

# Note de laboratoire : Dosage rapide et spécifique du lévétiracétam (Keppra®) par HPLC/MS

## *Rapid and specific determination of levetiracetam (Keppra®) in biological fluids by HPLC/MS*

---

**Antoine TRACQUI\*<sup>(1)</sup>, Laurence LE GOURRIER<sup>(2)</sup>, Marion VILLAIN<sup>(1)</sup>,  
Pascal KINTZ<sup>(1)</sup>, Albert JAEGER<sup>(3)</sup>, Bertrand LUDES<sup>(1)</sup>**

---

(1) Institut de Médecine Légale, Faculté de Médecine de Strasbourg, 11, rue Humann  
67085 STRASBOURG Cedex - FRANCE

(2) Service d'Anesthésie et de Réanimation Chirurgicale, Hôpital de Hautepierre, CHRU/Hôpitaux Universitaires  
de Strasbourg - 67098 STRASBOURG Cedex - FRANCE

(3) Service de Réanimation Médicale et des Urgences Médicales, Hôpital de Hautepierre, CHRU/Hôpitaux  
Universitaires de Strasbourg - 67098 STRASBOURG Cedex - FRANCE

---

\* Auteur à qui adresser la correspondance : Dr Antoine TRACQUI, Institut de Médecine Légale,  
11, rue Humann 67085 STRASBOURG Cedex - FRANCE  
Tél : +33 (0)3 90 24 33 61 - Fax : +33 (0)3 90 24 33 62 - E-mail : atracqui@mageos.com

---

(Reçu le 27 novembre 2002 ; accepté le 20 janvier 2003)

### **RÉSUMÉ**

Une méthode originale par HPLC/MS est proposée pour l'identification formelle et le dosage du lévétiracétam (LEV; Keppra®), un nouvel antiépileptique, dans les fluides biologiques. Après micro-extraction en phase liquide de 100 µl d'échantillon par le chloroforme/2-propanol/n-heptane (25 : 10 : 65, v/v) à pH 9,5 en utilisant le prazépam comme standard interne (SI), la séparation s'effectue sur colonne Waters NovaPak C18 (150 x 2,0 mm, i.d.) à l'aide d'un gradient acétonitrile/tampon 2 mM NH<sub>4</sub>COOH, pH 3,0. La détection est assurée par le spectromètre de masse API-100 (Perkin-Elmer) avec interface à pression atmosphérique de type ionspray utilisée en mode d'ions positifs ; l'acquisition se fait en courant ionique total ou en SIM à m/z 171,0 ; 154,0

### **SUMMARY**

An original method based upon HPLC/MS is presented for the identification and quantitation of levetiracetam (LEV; Keppra®), a novel antiepileptic agent, in biological fluids. After a liquid/liquid extraction micromethod (100 µl sample) using chloroforme/2-propanol/n-heptane (25 : 10 : 65, v/v) at pH 9.5 and prazepam as internal standard (IS), separation was performed on a Waters NovaPak C18 column (150 x 2.0 mm, i.d.), using a gradient of acetonitrile/2 mM NH<sub>4</sub>COOH buffer, pH 3.0. Detection was done by a Perkin-Elmer API-100 mass analyzer equipped with an ionspray atmospheric pressure interface, operated in the positive ionization mode. MS data were monitored in the TIC or SIM modes at m/z 171.0, 154.0 et 126.0 (LEV); and 325.0 (IS). The average

et 126,0 (LEV); et 325,0 (SI). Les temps de rétention moyens du LEV et du SI sont respectivement de  $3,60 \pm 0,12$  min et  $8,09 \pm 0,27$  min ; l'ensemble de la procédure d'analyse nécessite moins de 45 min. Les limites de détection pour le LEV sont comprises entre 150 et 200  $\mu\text{g/l}$ , la limite de quantification est de 500  $\mu\text{g/l}$  dans le sang total, le plasma ou l'urine. La méthode est simple, rapide, sensible et d'une très grande spécificité; elle est appropriée non seulement aux dosages à visée médico-légale mais aussi au monitoring thérapeutique ou à la toxicologie d'urgence. Une application clinique est présentée avec le cas d'un sujet de 66 ans supposé victime d'un surdosage en Keppra®, chez lequel la procédure décrite a permis de caractériser un taux plasmatique à 199,5 mg/l et un taux urinaire à 413,7 mg/l.

