

DETERMINACIÓN DE LEVETIRACETAM EN SUERO MEDIANTE HPLC-UV

LUZ ADRIANA SARMIENTO¹

¹Bacterióloga PhD, Coordinadora Laboratorio de Cromatografía, Universidad Metropolitana de Barranquilla.
Correspondencia: lusarru@hotmail.com

Recibido: Septiembre 27 de 2013 Aceptado: Enero 8 de 2014

Resumen

El Levetiracetam es un medicamento antiepiléptico derivado de la pirrolidona con un mecanismo de acción diferente a otros antiepilépticos, al unirse de forma específica a la proteína SV2A de la vesícula sináptica modulando su actividad. Diversos métodos han sido reportados para el análisis de Levetiracetam en variados fluidos biológicos, siendo la cromatografía líquida de alta precisión HPLC (de la sigla en inglés High Performance Liquid Chromatography) uno de los más utilizados. En este estudio se describe un método rápido y sencillo para la determinación de Levetiracetam en muestras de suero con extracción líquido-líquido, detección ultravioleta a 205 nm, fase móvil isocrática y Captopril como estándar interno, el rango de detección es entre 1 y 100 µg/ml con precisión y exactitud del 95% y un tiempo total de elución de 18 minutos por muestra. El método es lo suficientemente sensible, exacto, y reproducible para ser usado en estudios farmacocinéticos.

Palabras clave. HPLC, Levetiracetam, antiepilépticos, farmacocinética

LEVETIRACETAM DETERMINATION IN SERUM BY HPLC-UV

Abstract

Levetiracetam is an antiepileptic medicament derived from the pirrolidona, Its mechanism of action is different from other antiepileptic drugs, by binding specifically in the synaptic vesicle protein SV2A. Diversified methods have been brought to Levetiracetam analysis in varied biological fluids, being the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) one of the most used. In this study a method is described for rapid and simple Levetiracetam determination in serum samples with liquid - liquid extraction, ultraviolet detection to 205 nm, isocratic mobile phase and Captopril as internal standard. The method is linear over the studied range of 1 and 100 µg/ml, with 95% of precision and accuracy and total elution time to 18 min for a sample. This method is highly sensitive, exact and reproducible for be used in pharmacokinetic studies.

Keywords. HPLC, Levetiracetam, antiepileptic, pharmacokinetic

DETERMINAÇÃO DE LEVETIRACETAM EM SORO MEDIANTE HPLC-UV

Resumo

A droga anti-epiléptica Levetiracetam é um derivado da pirrolidona com um mecanismo de ação diferente de outros fármacos antiepilépticos, específica ao juntar-se com a proteína SV2A da

vesícula sináptica modulando sua atividade. Vários métodos têm sido relatados para a análise de levetiracetam em vários fluidos biológicos, a cromatografia líquida de alta precisão HPLC é um dos mais utilizados. Neste estudo relata-se um método simples e rápido para a determinação de levetiracetam em amostras de soro com a extração líquido-líquido, detecção UV a 205 nm, fase móvel isocrática e Captopril como padrão interno, a gama de detecção situa-se entre 1 e 100 ug/ml, com precisão e acurácia de 95% e um tempo total de eluição de 18 minutos por amostra, o método é suficientemente sensível, preciso e reproduzível para uso em estudos farmacocinéticos.

Palavras-chave: HPLC, Levetiracetam, antiepilépticos, farmacocinética.

Introducción

La epilepsia es un trastorno cerebral crónico caracterizado por alteraciones en la actividad eléctrica del cerebro que aparece a cualquier edad generalmente como episodios convulsivos. Su etiología es variada y puede estar asociada a traumatismos craneoencefálicos, lesiones estructurales del cerebro o ser de carácter idiopático, se calcula que afecta aproximadamente al 2% de la población. La mayoría de los medicamentos antiepilépticos basan su actividad principalmente en dos mecanismos: el bloqueo de los canales dependientes de sodio y de calcio a nivel inter-neuronal y potenciando la acción de GABA (ácido gamma-amino butírico) al inhibir las enzimas relacionadas con su degradación o bloquear su recaptación en las neuronas pre sinápticas (1).

