

Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 septembre 2023

Par

Pauline GRIFFEUILLE

Source de type Probe ElectroSpray Ionization couplée à la spectrométrie de masse : application au dosage de la metformine

Thèse dirigée par le Pr. Franck SAINT-MARCOUX

Examineurs :

Pr. Serge BATTU, Chimie analytique et bromatologie, Université de Limoges

Dr. David LEGER, Biochimie et biologie moléculaire, Université de Limoges

Pr. Franck SAINT-MARCOUX, Toxicologie, Université de Limoges

Dr. Souleiman EL BALKHI, Toxicologie, CHU de Limoges



Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 septembre 2023

Par Pauline GRIFFEUILLE

Source de type Probe ElectroSpray Ionization couplée à la spectrométrie de masse : application au dosage de la metformine

Thèse dirigée par le Pr. Franck SAINT-MARCOUX

Examineurs :

Pr. Serge BATTU, Chimie analytique et bromatologie, Université de Limoges

Dr. David LEGER, Biochimie et biologie moléculaire, Université de Limoges

Pr. Franck SAINT-MARCOUX, Toxicologie, Université de Limoges

Dr. Souleiman EL BALKHI, Toxicologie, CHU de Limoges



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} janvier 2023

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie

M. TROUILLAS Patrick Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*) Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. JOST Jérémy Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*) Chimie analytique et bromatologie

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme DELEBASSÉE Sylvie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Elise (*) Pharmacologie

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland	Pharmacologie
M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Assistant Hospitalo-Universitaire

Mme MARCELLAUD Elodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

Mme KENE MALAHA Angéladine	Épidémiologie, statistique, santé publique
M. NASSER Mohamad	Pharmacognosie, botanique et mycologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Au Professeur Serge BATTU, j'adresse mes sincèrement remerciements pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour l'intérêt porté à ce travail.

Au Docteur David LEGER, j'adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de siéger dans ce jury.

Au Docteur Souleiman EL BALKHI, j'adresse mes remerciements pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour tout ce que tu m'as appris, ta patience et le temps que tu m'as consacré.

Au Professeur Franck SAINT-MARCOUX, pour m'avoir proposé ce sujet passionnant qui m'a appris énormément et m'a ouvert de belles perspectives. Merci sincèrement pour votre patience, votre bienveillance et votre gentillesse à mon égard. Vous m'avez donné la chance de faire ce que j'aime et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Au Professeur Pierre MARQUET, je tiens à vous adresser mes sincères remerciement pour m'avoir accueillie dans votre service. Merci pour la justesse dont vous avez fait preuve envers moi.

Au Docteur Sylvain DULAURENT, merci pour ta disponibilité et tout le savoir analytique que tu m'as transmis. Merci pour ta patience et ta diplomatie.

A tous les biologistes, ingénieurs, techniciens et cadres du laboratoire, merci pour votre patience, votre disponibilité et pour toutes les connaissances que j'ai pu acquérir grâce à vous.

A ces collègues qui sont devenus des amis,

Alexandre et Adrien, merci pour votre soutien indéfectible, pour vos conseils avisés, et pour toutes les choses pas sérieuses que l'on s'envoie. Vous êtes des rayons de soleil.

Arnaud, merci pour ta subtilité, tes blagues de très bon goût et toutes ces discussions plus ou moins profondes que nous avons eu.

Valentin, Ludivine et tous les autres que je n'ai pas cité, merci pour votre gentillesse et tous les moments passés ensemble.

A **Stéphanie**, merci de me supporter depuis 10 ans. Des amis comme toi, on les compte sur les doigts d'une main. Merci pour tous ces repas qu'on a passé à discuter, pour nos licornes magnifiques et cette chute que je n'oublierai jamais !

A **Linh et Yann**, merci pour votre gentillesse et ce grain de folie que vous avez. Vous retrouver est toujours un plaisir.

A mes parents, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour l'amour inconditionnel que vous m'avez porté. Je n'en serais pas là sans vous. **Maman**, tu n'es plus là pour me voir aujourd'hui, la vie est ainsi. J'espère que tu aurais été fière de moi.

Papa, merci pour ton soutien, et la force que tu déploie. Merci de m'avoir transmis l'amour de la musique du jardinage et tant d'autres choses. Je te souhaite le meilleur.

Milou, même si on se voit moins, te retrouver est toujours un grand bonheur. Merci pour cette enfance fabuleuse que nous avons passée, pour les soirées à l'école véto et tous les rires que nous avons partagés. Je vous souhaite tout le bonheur possible à toi et Charline.

Mamie, merci pour tous les moments passés ensemble, pour m'avoir mis des aiguilles à tricoter dans les mains et transmis ce savoir. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

Patou, le plus grand mélomane que je connaisse, la seule personne capable de reconnaître une chanson dès la première note. Merci pour ce que tu m'as appris et m'apprend encore. Je ne serais pas moi si tu n'étais pas toi.

William, merci pour ton soutien et pour toutes les idées farfelues que tu as acceptées.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

EER : épuration extra-rénale

ESI : Electrospray ionization

FDA : Food and Drug Administration

LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

MALA : acidose lactique associée à la metformine

MILA : acidose lactique induite par la metformine

PESI-MS/MS : probe electrospray ionization couplée à la spectrométrie de masse en tandem

XIC : extracted ion count

Table des matières

Introduction	14
I. Toxicité de la metformine	16
I.1. Metformine et acidose lactique.....	16
I.1.1. L'acidose lactique	16
I.1.2. Mécanisme toxique.....	17
I.1.3. Prise en charge	18
I.2. Dosage de la metformine	19
II. La source PESI	20
III. Travaux personnels : dosage de la metformine par PESI-MS/MS	23
III.1. Stratégie	23
III.2. Méthode développée.....	23
III.2.1. Préparation d'échantillon	23
III.2.2. Conditions analytiques	23
III.2.3. Validation de méthode.....	24
III.2.4. Application à des échantillons hospitaliers.....	26
III.3. Résultats.....	26
Discussion – Conclusion	31
Références bibliographiques	34
Annexe	37
Serment De Galien.....	44

Table des illustrations

Figure 1 : Résultats des dosages de metformine réalisés au CHU de Limoges entre 2018 et 2022	19
Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement de la PESI	20
Figure 3 : Extracted ion count (XIC) obtenu pour la metformine à 0,5 mg/L.....	21
Figure 4 : Droites de régression obtenues pour les concentrations de metformine mesurées par PESI-MS/MS et LC-DAD (A) ou LC-MS/MS (B)	29
Figure 5 : Représentation de Bland-Altman des concentrations obtenues en PESI-MS/MS et LC-DAD (A) ou LC-MS/MS (B)	30

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des molécules utilisées pour l'étude de la spécificité	25
Tableau 2 : Paramètres de validation de la méthode	26
Tableau 3 : Concentrations obtenues avec les différentes méthodes de dosage.....	28

Introduction

La toxicologie est définie comme étant la « Science traitant des substances toxiques, de leurs effets sur l'organisme et de leur identification »(1).

La mise au point et l'amélioration de méthodes d'analyse toxicologique qui permettent de rechercher et/ou doser des xénobiotiques ou des substances endogènes dans des matrices biologiques ou non, font ainsi partie intégrante de la discipline. On parle de toxicologie analytique. Permettant le plus souvent de détecter et/ou de quantifier une molécule toxique *a priori* suspectée, les outils de toxicologie analytique permettent une meilleure orientation diagnostique, et participent donc à une meilleure prise en charge du patient.

A l'heure actuelle, on peut considérer, de façon schématique, que les laboratoires de toxicologie s'appuient sur deux types d'outils : l'immunochimie et les méthodes séparatives.

Les méthodes immunochimiques présentent les avantages d'être simple d'utilisation et de fournir un résultat rapide. Elles fonctionnent à l'aide de coffrets prêts à l'emploi et reposent sur le principe des réactions antigène-anticorps. Ce sont ces méthodes qui permettent le plus souvent d'offrir un panel d'analyses réalisables 24/24h dans les laboratoires hospitaliers, car elles ne réclament ni technicité particulière, ni retraitement ou interprétations particulières des données produites. En revanche, elles ne permettent parfois qu'une recherche par famille de molécules sans quantification possible (recherche d'une présence d'opiacés ou de benzodiazépines, par exemple). Dans des contextes d'urgence, une telle réponse qualitative peut être suffisante pour la prise en charge immédiate du patient, mais nécessite tout de même, le plus souvent, une information plus complète *a posteriori* par une méthode quantitative, plus spécifique.

Les méthodes séparatives sont toutes les approches faisant appel à une étape de séparation chromatographique en phase liquide ou en phase gazeuse. Elles peuvent être associées à divers types de détecteurs, les plus courant étant certainement la spectrométrie de masse ou la détection UV. La première identifie les molécules en fonction de leur rapport masse sur charge là où les seconds caractérisent les molécules selon leur absorbance. En utilisant le détecteur approprié, les méthodes séparatives permettent une identification et/ou une quantification des composés. Si elles sont plus spécifiques et si elles d'accéder à un dosage des molécules recherchées et identifiées, ces méthodes requièrent de grandes compétences techniques et analytiques de la part de l'opérateur. Là où le délai de rendu d'un résultat par une méthode immunochimique est usuellement de 15 à 20 min, ces méthodes qui nécessitent

une préparation de l'échantillon, puis une séparation chromatographique avec détection, puis un retraitement des données, ne sont généralement pas capables de fournir un résultat en moins 90 minutes (dans le meilleur des cas).

Les médicaments, les drogues, les toxiques à rechercher et/ou doser sont de plus en plus nombreux et de plus en plus variées. Mais on attend pour autant d'un Laboratoire qu'il travaille de plus en plus vite avec des méthodes de plus en plus sensibles et spécifiques. En particulier, les laboratoires de toxicologie clinique sont donc en permanence à la recherche de nouvelles méthodes, à la fois plus rapides, plus simples de mise en œuvre, mais performantes. Bien qu'encore peu connue, la source de type Probe ElectroSpray Ionization couplée à la spectrométrie de masse en tandem (PESI-MS/MS) semble pouvoir répondre à ces problématiques.

Ce manuscrit présente une méthode développée à l'aide d'un couplage innovant entre une source PESI et un spectromètre de masse de type triple quadrupole (MS/MS). Pour illustrer le potentiel de cette approche, nous avons ciblé le cas d'une situation réclamant à la fois une réponse rapide du laboratoire, et la mise en œuvre d'une méthode séparative : le dosage plasmatique de la metformine.

I. Toxicité de la metformine

La metformine est un antidiabétique oral de la famille des biguanides indiqué dans le traitement du diabète de type 2 lorsque les règles hygiéno-diététiques ne suffisent plus (2,3). La metformine a plusieurs mécanismes d'action permettant de réduire la glycémie. Elle réduit l'absorption intestinale du glucose, augmente l'absorption et l'utilisation du glucose par les muscles et diminue la néoglucogénèse hépatique (4).

En raison de ces mécanismes d'action, l'hypoglycémie n'est pas un effet indésirable attendu lors de la prise de metformine à la différence des sulfamides, autres antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète de type 2. Par contre, l'acidose lactique est une complication attendue et redoutée chez les patients surdosés (5). C'est ainsi qu'une mesure de la concentration plasmatique de la metformine est devenue légitime chez tout patient traité, pris en charge en urgence en milieu hospitalier. Depuis quelques années, ce dosage est devenu extrêmement fréquent. Au CHU de Limoges, l'activité de dosage pour l'année 2022 a représenté 520 dossiers.

A l'heure actuelle, aucun consensus n'a été établi concernant les concentrations souhaitables à la suite de prises de doses thérapeutiques. Dans une revue de la littérature, Kajbaf *et al.*(6) ont répertorié 65 intervalles de concentrations cibles différents. Cependant, la FDA a rapporté qu'une concentration maximale < 5 mg/L était retrouvée lors des essais cliniques même aux doses maximales (7).