### MOTS-CLÉS

lévétiracétam, HPLC/MS, dosage.

## Introduction

Le lévétiracétam (LEV) ((-)-(S)- $\alpha$ -éthyl-2-oxo-1-pyrrolidine acétamide, M.W. = 170,21) est un nouvel anti-épileptique à large spectre récemment commercialisé par les laboratoires UCB Pharma. Sans parenté structurale avec les autres anticomitiaux, ce composé est chimiquement proche du piracétam (Nootropyl®), médicament psychostimulant et nootrope mis sur le marché en 1971 (Figure 1). Indiqué chez le sujet épileptique en association dans le traitement des crises partielles avec ou sans généralisation, son mécanisme d'action est encore inconnu (1-5). Commercialisé sous forme d'énantiopur (l'isomère R est dépourvu d'activité pharmacologique), ce médicament est disponible en France depuis mars 2001 sous le nom de Keppra® (comprimés pelliculés à 500 mg, hôpitaux uniquement).

Le LEV se caractérise par une bonne tolérance clinique, un index thérapeutique élevé, une absence d'interaction avec les autres antiépileptiques et un profil pharmacocinétique intéressant (6, 7) : la résorption *per os* est rapide, avec une biodisponibilité absolue proche de 100 % et un  $T_{\text{max}}$  de 1,3 h en moyenne ; l'état stable est atteint après 2 jours d'un schéma d'administration biquotidienne. Pour des posologies comprises entre 750 et 2000 mg/j, les concentrations plasmatiques au pic ( $C_{\text{max}}$ ) ou à l'équilibre ( $C_{\text{ss}}$ ) sont comprises entre 20 et 50 mg/l (1, 7, 9). La fixation aux protéines plasmatiques est très faible (< 10 %) et le volume de distribution est de 0,5-0,7 l/kg, valeur proche de celle de l'eau échangeable. La biotransformation est peu importante (les 2/3 d'une dose orale sont retrouvés sous forme inchangée dans les urines) et ne fait pas intervenir le cytochrome P450 hépatique ; la voie métabolique principale (24 % de la dose) est l'hydrolyse du groupement acétamide conduisant à un métabolite inactif (UCB L057). La demi-vie d'élimination plasmatique est de 7

retention times for LEV and the IS were  $3.60 \pm 0.12$  min and  $8.09 \pm 0.27$  min, respectively ; the whole analytical procedure can be achieved in less than 45 min. LODs were in the range 150-200  $\mu\text{g/l}$  and the LOQ was 500  $\mu\text{g/l}$  in whole blood, plasma, or urine. This method is simple, rapid, sensitive and ultraspecific; it is suitable for both medicolegal and clinical purposes, e.g. therapeutic drug monitoring. As an application, we report the case of a 66-year-old man in which an overdose of Keppra® was suspected; as measured by our procedure, LEV concentrations in plasma and urine were 199.5 and 413.7 mg/l, respectively.

### KEY-WORDS

levetiracetam, HPLC/MS, determination.

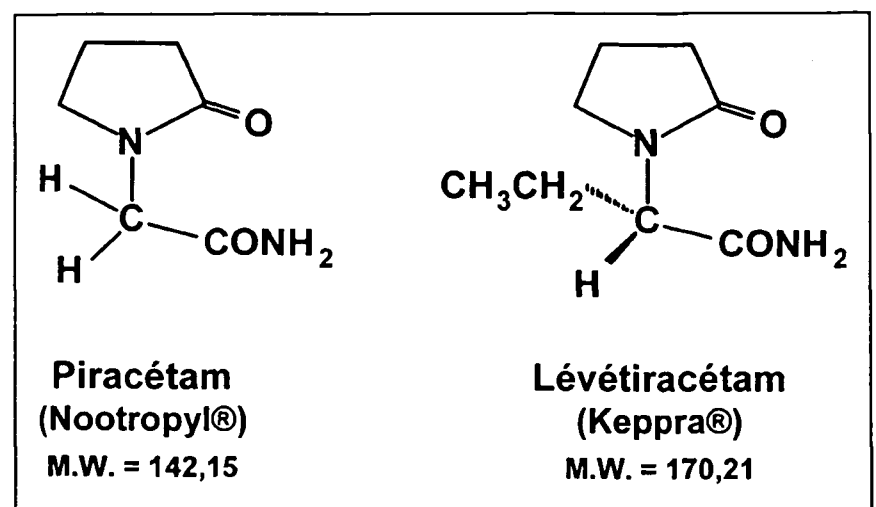


Figure 1 : Structures chimiques du piracétam et du lévétiracétam.

