

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND TIME OF STORAGE ON THE STABILITY OF FLUOXETINE IN BIOLOGICAL MATERIAL

Marzena SYKUTERA, Ewa PUFAL, Karol ŚLIWKA

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Bydgoszcz

ABSTRACT: The aim of the work was to analyse the influence of storage conditions such as time and temperature on the stability of fluoxetine in biological material. Determination of fluoxetine in blood, urine and liver samples was carried out using the HPLC method. Analysis revealed that fluoxetine showed consistent stability in samples which were stored at -20°C . Fluoxetine was stable in biological material stored at $+4^{\circ}\text{C}$ and $+25^{\circ}\text{C}$ for a period of only one month.

KEY WORDS: Fluoxetine; Stability; Biological material.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. L, 2002, 5–16

Received 19 April 2002; accepted 11 September 2002

INTRODUCTION

Determination of the real level of xenobiotics in biological material remains an unsolved problem in chemical toxicological analysis. The problem of the stability of xenobiotics in biological material is especially significant from the point of view of analysis, toxicology and the issuing of medico-legal expert reports.

From data in the literature it is known that conditions of storage of samples prepared for toxicological analysis influence results of the analyses and their interpretation [4].

A look through the literature reveals that many authors have studied the problem of the stability of medicines in biological material. The stability of medicines such as benzodiazepines [5, 9, 11, 16], barbiturates [12], cocaine [1, 6, 7, 13], antiepileptic medicines [3, 17], tricyclic antidepressant medicines [15] and other xenobiotics – carbon monoxide [8] and cyanide ions [2] has been described. These publications have mainly dealt with the influence of temperature on the stability of xenobiotics in samples of serum, blood or urine. Research performed by the authors shows that the stability of xenobiotics is dependent on many factors – amongst others, the type of xenobiotic, the type of biological material (in which the stability of xenobiotics is being investigated) and temperature. As a result of this research, it was found

that xenobiotics, even those belonging to the same group, are not always more stable in the blood.

An example of a similar finding in the literature is the work of Skopp et al. [16]. They analysed the stability of benzodiazepines in serum and blood at a temperature of +4°C, and showed that in the case of flurazepam and midazolam their stability was higher in blood than in serum, but that flunitrazepam and nordazepam were more stable in serum than in blood.

Among studies on the stability of xenobiotics, attempts at determination of the stability of fluoxetine in biological materials [10, 14, 18] have also been undertaken. Zuccaro et al. [18] analysed the stability of fluoxetine in serum and plasma with the addition of sodium versenate and heparin stored at a temperature of +4°C for 1 week and at a temperature of +20°C for 1 month. Lantz et al. [10] determined the fall in the concentration of fluoxetine and norfluoxetine in serum during storage of samples at room temperature and at -20°C. Determination of the stability of fluoxetine in serum at room temperature was also investigated by Nichols et al. [14].

Fluoxetine is a frequently used medicine, and in the literature there is a lack of comprehensive data on its stability in biological material other than serum, so it would seem to be important to perform further studies on its stability, in order to determine whether and to what degree the concentration of this medicine changes in biological material depending on temperature and the time of its storage.

MATERIALS AND METHODS

Samples of blood and urine were taken from the body and a standard solution of fluoxetine in an amount necessary to obtain a concentration of 500 ng/ml was added to them. Fragments of liver taken from the body were homogenised and, likewise, a standard solution of fluoxetine in the amount necessary to obtain a concentration of 500 ng/g was added to them. Immediately after the preparation of samples, the initial concentration of fluoxetine was determined, which was taken to be 100%. Samples of biological material containing fluoxetine were divided into test tubes, encapsulated and kept at different temperatures (-20°C, +4°C, +25°C). After periods of 1, 7, 30 and 90 days the concentration of fluoxetine in the samples was determined.

