Określono też odzysk metody dla pozostałych analitów, który mieścił się w granicach 75–99%.

Hydrofobową fazę stacjonarną C18 modyfikowano także, pokrywając ją albuminowymi przeciwciałami bydłecy w celu szybszego oczyszczenia surowicy krwi [35]. Optymalizacja procesu ekstrakcji zwiększyła czułość metody i jej selektywność, umożliwiając jednoczesne oznaczenie 16 związków psychoaktywnych. Powtarzalność i precyzja pośrednia przy oznaczaniu SRT były niższe niż 10%.

Kolumnienki o właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych wykorzystano do oznaczania SRT w osoczu. Roztwory wymyte z kolumnienek nastrzykiwano bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną, bez uprzedniego ich odparowania i ponownego rozpuszczenia, co miało na celu ograniczenie zużycia rozpuszczalników organicznych oraz zwiększenie wydajności ekstrakcji. Dzięki temu przekroczyła ona 81%. Sprawdzone też trwałość SRT, zarówno w próbkach osocza (przed procesem ekstrakcji), jak i po jej izolacji z materiału biologicznego. Badania wykazały, że podczas przechowywania SRT tylko w nieznacznym stopniu ulega rozkładowi. Największe straty odnotowano w trakcie długotrwałego przechowywania roztworu w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ , kiedy to po 71 dniach stężenie analitu spadło o około 5% [36].

Do oznaczania SRT oraz 13 innych substancji przeciwdepresyjnych wraz z ich metabolitami użyto kolumnienek typu Oasis MCX, które posiadają ugrupowania selektywnie wiążące anality o charakterze słabych zasad [14]. Zaletą opracowanej metody było wykorzystanie niewielkiej objętości osocza (50  $\mu\text{L}$ ) oraz możliwość bezpośredniego naniesienia ekstraktów na kolumnę chromatograficzną (tzw. ekstrakcja on-line), bez potrzeby odparowania i ponownego rozpuszczania próbek. Ten sposób analizy znacząco zwiększył wydajność procesu ekstrakcji, która przekroczyła 99%.

Ten sam typ kolumnienek posłużył do analizy 9 związków przeciwdepresyjnych, w tym SRT, oraz ich metabolitów w ślinie zdrowych ochotników [15]. Uzyskano dość niski, lecz akceptowalny odzysk, który dla analizowanych związków mieścił się w przedziale 49–72%. Kolumnienki Oasis MCX umożliwiły też eliminację wpływu matrycy na oznaczanie w osoczu krwi ludzkiej 5 leków z grupy SSRI wraz z głównymi metabolitami [38]. Ale i w tym wypadku wydajność ekstrakcji dla SRT była stosunkowo niska i wynosiła 78%. Opracowana metoda odznaczała się wysoką powtarzalnością i precyzją pośrednią, która w obu wariantach nie przekroczyła 6,5%.

Kolejnym materiałem biologicznym, z którego izolowano SRT, stosując kolumnienki MCX, było mleko ludzkie. Oznaczanie leków w tym materiale jest szczególnie istotne w wypadku depresji okołoporodowej. Najczęściej wskazana jest rezygnacja z karmienia piersią, tak aby nie doszło do wystąpienia działań niepożądanych u noworodka. Metodę oznaczenia SRT i innych leków przeciwdepresyjnych z grupy SSRI, a także niektórych z ich metabolitów w mleku ludzkim opracowali Weisskopf i wsp. [16]. Przed przystąpieniem do właściwej ekstrakcji próbkę mleka w objętości 0,25 mL odbiałczano, a następnie SRT izolowano za pomocą SPE. Walidacja wykazała, że metoda spełnia wymagane kryteria, tj. uzyskano powtarzalność oznaczeń na poziomie 9,3%, a precyzję pośrednią – 9,5%.

Kolumnienki o podobnych cechach, tzn. o silnych właściwościach jonowymiennych, wykorzystano do jednoczesnego oznaczenia 36 analitów w ślinie. Cel osiągnięto dzięki uniwersalnemu charakterowi wypełnienia kolumnienek oraz zastosowaniu wymywania frakcjonowanego [34]. Wadą metody jest niska wydajność ekstrakcji, która dla SRT mieściła się w granicach 46,5–74,9%.

