

## Sviluppo e validazione di un metodo HPLC per il dosaggio del levetiracetam nel siero

Candia Corsaro, Maria Agata Mangano, Antonino Signorelli

Laboratorio di Chimica e Clinica Tossicologica, Azienda USL 3, Catania

### ABSTRACT

**Development and validation of a HPLC method for the determination of levetiracetam in human serum.** A sensitive and specific HPLC method has been developed and validated for determination of levetiracetam in human serum. The sample preparation involves a clean-up procedure using a SPE C18 column. The separation was carried out on a Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm with Alltima C18 4.6 x 7.5 mm precolumn using phosphate-acetonitril buffer solution. Excellent linearity was found between 2.5 and 40.0 mg/L, with a limit of detection of 0.625 mg/L. Assay imprecision (% CV) was <6,8%. This method could be helpful for monitoring subjects with epileptic pathology to better optimize their therapy.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è migliorata la comprensione della malattia epilettica risultando più chiaro il legame fra l'azione in vitro dei farmaci antiepilettici e la loro efficacia nei confronti delle varie manifestazioni della malattia. Il termine "crisi epilettica" descrive una varietà di sintomi neurologici dovuti a una scarica elettrica anomala, sincronizzata e prolungata, di cellule nervose della corteccia o del tronco cerebrale. L'approccio terapeutico per questo tipo di patologia si avvale di un'ampia gamma di farmaci, che possono essere utilizzati sia singolarmente che in multiterapia (1-3). Si tratta di una terapia essenzialmente sintomatica, che pur non risolvendo le cause dell'epilessia, consente ai soggetti affetti da tale patologia di migliorare il proprio stile di vita (4).

Il levetiracetam, una (S)- $\alpha$ -etil-2-oxo-1-pirridolina acetammide con PM di 170,2, strutturalmente simile al piracetam e il cui meccanismo d'azione non è del tutto noto, non sembra agire attraverso la modulazione inibitoria o stimolatoria della neurotrasmissione, anche se si lega ai siti sinaptici delle cellule del sistema nervoso centrale. È eliminato dai reni, non interferisce con il metabolismo degli altri farmaci ed è un composto altamente solubile, permeabile, con un profilo farmacocinetico lineare e con scarsa variabilità intra- ed inter-individuale (5). La sua biodisponibilità orale è vicina al 100 %, e subisce solo un insignificante metabolismo epatico per formare metaboliti inattivi; è quindi vicino ad un farmaco con proprietà farmacocinetiche ideali. Il monitoraggio delle sue concentrazioni ematiche è tuttavia raccomandato per ottimizzare l'effetto terapeutico, specialmente nei pazienti con patologie renali, negli anziani, in cui il tempo di emivita è aumentato e nei bambini in cui il sovradosaggio può determinare effetti collaterali di tipo psichico, quali irritabilità, ostilità, sedazione e cefalea.

Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto una metodica in HPLC per il dosaggio di tale farmaco nel siero di pazienti in trattamento antiepilettico, che fosse semplice e soprattutto veloce.

### MATERIALI E METODI

#### Preparazione dei campioni

I campioni da sottoporre ad analisi, prelevati in provetta priva di anticoagulanti, sono stati purificati su colonnine SPE C18 da 200 mg (LabService Analytical), precedentemente equilibrate con 1 mL di metanolo e 1 mL di acqua. Per favorire l'eluizione è stato utilizzato un "vacuum box". Le colonnine sono state caricate con 100  $\mu$ L di campione (siero, calibratore o controllo) e, dopo assorbimento, sono state lavate con 1 mL di acqua e poi lasciate asciugare sotto vuoto. L'eluizione è stata effettuata con due passaggi di 750  $\mu$ L di una miscela di tampone fosfato 0,2 M, pH 5,9, e aceto nitrile in rapporto di 5:1. L'eluato finale costituisce il campione da iniettare in HPLC (6,7).

#### Strumentazione e reagenti

È stato utilizzato un sistema HPLC Agilent 1200, comprendente un degasatore, una pompa quaternaria, un compartimento per colonne termostato, un campionatore automatico e un rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile. Per la gestione dei dati, è stato utilizzato il programma Variant HPLC System della ditta BioRad. La separazione cromatografica dell'analita è stata effettuata su colonna Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 x 150 mm (dimensione delle particelle 5  $\mu$ m) con precolonna Alltima C18 4,6 x 7,5 mm (5  $\mu$ m).

Il levetiracetam è stato fornito dalla ditta UCB S.A., Pharma Sector, in polvere allo stato puro in confezione da 200 mg. Tramite pesata, è stata preparata una soluzione madre da 40 mg/L, dalla quale sono state poi ottenute le ulteriori diluizioni, mediante l'impiego di un pool di sieri, per la costruzione della curva di calibrazione (2,5, 5, 10 e 20 mg/L). Il bianco è stato ottenuto mediante l'utilizzo di un pool di sieri non contenenti il farmaco.