El Levetiracetam es un medicamento antiepiléptico derivado de la pirrolidona con un mecanismo de acción diferente a otros antiepilépticos. Análisis experimentales *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el Levetiracetam se une de forma muy específica a la proteína SV2A de la vesícula sináptica modulando su actividad, al parecer afectando la fusión de las vesículas y la exocitosis de neurotransmisores, lo que se refleja en su efecto anticonvulsivo (2,3). La dosis recomendada de Levetiracetam en adultos es de 500 mg dos veces al día y puede incrementarse hasta 1.500 mg dos veces al día; en niños la dosis recomendada es entre 10 y 50 mg/kg/día demostrándose en diversos estudios que es un anticonvulsivante seguro y eficaz en esta población (4). Después de su ingestión oral, cerca del 95% se absorbe rápidamente alcanzando la máxima concentración en sangre en aproximadamente 80 minutos, menos del 10% se une a proteínas plasmáticas y cerca del 24% es metabolizado por hidrólisis enzimática del grupo acetamida, generando metabolitos sin actividad biológica que son eliminados vía renal al igual que el 66% del Levetiracetam no metabolizado. Su vida media plasmática es de 6 a 8 horas (5). Las contraindicaciones y efectos secundarios del Levetiracetam son pocos considerándose un medicamento seguro y bien tolerado (6), se debe usar con precaución en

pacientes con insuficiencia renal grave debido a que esta es su vía de eliminación. En Colombia, el Levetiracetam se comercializa desde el año 2004 como molécula original con el nombre de *Keppra* y en presentación genérica desde el año 2010, aunque la aprobación del uso de medicamentos en Colombia está basada en estudios de bioequivalencia, es posible que no existan los suficientes estudios previos a la comercialización de algunas formas farmacéuticas de este medicamento, ya que diversos autores han reportado casos de falla terapéutica asociados a la utilización del Levetiracetam genérico (7). Es por esta razón que la creación de nuevos y sencillos métodos para estudios farmacocinéticos podrían permitir mejores análisis antes de la comercialización de algunos fármacos y el seguimiento de los mismos.

Diversos métodos han sido reportados para el análisis de Levetiracetam en variados fluidos biológicos, tales como espectrometría de masas (8,9), cromatografía de gases (10) y cromatografía líquida de alta precisión HPLC (11, 12, 13). En este estudio se ha realizado un método rápido y sencillo para la determinación de Levetiracetam en muestras de suero, basado en el método previamente reportado por Martens-Lobenhoffer con algunas modificaciones que lo hacen más sencillo, para ser empleado en estudios farmacocinéticos y se ha validado de acuerdo a los parámetros establecidos por la Oficina de las Naciones Unidas (14) y la FDA (15). El método propuesto se simplifica a una precipitación de las proteínas con ácido perclórico, seguida de la separación cromatográfica en fase reversa, utilizando fase móvil isocrática de ácido fosfórico al 5% y acetonitrilo (90:10 v/v) con detección ultravioleta a 205 nm y Captopril como estándar interno. El levetiracetam cuyo nombre químico y fórmula son (S)-etil-2-oxo-1-pirrolidona acetamida y $C_8H_{14}N_2O_2$ (figura 1), tiene un peso molecular de 170.21 gramos mol, es muy soluble en agua, parcialmente soluble en metanol y etanol e insoluble en solventes no polares como el hexano; por su parte el captopril, utilizado como estándar interno, es un anti-hipertensivo con fórmula química $C_9H_{15}NO_3S$ (figura 1), nombre 1-(2S)-3-Mercapto-2-metilpropionil-prolina, peso

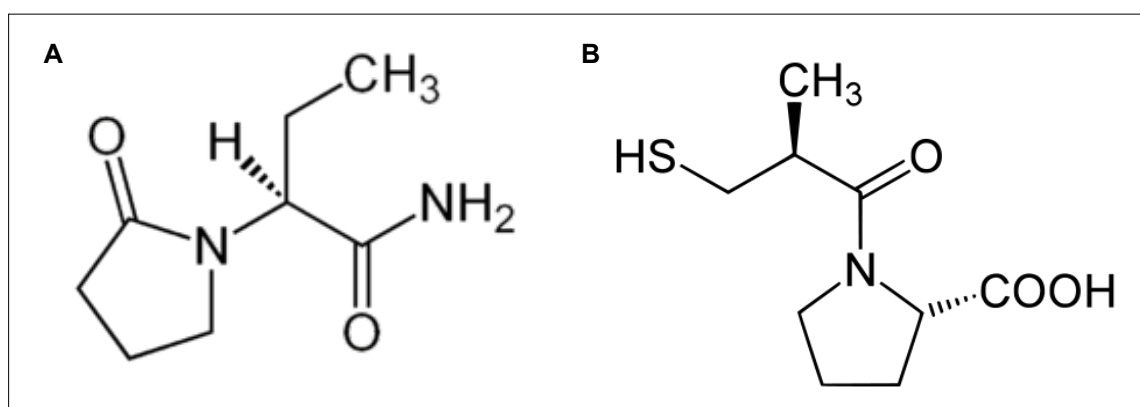


Figura 1. Estructura química de Levetiracetam (A) y Captopril (B).