Ślinę wykorzystali również Wylie i wsp. [37] do jednoczesnego oznaczania 49 substancji psychoaktywnych. Do ich izolacji użyto kolumnienek o właściwościach jonowymiennych, których sorbent zmodyfikowano dodatkiem siarczynu sodu, dzięki czemu uzyskano wysoki odzysk – na poziomie 92%.

### Ekstrakcja do fazy ciekłej

Ekstrakcja typu ciecz-ciecz (*Liquid-Liquid Extraction* – LLE) umożliwia izolację związków i jednoczesne oczyszczenie próbki dzięki różnej rozpuszczalności analitów w dwóch niemieszających się cieczach. W wypadku związków o dużej lipofilności, jakimi są leki przechodzące do OUN, ich rozpuszczalność w wodzie i rozpuszczalnikach polarnych jest ograniczona. Dlatego też w dużym stopniu wykorzystuje się rozpuszczalniki organiczne. Płyny biologiczne, takie jak krew, ślina czy mocz, w głównej mierze składają się z wody, stąd uzasadnione jest zastosowanie LLE do izolacji związków psychoaktywnych z matryc biologicznych.

LLE charakteryzuje się prostotą wykonania, jest też stosunkowo szybka, jednak duże zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych powoduje, że jest ona coraz rzadziej wykorzystywana. Jednakże ten typ ekstrakcji zastosowano do izolacji SRT i czterech innych substancji psychoaktywnych wraz z ich metabolitami ze śliny i włosów ludzkich [5]. Po oczyszczeniu z zanieczyszczeń zewnętrznych przez kilkakrotne mycie metanolem i suszenie odpowiednio pocięte włosy ekstrahowano metanolem

w aparacie Soxhleta. W wypadku śliny zastosowano deproteinizację, czyli wytrącenie białka za pomocą acetonitrylu.

SRT wraz z innymi lekami z grupy SSRI i ich metabolitami ekstrahowano również z surowicy krwi ludzkiej. Ekstrakcję prowadzono mieszaniną heptanu i alkoholu izoamyłowego w stosunku objętościowym 98,5:1,5, a wydajność ekstrakcji dla badanych analitów mieściła się w granicach od 71,4 do 85,1% [39]. Do ekstrakcji SRT z surowicy krwi ludzkiej zastosowano także chlorek butylu, a dodatkowa alkalizacja próbki węglanem sodu umożliwiła izolację związku z wydajnością powyżej 90% [10].

Niezwykle istotne z punktu widzenia toksykologii są metody oznaczania substancji psychoaktywnych w materiale biologicznym pochodzącym od osób zmarłych. W celu oznaczenia SRT we krwi osób zmarłych wykorzystano mieszaninę octanu etylu i n-heptanu w stosunku 80:20 (v/v). Oprócz SRT izolowano również 14 innych substancji, wśród nich leki przeciwdepresyjne i ich metabolity, substancje przeciwpsychotyczne, analgetyk, lek przeciwhistaminowy i  $\beta$ -bloker [21].

### Inne metody oczyszczania próbek

Do izolacji analitów z materiału biologicznego stosowana jest często modyfikacja SPE, tzw. mikroekstrakcja do fazy stałej (*Solid-Phase Microextraction* – SPME). Podstawowa różnica pomiędzy SPE i SPME polega na wykorzystaniu w SPME cienkiego włókna z naniesionym sorbentem, na którym adsorbuje się analit ze środowiska próbki. Zaadsorbowany analit jest przemywany i odparowywany w wypadku jego oznaczania za pomocą chromatografii gazowej (*Gas Chromatography* – GC) lub przenoszony do fazy ruchomej bądź innego roztworu w celu desorpcji, a następnie wprowadzany do kolumny chromatografu ciekowego (*High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC). Taki właśnie sposób ekstrakcji zastosowano do analizy zawartości SRT i innych leków działających na OUN w osoczu krwi ludzkiej. W trakcie oznaczania wykorzystano żel krzemionkowy zmodyfikowany grupami amino- i cjanopropylowymi [17]. Określono również wpływ rodzaju sorbentu na wydajność ekstrakcji.