I.1. Metformine et acidose lactique

I.1.1. L'acidose lactique

L'acidose lactique est une acidose métabolique causée par une accumulation de lactates dans l'organisme. Elle est causée par une augmentation de la production des lactates pouvant être associée à une diminution de leur élimination. Le diagnostic biologique repose sur l'analyse des gaz du sang artériel et de l'ionogramme sanguin. Il est alors attendu, une diminution du pH sanguin en deçà de 7,35 et une concentration en lactates supérieure à 45-54 mg/dL (5-6 mmol/L).

Deux types d'acidoses lactiques peuvent être différenciées d'après la classification de Cohen-Woods :

- L'acidose lactique de type A : elle survient lors d'états ischémiques. On la retrouve dans le cas d'hypoperfusions globales comme lors de choc septiques ou hypovolémiques. L'hypoperfusion hépatique induite empêche également le métabolisme des lactates, aggravant l'acidose. Les lactates sont produits à la suite de la mise en place du métabolisme anaérobie producteur d'ATP. C'est la forme la plus sévère d'acidose lactique.
- L'acidose lactique de type B : elle survient lors d'une hypoxie tissulaire locale avec une perfusion tissulaire normale. Elle est retrouvée dans les efforts physiques, l'hypothermie, ou peut être d'origine toxique ou médicamenteuse. Elle est généralement de meilleur pronostic.

I.1.2. Mécanisme toxique

Le mécanisme responsable de l'accumulation de lactates induite par la metformine n'est pas complètement élucidé. L'augmentation de la lactatémie serait la conséquence d'une diminution de la consommation des lactates et/ou d'une augmentation de leur production. Plusieurs hypothèses ont donc été émises (8).

Une hypothèse propose une production splanchnique des lactates (9). Dans une étude menée sur des rats, Bailey et al. ont mis en évidence une augmentation des lactates intestinaux lorsque du glucose était administré en association à de la metformine. En temps normal ces lactates sont éliminés par le foie, mais lorsque ses capacités sont dépassées, les lactates s'accumulent.

Cependant, l'hypothèse retenue à l'heure actuelle est que l'excès de lactates serait causé par une inhibition de la respiration mitochondriale (10,11).

La metformine pénètre dans les cellules *via* le transporteur OCT-1 (Organic Cations Transporter 1) largement retrouvés dans le foie, le rein et l'intestin. Elle favorise le transport intracellulaire du glucose en potentialisant l'activité insulino-dépendante de ses transporteurs membranaires GLUT 1 et GLUT 4.

La metformine entraînerait une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les conséquences seraient une diminution de la production d'ATP entraînant une augmentation du rapport AMP/ATP conduisant à une activation des AMP kinases. Cette activation amène à une inhibition de la néoglucogénèse, utilisant notamment les lactates pour produire du glucose.

Également, l'inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire entraînerait le métabolisme du glucose vers la voie anaérobie productrice de lactates. Il y aurait donc une diminution de la dégradation des lactates couplée à une augmentation de leur production, responsables de l'acidose lactique.

Dans la plupart des cas, l'accumulation de metformine et de lactates survient lorsque les conditions de prescriptions ne sont pas respectées, en particulier toutes les situations favorisant une insuffisance rénale aiguë, avec en particulier toutes celles créant une déshydratation (diarrhées, vomissements...). La metformine qui est excrétée inchangée par voie rénale, pourrait ainsi s'accumuler en cas de lésions rénales aiguës.

Au total, comme l'expliquent *Corchia et al.* (12), deux situations doivent être envisagées. La première est celle d'une acidose lactique imputable à la metformine. Dans ces situations où il est considéré que la metformine est un facteur prépondérant dans la survenue de l'acidose, on parle d'acidose lactique induite par la metformine ou MILA (metformin induced lactic acidosis). La seconde est celle où la cause de l'acidose est autre, mais où la metformine est l'un des facteurs aggravant l'acidose lactique. On parle alors d'une acidose lactique associée à la metformine ou MALA (metformin associated lactic acidosis).

Quel que soit le type d'acidose lactique une prise en charge rapide des patients est bien entendu nécessaire.

I.1.3. Prise en charge

La découverte d'une acidose lactique implique, dans un premier temps, en une prise en charge symptomatique visant à traiter le facteur déclenchant de l'acidose (hypovolémie, choc septique, etc.).

Aucun antidote n'existant pour la metformine, le traitement d'une acidose lactique associée à la metformine repose sur un traitement visant à corriger l'acidose et éliminer la metformine.

L'épuration extra-rénale (EER) est la méthode privilégiée pour éliminer la metformine de l'organisme (8,13). Le groupe de travail EXTRIP (Extracorporeal Treatments in Poisoning Workgroup) a recommandé la mise en place d'une EER pour un pH < 7,0 et une lactatémie > 20 mmol/L (14). Le poids moléculaire et la faible liaison aux protéines plasmatiques de la metformine en font un candidat idéal à ce type de traitement. Si les protocoles mis en place diffèrent selon les pays et les hôpitaux, il semblerait qu'une EER continue ou discontinue

répétée et prolongée, soit nécessaire. Cela s'explique par la distribution bi-compartimentale de la metformine, pouvant entraîner un effet rebond des concentrations(8,15).

De nombreux rapports de cas ou séries de cas de MALA et/ou MILA ont été publiés (16). Outre les concentrations de lactates sanguins, les valeurs de pH et l'évaluation de lésions rénales aiguës, toutes ces publications soulignent le fait qu'une mesure rapide de la concentration plasmatique de metformine est essentielle pour confirmer ou infirmer une MALA ou une MILA et mettre en place le traitement le plus approprié.

I.2. Dosage de la metformine

Bien que le dosage de metformine requière théoriquement d'être réalisé 24/24, il n'existe aucune méthode immunochimique permettant le dosage de la metformine.

De nombreuses méthodes de dosage par chromatographie ont été proposées (17,18). La majorité d'entre elles utilisent la chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diode (LC-DAD) ou à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Comme rapporté par Patel et al. les limites de détection obtenues avec la LC-DAD sont le plus souvent de l'ordre de quelques mg/L (11 µg/L à 5.9 mg/L) là où la LC-MS/MS permet d'obtenir des résultats 4 à 100 fois plus faibles (de 0,25 µg/L à 50 µg/L)(17). Ce point n'est toutefois pas le plus important dans la mesure où le dosage consiste à mettre en évidence un surdosage.

La figure 1 présente les résultats de dosages de metformine réalisés au CHU de Limoges entre 2018 et 2022.

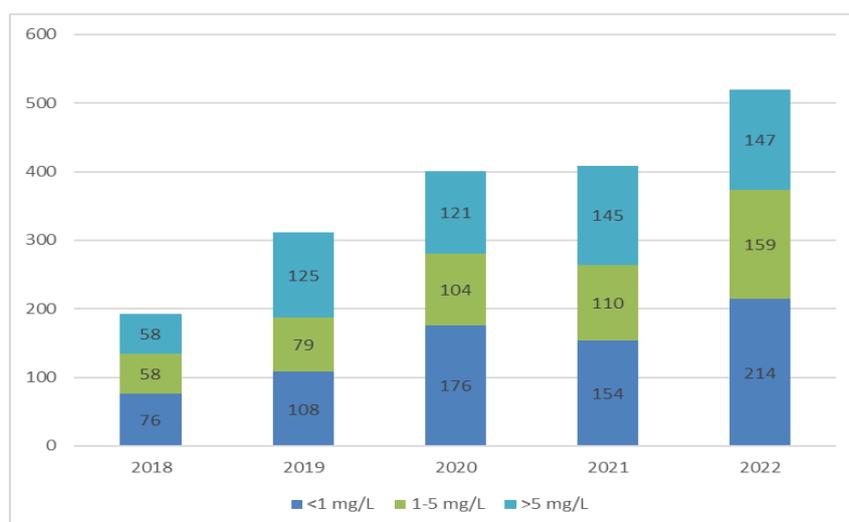


Figure 1 : Résultats des dosages de metformine réalisés au CHU de Limoges entre 2018 et 2022

II. La source PESI

La source Probe ElectroSpray Ionization (PESI) est une source d'ionisation à pression atmosphérique. Décrite pour la première fois en 2007 par Hiraoka (19), ce système peut être assimilé à une miniaturisation d'une source ElectroSpray classique. Cette méthode cumule les avantages et la qualité d'ionisation d'une source de type ElectroSpray et la simplicité d'utilisation d'une source à pression atmosphérique. Pour cela, la source PESI est placée en amont du spectromètre de masse et permet de s'affranchir de l'étape de séparation chromatographique.

Une aiguille en acier de quelques centaines de nanomètres est placée perpendiculairement à l'orifice d'entrée du spectromètre de masse. Des mouvements de va-et-vient vont permettre, consécutivement le prélèvement de l'échantillon et l'ionisation des molécules.

Lorsque l'aiguille est en position basse, l'échantillon se dépose en fine couche à sa surface. Lorsque qu'elle est en position haute, l'application d'un voltage d'environ 2 à 3 kV permet l'ionisation des molécules (figure 1).

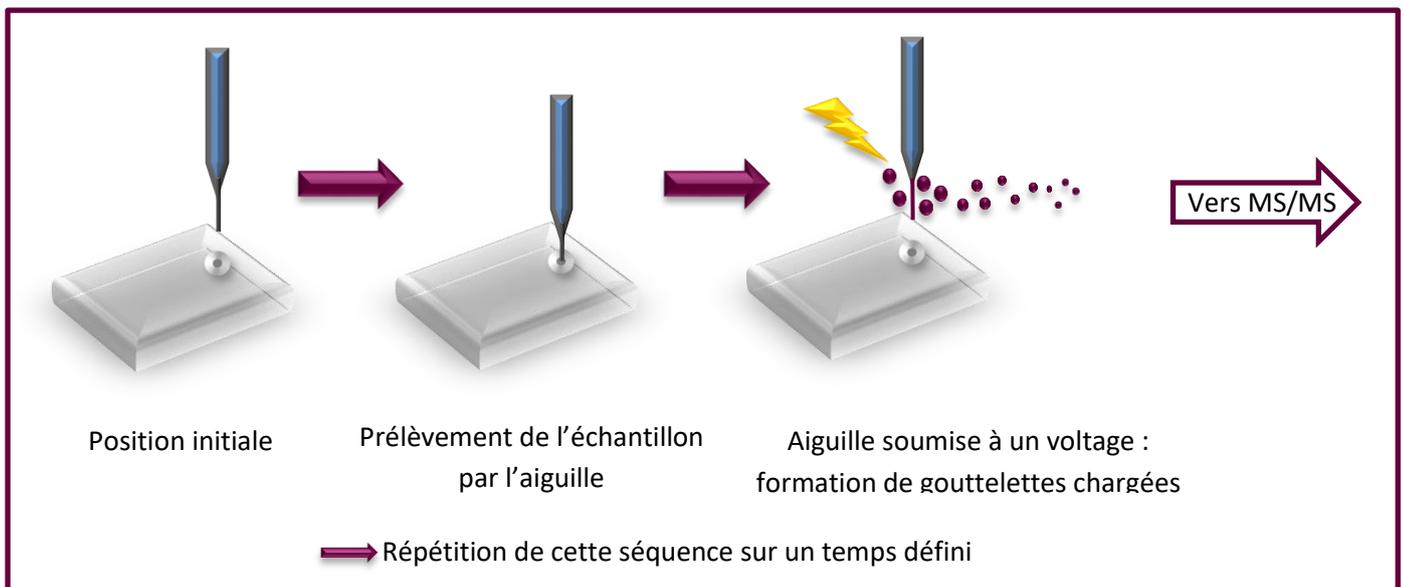


Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement de la PESI

Le signal résultant est alors une succession de « pics » reflétant le mouvement de l'aiguille dans la source. Lorsque l'aiguille est en position basse, dans l'échantillon, il n'y a pas d'ionisation, le signal est au niveau de la ligne de base. Lorsque l'aiguille est en position haute, l'ionisation a lieu et les ions sont détectés par le spectromètre de masse. Cette séquence étant répétée durant un temps défini, le signal obtenu prend la forme d'un « peigne » (figure 2). Le signal utilisé pour la quantification est l'aire totale des pics acquis durant le temps d'analyses, 0,06 à 0,31 min dans le cas présent.