Fluoxetine was isolated from the biological material by the method of liquid-liquid extraction with the use of diethyl ether (pH = 9). Quantitative analysis was performed by liquid chromatography with a multidiode detector using a 1100 Series chromatographic set by Agilent Technologies, which consisted of a de-gaser, a binary pump, an autosampler and a multidiode detector. Chromatographic separation was performed in the following condi-

tions: the column – XDB C8 (150 mm × 4.6 mm; 5 μm), the eluent – triethylamine acetate: acetonitrile (65:35 v/v), the flow – 1.5 ml/min, the volume of the injected sample – 10 μl, measurement at a wavelength of 228 nm. The signal from the detector was converted electronically with the use of ChemStation software. The concentration of fluoxetine was determined by the internal standard method (diazepam) from the appropriate calibration curves.

105 samples of blood, 105 samples of urine and 105 samples of fragments of the liver were examined.

RESULTS AND DISCUSSION

The aim of toxicological analysis is to identify and determine a xenobiotic. The result of this process is influenced by the state of the biological material, which depends among other things on the conditions in which the material was kept before being delivered to the institution performing the examination and on the time which elapsed from collection of the sample to the performing of the analysis.

In the available literature there is a lack of data describing the stability of fluoxetine in biological materials such as blood, urine or the internal organs. Research on the stability of fluoxetine has related only to biological fluids, such as serum [10, 14, 18] and plasma [18]. Thus, the aim of the present work was to show to what degree processes occurring in biological material, se-

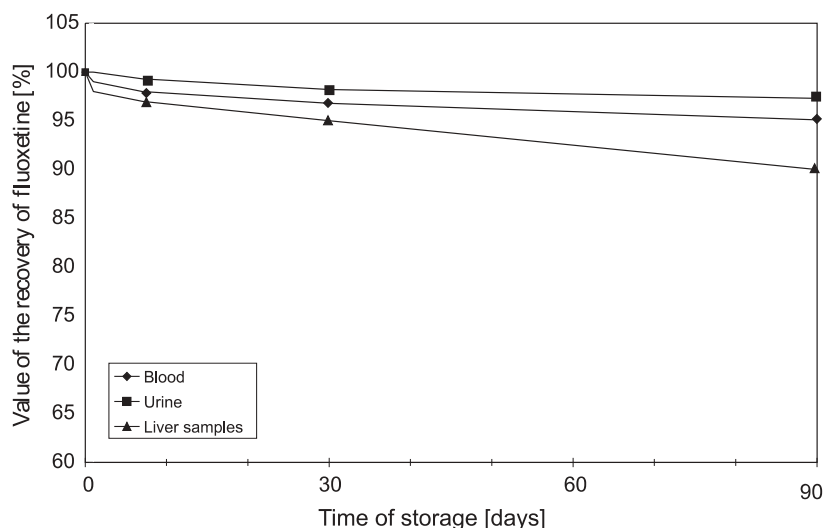


Fig. 1. A graph of the recovery of fluoxetine against time of storage of samples of blood, urine and fragments of liver at a temperature of -20°C .

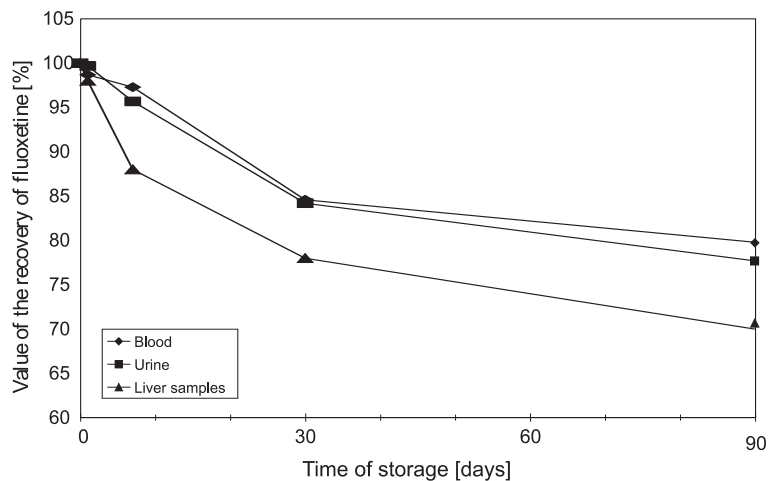


Fig. 2. A graph of the recovery of fluoxetine against time of storage of samples of blood, urine and fragments of liver at a temperature of +4°C.