SPME z polipirolem jako sorbentem zastosowano do izolacji leków przeciwdepresyjnych z surowicy krwi. Walidacja procesu ekstrakcji wykazała, że odzysk wyniósł około 70% [40]. Te same leki z surowicy krwi izolowano też, stosując włókno pokryte mieszaniną sorbentu C8 i silnego kationitu. Optymalizacja ekstrakcji polegała na określeniu wpływu pH i składu mieszaniny rozpuszczalników na proces przemywania sorbentu i wymywania analitów. Określono ponadto, jakie znaczenie ma objętość użytej do analizy próbki. Stwierdzono, że optymalna objętość surowicy to 0,4 mL, natomiast przemycie sorbentu jest najbardziej efektywne z użyciem wody zakwaszonej 0,1% kwasem mrówkowym. W zoptymalizowanych warunkach ekstrakcji powtarzalność procesu kształtowała się na poziomie 8,7% [41].

Jedną z najnowszych, a zarazem prostą w wykonaniu metodą oczyszczania próbek jest precypitacja białka za pomocą rozpuszczalników organicznych. Zwykle w tym celu do badanej próbki dodaje się niewielką ilość metanolu lub acetonitrylu, wytrząsa się, a następnie odwirowuje. Otrzymany w ten sposób supernatant nastrzykuje się na kolumnę i poddaje analizie chromatograficznej. Precypitację można zastosować jako

odrębny proces oczyszczania próbki [19, 20] lub może ona stanowić etap poprzedzający właściwą ekstrakcję [16, 38].

Metody precipitacji białka użyto do oczyszczenia próbek osocza krwi w celu oznaczenia SRT. Po dodaniu acetonitrylu do krwi próbkę dokładnie wymieszano, a następnie wytrząsano i odwirowano. Ostatecznie do analizy chromatograficznej pobrano 0,01 mL supernatantu, uzyskując odzysk powyżej 88% dla wszystkich badanych stężeń [19].

Precypitację białka zastosowano też podczas oznaczania SRT w osoczu obok innych leków przeciwdepresyjnych, przeciwpsychotycznych, przeciwpadaczkowych i uspokajających. Również w tym wypadku do odbiałczenia próbek użyto acetonitrylu, który dodano w objętości dwukrotnie większej niż objętość próbki krwi. I tak 0,5 mL supernatantu odparowano, a suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie wody z dodatkiem kwasu mrówkowego i acetonitrylu (90:10; v/v). Powtarzalność opracowanej metody była niższa niż 12%, natomiast precyzja pośrednia wyniosła od 0,1 do 10,4% [20].

### Analiza ilościowa sertraliny

O czułości, w sensie wykrywalności i oznaczalności, metod oznaczania SRT w największym stopniu decyduje rodzaj użytego detektora, a zastosowanie niektórych typów detekcji, np. spektroskopii mas (*Mass Spectrometry* – MS), pozwala dodatkowo potwierdzić tożsamość analitu. Takiej możliwości nie oferuje detektor UV. Nie jest on również tak czuły jak MS. Detektor UV jest jednak uniwersalny, a także nieporównywalnie tańszy niż MS. Odpowiednia czułość detektora pozwala na osiągnięcie niskiej granicy wykrywalności (*Limit of Detection* – LOD) oraz oznaczalności (*Limit of Quantification* – LOQ).

Do analizy ilościowej SRT najczęściej używa się chromatografii cieczowej, zarówno HPLC, jak i LC, sprzężonej z detektorem UV [4, 8, 26, 33, 40, 41] lub MS [5, 10, 14–21, 25, 35–38]. SRT oznaczano również za pomocą GC sprzężonej z MS [15] lub detektorem azotowo-fosforowym [39].

Najmniej korzystne wartości LOD i LOQ uzyskano, oznaczając SRT techniką GC z detektorem azotowo-fosforowym – przy liniowości metody w zakresie 20–400 ng/mL wynosiły one odpowiednio 10 i 20 ng/mL [39]. Natomiast zastosowanie detekcji UV w HPLC zapewniło LOQ na poziomie 4 ng/mL [26] lub 5 ng/mL [33]. Podobną wartość LOQ dla SRT oraz DSRT wyznaczyli Mandrioli i wsp. [4], która dla obu związków wyniosła 7,5 ng/mL. W wypadku SRT granica oznaczalności stanowiła także pierwszy punkt krzywej kalibracji. Natomiast dla DSRT liniowość metody sprawdzono w zakresie stężeń 10–500 ng/mL. Dla oznaczanych związków wyznaczono też wartość LOD, która w obu wypadkach była na poziomie 2,5 ng/mL. Znacznie gorsze wartości LOQ dla obu analitów otrzymano, stosując ekstrakcję SPME, którą wyznaczono na poziomie 25 ng/mL [40]. Odpowiednia modyfikacja złoża umożliwiła obniżenie LOQ do wartości 10 ng/mL [41].