molecular de 217.29 gramos mol, fácilmente soluble en agua, metanol y etanol, es estable en solución acuosa a pH bajo. En las condiciones cromatográficas analizadas se logra una adecuada separación de estas dos sustancias.

Materiales y métodos

Reactivos y equipos: Se utilizó estándar secundario de Levetiracetam pureza de 99,2%; Captopril presentación comercial de 25mg de laboratorios tecnoquímicas como estándar interno; acetonitrilo y metanol al 99,9% grado HPLC de J.T. Baker; ácido fosfórico H₃PO₄ al 85%, ciclohexano al 99,9% y ácido perclórico 70-72% fueron grado analítico de Merck. Los equipos utilizados fueron: centrífuga Mikro 200, agitador vórtex RELAX top de Heidolph, microbalanza analítica Sartorius, y congelador a -20 °C thermo scientific.

Sistema cromatográfico: El equipo de cromatografía utilizado fue HPLC LaChrom Elite dotado de: Bomba L2130, Inyector L2200, horno L2300 y Detector UV L2400, Columna Hypersil GOLD C8 250 x 4,6 y 5 μ Part No. 25205-254630. La separación cromatográfica se realizó a 40 °C de temperatura. La fase móvil fue isocrática con flujo constante de 1,2 ml por minuto y consistió en ácido fosfórico al 5% y acetonitrilo en una proporción 90:10 v/v. El tiempo de elución total fue de 18 minutos por muestra.

Soluciones de trabajo: La solución Stock de Levetiracetam de 1mg/ml fue preparada en metanol al 99,9% grado HPLC y colocada inmediatamente a -20 °C hasta su uso. La solución de trabajo del estándar interno Captopril a una concentración de 400 μg/ml fue preparada en ácido fosfórico al 5% y 50 μl de esta solución colocados a cada muestra como estándar interno

Sueros control: Con firma de consentimiento informado se tomó una muestra de sangre (dos tubos sin anticoagulante) a 10 voluntarios sanos quienes manifestaron no estar tomando ningún medicamento, las muestras fueron centrifugadas a 1500g durante 10 minutos, los sueros fueron extraídos y almacenados a -20 °C hasta su uso. Cada suero de forma individual fue analizado en el HPLC para verificar la ausencia de picos interferentes con los analitos de interés y finalmente se realizó un pool de sueros a partir del cual se prepararon sueros control con concentraciones de Levetiracetam de 1, 5, 10, 20, 40, 70 y 100 μg/ml a partir la solución de Levetiracetam de 1mg/ml.

Preparación de las muestras y curvas de calibración: 500 μl de suero control fueron colocados en un tubo Eppendorf de 1,5 ml junto con 50 μl de Captopril de 400 μg/ml como estándar interno, se agitó en vórtex 30 segundos y se adicionaron 200 μl de ácido perclórico 35% v/v en agua bidestilada, se agitó en vórtex por 10 minutos y se centrifugó a 9000 gravedades durante 10 minutos; 200 μl del sobrenadante fueron colocados en un vial para HPLC dotado con inserto para 200 μl y 30 μl de la muestra fueron inyectados en el HPLC. La curva de calibración se realizó procesando sueros control con concentraciones de Levetiracetam en un rango entre 1 a 100 μg/ml (1, 5, 10, 20, 40, 70 y 100 μg/ml) por triplicado. Para determinar la linealidad del sistema, se estableció el valor de R² en la curva de calibración y el coeficiente de variación entre las mediciones de una misma concentración.

Capacidad de recuperación: Soluciones de Levetiracetam de 5 y 70 μg/ml y sueros control con iguales concentraciones fueron analizados por triplicado para comparar los valores obtenidos en cada caso y se calculó el porcentaje de recuperación del analito.