$\pm 1$  h chez l'adulte (elle est augmentée d'environ 40 % chez le sujet âgé) et ne varie pas avec la dose, la voie d'administration ou la répétition des doses.

A la demande des réanimateurs strasbourgeois confrontés à un probable surdosage en Keppra®, nous avons développé et validé une méthode rapide et originale de dosage du LEV dans les fluides biologiques par micro-extraction en phase liquide et chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS).

## Matériels et méthodes

### Standards, réactifs et solvants

Le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (ACN) sont de qualité HPLC (Prolabo et Merck, respectivement). L'acide formique concentré (HCOOH, 99-100 %) est de qualité Normatom™ (Prolabo). Tous les autres solvants et réactifs sont de qualité analytique et sont fournis par Merck, Fluka et Prolabo. Le lévétiracétam, n'ayant pu être obtenu sous forme pure dans des délais

raisonnables, provient de comprimés de Keppra® remis par la Pharmacie Centrale du CHRU de Strasbourg. Une solution mère à 10 g/l a été obtenue par broyage au mortier et dissolution d'un comprimé dans 50 ml de MeOH, centrifugation à 3500 g et filtration du surnageant au moyen de filtres Millex®-HV (Millipore) de 0,45 µm ; les solutions de travail étaient obtenues juste avant usage par dilutions méthanoliques appropriées de cette solution mère conservée à + 4 °C dans l'obscurité. Aucun des excipients présents dans les comprimés de Keppra® n'a donné lieu à des interférences analytiques observables. Le prazépam (standard interne) est fourni par Sigma.

### Extraction

Dans des tubes Eppendorff de 1,5 ml étaient ajoutés 100 µl de fluide biologique (sang, plasma, urine), 20 µl de standard interne (prazépam, 100 mg/l), 200 µl de tampon NH<sub>4</sub>Cl saturé (pH 9,5) et 1 ml de chloroforme/2-propanol/*n*-heptane (25 : 10 : 65, v/v). Après agitation (vortex, 20 s) et centrifugation (10500 g, 5 min) de ce mélange, la phase organique était évaporée (SpeedVac® Plus SC210A, 43° C, 20 min). L'extrait sec était ensuite repris avec 30 µl de MeOH, dont 2 µl étaient injectés dans la colonne à chaque analyse.

### HPLC/MS

**Pompe HPLC** : Pompe à double seringue (20 ml) pour micro-débits (Applied Biosystems 140B) ; **Injecteur** : vanne manuelle (Rhéodyne mod. 8125) avec boucle PEEK de 2 µl ; **Colonne HPLC** : 4-µm NovaPak C18 (Waters), 150 x 2,0 mm, i.d. (avec pré-colonne Opti-Guard™ C18 (Interchim), 15 x 1,0 mm, i.d.) ; **Phase mobile** : ACN/tampon 2 mM NH<sub>4</sub>COOH, pH 3,0. Gradient : ACN 15 % à T<sub>0</sub>, 80 % à 6 min, maintenu isocratique jusqu'à 8 min, puis retour à 15 % à 12 min (tous les segments sont linéaires). Débit 270 µl/min (avec split post-colonne 1 : 3), équilibration de 5 min entre deux analyses consécutives ; **Interface HPLC/MS** : Perkin-Elmer Sciex Ionspray™ (ISP ou électrospray pneumatiquement assisté) ; gaz nébuliseur : Azote U (99,95 %), 40 psi, 1,04 l/min ; gaz rideau : idem, 1,44 l/min ; **Détecteur MS** : Perkin-Elmer Sciex API-100. Principaux paramètres : tension d'ionisation (capillaire ionspray) : + 4500 V ; orifice : + 15 V ; électromultiplicateur : + 2900 V ; acquisition en mode de spectre complet ou TIC (total ion current) avec une bande passante de 30-350 uma et un pas de 0,2 uma, ou en mode SIM (selected ion monitoring) à *m/z* 171,0 ; 154,0 et 126,0 (LEV); et 325,0 (prazépam).