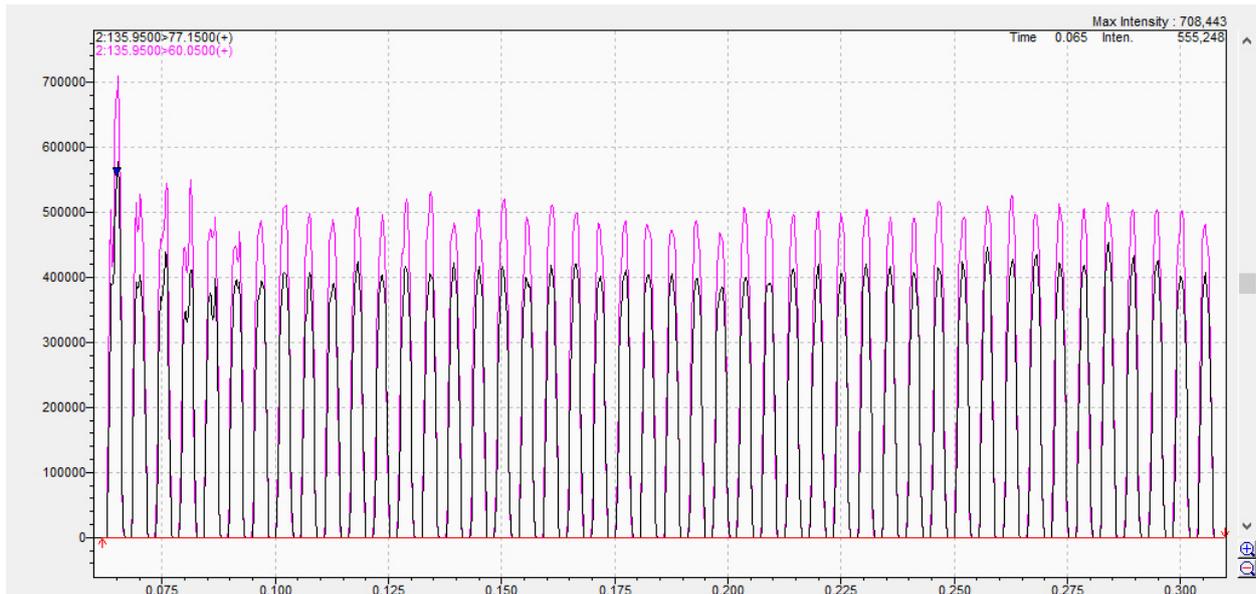


Figure 3 : Extracted ion count (XIC) obtenu pour la metformine à 0,5 mg/L

Les premiers travaux utilisant la source PESI, réalisés par Zaitso et al. (20) ont permis son application en recherche fondamentale et notamment à la métabolomique. Ainsi, cette équipe a été en mesure de suivre en temps réel la formation de métabolites cérébraux chez une souris anesthésiée à l'isoflurane. La même équipe a utilisé la PESI pour mesurer 26 métabolites endogènes du foie de souris, dont des acides aminés, des acides organiques et des saccharides (21).

Outre ces travaux, la PESI-MS/MS a été appliquée au diagnostic clinique. Johno et al. (22) ont proposé un système de diagnostic automatique des troubles athéroscléreux en mesurant plusieurs composés dont le sulfate de cholestérol et un phospholipide, qui sont des biomarqueurs de l'athérosclérose.

Usui et al. ont développé des applications de toxicologie clinique en utilisant la PESI-MS/MS comme une méthode de quantification du paracétamol (23) ou lors d'intoxication aiguës par des pesticides (6).

III. Travaux personnels : dosage de la metformine par PESI-MS/MS

III.1. Stratégie

L'objectif des travaux était de développer une méthode ultra-rapide de dosage de la metformine en minimisant le volume d'échantillon nécessaire et en obtenant un délai de rendu de résultat extrêmement court.

Pour cela, la metformine et son étalon interne deutéré (metformine-D6) ont d'abord été infusés afin d'obtenir leur spectre de masse respectifs et les paramètres optimaux d'ionisation.

Ensuite la préparation d'échantillon a été optimisée afin d'être la plus simple possible.

Une étape de « désoptimisation » des paramètres du spectromètre de masse a ensuite été nécessaire. Cette étape est indispensable pour l'application d'une quantification par dilution isotopique. Elle a pour but de trouver des paramètres permettant un équilibre entre :

- Une intensité des signaux suffisantes
- Des ionisation et fragmentation répétables
- Des aires moyennes similaires entre la metformine et son étalon interne.

III.2. Méthode développée

III.2.1. Préparation d'échantillon

Dix microlitres de plasma sont dilués dans 1 mL d'un mélange éthanol/ formiate d'ammonium 10 mM (1 :1, v/v). Dix microlitres d'une solution méthanolique de metformine-D6 à 5 mg/L sont ensuite ajoutés. Enfin, 10 µL de ce mélange sont déposés sur les plaques de PESI.

III.2.2. Conditions analytiques

Source PESI

La metformine et la metformine-D6 ont été analysées en mode d'ionisation positif. Les mouvements verticaux de l'aiguille étaient répétés selon une fréquence de 3,1 Hz (184 mouvements/min) durant 0,31 min. Les paramètres étaient les suivants : temps de cycle de l'aiguille = 150 ms ; tension appliquée à l'aiguille = 2,3 kV ; température de la « *desolvation line* » = 250 °C ; température du « *heat block* » = 30 °C.

Spectromètre de masse

La méthode de dosage a été développée sur un spectromètre de masse triple quadripôle 8060 (Shimadzu, Marne-la-Valée, France).

La metformine et la metformine-D6 ont été analysées selon un mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)

Les transitions de quantification utilisées étaient 130,15 > 71,10 pour la metformine et 135,95 > 77,15 pour la metformine-D6. Et les transitions de confirmation étaient 130,15 > 60,05 pour la metformine et 135,95 > 60,05 pour la metformine-D6.

Afin de permettre une quantification par dilution isotopique, les paramètres du spectromètre ont été optimisés afin d'obtenir une intensité similaire pour les 2 transitions de quantification. Pour la metformine et la metformine-D6, Pour ces deux transitions, CE, Q1 et Q3 étaient respectivement de -23eV, -17V et -15V, et de -23eV, -20V et -22V.

III.2.3. Validation de méthode

Selon le principe de la dilution isotopique, toutes les concentrations ont été calculées en utilisant le rapport entre l'aire du signal de la metformine et la metformine-D6 multipliée par sa concentration (5 mg/L dans le cas présent).

$$[\text{Analyte}] = \frac{\text{Aire de l'analyte} \times [\text{Etalon interne}]}{\text{Aire de l'étalon interne}}$$

Cinq niveaux de concentrations ont été utilisés pour la validation de méthode : 0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; et 50 mg/L. Les étapes suivies respectent une procédure interne du laboratoire approuvée par le comité français d'accréditation.

Cette procédure comprend une étude de :

- La répétabilité : analyses le même jour de 6 plasmas dopés, pour toutes les concentrations
- La reproductibilité : analyse tous les jours pendant 6 jours de chaque concentration
- La spécificité : 6 plasmas vierges ont été dopés avec un mélange de contraceptifs hormonaux, co-traitements potentiels, molécules de masse proche de la metformine

(tableau 1). L'absence de composant interférent est validée si le rapport moyen entre les aires des blancs et celles à la limite de quantification est inférieur à 5%.

- L'effet matrice : évalué à 10 mg/L, consiste à analyser 6 plasmas différents et 6 échantillons d'eau purifiée le même jour. La comparaison des aires obtenues permet la mise en évidence d'une suppression ou d'une augmentation du signal due à la matrice biologique.

Tableau 1 : Liste des molécules utilisées pour l'étude de la spécificité

Co-traitements potentiels (1 mg/L)		
Acide acétylsalicylique	Enalapril	Phényléphrine
Acide mycophénolique	Flucytosine	Phloroglucinol
Acide salicylique	Ganciclovir	Pralidoxime
Allopurinol	Ibuprofène	Prednisone
Amphétamine	Ketoprofène	Prednisolone
Bromphéniramine	Lansoprazole	Pseudoéphédrine
Caféine	Loratadine	Ramipril
Candesartan	Losartan	Ranitidine
Captopril	Méthylprednisone	Taurine
Cétirizine	Naproxène	Triméthoprim et sulfaméthoxazole
Cotinine	Nicotine	Uracile
Dextrométhorphan	Oméprazole	Valsartan
Diméthylhydrate	Paracétamol	Vigabatrin
Diphéhydramine	Périndopril	
Contraceptifs hormonaux (1 µg/L)		
Drospirénone	Norethindrone	Etonorgestrel
Ethinyl Estradiol	Cyproterone Acetate	Estradiol
Levonorgestrel	Desogestrel	Norgestimate
Medroxyprogestérone Acetate		

III.2.4. Application à des échantillons hospitaliers

La méthode développée a été comparée à deux méthodes de référence. Pour cela, des échantillons provenant de l'activité de routine de deux hôpitaux extérieurs ont été transmis anonymement à notre laboratoire. Ainsi, 11 échantillons, ont été analysés par le laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU d'Amiens Picardie utilisant une méthode de LC-DAD (19) et 18 échantillons ont été analysés par le laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacogénétique du CHU de Rouen, utilisant une méthode de LC-MS/MS. Cette méthode LC-MS/MS consiste en une précipitation des protéines avec de l'acétonitrile et est basée sur un système UFLC Prominence Shimadzu (LC-20, Shimadzu®, Prominence, Japon) en combinaison avec un 4000QTRAP équipé d'une source ESI fonctionnant en mode d'ionisation positif (Sciex®, Canada). Elle a été entièrement validée pour la pratique clinique conformément aux directives de l'Agence européenne des médicaments (EMA), de l'US Food and Drug Administration (FDA) et de la norme ISO15189, pour une gamme d'étalonnage allant de 0,1 à 10 mg/L.

III.3. Résultats

Les résultats obtenus pour la répétabilité et la reproductibilité sont présentés dans le tableau 2. Les coefficients de variation étaient compris entre 14,01 % et 17,24 % pour la reproductibilité et compris entre 1,01 % et 1,60 % pour la répétabilité. Les biais mesurés allaient de -12,13 % à 13,86 % pour la reproductibilité et de -16,42 % à 15,88 % pour la répétabilité.

Tableau 2 : Paramètres de validation de la méthode

Concentrations (mg/L)	Reproductibilité		Répétabilité	
	CV (%)	Biais (%)	CV (%)	Biais (%)
0,5	14,01	-1,94	1,60	-0,98
2,5	14,56	-0,42	1,11	-8,93
5	17,12	-12,13	1,11	15,88
10	17,24	13,86	1,01	6,06
50	15,42	4,53	1,35	-16,42

Concernant l'effet matrice, le signal obtenu pour la metformine dans les plasmas était en moyenne augmenté de 57 % par rapport au signal obtenu dans l'eau purifiée. Cependant, cet effet matrice est complètement compensé par l'utilisation d'un étalon interne deutéré et de la dilution isotopique. Le biais moyen obtenu sur les concentrations n'est alors plus que de 1 %.

L'étude de la spécificité a également donné de bons résultats. Aucune interférence n'a été détectée pour les 52 molécules testées. Les rapports d'aires calculés entre le blanc et la limite de quantification basse étaient systématiquement inférieurs à 5% pour la metformine (entre 2,52 % et 4,79 %), et la metformine-D6 (entre 0,13 % et 1,67 %).