Especificidad: La especificidad es la capacidad del método para diferenciar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. Diez muestras de suero provenientes de diferentes donantes fueron procesadas como muestras y analizadas para verificar la ausencia de picos en el cromatograma interferentes con el analito en cuestión. Posteriormente los cromatogramas fueron comparados con los de sueros control con concentraciones de Levetiracetam de 5 y 70 µg/ml adicionados de Captopril como estándar interno. En tres de las muestras de cada grupo con o sin Levetiracetam, se adicionaron 200 µl de ciclohexano al tiempo con los 200 µl del ácido perclórico para evaluar su efecto en la eliminación de impurezas no polares de la muestra.

Precisión y exactitud: Describe el grado de dispersión del valor obtenido respecto al valor real o conocido bajo las condiciones establecidas de análisis. Sueros control con concentraciones de Levetiracetam de 5, 20 y 70 µg/ml fueron analizados por triplicado y durante dos días diferentes para evaluar la repetitividad y reproducibilidad del sistema.

Estabilidad de los analitos: La estabilidad de los analitos se evaluó por triplicado en sueros control a concentraciones de Levetiracetam de 5, 20 y 70 µg/ml y adicionados de 50 µl de Captopril de 400 µg/ml bajo las siguientes condiciones: (i) estabilidad de congelamiento y descongelamiento: Los sueros descritos fueron sometidos

a periodos de congelación a -20 °C, descongelados a las 24 y 72 horas, procesados, evaluados y los resultados comparados con sueros sin congelar. (ii) estabilidad de los sueros control a temperatura ambiente: Los sueros control fueron analizados después de ser procesados y permanecer 24 y 72 horas a temperatura ambiente en el auto muestreador. Y (iii) estabilidad de las soluciones: Soluciones de Levetiracetam de 20 µg/ml y sueros control de igual concentración fueron adicionadas de estándar interno y procesadas como una muestra, posteriormente fueron analizadas después de permanecer 15 y 22 horas a temperatura ambiente en el auto muestreador

Resultados

Se adaptó, estandarizó y validó un método analítico mediante HPLC-UV para la determinación de Levetiracetam en suero humano con estándar interno Captopril, del cual se resumen las condiciones instrumentales en la tabla 1

Los análisis de especificidad demostraron que no existe ningún pico en el tiempo de retención de Levetiracetam ni de Captopril cuando se analizaron separadamente diez muestras de suero solo, en comparación a muestras que contenían los analitos (figura 2). No se observaron diferencias significativas respecto a la eliminación de impurezas en la muestra en los cromatogramas de las muestras adicionadas con ciclohexano frente a las tratadas solo con

Tabla 1. Condiciones instrumentales para la determinación de Levetiracetam en suero mediante HPLC-UV.

Parámetros instrumentales	Condiciones
Fase móvil	Acido fosfórico 0,5%: acetonitrilo (90:10)
Modo de elución	Isocrático
Longitud de onda	205 nm
Columna	Fase reversa C8 5 µm, 250 x 4,6 mm
Temperatura columna	40 °C
Temperatura del auto muestreador	Ambiente
Flujo de fase móvil	1,2 ml/min
Volumen de inyección	30 µL
Modo de cuantificación	Estándar interno y curva de calibración
Modo de cualificación	Tiempo de retención
Unidades de concentración	µg/mL
Tiempo de retención Levetiracetam	5,2 min
Tiempo de retención Captopril	14,25 min
Tiempo de corrida	18 min