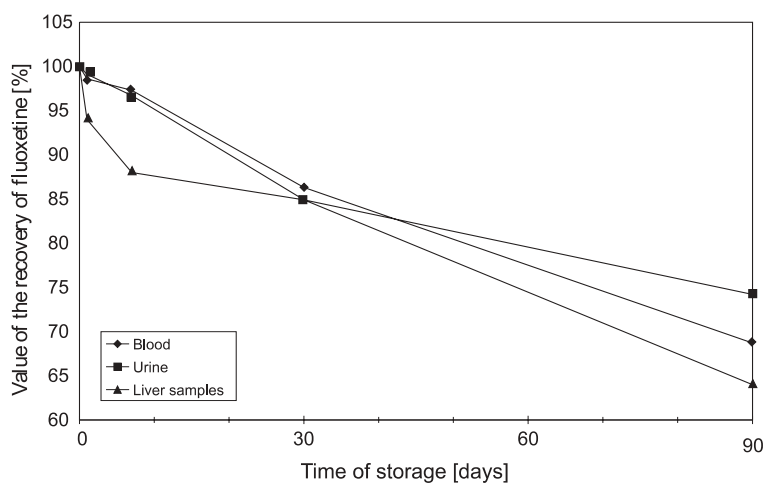


Fig. 3. A graph of the recovery of fluoxetine against time of storage of samples of blood, urine and fragments of liver at a temperature of +25°C.

cured for analysis and taking place under the influence of such factors as time and temperature of storage, affect the stability of fluoxetine in samples of blood, urine and fragments of the liver.

Results of the performed studies have been presented in the form of graphs of fluoxetine recovered against time of storage of samples of the bio-

logical material at different temperatures (Figure 1, 2 and 3). Average values of the recovery of fluoxetine from biological material are shown in Table I.

The data obtained in the present work show unequivocally that the highest stability of fluoxetine in samples of blood, urine and fragments of the liver was observed at a temperature of -20°C .

The obtained results of the examinations indicate that the stability of fluoxetine decreased most at a temperature of $+25^{\circ}\text{C}$. After 7 days, 2.7% of fluoxetine decomposed in blood samples, 3.3% in urine samples and 12.0% in fragments of liver; after 30 days of storage the loss of the medicine was 13.7% in blood, 15.1% in urine and in fragments of liver, and after 90 days the loss of the medicine was as high as 31.3% in blood, 25.8% in urine and in fragments of the liver, 36.0%. The above results show that fluoxetine is stable at a temperature of $+25^{\circ}\text{C}$ in blood, fragments of the liver and urine for 30 days.

TABLE I. THE MEAN VALUES OF RECOVERY OF FLUOXETINE FROM BIOLOGICAL SAMPLES AGAINST TEMPERATURE AND TIME OF STORAGE

Investigated material	Time of storage [days]	Temperature of storage		
		-20°C	$+4^{\circ}\text{C}$	$+25^{\circ}\text{C}$
		Value of the recovery of fluoxetine [%] ($n = 7$, initial concentration of fluoxetine 500 ng/ml)		
Urine	0	100.0 ± 1.4	100.0 ± 1.2	100.0 ± 1.6
	1	100.0 ± 1.6	99.7 ± 1.1	99.1 ± 3.8
	7	99.3 ± 2.3	95.7 ± 3.8	96.7 ± 4.2
	30	98.2 ± 4.1	84.2 ± 4.2	84.9 ± 3.7
	90	97.3 ± 3.7	77.7 ± 3.6	74.2 ± 3.6
Blood	0	100.0 ± 1.4	100.0 ± 1.4	100.0 ± 2.7
	1	99.0 ± 3.1	98.7 ± 2.6	98.6 ± 3.1
	7	98.0 ± 3.2	97.3 ± 3.1	97.3 ± 4.6
	30	96.8 ± 4.2	84.6 ± 4.6	86.3 ± 4.7
	90	95.1 ± 3.7	79.8 ± 6.2	68.7 ± 6.3
Liver samples	0	100.0 ± 2.4	100.0 ± 2.7	100.0 ± 2.6
	1	98.0 ± 3.8	98.0 ± 3.9	94.0 ± 4.0
	7	97.0 ± 4.2	88.0 ± 4.3	88.0 ± 4.1
	30	95.0 ± 4.6	78.0 ± 4.8	84.9 ± 5.9
	90	90.0 ± 5.2	70.0 ± 5.4	64.0 ± 7.2