Les résultats obtenus lors de la comparaison aux méthodes de référence sont présentés dans le tableau 3. Les figures 3 et 4 rapportent les droites de régression obtenues entre la PESI-MS/MS et les deux méthodes de référence, ainsi que les représentations de Bland-Altman. Dans cette population représentative, 55% des patients présentaient une concentration inférieure à 5 mg/L, 38% avaient une concentration supérieure à 5 mg/L et 7% étaient non détectés. Une bonne corrélation a été observée avec la LC-DAD ($r^2=0,99$, $n = 11$) ainsi qu'avec la LC-MS/MS ($r^2=0,99$; $n=18$)

Tableau 3 : Concentrations obtenues avec les différentes méthodes de dosage

LC-DAD (mg/L)	PESI-MS/MS (mg/L)	LC-MS/MS (mg/L)	PESI-MS/MS (mg/L)
0,61	0,60	ND	ND
1,40	1,40	ND	ND
1,67	1,70	0,55	0,66
2,79	2,40	0,62	0,73
3,38	3,30	0,74	0,73
5,75	6,25	0,82	1,03
8,10	10,00	0,88	0,95
8,86	9,35	1,00	1,12
15,81	19,90	1,27	1,16
16,23	18,10	1,82	2,26
55,30	53,60	3,50	3,59
		3,90	4,86
		4,27	4,55
		7,01	8,04
		18,17	17,70
		27,97	27,68
		30,93	33,01
		44,72	39,10

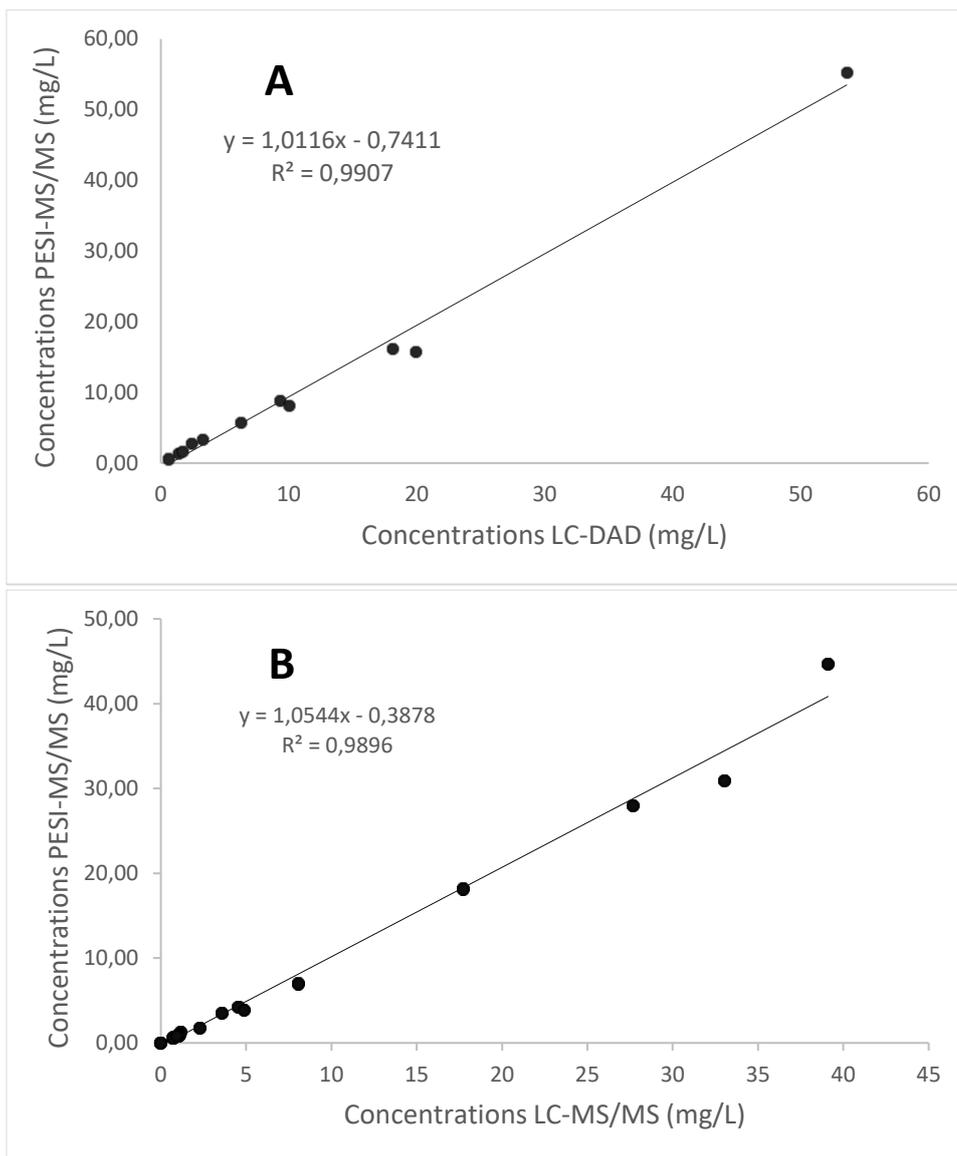


Figure 4 : Droites de régression obtenues pour les concentrations de metformine mesurées par PESI-MS/MS et LC-DAD (A) ou LC-MS/MS (B)

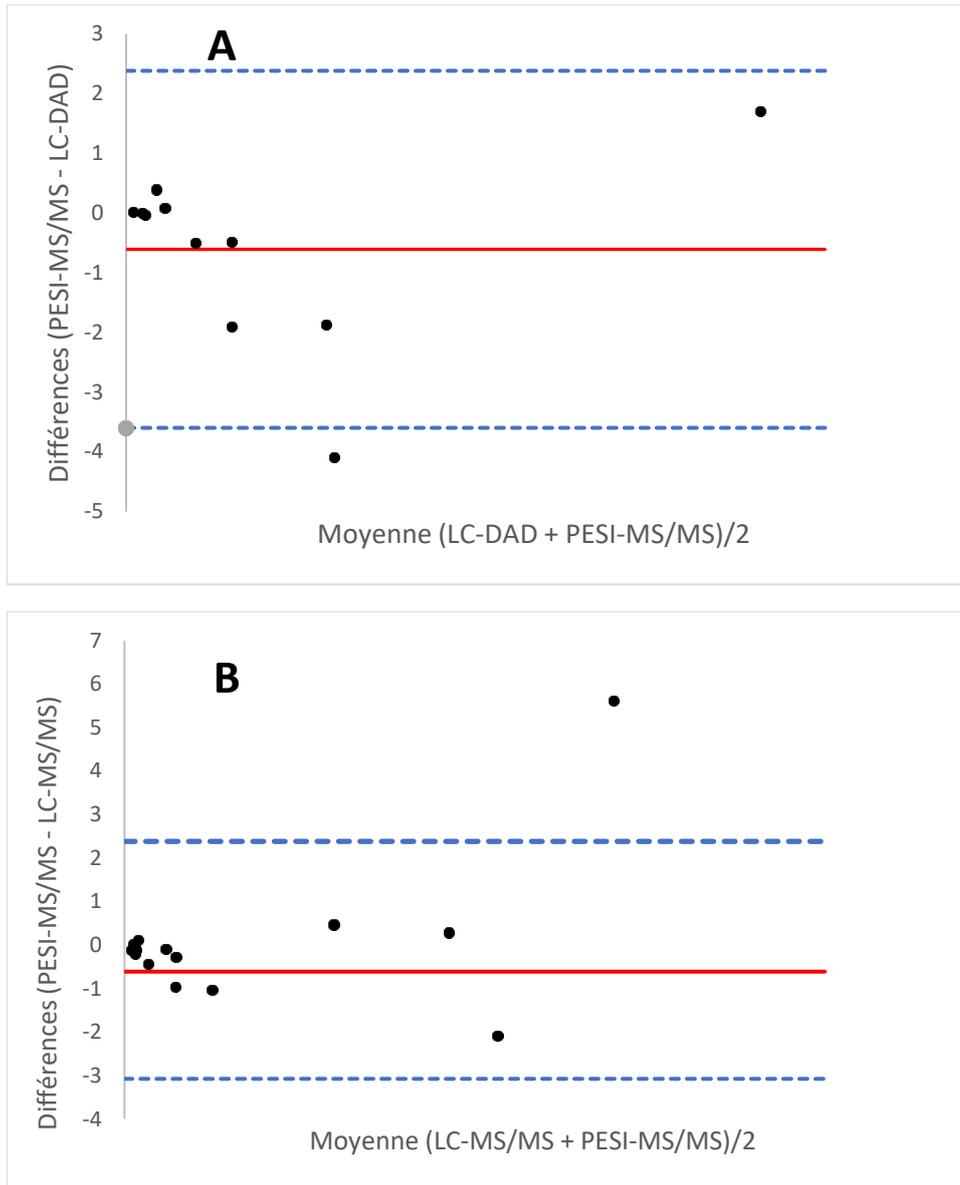


Figure 5 : Représentation de Bland-Altman des concentrations obtenues en PESI-MS/MS et LC-DAD (A) ou LC-MS/MS (B)

Discussion – Conclusion

Ces travaux ont permis le développement d'une méthode de dosage de la metformine, extrêmement rapide et fiable. La source PESI couplée à un protocole de dilution isotopique permet, à partir de 10 µL de matrice, de quantifier, dans un échantillon plasmatique, la metformine en 30 secondes environ.

Le dosage de la metformine dans le plasma dans des contextes d'urgence est nécessaire pour les patients suivant ce traitement. De multiples études ont exploré les relations possibles entre la concentration en metformine, l'acidose lactique et/ou la mortalité. Si leurs conclusions diffèrent légèrement, il est admis qu'une élévation de la concentration plasmatique de metformine peut induire ou être associée à une acidose lactique(12,16). Dans le premier cas, aucun facteur ne permet d'expliquer l'acidose lactique, si ce n'est la présence de metformine. En revanche, dans le second cas de figure, l'acidose lactique peut être expliquée par des causes autres (sepsis, hémorragie, convulsions...) (24).

Dans une étude multicentrique regroupant 173 patients présentant une acidose lactique dans un contexte d'insuffisance rénale, Corchia et al. (12) ont observé qu'une mortalité due à une acidose réfractaire pouvait être imputée à une accumulation de metformine (n=109). Chez les 64 autres patients, la mortalité pouvait être attribuée à des troubles sous-jacents, la metformine étant alors un facteur aggravant de l'acidose lactique.

Dans une population de 194 patients traités par metformine admis aux urgences ou en soins intensifs, Bennis et al. ont rapporté qu'une concentration en metformine >9,9 mg/L était fortement associée à la présence d'une acidose lactique (25). Plus précisément, dans cette population, cette valeur seuil présentait une spécificité de 92,6 %.

D'autres études cliniques ont rapporté une association entre l'élévation des concentrations plasmatiques en metformine et l'acidose lactique (15,26) ou avec la sévérité des atteintes rénales aiguës (27,28).

Tous ces éléments justifient l'identification rapide d'une accumulation de metformine chez les patients admis en service d'urgence ou de soins intensifs. La confirmation d'une augmentation significative de la concentration plasmatique en metformine est donc essentielle afin d'aider les cliniciens à poser un diagnostic de MILA ou de MALA et ainsi adapter leur prise en charge. Cela est d'autant plus important que l'évolution de l'acidose lactique dépend de la mise en place précoce d'une épuration extra-rénale et ce, même si les concentrations toxiques ne sont pas clairement établies.