## Résultats et discussion

Plusieurs procédures analytiques ont déjà été proposées pour le dosage du LEV dans les fluides biologiques, incluant la chromatographie liquide avec détection UV (9-11) et la chromatographie gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC/FID) (8,12), azote-phosphore (GC/NPD) (9) ou spectrométrie de masse (GC/MS) (13,14). La présente méthode est en revanche la première faisant appel au couplage HPLC/MS.

La Figure 2 représente le spectre de masse ISP du LEV en mode d'ions positifs pour une tension d'orifice optimisée à + 15 V. Dans ces conditions analytiques le spectre se compose essentiellement de l'ion pseudomoléculaire protoné [M + H]<sup>+</sup> à *m/z* 171 et de deux fragments d'abondance voisine à *m/z* 126 et 154 qui selon toute vraisemblance correspondent respectivement à la perte du groupement amide et de l'oxygène cétonique. L'obtention de ces deux ions de confirmation garantit l'identification du LEV avec une spécificité absolue.

Dans les conditions chromatographiques choisies, les temps de rétention moyens de l'analyte et du standard interne sont respectivement de 3,60 ± 0,12 min et 8,09 ± 0,27 min. Les concentrations thérapeutiques élevées du LEV et l'excellente sensibilité du couplage HPLC/MS pour cette molécule nous ont conduits à développer une procédure de micro-extraction en phase liquide (MEPL) d'inspiration similaire à celle que nous avons déjà décrite pour le dosage HPLC/MS du méprobamate (15,16). Ce procédé combine les avantages de la simplicité, d'une économie en fluide biologique (100 µl) comme en solvant extracteur, d'une absence de vaisselle (tubes jetables) et d'une grande rapidité : l'étape d'extraction se fait en moins de 30 minutes, ce qui ramène la durée totale de l'analyse à moins de 45 minutes. Les rendements d'extraction sont satisfaisants quel que soit le fluide biologique étudié : dans le sang total surchargé en LEV à 10 et 100 mg/l, ces rendements sont respectivement de 85,4 ± 4,9 % et 87,7 ± 5,5 % ; dans le plasma et l'urine, ils sont toujours supérieurs à 86 %.

Les limites de détection dans le sang total, le plasma et l'urine (3 fois le bruit de fond en mode SIM à *m/z* 171) sont comprises entre 150 et 200 µg/l, la limite de quantification a été fixée à 500 µg/l pour les 3 matrices ; on voit que même en n'utilisant que 100 µl d'échantillon ces limites restent considérablement inférieures aux concentrations thérapeutiques usuelles du LEV, ce qui rend notre technique appropriée au monitoring thérapeutique aussi bien qu'à la toxicologie médico-légale. La quantification du LEV est réalisée en reportant le ratio des aires de pic (analyte/standard interne) en mode SIM (*m/z* 171 et 325, respectivement) sur la droi-

te de calibration établie à l'aide d'échantillons de sang total surchargés à 0,5, 2, 5, 40 et 200 mg/l ; sur cette gamme d'étalonnage la linéarité apparaît excellente ( $r = 0,994$ ). La justesse et la précision de la méthode ont été déterminées à l'aide d'échantillons de sang total surchargés à 5 et 40 mg/l (10 mesures pour chaque concentration) ; les résultats sont respectivement de 5,2 % et 10,5 % à 5 mg/l, 5,9 % et 8,8 % à 40 mg/l. L'imprécision inter-jour, étudiée à l'aide d'aliquotes de sang total surchargé à 40 mg/l (1 dosage par jour pendant 6 jours) est de 13,3 %.