The stability of fluoxetine at a temperature of +25°C was also investigated by Lantz et al. [10] and Nichols et al. [14]. However, the above examinations concerned only the stability of fluoxetine in serum. In the work of Lantz et al. [10] a significantly lower stability of fluoxetine in serum kept at room temperature was observed. The authors showed that in such conditions fluoxetine was stable only for 96 hours. However, Nichols et al. [14] in their work showed that fluoxetine in serum is stable at room temperature for a shorter time, i.e. only for 48 hours.

In the present work, experiments were also performed in order to determine the stability of fluoxetine in blood, urine and fragments of liver at a temperature of +4°C. The obtained results showed that the storage of a biological material for 7 days caused slight decreases of the medicine at a level of 2.7% in blood, 4.3% in urine, and 12.0% in fragments of liver. After 30 days these values changed to 15.4% in blood, 15.8% in urine and 22.0% in fragments of the liver, and after 90 days the loss of fluoxetine reached a level of 20.2% in blood, 22.3% in urine and in fragments of liver 30.0%. Bearing in mind the above data, one can state that fluoxetine is stable in blood, urine and the liver at a temperature of +4°C, similarly to a temperature of +25°C, only for 30 days.

Nichols et al. [14], examining the influence of temperature on the stability of fluoxetine in serum, ascertained that it is stable at a temperature of +4°C only for 1 week. Zuccaro et al. [18] showed that addition of preservatives, such as sodium versenate and heparin, had no influence on the length of stability of fluoxetine in serum and plasma at a temperature of +4°C.

The differences between the results of the studies on the stability of fluoxetine in serum at a temperature of +4°C and +25°C, and the results of the studies on the stability of this medicine in blood, urine or fragments of the liver could result from the different kinds of biological matrix used for the studies.

The performed investigations on the stability of fluoxetine at a temperature of -20°C demonstrated that freezing of samples of urine, similarly to freezing of samples of blood and fragments of liver guarantees the stability of fluoxetine for 90 days. In this case the storage of blood, urine and fragments of liver at a temperature of -20°C caused only insignificant losses of the medicine – in blood 4.9%, in fragments of the liver 10.0% and in urine only 2.7%. Similar behaviour of fluoxetine was observed by Nichols et al. [14] during their studies of the stability of fluoxetine in serum. These experiments demonstrated that in samples of serum frozen to -20°C, the decrease in the concentration of fluoxetine is insignificant, even after several months. Similar results from research into the stability of fluoxetine in serum at a temperature of -20°C were also obtained by Lantz et al. [10]. They found that the level of fluoxetine at this temperature did not change even after 1 year.

CONCLUSION

The investigations performed in the course of this work showed that:

1. The storage of samples of blood, urine and fragments of liver containing fluoxetine at a temperature of -20°C allows us to obtain reliable results of analysis even when 90 days have passed from the moment of collection of the biological material;
2. In situations where biological material is kept at a higher temperature, i.e. $+4^{\circ}\text{C}$ (temperature of a refrigerator) or $+25^{\circ}\text{C}$ (room temperature), analysis in order to detect the presence of fluoxetine should be performed in a period not exceeding 30 days from the moment of collection of the sample, because of large losses of the medicine;
3. Bearing in mind the above results, it seems advisable to perform further studies taking into account the influence of other non-analysed factors on the stability of fluoxetine in biological materials, such as the presence of air, light, pH of the environment or the addition of preservatives.