La separazione del levetiracetam è stata effettuata tramite una eluizione isocratica utilizzando una miscela di tampone fosfato 0,2 M pH 5,9 e aceto nitrile nel rapporto

di 5:1 ad una velocità di flusso di 0,3 mL/min e ad una temperatura della colonna di 25 °C. La lunghezza d'onda del rivelatore era 220 nm. Nelle condizioni descritte il tempo di ritenzione del levetiracetam era di circa 9 min (Figura 1).

### Validazione del metodo

#### Selettività/specificità

Considerando le caratteristiche cromatografiche del levetiracetam, al fine di valutare la selettività del nostro metodo, è stata testata una serie di campioni contenenti, oltre al levetiracetam, i seguenti principi attivi ed eventuali loro metaboliti: caffeina, carbamazepina; paracetamolo, gentamicina, metotrexate, N-acetilprocainamide, primidone, procainamide, chinidina, vancomicina, alprazolam, amitriptilina e metaboliti, amfetamina, atenololo, atracurio, bisoprololo, clorpromazina e metaboliti, citalopram, clozapina, codeina, difenidramina, efedrina, flurazepam e metaboliti, fluvoxamina, aloperidolo, imipramina, lidocaina e metaboliti, lorazepam, 3,4-metilenediossimetamfetamina (MDMA), 3,4-metilenedioossiamfetamina (DMA), nortriptilina e metabolita, ranitidina e metaboliti, temazepam, trazodone, promazina, sulperide e verapamil. Sono stati anche testati alcuni degli antiepilettici utilizzati in multiterapia come fenobarbital, fenitoina e acido valproico.

#### Limite di rivelabilità

Col termine limite di rivelabilità (LoD) o minima quantità rivelabile si intende definire la concentrazione di un analita che produce un segnale significativamente diverso da quello di un campione che non contiene l'analita. Per definire questo valore sono state preparate diluizioni scalari, a partire dall'ultima concentrazione utile per la

costruzione della retta di calibrazione (1,25, 0,625, 0,325 e 0,156 mg/L).

#### Imprecisione

Sono stati analizzati, nella stessa giornata, i calibratori alle diverse concentrazioni per 10 volte e la stessa procedura è stata eseguita in due settimane successive.

### RISULTATI

I principi attivi analizzati insieme al levetiracetam non hanno mostrato interferenze nell'analisi, poiché alcuni, come paracetamolo e salicilati, presentano tempi diversi di ritenzione (Figure 2 e 3), mentre altri, che spesso vengono utilizzati nella multiterapia, come fenobarbital, acido valproico e fenitoina, non sono stati rilevati con questa metodica.

Analizzando i dati delle curve di calibrazione (n=10) è stata ottenuta una relazione lineare fra concentrazioni di levetiracetam e valori medi delle aree dei picchi ( $r^2=0,999$ ) (Figura 4).

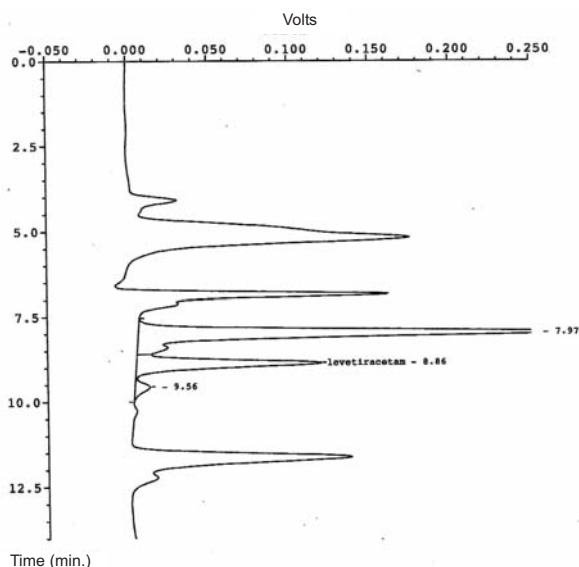
Come LoD dell'analita sullo strumento è stato determinato il valore di 0,625 mg/L. Il limite di quantificazione, fissato ad una concentrazione pari a 20 volte il segnale della DS del calibratore zero, era pari a 2,1 mg/L.

Prove eseguite con un campione di siero contenente una concentrazione di 20 mg/L di levetiracetam, mostravano un recupero medio pari al 99,9% (intervallo compreso tra 94,9% e 105,1%, n=10).

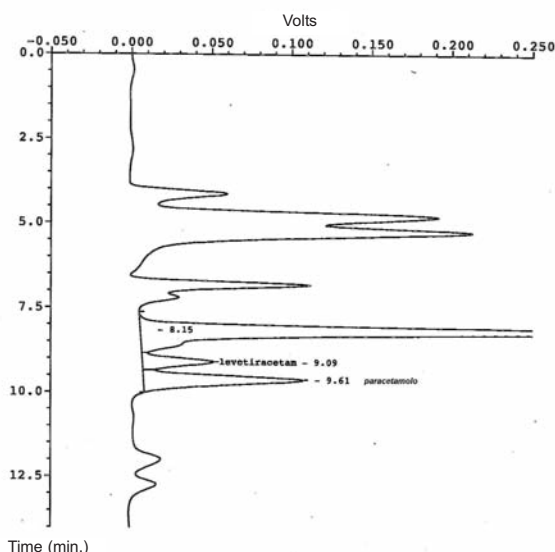
La Tabella 1 mostra i risultati ottenuti nello studio della ripetibilità del metodo.