Plusieurs méthodes de dosage de la metformine dans les matrices biologiques ont été décrites. Les revues de la littérature proposées par Patel et al.(17) et Fachi et al.(18) ont montré que la majorité des méthodes de dosage reposaient sur la chromatographie liquide couplée à des détecteurs à barrette de diodes ou de la spectrométrie de masse, avec une tendance allant vers une démocratisation de la seconde (29–31). Quelle que soit la méthode, une préparation d'échantillon et une droite de calibration sont nécessaires, ce qui implique un délai dans le rendu de résultat.

Dans des travaux précédents utilisant la PESI-MS/MS, Usui et al. ont montré la possibilité de doser le paracétamol en moins de 2 min (23). Cependant, leur méthode nécessite 7 points de calibration ainsi que 3 contrôles qualité. Un résultat de patient peut donc théoriquement être rendu dans un délai de 15 min. Ce temps est donc, finalement, de l'ordre de celui des analyses immunochimiques. C'est pourquoi nous avons souhaitons introduire une approche par dilution isotopique. Dans nos travaux, nous avons montré qu'une détermination précise de la concentration en metformine était possible par simple calcul prenant en compte le rapport entre la surface du signal de metformine et metformine-D6. Le paramétrage des conditions d'acquisition spectrale a été fait de sorte que, pour une même concentration, les aires de la metformine et de son étalon interne soient similaires. Ce paramètre est la clef de voute de la dilution isotopique. Dans des études préliminaires, de nombreux tests ont été réalisés afin de s'assurer de la stabilité de ces paramètres.

Dans un groupe représentatif de patients, nous avons observé une très bonne corrélation entre la PESI-MS/MS et deux méthodes chromatographiques. Ces données confirment le fait que la PESI-MS/MS peut réduire considérablement le temps d'analyse nécessaire tout en conservant la qualité de résultat. D'un point de vue pratique, dans un contexte d'urgence, nous proposons d'analyser un blanc, un contrôle de qualité interne à 5 mg/L et l'échantillon patient. En tenant compte de toutes les étapes de préparation d'échantillon (dilution, dopage de l'échantillon et dépôt sur la plaque), moins de 5 minutes sont nécessaires pour doser la metformine chez un patient.

Cette approche permet de s'affranchir des étapes d'extraction et de séparation chromatographique. Aucune compétence technique n'est nécessaire car l'opérateur doit simplement diluer l'échantillon dans un tampon éthanol/formiate, ajouter l'étalon interne et déposer la plaque dans la source PESI. De plus, il n'est pas nécessaire de posséder un système dédié à la source PESI. Cette dernière peut être facilement interchangeée avec une source ESI classique sans éteindre le système.

Malgré tout, la PESI présente quelques inconvénients. En raison de l'absence de chromatographie, les composés ayant les mêmes masses et même fragments (isobares/isomères) peuvent interférer.

Également, à l'heure actuelle, les aiguilles et les plaques sont à usage unique. Cela implique la présence en permanence d'un opérateur pour déposer les échantillons les uns après les autres.

Cependant la rapidité d'analyse, couplée à la sensibilité et la spécificité de la spectrométrie de masse, place l'approche PESI-MS/MS comme un outil analytique prometteur dans toutes les situations où un dosage rapide est nécessaire pour aider au diagnostic et aiguiller la prise en charge. D'autres travaux que nous avons menés ont confirmé cette faisabilité pour la recherche et le dosage de drogues (opiacés, amphétamines et dérivés de la cocaïne) et le dosage de benzodiazépines.

Références bibliographiques

1. Définitions : toxicologie - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 24 août 2023]. Disponible sur : <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/toxicologie/78799>
2. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011;18.
3. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. *Diabetes Care*. 1 juin 2012;35(6):1364-79.
4. LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr Rev*. 8 sept 2020;42(1):77-96.
5. Orban JC, Ghaddab A, Chatti O, Ichai C. Acidose lactique et metformine. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. oct 2006;25(10):1046-52.
6. Kajbaf F, De Broe ME, Lalau JD. Therapeutic Concentrations of Metformin: A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet*. avr 2016;55(4):439-59.
7. 020357s037s039,021202s021s023lbl.pdf [Internet]. [cité 19 juill 2023]. Disponible sur: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020357s037s039,021202s021s023lbl.pdf
8. Fourrier F, Seidowsky A. Intoxication par la metformine : mécanismes de toxicité et prise en charge. *Réanimation*. 1 oct 2010;19(6):539-44.
9. Bailey CJ, Wilcock C, Day C. Effect of metformin on glucose metabolism in the splanchnic bed. *British Journal of Pharmacology*. avr 1992;105(4):1009-13.
10. Foretz M, Viollet B. Mécanisme d'inhibition de la production hépatique de glucose par la metformine: Un nouveau concept pour un ancien remède. *Med Sci (Paris)*. juin 2010;26(6-7):663-6.
11. Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y. Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 déc 2008;233(2):203-10.

12. Corchia A, Wynckel A, Journet J, Moussi Frances J, Skandrani N, Lautrette A, et al. Metformin-related lactic acidosis with acute kidney injury: results of a French observational multicenter study. *Clinical Toxicology*. 3 mai 2020;58(5):375-82.
13. Simon M, Baudry T, Hernu R, Cour M, Argaud L. Intoxication à la metformine. *Médecine Intensive Réanimation*. 1 sept 2019;28(5):380-8.
14. Calello DP, Liu KD, Wiegand TJ, Roberts DM, Lavergne V, Gosselin S, et al. Extracorporeal Treatment for Metformin Poisoning: Systematic Review and Recommendations From the Extracorporeal Treatments in Poisoning Workgroup. *Crit Care Med*. août 2015;43(8):1716-30.
15. Seidowsky A, Nseir S, Houdret N, Fourrier F. Metformin-associated lactic acidosis: A prognostic and therapeutic study*: *Critical Care Medicine*. juill 2009;37(7):2191-6.
16. Kajbaf F, Lalau JD. Mortality rate in so-called "metformin-associated lactic acidosis": a review of the data since the 1960s: Mortality in Metformin-Associated Lactic Acidosis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. nov 2014;23(11):1123-7.
17. Patel D, Kumar P, Sharma S, Dwivedi J. Analytical Methods for Metformin Estimation. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 3 sept 2017;47(5):405-17.
18. Fachi MM, Leonart LP, Degaut Pontes FL, Oliveira Vilhena R de, Cerqueira LB, Pontarolo R. Bioanalytical methods for the detection of antidiabetic drugs: a review. *Bioanalysis*. déc 2017;9(24):2015-25.
19. Hiraoka K, Nishidate K, Mori K, Asakawa D, Suzuki S. Development of probe electrospray using a solid needle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007;21(18):3139-44.
20. Zaitso K, Hayashi Y, Murata T, Yokota K, Ohara T, Kusano M, et al. In Vivo Real-Time Monitoring System Using Probe Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry for Metabolites in Mouse Brain. *Anal Chem*. 3 avr 2018;90(7):4695-701.
21. Zaitso K, Hayashi Y, Murata T, Ohara T, Nakagiri K, Kusano M, et al. Intact Endogenous Metabolite Analysis of Mice Liver by Probe Electrospray Ionization/Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry and Its Preliminary Application to in Vivo Real-Time Analysis. *Anal Chem*. 5 avr 2016;88(7):3556-61.
22. Johno H, Yoshimura K, Mori Y, Kimura T, Niimi M, Yamada M, et al. Detection of potential new biomarkers of atherosclerosis by probe electrospray ionization mass spectrometry. *Metabolomics*. 27 févr 2018;14(4):38.

23. Usui K, Kobayashi H, Fujita Y, Kubota E, Hanazawa T, Yoshizawa T, et al. An ultra-rapid drug screening method for acetaminophen in blood serum based on probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Food Drug Anal.* juill 2019;27(3):786-92.
24. Aharaz A, Pottegård A, Henriksen DP, Hallas J, Beck-Nielsen H, Lassen AT. Risk of lactic acidosis in type 2 diabetes patients using metformin: A case control study. Shimosawa T, éditeur. *PLoS ONE.* 8 mai 2018;13(5):e0196122.
25. Bennis Y, Bodeau S, Batteux B, Gras-Champel V, Masmoudi K, Maizel J, et al. A Study of Associations Between Plasma Metformin Concentration, Lactic Acidosis, and Mortality in an Emergency Hospitalization Context. *Critical Care Medicine.* déc 2020;48(12):e1194-202.
26. Vecchio S, Giampreti A, Petrolini VM, Lonati D, Protti A, Papa P, et al. Metformin accumulation: Lactic acidosis and high plasmatic metformin levels in a retrospective case series of 66 patients on chronic therapy. *Clinical Toxicology.* févr 2014;52(2):129-35.
27. Connelly PJ, Lonergan M, Soto-Pedre E, Donnelly L, Zhou K, Pearson ER. Acute kidney injury, plasma lactate concentrations and lactic acidosis in metformin users: A GoDarts study: CONNELLY et al. *Diabetes Obes Metab.* nov 2017;19(11):1579-86.
28. Lepelley M, Gai J, Yahiaoui N, Chanoine S, Villier C. Lactic Acidosis in Diabetic Population: Is Metformin Implicated? Results of a Matched Case-Control Study Performed on the Type 2 Diabetes Population of Grenoble Hospital University. *Journal of Diabetes Research.* 2016;2016:1-8.
29. Wattamwar T, Mungantiwar A, Halde S, Pandita N. Development of simultaneous determination of empagliflozin and metformin in human plasma using liquid chromatography–mass spectrometry and application to pharmacokinetics. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* avr 2020;26(2):117-30.
30. Wattamwar T, Mungantiwar A, Gujar S, Pandita N. Development of LC-MS/MS method for simultaneous determination of Canagliflozin and Metformin in human plasma and its pharmacokinetic application in Indian population under fast and fed conditions. *Journal of Chromatography B.* oct 2020;1154:122281.
31. Shah PA, Shrivastav PS, Shah JV, George A. Simultaneous quantitation of metformin and dapagliflozin in human plasma by LC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography.* avr 2019;33(4):e4453.

Ultrafast Measurement of Metformin in the Clinical Setting Using Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Pauline Griffeuille¹, Souleiman El Balkhi¹, Sandra Bodeau², Fabien Lamoureux³, Pierre Marquet^{1,4}, Sylvain Dulaurent¹ and Franck Saint-Marcoux^{1,5,*}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Limoges University Hospital, France

²Department of Pharmacology and Toxicology, Amiens University Hospital, France

³Department of Pharmacology and Toxicology, Rouen University Hospital, France

⁴Pharmacology & Transplantation, UMR1248, INSERM, University of Limoges, Limoges, France

⁵Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Limoges, France

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: Franck.saint-marcoux@unilim.fr

Abstract

Metformin (MtF) is a treatment used for type 2 diabetes. Lactic acidosis (LA) is a frequent complication that can be either induced by or associated with elevated MtF plasma concentrations. When coupled with a mass spectrometry (MS) system, the probe electrospray ionization (PESI) method allows direct and rapid analysis of different types of matrices without pretreatment. In this study, we developed a PESI–MS method for the determination of MtF in plasma. We used a tandem mass spectrometer equipped with a PESI source in the reaction monitoring mode for the quantitation of MtF. MtF-D6 was chosen as the internal standard, following an isotope dilution (ID) approach. The method was fully validated with six concentration levels (0.5–50 mg/L). The matrix effect was evaluated for each level, and the specificity was tested with a mix of potential co-medications. Using patient samples, the performance was compared with two classical LC–MS–MS and LC–diode array detector (DAD) methods used in external labs. Sample preparation consisted in mixing 10 µL plasma in 1,000 µL ethanol/ammonium formate buffer including MtF-D6 at a fixed concentration of 5 mg/L. The total run time was 0.31 min. ID gave satisfactory results of accuracy and precision (min–max: –12.1 to 15.8% and 1.0–17.1%, respectively). The matrix effect was fully corrected by the internal standard (bias < 1%). The specificity study also reported satisfactory results. Finally, in a representative group of 29 patients (55% with a concentration < 5 mg/L, 38% with a concentration > 5 mg/L and 7% not detected), we observed almost identical results when comparing LC–DAD and LC–MS–MS to PESI–MS ($r^2 > 0.99$). We propose a specific, sensitive, accurate and ultrafast solution for the measurement of MtF in patient plasma, with no sample preparation or calibration curve building. This could be helpful in a core lab when rapid diagnosis of LA is needed.