References:

1. Baselt R. C., Yoshikawa D., Chang J. [et al.], Improved long-term stability of blood cocaine in evacuated collection tubes, *Journal of Forensic Science* 1993, vol. 38, pp. 935–937.
2. Bright J. E., Inns R. H., Tuckwell N. J [et al.], The effect of storage upon cyanide in blood samples, *Human and Experimental Toxicology* 1990, vol. 9, pp. 125–129.
3. Chetty M., The stability of anticonvulsant drugs in whole blood, *Therapeutic Drug Monitoring* 1994, vol. 16, pp. 491–494.
4. Gut W., Wpływ czynników pozaanalitycznych na wynik sądowej analizy chemiczno-toksykologicznej i jego interpretację. Część II. Stan materiału do badań toksykologiczno-sądowych i jego wpływ na wynik analizy, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1995, t. XLV, pp. 3–4.
5. al-Hadidi K. A., Oliver J. S., Stability of temazepam in blood, *Science and Justice* 1995, vol. 35, pp. 105–108.
6. Hippenstiel M. J., Gerson B., Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine: a review, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 104–109.
7. Kiszka M., Buszewicz G., Mađro R., Stability of cocaine in phosphate buffer and in urine, *Problems of Forensic Sciences* 2000, vol. 46, pp. 7–23.
8. Kojima T., Nishiyama Y., Yashiki M. [et al.], Postmortem formation of carbon monoxide, *Forensic Science International* 1982, vol. 19, pp. 243–248.
9. Konig I., Skopp G., Schmitt G. [et al.], Storage stability of flunitrazepam, flurazepam, diazepam and metabolites in blood and plasma, *Archiv für Kryminologie* 1997, vol. 200, pp. 17–24.

10. Lantz R., Farid K., Koons J. [et al.], Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by capillary gas chromatography with electron – capture detection, *Journal of Chromatography* 1993, vol. 614, pp. 175–179.
11. Levine B. S., Blanke R. V., Alentour J. S., Postmortem stability of benzodiazepine in blood and tissue, *Journal of Forensic Science* 1983, vol. 28, pp. 102–115.
12. Levine B. S., Blanke R. V., Valentour J. C., Postmortem stability of barbiturates in blood and tissue, *Journal of Forensic Science* 1984, vol. 29, pp. 131–138.
13. Mc-Curdy H. H., Callahan L. S., Williams R. D., Studies on the stability and detection of cocaine, benzoylecgonine and 11-nor-⁹-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in whole blood using Abuscreen radioimmunoassay, *Journal of Forensic Science* 1989, vol. 34, pp. 858–870.
14. Nichols J. H., Charlson J., Lawson G., Automated HPLC Assay of fluoxetine and norfluoxetine in serum, *Clinical Chemistry* 1994, vol. 40, pp. 1312–1316.
15. Nyberg G., Martensson E., Preparation of serum and plasma samples for determination of tricyclic antidepressants: effects of blood collection tubes and storage, *Therapeutic Drug Monitoring* 1986, vol. 8, pp. 478–482.
16. Skopp G., Potsch L., König I. [et al.], A preliminary study on the stability of benzodiazepines in blood and plasma stored at 4 degrees C, *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 111, pp. 1–5.
17. Tarasidis C. G., Garnett W. R., Kline B. J. [et al.], Influence of tube, storage time and temperature on the total and free concentration of valproic acid, *Therapeutic Drug Monitoring* 1986, vol. 8, pp. 373–376.
18. Zuccaro P., Pacifici R., Altieri J. [et al.], Issues in methodology and applications for therapeutic drug monitoring of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers, *Therapeutic Drug Monitoring* 1998, vol. 20, pp. 20–24.