A titre d'exemple, cette procédure analytique a pu être utilisée dans le cas d'un homme de 66 ans aux antécédents médico-chirurgicaux chargés (transplantation cardiaque en 2000, hypertension artérielle, insuffisance respiratoire chronique), traité par Keppra® 2 cp 3 fois/j pour une comitialité post-encéphalitique et hospitalisé dans un tableau d'asthénie et d'altération de la vigilance. Le dosage du LEV a permis de caractériser un taux

de 199,5 mg/l dans le plasma (Figure 3) et de 413,7 mg/l dans les urines, suggérant un net surdosage - probablement favorisé par la survenue d'une insuffisance rénale fonctionnelle - par rapport aux valeurs thérapeutiques usuelles ; les troubles neurologiques se sont rapidement amendés sous correction de l'insuffisance rénale et arrêt du Keppra®. Il s'agit à notre connaissance du premier cas clinique de surdosage en LEV décrit jusqu'à présent.

## Conclusion

La méthode HPLC/MS développée pour le dosage du Keppra® dans les fluides biologiques se caractérise par sa bonne sensibilité et sa très grande spécificité. Sa simplicité et sa rapidité la rendent appropriée non seulement aux dosages à visée médico-légale mais aussi au monitoring thérapeutique ou à la toxicologie d'urgence.