### CONCLUSIONI

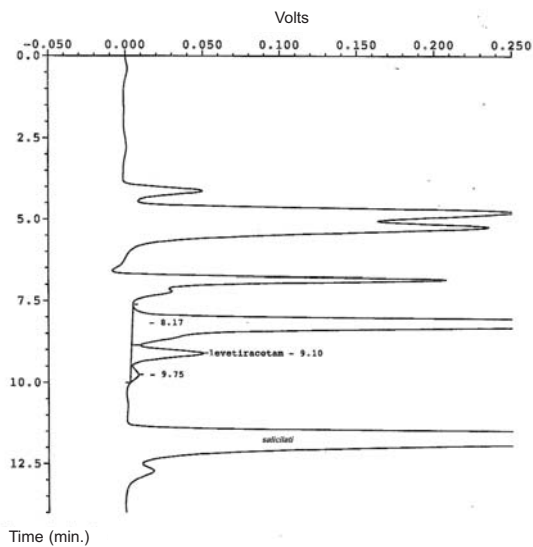
La scoperta di nuovi farmaci con minori effetti tossici per la cura dell'epilessia rappresenta sicuramente un



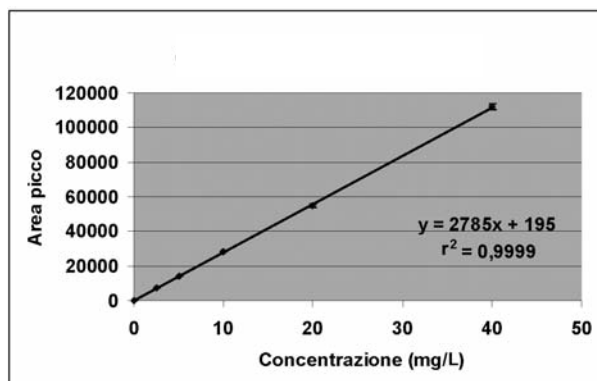
**Figura 1**  
Cromatogramma di un campione di siero contenente 20 mg/L di levetiracetam.



**Figura 2**  
Cromatogramma di un campione di siero contenente 20 mg/L di levetiracetam e 20 mg/L di paracetamolo.



**Figura 3**  
Cromatogramma di un campione di siero contenente 20 mg/L di levetiracetam e 20 mg/L di salicilati.



**Figura 4**  
Retta di calibrazione costruita con le medie dei valori relativi alle aree dei picchi ( $n=10$ ) dei calibratori a concentrazione 2,5, 5, 10, 20 e 40 mg/L di levetiracetam.

**Tabella 1**  
Imprecisione del metodo proposto

Calibratore	DS nella serie	CV	DS nei giorni	CV%
2,5 mg/L	0,16 mg/L	6,4%	0,17 mg/L	6,8%
5 mg/L	0,18 mg/L	3,6%	0,19 mg/L	3,8%
10 mg/L	0,53 mg/L	5,3%	0,61 mg/L	6,1%
20 mg/L	0,73 mg/L	3,7%	0,81 mg/L	4,1%
40 mg/L	1,16 mg/L	2,9%	1,18 mg/L	3,0%

vantaggio, ma, anche con nuove terapie, i soggetti in trattamento necessitano di un costante monitoraggio della terapia di mantenimento al fine di ridurre l'incidenza degli effetti collaterali. In questo contesto, la determinazione del levetiracetam in HPLC da noi proposta risulta semplice, veloce, poco costosa e sufficientemente

robusta. Il metodo presenta un'imprecisione accettabile (<6,8%) e nessuna importante interferenza, specie col fenobarbital, spesso somministrato in associazione al levetiracetam.

## BIBLIOGRAFIA

1. Manfredi M. La terapia farmacologica dell'epilessia. Roma: Associazione Forep, 2002.
2. Zaccara G, Cruccu G, Guerrini R, et al. I farmaci antiepilettici. Firenze: SEE Editrice, 2006.
3. Crawford P, Lee P. Gender difference in the management of epilepsy-what women are hearing. *Seizure* 1999;8:135-9.
4. Perucca E. Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2006;61:246-55.
5. Harden C. Safety profile of levetiracetam. *Epilepsia* 2001;42:36-9.
6. Tang PH, Miles MV. Rapid monitoring of levetiracetam in plasma and saliva by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 2005;27:255-6.
7. Martens-lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment. *J Chromatogr B* 2005;10:197-200.