WPLYW TEMPERATURY I CZASU PRZECHOWYWANIA NA STABILNOŚĆ FLUOKSETYNY W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Marzena SYKUTERA, Ewa PUFAL, Karol ŚLIWKA

WSTĘP

Określenie rzeczywistego poziomu ksenobiotyków w materiale biologicznym stanowi ciągle aktualny i nierozwiązany problem w chemicznej analizie toksykologicznej. Szczególnie istotna z punktu widzenia analitycznego, toksykologicznego oraz z punktu widzenia orzecznictwa sądowo-lekarskiego jest problematyka stabilności ksenobiotyków w materiale biologicznym.

Z danych zawartych w literaturze przedmiotu wiadomo, że warunki przechowywania prób przeznaczonych do analizy toksykologicznej wpływają na wyniki analiz i ich interpretację [4].

Z piśmiennictwa wynika, że problemem stabilności leków w materiale biologicznym zajmowało się wielu autorów. Opisana została stabilność takich leków, jak benzodiazepiny [5, 9, 11, 16], barbiturany [12], kokaina [1, 6, 7, 13], leki przeciwpadaczkowe [3, 17], trójcykliczne leki antydepresyjne [15] oraz stabilność innych ksenobiotyków – tlenku węgla [8] czy jonów cyjankowych [2]. W publikacjach tych zajmowano się głównie wpływem temperatury na stabilność ksenobiotyków w próbach surowicy, krwi czy próbach moczu. Przeprowadzone przez autorów pracy badania dowiodły, iż stabilność ksenobiotyków jest zależna od wielu czynników, w tym między innymi od rodzaju ksenobiotyku oraz rodzaju materiału biologicznego, w którym stabilność ksenobiotyków jest badana, i temperatury. Z badań tych wynika, że ksenobiotyki nawet te należące do tej samej grupy nie zawsze są bardziej stabilne we krwi.

Na przykład Skopp i in. [16], analizując stabilność benzodiazepin w surowicy i krwi w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, wykazali w przypadku flurazepamu i midazolamu wyższą stabilność we krwi niż w surowicy, natomiast flunitrazepam i nordazepam były bardziej stabilne w surowicy niż we krwi.

Wśród badań nad stabilnością ksenobiotyków podejmowano również próby określenia stabilności fluoksetyny w materiale biologicznym [10, 14, 18]. Zuccaro i in. [18] analizowali stabilność fluoksetyny w surowicy i osoczu z dodatkiem wersenianu sodowego i heparyny przechowywanych w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ przez 1 tydzień i w temperaturze $+20^{\circ}\text{C}$ przez 1 miesiąc. Z kolei Lantz i in. [10] oznaczali spadek stężenia fluoksetyny i norfluoksetyny w surowicy podczas przechowywania prób w temperaturze pokojowej oraz w temperaturze -20°C . Określeniem stabilności fluoksetyny w surowicy w temperaturze pokojowej zajmowali się również Nichols i in. [14].

Z uwagi na to, iż fluoksetyna jest często stosowanym lekiem, a w literaturze przedmiotu brak jest pełnych danych na temat jej trwałości w innym niż surowica materiale biologicznym, dlatego istotne wydaje się przeprowadzenie dalszych badań nad jej stabilnością w celu określenia, czy i w jakim stopniu ulega zmianie stężenie

tego leku w materiale biologicznym w zależności od temperatury i czasu przechowywania.

MATERIAŁ I METODY

Ze zwłok pobrano próby krwi i moczu i dodano do nich wzorcowy roztwór fluoksetyny w ilości koniecznej do otrzymania stężenia 500 ng/ml. Wycinki wątroby pobrane ze zwłok zhomogenizowano i również dodano do nich wzorcowy roztwór fluoksetyny w ilości koniecznej do otrzymania stężenia 500 ng/g. Bezpośrednio po przygotowaniu prób określono wyjściowe stężenie fluoksetyny, które to przyjęto za 100%. Próby materiału biologicznego zawierające fluoksetynę podzielono do próbek, szczelnie zamknięto i przechowywano w różnej temperaturze (-20°C , $+4^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$). Po upływie 1, 7, 30 i 90 dni oznaczano w próbach stężenie fluoksetyny.