Z danych zamieszczonych w literaturze przedmiotu wynika, że detekcja UV umożliwiła osiągnięcie LOQ na poziomie kilku ng/mL, tj. nie udało się osiągnąć wartości niższej niż 4 ng/mL. Również najniższą wartość LOD wyznaczono na

poziomie kilku ng/mL. Niższe wartości LOD i LOQ można osiągnąć, stosując spektrometrię mas. Nie zawsze jednak jest konieczne dążenie do uzyskania niskich wartości LOD i LOQ, zwłaszcza gdy analit znajduje się w materiale biologicznym na poziomie kilkuset ng/mL.

Najniższą wartość LOQ dla SRT osiągnięto techniką LC sprzężoną z MS. Wyniosła ona 0,05 ng/mL [17]. Pierwszy punkt krzywej kalibracji wyznaczono jednak na poziomie 5 ng/mL. LOQ niższą niż 1 ng/mL osiągnięto w czterech przypadkach. W trzech, gdy spektrometria mas była sprzężona z LC – wówczas wartość LOQ wyniosła 0,1 ng/mL [19] oraz 0,5 ng/mL [35, 36]. W czwartym przypadku do rozdzielania chromatograficznego użyto ultrasprawnej chromatografii cieczowej (*Ultra High-Performance Liquid Chromatography* – UHPLC), a granicę ustanowiono na poziomie 0,76 ng/mL [21]. Najczęściej jednak LOQ dla SRT oznaczanej z użyciem LC sprzężonej z MS, niezależnie od metody ekstrakcji czy też rodzaju materiału biologicznego, wyznaczano na poziomie kilku ng/mL [10, 14–16, 20, 36].

Natomiast podczas oznaczania SRT w ślinie za pomocą GC sprzężonej ze spektrometrią mas wartości LOD oraz LOQ były znacznie wyższe i wynosiły odpowiednio 6,2 i 18,6 ng/mL [34]. Może to wynikać ze sposobu oznaczania, ale również rodzaju materiału biologicznego użytego do badań. Najczęściej analizuje się krew, jednak w tym wypadku badano ślinę, której skład różni się od składu krwi. Ponadto próbki śliny wymagają często dodatkowych etapów oczyszczenia w celu pozbycia się np. mucyn.

### Podsumowanie

Oznaczanie SRT i jej metabolitu w materiale biologicznym różnego pochodzenia pozwala przede wszystkim monitorować poziom leku w organizmie, co jest niezwykle istotne w wypadku nasilonych działań niepożądanych lub braku reakcji organizmu na lek mimo prawidłowo stosowanej terapii. Oznaczanie SRT i DSRT umożliwia optymalizację dawkowania i personalizację leczenia. Innym celem wykorzystania metod analizy ilościowej jest szybka ocena toksykologiczna.

Przedstawiony przegląd piśmiennictwa dotyczący metod ekstrakcji SRT wskazuje, że obecnie SRT jest najczęściej izolowana z materiału biologicznego za pomocą SPE, a odpowiednia modyfikacja złoża daje szansę na jednoczesną izolację kilku analitów o podobnej budowie i działaniu. Pozwala to na opracowanie metod znacząco ograniczających zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych i umożliwiających oznaczenie analitów w jak najmniejszej objętości materiału biologicznego.

Cytowane źródła ujawniają również, że wśród używanych sorbentów największe zastosowanie znalazły adsorbenty hydrofobowe, co jest związane z naturą analitu. Ponadto często wykorzystywane są też wymiennicze jonowe, które całkowicie eliminują wpływ matrycy na oznaczanie, jednak nie zapewniają takiej wydajności ekstrakcji jak sorbenty hydrofobowe. Spośród technik analitycznych służących do oznaczania SRT największe znaczenie ma obecnie chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas. Użycie tego detektora gwarantuje bardzo dobrą czułość metody. Należy wszakże wziąć pod uwagę, że jest to najdroższy ze stosowanych detektorów, a bardzo niskie granice wykrywalności osiągnane dzięki niemu nie zawsze są wymagane

podczas rutynowych oznaczeń. Stąd wykorzystanie detektora DAD, będącego jednym z typów detektora UV, umożliwi jednocześnie wykrycie związku występującego w małej ilości w badanej próbce oraz potwierdzenie jego tożsamości w postaci widma UV. Ta metodologia oznaczania jest korzystniejsza z punktu widzenia ekonomii niż użycie kosztownego detektora MS.