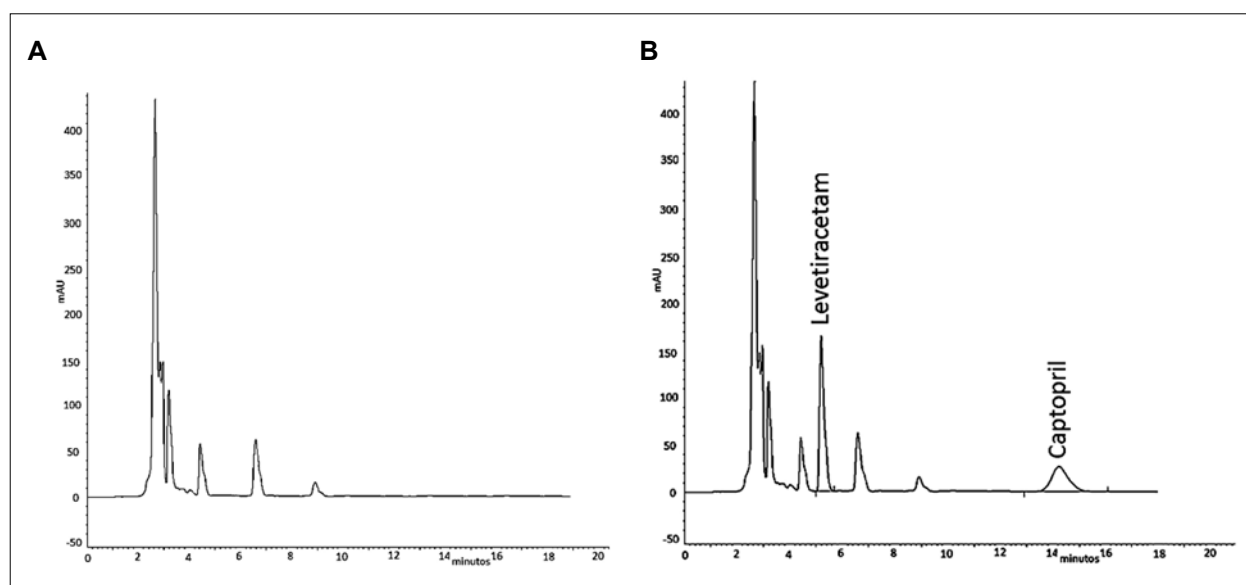


Figura 2. **A.** Cromatograma obtenido con un suero solo; **B.** Cromatograma de Levetiracetam 70 µg/ml (5,2 min) y Captopril estándar interno (14,25 min).

ácido perclórico, obteniéndose cromatogramas con un patrón de picos iguales a los observados en la figura 2 para ambos casos, cuando la muestra contenía o no el principio activo. Los tiempos de retención para estas moléculas fueron 5,2 minutos para Levetiracetam y 14,25 minutos para Captopril.

Los resultados del modelo lineal para la elaboración de la curva de calibración de Levetiracetam indican la correlación existente entre la concentración y la medida del área de los picos obtenidas en muestras de suero con el analito, se obtuvo un R^2 estadístico de 0,993 y en ningún caso el coeficiente de variación entre las áreas obtenidas en mediciones de sueros con la misma concentración fue superior a 1% lo cual indica que hay muy poca dispersión entre las mediciones de una misma concentración (tabla 2).

La eficiencia de la extracción se calculó mediante la comparación de las relaciones de área de las muestras extraídas y los estándares no extraídos observándose que a una concentración de Levetiracetam de 5 µg/ml la recuperación es de 99,11% y a concentración de 70 µg/ml es de 96,04%, el coeficiente de variación de las réplicas en cada caso es inferior a 1 % (tabla 3).

La precisión de las mediciones en las concentraciones de Levetiracetam 5, 20 y 70 siempre tuvo un coeficiente de variación inferior a 1%, respecto a la exactitud el porcentaje de error de las mediciones a las concentraciones analizadas nunca fue superior a 5% (tabla 4)

Los análisis de estabilidad muestran que Levetiracetam en una muestra de suero es estable a la congelación y descongelación en los periodos analizados, cuando soluciones de Levetiracetam fueron dejadas en el auto muestreador por más de 20 horas se observó que sufren una disminución en la concentración de la muestra inferior al 5% por esta razón las muestras nunca fueron dejadas por un tiempo superior a veinte horas en el auto muestreador después de su preparación.

Discusión

En el mundo hay aproximadamente 50 millones de personas con epilepsia y cerca del 80% son de regiones en desarrollo de acuerdo a las cifras de la Organización Mundial de la Salud. En Colombia la epilepsia tiene una prevalencia de 11,3 por cada 1000 habitantes (16) y aunque existen diversos medicamentos para su tratamiento aproximadamente en el 30 % de los casos estos no logran la efectividad necesaria persistiendo las crisis epilépticas y presentándose la denominada epilepsia refractaria, que es debida, entre otros a factores farmacocinéticos, farmacodinámicos o de resistencia farmacológica en dichos pacientes (17). Resulta entonces de gran importancia el desarrollo e implementación de métodos analíticos que permitan el monitoreo constante de los medicamentos antiepilépticos en muestras biológicas así como su implementación en el estudio para el desarrollo de nuevos me-

Tabla 2. Resultados del estudio de linealidad.