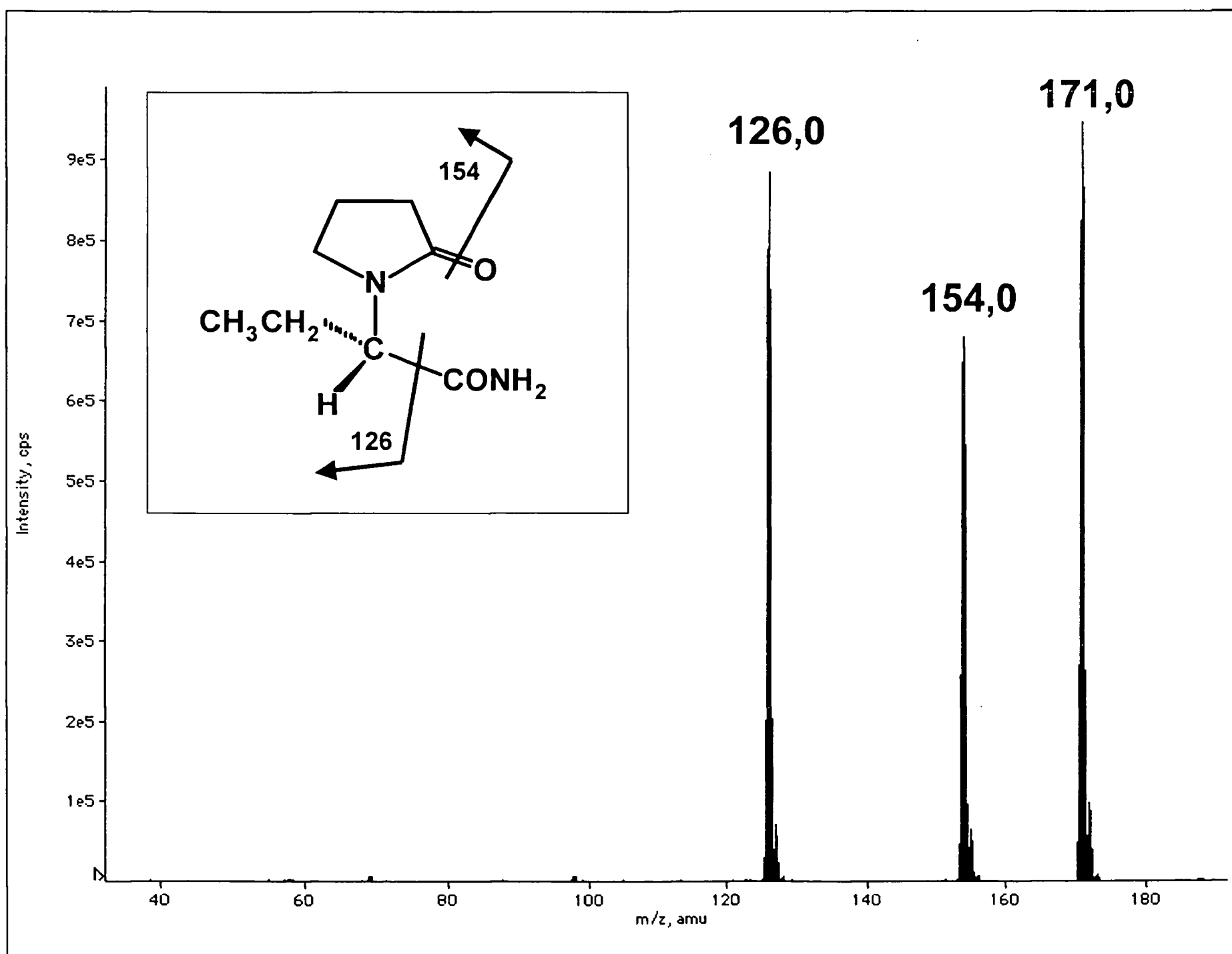
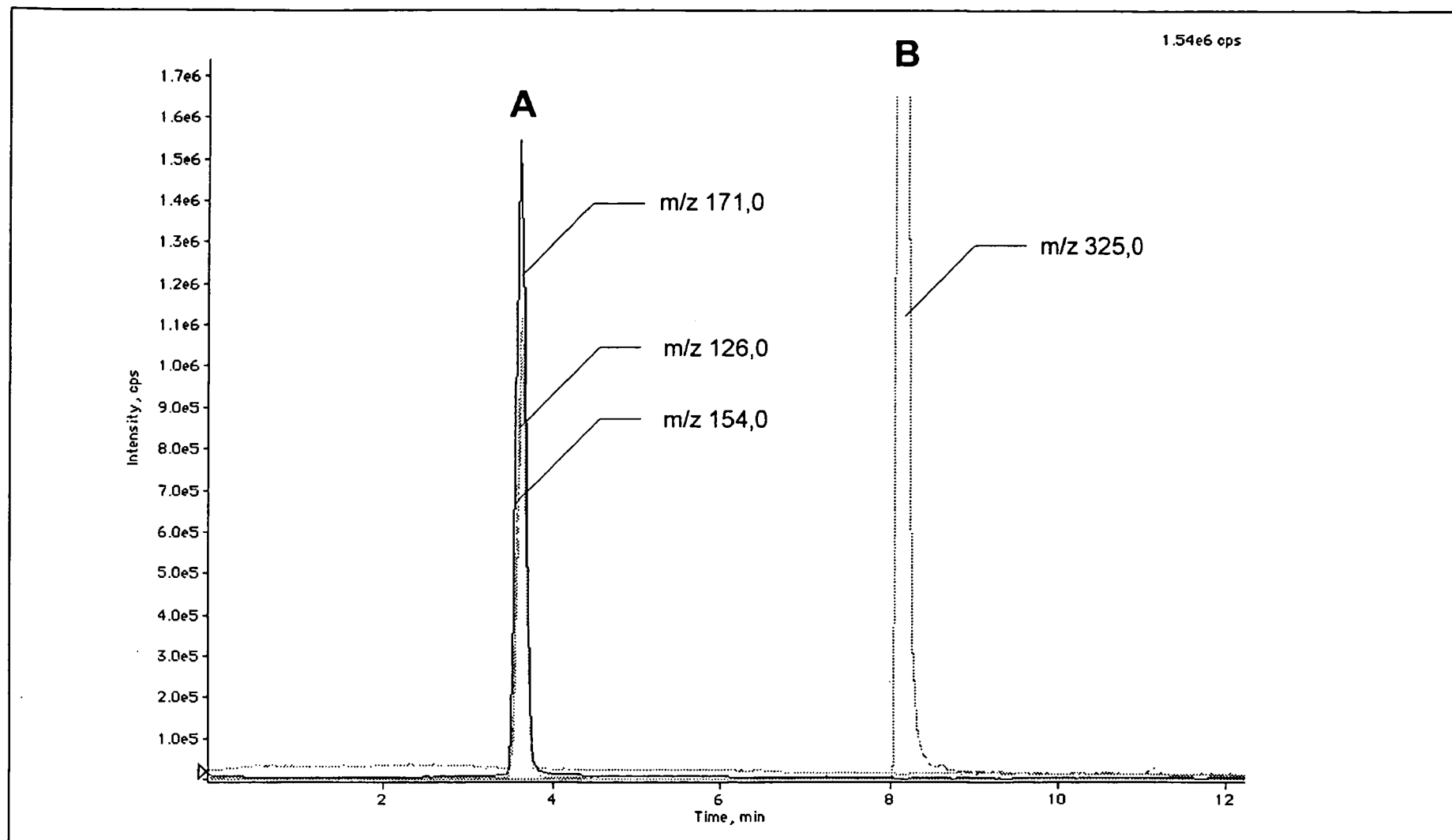


Figure 2 : Spectre de masse ionspray (mode ions positifs, OR = + 15 V) du lévétiracétam. Fenêtre : schéma proposé de fragmentation.