### Piśmiennictwo

1. DeBattista C, Katzung BG, Trevor AJ. *Antidepressant agents*. Basic & Clinical Pharmacology. 2015; e. 13. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1193&Sectionid=69108237>.
2. Hiemke C, Härtter S. *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors*. Pharmacol. Ther. 2000; 85(1): 11–28.
3. <http://accesspharmacy.mhmedical.com/drugs.aspx?GbosID=133788#monoNumber=133788&sectionID=122372314&tab=tab0>.
4. Mandrioli R, Saracino MA, Ferrari S, Berardi D, Kenndler E, Raggi MA. *HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma*. J. Chromatogr. B. 2006; 836(1–2): 116–119.
5. Doherty B, Rodriguez V, Leslie J, McClean S, Smyth W. *An electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of selected psychoactive pharmaceuticals and its application in drug and metabolite profiling by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21(13): 2031–2038.
6. Westin AA, Brekke M, Molden E, Skogvoll E, Spigset O. *Selective serotonin reuptake inhibitors and venlafaxine in pregnancy: Changes in drug disposition*. PLOS ONE. 12(7): e0181082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181082>.
7. Paulzen M, Goecke TW, Stickeler E, Gründer G, Schoretsanitis G. *Sertraline in pregnancy – Therapeutic drug monitoring in maternal blood, amniotic fluid and cord blood*. J. Affect. Disord. 2017; 212: 1–6.
8. Reis M, Åberg-Wistedt A, Ågren H, Höglund P, Åkerblad A-Ch, Bengtsson F. *Serum disposition of sertraline, N-desmethylsertraline and paroxetine: A pharmacokinetic evaluation of repeated drug concentration measurements during 6 months of treatment for major depression*. Hum. Psychopharmacol. 2004; 19(5): 283–291.
9. Hemeryck A, Belpaire FM. *Selective serotonin reuptake inhibitors and cytochrome P-450 mediated drug-drug interactions: An update*. Curr. Drug Metab. 2002; 3(1): 13–37.
10. Gjestead C, Westin AA, Skogvoll E, Spigset O. *Effect of proton pump inhibitors on the serum concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitors citalopram, escitalopram, and sertraline*. Ther. Drug Monit. 2015; 37(1): 90–97.
11. Spina E, Leon de J. *Clinical applications of CYP genotyping in psychiatry*. J. Neural. Transm. (Vienna) 2015; 122(1): 5–28.
12. Chermá MD, Ahlner J, Bengtsson F, Gustafsson PA. *Antidepressant drugs in children and adolescents analytical and demographic data in a naturalistic, clinical study*. J. Clin. Psychopharmacol. 2011; 31(1): 98–102.
13. Deligiannidis KM, Byatt N, Freeman MP. *Pharmacotherapy for mood disorders in pregnancy: a review of pharmacokinetic changes and clinical recommendations for therapeutic drug monitoring*. J. Clin. Psychopharmacol. 2014; 34(2): 244–255.