Introduction

Metformin (MtF) is an oral antihyperglycemic agent widely used for type 2 diabetes when lifestyle modifications are insufficient (1, 2). It reduces the absorption of glucose by the intestine, increases the uptake and use of glucose by the muscle and decreases the hepatic production of glucose. Although hypoglycemia is not an expected toxic effect of MtF, lactic acidosis (LA) is of great concern in overdosed patients. The mechanism responsible for this lactate accumulation is not fully understood. It could be caused by an inhibition of mitochondrial respiration (3), but the relationships between MtF and LA remain unclear. MtF is excreted unchanged in the urine and could accumulate in case of acute kidney injury. As explained by Corchia et al. (4), two situations must be considered. The first one is when LA is induced by MtF or when MtF is essential to lead to LA, namely, MtF-induced LA (MILA). The second one is when MtF is one of several factors that may favor LA, namely, MtF-associated LA (MALA). Both have a different prognosis and treatment.

Numerous case reports or case series of MALA and/or MILA have been published (5). Along with blood lactate levels, pH values, and KDIGO criteria (evaluation of acute

kidney injury), all of these publications highlight the fact that a rapid measurement of plasma MtF concentration is essential for clinicians to diagnose MALA or MILA and initiate the most appropriate treatment. Consequently, multiple analytical methods have been proposed so far. These have been recently reviewed by Patel et al. (6) and Fachi et al. (7). Methods using high-performance liquid chromatography (HPLC) are mainly used. HPLC can be coupled with a diode array detector (DAD) that gives accurate results at a low cost or with a mass spectrometer (HPLC–mass spectrometry (MS)–MS), which is more sensitive and more selective.

Recently, Usui et al. applied a probe electrospray ionization (PESI)–tandem MS (PESI–MS) for the detection of acetaminophen in < 2 min (8). The same team also proposed a similar approach for the diagnosis of acute intoxications by glyphosate (9). The principles of PESI have been extensively detailed by Hiraoka et al. (10). Briefly, PESI can be seen as a miniaturization of electrospray ionization (ESI) where the capillary of the nanoelectrospray converges on a solid needle with a tip of several hundred nanometers. This probe was developed to be coupled directly to a mass spectrometer without the need for chromatographic separation,

allowing ultrafast analysis with minimal sample preparation. In addition to the works of Usui et al. (8, 9), PESI-MS has been applied to the analysis of biological samples, from basic research to clinical settings such as clinical toxicology, forensic science, food science, or metabolic profiling. Zaitso et al. applied PESI to measure 26 endogenous metabolites of mice liver, including amino acids, organic acids, and saccharides (11). The same team was also able to monitor eight cere-brum metabolites related to central energy metabolism in an isoflurane-anesthetized mouse (12). Johno et al. proposed an automatic diagnosis system of atherosclerotic disorders by measuring metabolites including cholesterol sulfate and a phospholipid, which are biomarkers of atherosclerosis (13).

In the present study, our objective was to develop a PESI-MS method for an ultrarapid determination of MtF in plasma by using an isotope dilution (ID) approach.

Material and Methods

Chemicals and reagents

MtF and MtF-D6 were supplied by Alsachim. Ammonium formate was purchased from Carlo Erba and methanol from Fisher Chemical. Pure water was obtained using a Millipore Integral purification system. Drug-free plasma was obtained from *Etablissement français du sang*.

Sample preparation

Ten microliters of plasma was mixed with 1,000 µL of an ethanol/ammonium formate 10 mM (1:1 v/v) buffer. Then, 10 µL of a solution of MtF-D6 at 5 mg/L was added. Finally, 10 µL of this mixture was spiked on the dedicated plastic sample plate and placed into the PESI ion source.

Five MtF working solutions (0.5, 2.5, 5, 10, and 50 mg/L) were prepared in methanol and stored at -20°C to perform the method validation tests. Internal control solutions were prepared daily at concentrations of 0.5, 2.5, 5, 10, and 50 mg/L by spiking plasma with working solutions.

PESI-MS/MS conditions

A Shimadzu 8060 triple quadrupole mass spectrometer (Marne-la-Vallée, France) was used in positive ionization mode for MtF and MtF-D6 detection.

The vertical movement of the needle was repeated with a frequency of 3.1 Hz (184/min) for a run time of 0.31 min. The parameter settings were as follows: time for probe movement = 150 ms; probe voltage = 2.3 kV; desolvation line temperature = 250°C; and heat block temperature = 30°C.

MtF and MtF-D6 were detected with a multiple reaction monitoring method. The selected transitions were *m/z* 130.15 > 71.10 for quantitation and *m/z* 130.15 > 60.05 as qualifier ion for MtF. The transitions were *m/z* 135.95 > 77.15 and *m/z* 135.95 > 60.05 for MtF-D6.

To apply an ID protocol (as mentioned later), the main MS parameters were optimized to obtain the same intensity for the *m/z* 130.15 > 71.10 (MtF) and *m/z* 135.95 > 77.15 (MtF-D6) transitions. For these two transitions, CE, Q1 and Q3 were -23 eV, -17 V and -15 V, and -23 eV, -20 V and -22 V, respectively.

Validation of the method

According to the ID principle, each concentration level was determined using the ratio between the peak area of MtF

and MtF-D6 multiplied by its concentration, which was fixed at 5 mg/L. Five concentration levels (0.5, 2.5, 5, 10 and 50 mg/L) were considered for the validation of the method.

Each concentration was prepared and analyzed each day for 6 days, and the inter-day precision (coefficient of variation (CV)) and accuracy (bias) were determined for each concentration level using the ID approach.

The intra-day precision and accuracy were assessed for each level (*n* = 6 for the same day).

Acceptance criteria were intra- and inter-day precision and accuracy <20% for each level.

The limit of detection and the limit of quantification (LOQ) were arbitrarily fixed at 0.5 mg/L, which was the lowest calibrator concentration.

The matrix effect was evaluated at 10 mg/L using six different plasma and six purified water samples. The signals obtained in plasma were compared to those in pure water to reveal a potential ion suppression or enhancement.

Table I. List of Co-Medications and Hormonal Contraceptives Spiked in Blank Samples for Specificity Testing

Potential co-medications(1 mg/L)	Hormonal contraceptives (1 µg/L)
Acetaminophen	Drospirenone
Acetylsalicylic acid	Ethinyl estradiol
Allopurinol	Levonorgestrel
Amphetamine	Medroxyprogesterone acetate
Brompheniramine	Norethindrone
Caffeine	Cyproterone acetate
Candesartan	Desogestrel
Captopril	Etonogestrel
Cetirizine	Estradiol
Cotinine	Norgestimate
Dextromethorphan	
Dimenhydrinate	
Diphenhydramine	
Enalapril	
Flucytosine	
Ganciclovir	
Ibuprofen	
Ketoprofen	
Lansoprazole	
Loratadine	
Losartan	
Methylprednisone	
Mycophenolic acid	
Naproxen	
Nicotine	
Omeprazole	
Perindopril	
Phenylephrine	
Phloroglucinol	
Pralidoxime	
Prednisone	
Prednisolone	
Pseudoephedrine	
Ramipril	
Ranitidine	
Salicylic acid	
Taurine	
Trimethoprim and sulfamethoxazole	
Uracil	
Valsartan	
Vigabatrin	

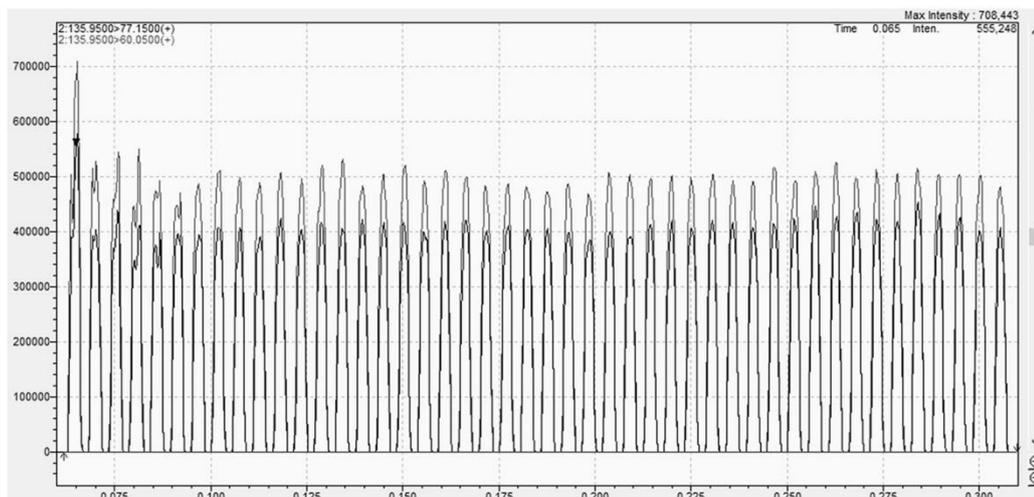


Figure 1. Extracted ion count for MtF in plasma spiked at 0.5 mg/L.

Specificity was tested by analyzing six blank plasma samples collected from healthy volunteers, each spiked with potential co-medications, hormonal contraceptives, and drugs with a molecular weight close to that of MtF (Table I). The absence of interfering components was validated for a mean ratio of <5% between the peak areas measured in blank and the peak areas in the lower LOQ (LLOQ) samples for MtF and MtF-D6.

Application to real samples

Samples obtained from the routine activity of two external

laboratories were analyzed. All these samples were anonymously transmitted to our lab. Precisely, 11 samples were measured by the Laboratory of Pharmacology and Toxicology at Amiens-Picardie University Hospital (France) using a previously published LC-DAD method (14), and 18 samples were measured by the Laboratory of Pharmacology, Toxicology and Pharmacogenetic at Rouen University Hospital (France) using an LC-MS-MS method. This LC-MS-MS method consisted of a protein precipitation extraction with acetonitrile and was based on a Prominence Shimadzu UFLC system (LC-20, Shimadzu®, Prominence, Japan) in combination with a 4000QTRAP equipped with an ESI source operating in positive ion mode (Sciex®, Canada). This method was fully validated for clinical practice according to European Medicines Agency, U.S. Food & Drug Administration (FDA) and ISO15189 guidelines, for a calibration range from 0.1 to 10 ng/mL.

Results

An extracted ion count of MtF in a plasma spiked at a concentration of 0.5 mg/L (the lowest point of a calibration curve) is presented in Figure 1. As represented in this figure, the signal that is considered for the quantitation corresponds to the sum of all peak areas acquired in a 0–0.31 min interval.

Table II. Validation Parameters of the Method

Concentrations (mg/L)	Inter-day		Intra-day	
	CV (%)	Bias (%)	CV (%)	Bias (%)
0.5	14.01	-1.94	1.60	-0.98
2.5	14.56	-0.42	1.11	-8.93
5	17.12	-12.13	1.11	15.88
10	17.24	13.86	1.01	6.06
50	15.42	4.53	1.35	-16.42

The method’s validation parameters are summarized in Table II. The values of inter- and intra-day precision were between 14.01% and 17.24%, and 1.11% and 1.78%, respectively. The accuracy was between -0.42% and 13.86% for inter-day and between -16.42% and 15.87% for intra-day.