**Figure 3** : Chromatogramme (mode SIM, m/z 325, 171, 154 et 126) d'un prélèvement de plasma (100 µl) dans un surdosage supposé en Keppra® ; **Pic A** (3,65 min) = lévétiracétam (199,5 mg/l) ; **Pic B** (8,14 min) = prazépam (standard interne).

## Références

1. Welty T.E., Gidal B.E., Ficker D.M., Privitera M.D. Levetiracetam: a different approach to the pharmacotherapy of epilepsy. *Ann. Pharmacother.* 2002 ; 36 : 296-304.
2. Leppik I.E. The place of levetiracetam in the treatment of epilepsy. *Epilepsia* 2001 ; 42 : 44-5.
3. Hovinga C.A. Levetiracetam: a novel antiepileptic drug. *Pharmacotherapy* 2001 ; 21 : 1375-88.
4. Privitera M. Efficacy of levetiracetam: a review of three pivotal clinical trials. *Epilepsia* 2001 ; 42 : 31-5.
5. Dooley M., Plosker G. L. Levetiracetam. A review of its adjunctive use in the management of partial onset seizures. *Drugs* 2000 ; 60 : 871-93.
6. Radtke R.A. Pharmacokinetics of levetiracetam. *Epilepsia* 2001 ; 42 : 24-7.
7. Patsalos P.N. Pharmacokinetic profile of levetiracetam : toward ideal characteristics. *Pharmacol. Ther.* 2000 ; 85 : 77-85.
8. Ragueneau-Majlessi I., Levy R.H., Meyerhoff C. Lack of effect of repeated administration of levetiracetam on the pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles of warfarin. *Epilepsy Res.* 2001 ; 47 : 55-63.
9. Vermeij T.A., Edelbroek P.M. High-performance liquid chromatographic and megabore gas-liquid chromatographic determination of levetiracetam (ucb L059) in human serum after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1994 ; 662 : 134-9.
10. Ratnaraj N., Doheny H.C., Patsalos P.N. A micromethod for the determination of the new antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) in serum or plasma by high performance liquid chromatography. *Ther. Drug Monit.* 1996 ; 18 : 154-7.
11. Tong X., Patsalos P.N. A microdialysis study of the novel antiepileptic drug levetiracetam: extracellular pharmacokinetics and effect on taurine in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 2001 ; 133 : 867-74.
12. Levy R.H., Ragueneau-Majlessi I., Baltes E. Repeated administration of the novel antiepileptic agent levetiracetam does not alter digoxin pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Epilepsy Res.* 2001 ; 46 : 93-9.
13. Isoherranen N., Roeder M., Soback S., Yagen B., Schurig V., Bialer M. Enantioselective analysis of levetiracetam and its enantiomer (R)-alpha-ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide using gas chromatography and ion trap mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000 ; 745 : 325-32.
14. Isoherranen N., Yagen B., Soback S., Roeder M., Schurig V., Bialer M. Pharmacokinetics of levetiracetam and its enantiomer (R)-alpha-ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide in dogs. *Epilepsia* 2001 ; 42 : 825-30.
15. Tracqui A., Géraut A., Kintz P., Ludes B. Identification formelle et dosage ultra-rapide du méprobamate par HPLC/MS : Intérêt en toxicologie d'urgence. Communication présentée à la Réunion d'Été 1997 de la Société Suisse de Médecine Légale, Sierre (Suisse), 13-14 juin 1997.
16. Tracqui A. La LC/MS en toxicologie analytique. Mémoire pour l'habilitation à diriger les recherches (HDR) en sciences, Strasbourg, 2000, 261 pages.