14. Castro de A, Ramírez Fernandez del M, Laloup M, Samyn N, De Boeck G i wsp. *High-throughput on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma*. J. Chromatogr. A. 2007; 1160(1–2): 3–12.
15. Castro de A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. *LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma: Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2008; 48(1): 183–193.
16. Weisskopf E, Panchaud A, Nguyen KA, Grosjean D, Hascoët J-M i wsp. *Simultaneous determination of selective serotonin reuptake inhibitors and their main metabolites in human breast milk by liquid chromatography electrospray mass spectrometry*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2017; 1057: 101–109.
17. Souza de ID, Domingues DS, Queiroz MEC. *Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Talanta 2015; 140: 166–175.
18. Wylie FM, Torrance H, Seymour A, Buttress S, Oliver JS. *Drugs in oral fluid Part II. Investigation of drugs in drivers*. Forensic Sci. Int. 2005; 150(2–3): 199–204.
19. Zhang M, Gao F, Cui X, Zhang Y, Sun Y, Gu J. *Development and validation of an improved method for the quantitation of sertraline in human plasma using LC-MS-MS and its application to bioequivalence studies*. J. Chromatogr. Sci. 2011; 49(2): 89–93.
20. Domingues DS, Pinto MA, Souza de ID, Hallak JE, Crippa JA, Queiroz ME. *Determination of drugs in plasma samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of schizophrenic patients*. J. Anal. Toxicol. 2016; 40(1): 28–36.
21. Amundsen I, Oiestad ÅM, Ekeberg D, Kristoffersen L. *Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2013; 927: 112–123.
22. Burke MJ, Preskorn SH. *Therapeutic drug monitoring of antidepressants: Cost implications and relevance to clinical practice*. Clin. Pharmacokinet. 1999; 37(2): 147–165.
23. Knorr von L, Åkerblad A-C, Bengtsson F, Carlsson Å, Ekselius L. *Cost of depression: Effect of adherence and treatment response*. Eur. Psychiatry 2006; 21(6): 349–354.
24. Lundmark J, Bengtsson F, Nordin C, Reis M, Wälinder J. *Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing strategies and reduces drug costs in depressed elderly patients*. Acta Psychiatr. Scand. 2000; 101(5): 354–359.
25. Hermann M, Waade RB, Molden E. *Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors in elderly patients*. Ther. Drug Monit. 2015; 37(4): 546–549.
26. Taurines R, Burger R, Wewetzer C, Pfuhlmann B, Mehler-Wex C i wsp. *The relation between dosage, serum concentrations, and clinical outcome in children and adolescents treated with sertraline: A naturalistic study*. Ther. Drug Monit. 2013; 35(1): 84–91.
27. Unterecker S, Riederer P, Proft F, Maloney J, Deckert J, Pfuhlmann B. *Effects of gender and age on serum concentrations of antidepressants under naturalistic conditions*. J. Neural. Transm. (Vienna) 2013; 120(8): 1237–1246.
28. Zencirci B. *Sertraline-induced pseudocholinesterase enzyme deficiency*. Int. J. Gen. Med. 2010; 3: 375–378.
29. Hamilton SP, Nunes EV, Janal M, Weber L. *The effect of sertraline on methadone plasma levels in methadone-maintenance patients*. Am. J. Addict. 2000; 9(1): 63–69.

30. Sala M, Vicentini A, Brambilla P, Montomoli C, Jogia JR i wsp. *QT interval prolongation related to psychoactive drug treatment: A comparison of monotherapy versus polytherapy*. Ann. Gen. Psychiatry 2005; 4(1): 1–6.
31. Stowe ZN, Owens MJ, Landry JC, Kilts CD, Ely T i wsp. *Sertraline and desmethylsertraline in human breast milk and nursing infants*. Am. J. Psychiatry 1997; 154(9): 1255–1260.
32. <https://www.medicinescomplete.com/mc/clarke/Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.htm>.
33. Frahnert C, Rao ML, Grasmäder K. *Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: A simple tool for therapeutic drug monitoring*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003; 794(1): 35–47.
34. Pujadas M, Pichini S, Civit E, Santamariña E, Perez K, Torre de la R. *A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007; 44(2): 594–601.
35. Pinto MAL, Souza de ID, Queiroza MEC. *Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2017; 139: 116–124.
36. Jain DS, Sanyal M, Subbaiah G, Pande UC, Shrivastav P. *Rapid and sensitive method for the determination of sertraline in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2005; 829(1–2): 69–74.
37. Wylie FM, Torrance H, Anderson RA, Oliver JS. *Drugs in oral fluid Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid*. Forensic Sci. Int. 2005; 150(2–3): 191–198.
38. Ansermot N, Brawand-Amey M, Eap CB. *Simultaneous quantification of selective serotonin reuptake inhibitors and metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for therapeutic drug monitoring*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2012; 885–886: 117–130.
39. Lacassie E, Gaulier JM, Marquet P, Rabatel JF, Lachâtre G. *Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography*. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 2000; 742(2): 229–238.
40. Chaves AR, Chiericato Júnior G, Queiroz ME. *Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2009; 877(7): 587–593.
41. 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; 878(23): 2123–2129.

Adres: Marek Wesolowski  
Katedra i Zakład Chemii Analitycznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
80-416 Gdańsk, ul. Gen. J. Hallera 107  
e-mail: marwes@gumed.edu.pl

Otrzymano: 16.08.2017

Zrecenzowano: 28.10.2017

Otrzymano po poprawie: 14.12.2017

Przyjęto do druku: 26.02.2018