Concerning the matrix effects, we observed an average enhancement of 57% between MtF signal obtained in the six different plasma and those obtained in purified water samples. However, this matrix effect was fully corrected by the IS (bias of 1% between plasma and water after correction). The study exploring the specificity with a solution of 52 molecules reported satisfactory results: the ratio between the peak areas measured in blank and the peak areas in the LLOQ samples was systematically <5% for MtF (from 2.5% to 4.7%) and MtF-D6 (from 0.13% to 1.67%).

The concentrations of MtF measured in 29 patients with PESI-MS and two other analytical methods (LC-MS-MS or LC-DAD) are presented in Table III. Figures 2 and 3 report the regression analyses between PESI-MS and these two methods, and Bland-Altman representations. In this representative group of patients (55% with a concentration <5 mg/L, 38% with a concentration >5 mg/L and 7% not detected), excellent agreements were observed with either LC-DAD ($r^2 = 0.99$; $n = 11$) or LC-MS-MS ($r^2 = 0.99$; $n = 16$).

Table III. Concentration Obtained in 29 Patients Measured by PESI-MS-MS and either LC-DAD or LC-MS-MS

LC-DAD (mg/L)	PESI-MS/MS (mg/L)
0.61	0.6
1.4	1.4
1.67	1.7
2.79	2.4
3.38	3.3
5.75	6.25
8.1	10
8.86	9.35
15.81	19.9
16.23	18.1
55.3	53.6
LC-MS-MS (mg/L)	PESI-MS-MS (mg/L)
ND	ND
ND	ND
0.55	0.66
0.62	0.73
0.74	0.73
0.82	1.03
0.88	0.95
1	1.12
1.27	1.16
1.82	2.26
3.5	3.59
3.9	4.86
4.27	4.55
7.01	8.04
18.17	17.7
27.97	27.68
30.93	33.01
44.72	39.1

Discussion

A method for an ultrafast measurement of MtF in plasma was developed and validated using a PESI-MS approach. Using only 10 μ L of plasma, this method provides an accurate determination of MtF in about 30 s.

The measurement of plasma MtF concentration in an emergency hospitalization context is necessary for patients treated with this drug. Multiple studies have explored the associations between this parameter and LA and/or mortality. If their conclusions are slightly different, it is consensually accepted that elevated concentrations of MtF are associated with LA (MALA) or could induce LA (MILA). In other terms, MILA is a situation where no possible documented explanation for LA other than MtF can be found, while MALA is a situation where causes other than MtF can trigger LA (sepsis, seizures, hemorrhage, etc.) (15). In a multicenter study of 173 diabetic patients presenting LA in a context of acute kidney injury, Corchia et al. observed that MILA ($n = 109$) was associated with death due to severe refractory acidosis that could be attributed to MtF accumulation. In MALA patients ($n = 64$), they observed that death was mainly attributed to underlying conditions and that MtF accumulation increased LA. In a population of 194 MtF-treated diabetic patients admitted to an emergency or intensive care unit (ICU), Bennis et al. reported that an MtF plasma concentration of >9.9 mg/L was strongly associated with the presence of LA (16). More

precisely, in this population, this threshold value had a specificity of 92.6%. Other clinical studies have reported an association between elevated MtF concentrations and LA (17, 18) or an association with the severity of acute kidney injury (19, 20).

All of this supports the fact that MtF accumulation must be rapidly identified in patients admitted to emergency or ICUs. The confirmation of an elevated MtF plasma concentration is essential to help clinicians establish the diagnosis of MALA or MILA and consequently to initiate an adequate treatment. In particular, the evolution of LA depends on the early initiation of renal replacement therapy.

Nevertheless, it remains unclear what a normal or usual MtF plasma concentration in a diabetic patient should be. Kajbaf et al. performed a review that identified 65 different proposed concentration ranges (21). However, the FDA's prescribing information reported that concentrations of <5 mg/L were observed during controlled clinical trials, even at maximum doses (22).

Multiple techniques are available for the analysis of MtF in biological samples. However, the review articles by Patel et al. (6) and Fachi et al. (7) highlighted that most are HPLC methods coupled with either DAD or MS, with a migration toward MS in the recent years (23–25). Whatever the approach, sample preparation and the construction of a calibration curve are necessary. This implies a delay in the measurement of MtF. In a previous study in which a PESI-MS approach was applied to the measurement of acetaminophen, Usui et al. reported the possibility of determining this toxic agent in <2 min. However, the procedure included a 7-point calibration curve and three different quality control samples. This means that the actual time it took to measure a patient was probably not <15 min. Even if short, such a delay is not significantly better than that of a classical immunoassay. Here, we have demonstrated that an accurate determination of MtF can be performed by a simple calculation taking into account the ratio between the peak area of MtF and MtF-D6. When developing the MS conditions, we have verified that both the ion transitions of MtF and MtF-D6 produced the same intensity. This is a key point when applying ID. In preliminary studies, multiple tests were performed to check the stability of this parameter (data not shown). This was also confirmed during the validation of the method.

In a representative group of patients, we observed a very good agreement of PESI-MS with two methods of chromatography.

This supports the fact that PESI-MS can significantly shorten the time necessary to obtain a result along with an accurate measurement. Practically, in a clinical emergency setting, we propose to analyze an MtF control quality sample spiked at 5 mg/L together with the patient sample. When taking into account all the manual steps (dilution and spiking of the sample on the plate), <5 min is needed to measure MtF in a patient.

With this PESI-MS approach, there is no sample extraction and no column separation process. No particular skill in LC-MS is needed as the operator simply has to dilute the plasma in an ethanol/formate buffer, add the IS solution and then set the sample plate into the PESI source. Additionally, it is not necessary to dedicate an MS system to the PESI technology. In fact, the PESI source can be easily installed and

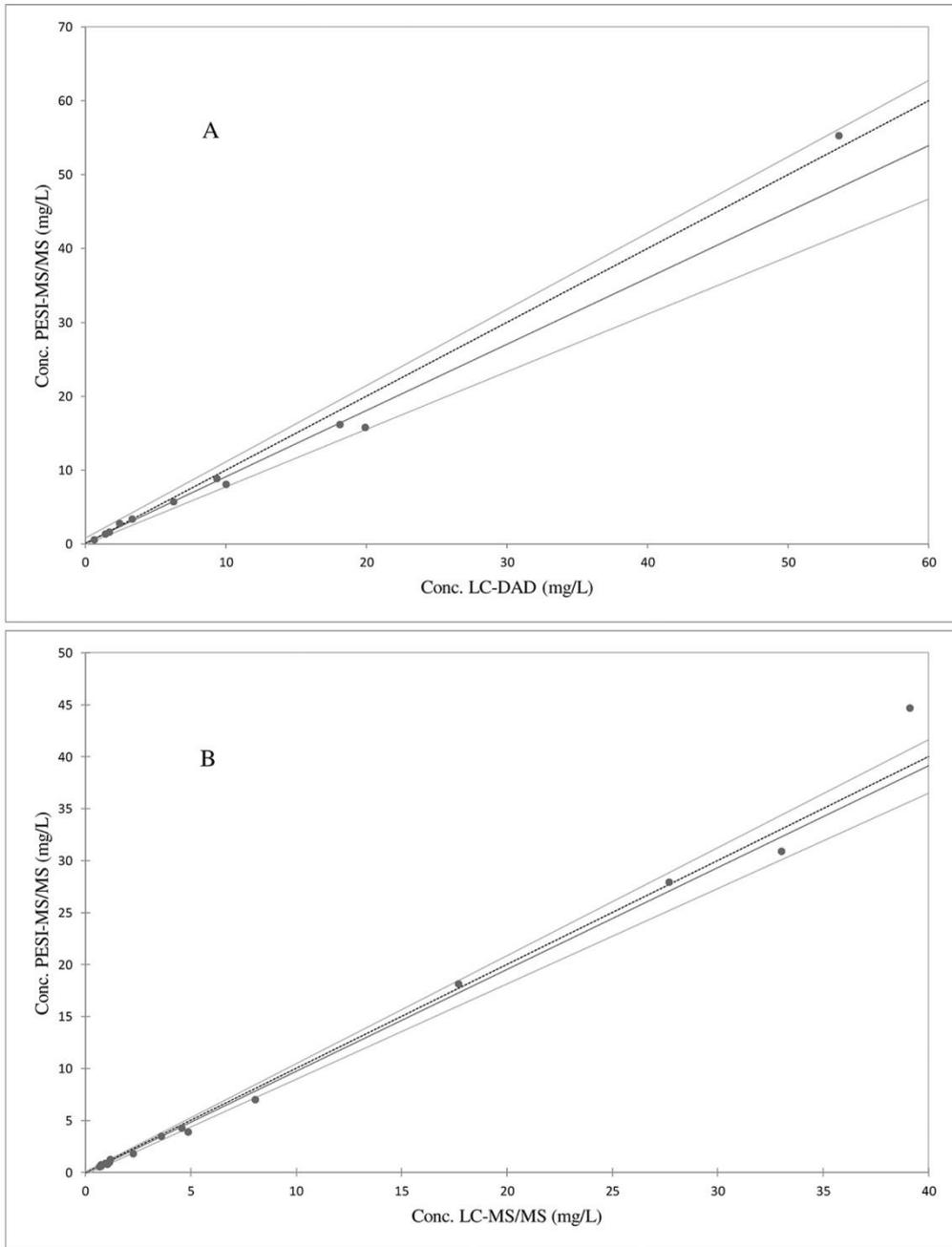


Figure 2. Passing and Bablok regression analysis for MtF concentrations measured by PESI-MS-MS and either LC-DAD (A) or LC-MS-MS (B).

removed in front of the MS system and is interchangeable with a classical ESI source without shutting down the system. However, PESI-MS has some drawbacks. First, as it does not

have chromatographic separation, compounds with the same molecular ions (isobars/isomers) can theoretically interfere. However, in the present study, the experiments performed