Concentración Levetiracetam $\mu\text{g/ml}$	Área del pico	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
100	11407929	11355714	46485,72	0,41
	11340384			
	11318830			
70	8132319	8101394	31904,42	0,39
	8103271			
	8068593			
40	4962199	4909443	46198,04	0,94
	4889913			
	4876218			
20	2733558	2740095	8013,59	0,29
	2749035			
	2737691			
10	1546665	1537169	9477,06	0,62
	1537130			
	1527711			
5	965812	967239	2366,49	0,24
	969971			
	965935			
1	403991	403260	2305,69	0,57
	400677			
	405111			

Tabla 3. Capacidad de recuperación de Levetiracetam en el proceso de extracción del suero.

Concentración	Levetiracetam en solución	Suero con Levetiracetam	% recuperación	Promedio	Coefficiente de variación %
70	8404034	8132319	96,77	96,04	0,77
	8435048	8103271	96,07		
	8468250	8068593	95,28		
5	979726	965812	98,58	99,11	0,77
	970179	969971	99,98		
	978003	965935	98,77		

dicamentos y el mayor conocimiento de los ya existentes. El Levetiracetam es un fármaco antiepiléptico considerado de nueva generación ya que su mecanismo de acción difiere de los demás antiepilépticos de uso común. Algunos autores consideran que el Levetiracetam puede ser el medicamento de elección en pacientes con epilepsia refractaria y diferentes estudios así lo demuestran (18,19).

En este trabajo se validó un método sencillo y rápido para la determinación de Levetiracetam en muestras de suero mediante HPLC con detección ultravioleta a 205 nm. Otros autores han reportado previamente métodos para la determinación de Levetiracetam en suero utilizando

HPLC- UV, Zufia y colaboradores en el 2010 describen un método con extracción en fase sólida utilizando las columnas OASIS HLB (20); Contin y colaboradores en 2008 (12) hacen una precipitación de las proteínas séricas con metanol y eliminan parte de los lípidos interferentes por centrifugación de la muestra a 4 C; Martens-Lobenhoffer en el 2004 (11) realiza una precipitación proteica con ácido perclórico adicionando ciclohexano para eliminar las interferencias no polares en la muestra y hace la separación cromatográfica con un gradiente de acetonitrilo y ácido fosfórico, siendo este último método en el que se basa el aquí reportado con las modificaciones que se describen a continuación y que lo hacen más sencillo: Se suprimió

Tabla 4. Resultados de la determinación de Levetiracetam en diferentes días.

$\mu\text{g/ml}$	Suero con Levetiracetam	Área del pico	Levetiracetam $\mu\text{g/ml}$	Coefficiente de variación %	Error relativo %
70	Día 1	8132319	70,16	0,56	0,35
		8103271	69,90		
		8068593	69,58		
	Día 5	8198758	70,77		
		8117023	70,02		
		8113462	69,99		
20	Día 1	2733558	20,89	0,70	4,19
		2749035	21,03		
		2737691	20,93		
	Día 5	2705705	20,63		
		2726859	20,83		
		2713191	20,70		
5,0	Día 1	965812	4,75	0,43	4,39
		969971	4,79		
		965935	4,75		
	Día 5	969890	4,79		
		971015	4,80		
		969677	4,79		

el uso de ciclohexano al evidenciarse en las pruebas realizadas que no implicaba reducciones significativas de las impurezas polares de la muestra y que las presentes no interferían con la especificidad de método para el analito de interés, se utilizó fase móvil isocrática de ácido fosfórico al 5% y acetonitrilo 90:10 v/v obteniéndose un tiempo de retención para el Levetiracetam de 5,2 minutos, similar al obtenido por Martens-Lobenhoffer que fue de 6,8 minutos utilizando un gradiente de los mismos solventes y se implementó el uso de Captopril como estándar interno al considerarlo un parámetro importante para garantizar el control de posibles errores en la manipulación de la muestra y de los volúmenes de inyección en el equipo. Se evidencio además que la separación cromatográfica de Levetiracetam y Captopril en las condiciones descritas, se realiza eficientemente en una columna de fase reversa convencional como la C8 utilizada en este estudio y que la retención del Levetiracetam es similar a la lograda en una columna de Carbón Poroso Grafitzado (PGC) como la HyperCarb utilizada en el método de referencia. Aunque el Levetiracetam no se metaboliza de forma importante en humanos, el 24% del medicamento adsorbido sufre una hidrólisis enzimática del grupo acetamida dando origen al principal metabolito ucb L057 sin actividad biológica, el cual es difícilmente separado por métodos cromato-

gráficos de fase reversa, interferencia que se presenta en muchos de los métodos analíticos reportados incluido el de este trabajo, este inconveniente puede ser superado combinando a la técnica HPLC otra tecnología como la espectrometría de masas que permitiría una clara diferenciación de estas dos moléculas (21).