Fluoksetynę wyosabniano z materiału biologicznego metodą ekstrakcji cieczy z użyciem eteru dietylowego ($\text{pH} = 9$). Analizę ilościową przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej z detektorem wielodiodowym przy użyciu zestawu chromatograficznego 1100 Series firmy Agilent Technologies składającego się z degazera, pompy binarnej, autosamplera i detektora wielodiodowego. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w następujących warunkach: kolumna – XDB C8 ($150\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$; $5\text{ }\mu\text{m}$), eluent – octan trietyloaminy : acetonitryl (65:35 v/v), przepływ – $1,5\text{ ml/min}$, objętość nastrzykiwanej próbki – $10\text{ }\mu\text{l}$, pomiar przy długości fali 228 nm. Sygnał z detektora był przetwarzany elektronicznie z zastosowaniem oprogramowania ChemStation. Stężenie fluoksetyny oznaczano metodą standardu wewnętrznego (diazepam) z odpowiednich krzywych kalibracji.

Przebadano 105 prób krwi, 105 prób moczu i 105 prób wycinków wątroby.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Celem analizy toksykologicznej jest zidentyfikowanie i oznaczenie ksenobiotyku. Na wynik tego procesu ma wpływ stan materiału biologicznego, który zależy między innymi od warunków, w jakich znajdował się przed dostarczeniem do zakładu wykonującego badanie oraz czasu, jaki upłynął od pobrania do wykonania analizy.

W dostępnej literaturze brakuje danych dotyczących stabilności fluoksetyny w materiale biologicznym takim jak krew, mocz czy wycinki narządów wewnętrznych. Badania nad stabilnością fluoksetyny dotyczyły tylko płynów biologicznych, takich jak surowica [10, 14, 18] i osocze [18]. Dlatego też w związku z powyższym celem niniejszej pracy było wykazanie, w jakim stopniu procesy występujące w zabezpieczonym do analiz materiale biologicznym, a zachodzące pod wpływem takich czynników, jak czas oraz temperatura przechowywania, mają wpływ na stabilność fluoksetyny w próbach krwi, moczu i wycinkach wątroby.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w postaci wykresów zależności wartości odzysku fluoksetyny od czasu przechowywania prób materiału biologicznego w różnej temperaturze (rycina 1, 2, 3). Średnie wartości odzysku fluoksetyny z materiału biologicznego przedstawiono w tabeli I.

Z danych przedstawionych w niniejszej pracy wynika jednoznacznie, że najwyższą stabilność fluoksetyny w próbach krwi, moczu i wycinkach wątroby zaobserwowano w temperaturze -20°C .

Uzyskane wyniki badań wskazują, iż stabilność fluoksetyny obniżała się najbardziej w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$. Po 7 dniach w próbach uległo bowiem rozkładowi 2,7% fluoksetyny we krwi, 3,3% w moczu, a w wycinkach wątroby 12,0%; po 30 dniach przechowywania straty leku wynosiły 13,7% we krwi, 15,1% w moczu i w wycinkach wątroby, a po upływie 90 dni straty leku dochodziły nawet do 31,3% we krwi, 25,8% w moczu, natomiast w wycinkach wątroby 36,0%. Powyższe dane wskazują więc, że fluoksetyna jest stabilna w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ we krwi, wycinkach wątroby i moczu przez 30 dni.

Badaniem stabilności fluoksetyny w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ zajmowali się również Lantz i in. [10] oraz Nichols i in. [14]. Jednakże powyższe badania dotyczyły stabilności fluoksetyny tylko w surowicy. W pracy Lantza i in. [10] odnotowano zdecydowanie niższą stabilność fluoksetyny w surowicy przechowywanej w temperaturze pokojowej. Autorzy dowiedli, że w takich warunkach fluoksetyna jest stabilna tylko przez 96 godzin. Z kolei Nichols i in. [14] w swojej pracy wykazali, że fluoksetyna w surowicy jest stabilna w temperaturze pokojowej przez krótszy czas, bo tylko przez 48 godzin.