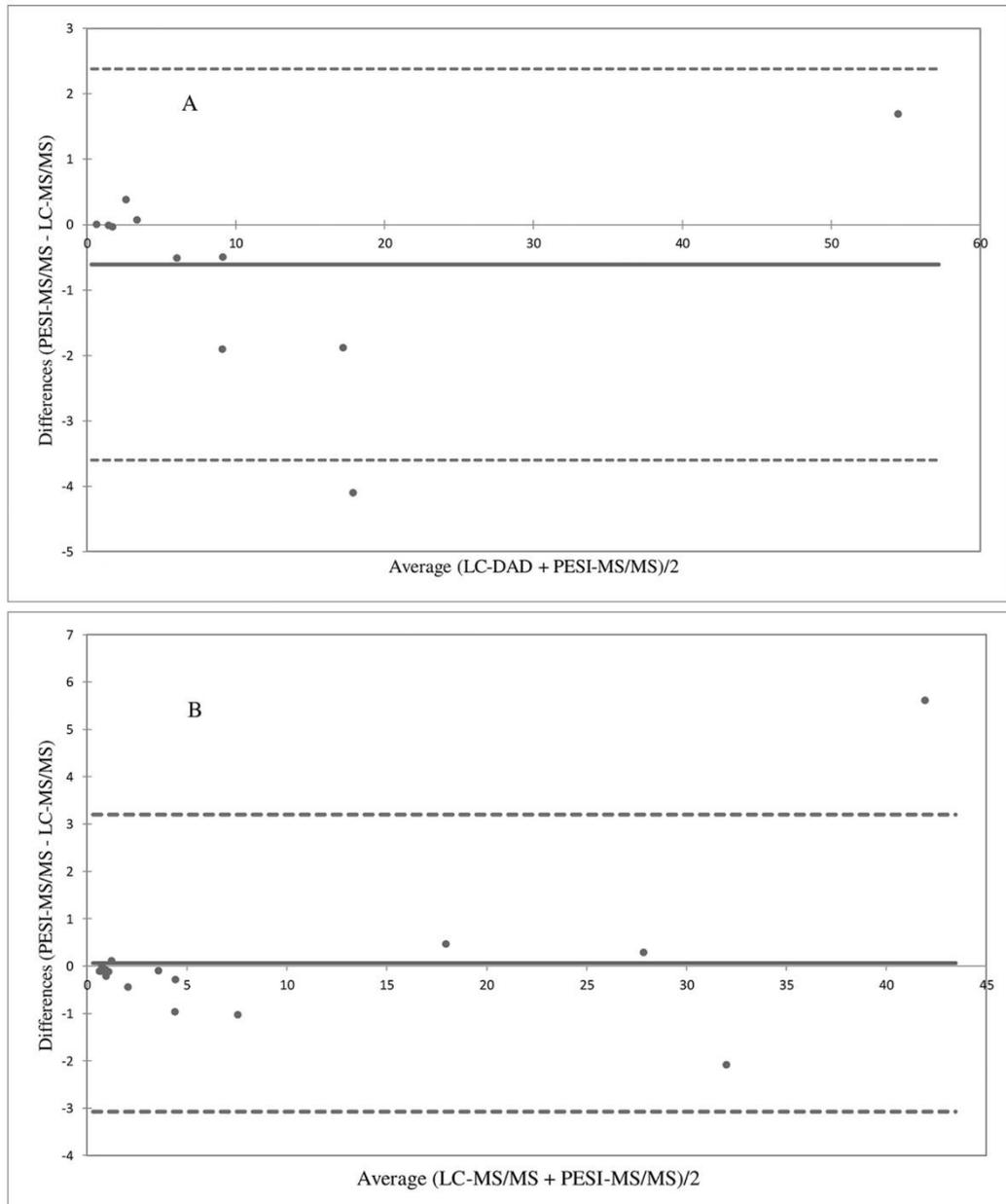


Figure 3. Bland-Altman analysis for MtF concentrations measured by PESI-MS-MS and either LC-DAD (A) or LC-MS-MS (B).

with a solution containing a mix of potential co-medications or hormonal compounds revealed no interferences. Second, needles and the dedicated plastic sample plates are of single use. This implies that the operator has to analyze the samples one after the other. However, each analysis only takes 0.31 min.

Conclusions

The PESI-MS approach needs no sample preparation. Combined with an ID protocol that requires no calibration curve building, it offers the best possibility to design specific, sensitive, accurate and ultrafast solutions. Our study presents a method which allows an accurate determination of MtF

in about 30 s that will be helpful in a core lab when rapid diagnosis of LA is needed.

References

- Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., Duong, J.K., et al. (2011) Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clinical Pharmacokinetics*.
- Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., et al. (2012) Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. *Diabetes Care*, **35**, 1364–1379.
- Foretz, M., Viollet, B. (2010) Mécanisme d'inhibition de la production hépatique de glucose par la metformine: un nouveau concept pour un ancien remède. *Medecine/sciences*, **26**, 663–666.
- Corchia, A., Wynckel, A., Journet, J., Moussi Frances, J., Skandrani, N., Lautrette, A., et al. (2020) Metformin-related lactic acidosis with acute kidney injury: results of a French observational multicenter study. *Clinical Toxicology*, **58**, 375–382.
- Kajbaf, F., Lalau, J.-D. (2014) Mortality rate in so-called "metformin-associated lactic acidosis": a review of the data since the 1960s: mortality in metformin-associated lactic acidosis. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, **23**, 1123–1127.
- Patel, D., Kumar, P., Sharma, S., Dwivedi, J. (2017) Analytical methods for metformin estimation. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **47**, 405–417.
- Fachi, M.M., Leonart, L.P., Degaut Pontes, F.L., Oliveira Vilhena, R.D., Cerqueira, L.B., Pontarolo, R. (2017) Bioanalytical methods for the detection of antidiabetic drugs: a review. *Bioanalysis*, **9**, 2015–2025.
- Usui, K., Kobayashi, H., Fujita, Y., Kubota, E., Hanazawa, T., Yoshizawa, T., et al. (2019) An ultra-rapid drug screening method for acetaminophen in blood serum based on probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, **27**, 786–792.
- Usui, K., Minami, E., Fujita, Y., Kubota, E., Kobayashi, H., Hanazawa, T., et al. (2019) Application of probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry to ultra-rapid determination of glufosinate and glyphosate in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **174**, 175–181.
- Hiraoka, K., Nishidate, K., Mori, K., Asakawa, D., Suzuki, S. (2007) Development of probe electrospray using a solid needle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, 3139–3144.
- Zaitsu, K., Hayashi, Y., Murata, T., Ohara, T., Nakagiri, K., Kusano, M., et al. (2016) Intact endogenous metabolite analysis of mice liver by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry and its preliminary application to in vivo real-time analysis. *Analytical Chemistry*, **88**, 3556–3561.
- Zaitsu, K., Hayashi, Y., Murata, T., Yokota, K., Ohara, T., Kusano, M., et al. (2018) In vivo real-time monitoring system using probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry for metabolites in mouse brain. *Analytical Chemistry*, **90**, 4695–4701.
- Johno, H., Yoshimura, K., Mori, Y., Kimura, T., Niimi, M., Yamada, M., et al. (2018) Detection of potential new biomarkers of atherosclerosis by probe electrospray ionization mass spectrometry. *Metabolomics*, **14**, 38.
- Lalau, J.-D., Kajbaf, F., Bennis, Y., Hurtel-Lemaire, A.-S., Belpaire, F., De Broe, M.E. (2018) Metformin treatment in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease stages 3A, 3B, or 4. *Diabetes Care*, **41**, 547–553.
- Aharaz, A., Pottgærd, A., Henriksen, D.P., Hallas, J., Beck-Nielsen, H., Lassen, A.T. (2018) Risk of lactic acidosis in type 2 diabetes patients using metformin: a case control study. *PLOS ONE*, **13**, e0196122.
- Bennis, Y., Bodeau, S., Batteux, B., Gras-Champel, V., Masmoudi, K., Maizel, J., et al. (2020) A study of associations between plasma metformin concentration, lactic acidosis, and mortality in an emergency hospitalization context. *Critical Care Medicine*, **48**, e1194–e1202.
- Vecchio, S., Giampreti, A., Petrolini, V.M., Lonati, D., Protti, A., Papa, P., et al. (2014) Metformin accumulation: lactic acidosis and high plasmatic metformin levels in a retrospective case series of 66 patients on chronic therapy. *Clinical Toxicology*, **52**, 129–135.
- Seidowsky, A., Nseir, S., Houdret, N., Fourrier, F. (2009) Metformin-associated lactic acidosis: a prognostic and therapeutic study. *Critical Care Medicine*, **37**, 2191–2196.
- Connelly, P.J., Lonergan, M., Soto-Pedre, E., Donnelly, L., Zhou, K., Pearson, E.R. (2017) Acute kidney injury, plasma lactate concentrations and lactic acidosis in metformin users: a GoDarts study. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, **19**, 1579–1586.
- Lepelley, M., Gai, J., Yahiaoui, N., Chanoine, S., Villier, C. (2016) Lactic acidosis in diabetic population: is metformin implicated? Results of a matched case-control study performed on the type 2 diabetes population of Grenoble Hospital University. *Journal of Diabetes Research*, **2016**, 1–8.
- Kajbaf, F., De Broe, M.E., Lalau, J.-D. (2016) Therapeutic concentrations of metformin: a systematic review. *Clinical Pharmacokinetics*, **55**, 439–459.
- (2017) Merck KGaA: FDA Label Approved for Metformin Hydrochloride-2017 Version. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020357s037s039,021202s021s0231bl.pdf (accessed Feb 2022).
- Wattamwar, T., Mungantiwar, A., Halde, S., Pandita, N. (2020) Development of simultaneous determination of empagliflozin and metformin in human plasma using liquid chromatography–mass spectrometry and application to pharmacokinetics. *European Journal of Mass Spectrometry*, **26**, 117–130.
- Wattamwar, T., Mungantiwar, A., Gujar, S., Pandita, N. (2020) Development of LC-MS/MS method for simultaneous determination of canagliflozin and metformin in human plasma and its pharmacokinetic application in Indian population under fast and fed conditions. *Journal of Chromatography B*, **1154**, 122281.
- Shah, P.A., Shrivastav, P.S., Shah, J.V., George, A. (2019) Simultaneous quantitation of metformin and dapagliflozin in human plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, **33**, e4453.

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Source de type Probe ElectroSpray Ionization couplée à la spectrométrie de masse : application au dosage de la metformine

La metformine est un antidiabétique largement utilisé dans le traitement du diabète de type 2. Bien que rare, l'acidose lactique est une de ses complications les plus préoccupantes. La metformine peut être la source directe de l'acidose, soit être un facteur aggravant d'une acidose préexistante. Chaque contexte a une prise en charge et un pronostic différent. Il est donc nécessaire pour les laboratoires de fournir une méthode de dosage rapide de la metformine. La source de type Probe ElectroSpray Ionization couplée à la spectrométrie de masse en tandem (PESI-MS/MS) répond à cette problématique en permettant l'analyse directe et rapide, sans prétraitement.

La metformine est analysée selon un mode « Multiple Reaction Monitoring ». La quantification est possible sans gamme de calibration grâce à l'utilisation d'un étalon interne deutéré (metformine-D6) et l'application d'un protocole de dilution isotopique. La préparation d'échantillon consiste à mélanger 10 µL de plasma, 1000 µL d'un mélange d'éthanol/formiate d'ammonium et 10 µL d'étalon interne à une concentration de 5 mg/L.

La méthode a été entièrement validée avec 6 niveaux de concentrations allant de 0,5 mg/L à 50 mg/L. La dilution isotopique a permis d'obtenir des résultats de biais et coefficients de variation satisfaisants (min-max : -12.1 à 15.8% et 1.0-17.1%, respectivement). L'effet matrice a été totalement compensé par l'utilisation d'un étalon interne deutéré et le protocole de dilution isotopique (biais < 1%). L'étude de spécificité n'a pas mis en lumière d'interférence significative et la comparaison à des méthodes de référence a rapporté une bonne corrélation ($r^2 > 0.99$).

Le temps d'analyse total est alors de 19 secondes. La méthode permet donc un dosage sensible, rapide et précis de la metformine plasmatique, sans préparation d'échantillon ni droite de calibration. Elle ouvre la voie à une nouvelle approche toxicologique permettant un rendu de résultat quasi instantané et devra être extrapolé à d'autres contextes afin de montrer son utilité clinique.

Mots-clés : Metformine, spectrométrie de masse, probe electrospray ionization, toxicologie

Probe ElectroSpray Ionization coupled with mass spectrometry: application to metformin assay.

Metformin is an antidiabetic agent widely used in the treatment of type 2 diabetes. Although rare, lactic acidosis is of great concern in patients treated with metformin. It can either directly induce acidosis or be an aggravating factor for pre-existing acidosis. Each context has different management and prognosis. Therefore, it is necessary for laboratories to provide methods for the rapid detection of metformin. The Probe ElectroSpray Ionization Source coupled with tandem mass spectrometry (PESI-MS/MS) responds to this problem by allowing the direct and rapid analysis of various matrices, without pretreatment.

Metformin is analyzed using a "Multiple Reaction Monitoring" mode. Quantification is possible without a calibration range thanks to the use of a deuterated internal standard (metformin-D6) and the application of an isotopic dilution protocol.

Isotope dilution gave satisfactory quantitative results as the accuracy and precision were within acceptable ranges (min-max: -12.1-15.8% and 1.0-17.1%, respectively). Excellent agreements were observed with either LC-DAD or LC-MS/MS ($r^2 > 0.99$).

We propose a specific, sensitive, accurate and ultra-fast solution for the measurement of metformin in patient plasma, without sample preparation or calibration curve construction. This could be helpful in a core lab when rapid diagnosis of lactic acidosis is needed.

Keywords : Metformin, mass spectrometry, probe electrospray ionization, clinical toxicology