Conclusiones

El método analítico descrito y validado para la determinación de Levetiracetam en sangre utilizando como estándar interno Captopril mediante la técnica HPLC-UV es específico para el principio activo de interés, tiene la exactitud, precisión, linealidad y reproductividad adecuadas para dicho análisis, por lo tanto se puede utilizar en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia para productos que contengan Levetiracetam como principio activo.

Agradecimientos

Al laboratorio de Toxicología Vargas-Melo de la Ciudad de Bogotá, por el aporte de algunos de los materiales y reactivos necesarios para la elaboración de este trabajo.

Bibliografía

1. Czapinski P, Blaszczyk B, Stanislaw J. Czuczwar. Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2005; 5: 3-14.
2. Lynch B, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh S, Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *PNAS*. 2004; 101 (26): 9861-9866.
3. Meehan A, Yang X, McAdams B, Yuan L, Rothman S. A new mechanism for antiepileptic drug action: vesicular entry may mediate the effects of levetiracetam. *AJP - JN Physiol* . 2011; 106 (3): 1227-1239.
4. Giroux PC, Salas-Prato M, Théorêt Y, Carmant L. Levetiracetam in children with refractory epilepsy: lack of correlation between plasma concentration and efficacy. *Seizure*. 2009; 18(8):559-63.
5. Patsalos PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clin Pharmacokinet*. 2004; 43(11):707-724.
6. Rupperecht S, Franke K, Fitzek S, Witte O W, Hagemann G. Levetiracetam as a treatment option in non-convulsive status epilepticus. *Epilepsy Research*. 2007; 73(3): 238-244.
7. Granados A. Fallo terapéutico y eventos adversos asociados al uso de Levetiracetam genérico: un reporte de 4 casos. *Acta Neurol Colomb*. 2011; .27 (2):129-133.
8. Austgulen Westin A, Reimers A, Helde G, Nakken K. O, Brodtkorb E. Serum concentration/dose ratio of levetiracetam before, during and after pregnancy. *Seizure*. 2008;17: 192-198.
9. Guo T, Oswald L. M, Rao Mendu D, Soldin S. J. Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 375 (1-2): 115-118.
10. 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. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1994; 662. (1): 134-139.
11. Martens-Lobenhoffer, Bode-Boger M. S. Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment . *Journal of Chromatography B*. 2005; 819:197-200
12. Contin M, Mohamed S, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simple and validated HPLC-UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *Journal of Chromatography B*. 2008; 873 (1- 15): 129-132
13. Mohammadi B, Majnooni M, Afnanzade N, Jalili R, Bahrami G. Simple and rapid ultra-high performance liquid chromatographic (UHPLC) method for the determination of levetiracetam in human serum: Application to a bioequivalence study. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012; 6(27): 2017-2022.
14. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. 2010. Disponible en: http://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
15. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
16. Vélez A, Eslava-Cobos J. Epilepsy in Colombia: epidemiologic profile and classification of epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*. 2006; 47(1):193-201.
17. Torres Zambrano M, Castillo Támara E, Camargo Ballestas J. M. Resistencia farmacológica en epilepsia. *Acta Neurológica Colombiana*. 2007;23 (4): 279-285.
18. Grant R., Shorvon SD. Efficacy and tolerability of 1000-4000 mg per day of levetiracetam as add-on therapy in patients with refractory epilepsy. *Epilepsy research*. 2000; 42(2-3):89-95.
19. Grosso S, Franzoni E, Coppola G, Iannetti P, Verrotti A, Cordelli D.M, *et al*. Efficacy and safety of levetiracetam: An add-on trial in children with refractory epilepsy. *Seizure*. 2005; 14 (4): 248-253.
20. Zufia L, Aldaz A, Ibáñez N, Giráldez J, Viteri C. LC method for therapeutic drug monitoring of levetiracetam: Evaluation of the assay performance and validation of its application in the routine area. *Clinical Biochemistry*. 2010; 43: 473-482.
21. Rao Mendu D, Soldin S. Simultaneous determination of Levetiracetam and its acid metabolite (ucb L057) in serum/plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. 2010; 43 (4-5): 485-489