W niniejszej pracy opisano również doświadczenia mające na celu określenie stabilności fluoksetyny we krwi, moczu i wycinkach wątroby w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Uzyskane wyniki dowiodły, że przechowywanie materiału biologicznego przez 7 dni spowodowało nieznaczne ubytki leku w wysokości 2,7% we krwi, 4,3% w moczu, a w wycinkach wątroby 12,0%. Po upływie 30 dni wartości te uległy zmianie do 15,4% we krwi, 15,8% w moczu i 22,0% w wycinkach wątroby, a po 90 dniach straty fluoksetyny kształtowały się już na poziomie 20,2% we krwi, 22,3% w moczu i w wycinkach wątroby 30,0%. Mając na uwadze powyższe dane, można przyjąć, że fluoksetyna jest stabilna we krwi, moczu i wycinkach wątroby w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, podobnie jak w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$, tylko przez 30 dni.

Nichols i in. [14], badając wpływ temperatury na stabilność fluoksetyny w surowicy, stwierdził, że jest ona stabilna w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ tylko przez 1 tydzień. Na przedłużenie stabilności fluoksetyny w surowicy i osoczu w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, jak wykazał Zuccaro i in. [18], nie miał wpływu dodatek substancji konserwujących takich jak wersenian sodowy i heparyna.

Różnice między wynikami badań nad stabilnością fluoksetyny w surowicy w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ i $+25^{\circ}\text{C}$ a wynikami badań nad stabilnością tego leku we krwi, moczu czy wycinkach wątroby mogły być spowodowane rodzajem matrycy biologicznej użytej do badań.

Z przeprowadzonych badań nad stabilnością fluoksetyny w temperaturze -20°C wynika, że zamrożenie próbek moczu, podobnie jak zamrożenie próbek krwi i wycinków wątroby, gwarantuje trwałość fluoksetyny przez 90 dni. W tym przypadku przechowywanie krwi, moczu, wycinków wątroby w temperaturze -20°C spowodowało nieznaczne straty leku – we krwi 4,9%, w wycinkach wątroby 10,0% a w moczu tylko 2,7%. Podobne zachowanie się fluoksetyny zaobserwował Nichols i in. [14] podczas badań jej stabilności w surowicy. Doświadczenia te wykazały, że w próbkach surowicy zamrożonej do -20°C nawet po kilku miesiącach obniżenie stężenia fluoksetyny jest nieznaczne. Zbliżone wyniki badań nad stabilnością fluoksetyny w surowicy

w temperaturze -20°C przedstawił również Lantz i in. [10]. Wykazali oni bowiem, że poziom fluoksetyny w tej temperaturze nie zmieniał się nawet przez 1 rok.

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone w toku realizacji niniejszej pracy badania wykazały, iż:

1. przechowywanie prób krwi, moczu oraz wycinków wątroby zawierających fluoksetynę w temperaturze -20°C pozwala na uzyskania wiarygodnych wyników analizy nawet po upływie 90 dni od chwili pobrania materiału biologicznego do momentu przeprowadzenia badań;
2. w sytuacjach, gdy materiał biologiczny przechowywany jest w wyższej temperaturze, tzn. $+4^{\circ}\text{C}$ (temperatura lodówki) lub $+25^{\circ}\text{C}$ (temperatura pokojowa), analizę w celu stwierdzenia obecności fluoksetyny należałoby przeprowadzić w okresie nie przekraczającym 30 dni od momentu pobrania próby do analizy ze względu na duże straty leku;
3. mając na uwadze powyższe rezultaty, wydaje się celowe przeprowadzenie dalszych badań uwzględniających wpływ innych czynników pozaanalitycznych na stabilność fluoksetyny w materiale biologicznym, takich jak dostęp powietrza, dostęp światła, pH środowiska czy dodatek substancji konserwujących.