

# Note de laboratoire : Dosage ultra-rapide de la metformine plasmatique par chromatographie liquide d'interaction hydrophile

## *Ultra-short determination of metformin in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography*

---

Marc DEVEAUX<sup>\*(1)</sup>, Philippe DALLET<sup>(2)</sup>, Caroline QUINTIN<sup>(1)</sup>,  
Patrick NISSE<sup>(3)</sup>, Didier GOSSET<sup>(1)</sup>

---

(1) Institut de Médecine Légale, Faculté de Médecine, Université de Lille 2 - LILLE

(2) Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Université Victor Segalen - BORDEAUX

(3) Centre Antipoison, Centre Hospitalier Régional Universitaire - LILLE

---

\* Auteur à qui adresser la correspondance : Marc DEVEAUX, Institut de Médecine Légale,  
place Théo Varlet - 59000 LILLE - FRANCE

Tél : +33 (0)3 20 62 12 23 - Fax : +33 (0)3 20 62 12 29 - e-mail : mdeveaux@easynet.fr

---

(Reçu le 28 mai 2002 ; accepté le 10 juin 2002)

### RÉSUMÉ

La metformine est un biguanide hypoglycémiant largement utilisé. Bien que sa marge thérapeutique soit grande, une acidose lactique mortelle peut survenir rapidement en cas de surdosage massif. Le diagnostic différentiel de l'acidose est facilité par le dosage de la metformine plasmatique. L'objectif de ce travail est de mettre au point et valider une méthode de dosage ultra-rapide de la metformine, petite molécule très polaire difficile à extraire par les solvants classiques et difficile à doser en CLHP en phase inverse. La méthode choisie est la chromatographie d'interaction hydro-

### SUMMARY

Metformin is a biguanid oral hypoglycemic agent, widely used in France. Despite its wide therapeutic margin, it has a propensity for causing severe lactic acidosis in case of overdosage and assay of metformin in plasma may contribute towards the differential diagnosis of the acidosis. The aim of this work is to develop an ultra-short technique for the determination of metformin in plasma. This little molecule is a very polar one and is very difficult to extract by classical solvents and to assay by reverse phase HPLC. That is why we choose hydrophilic interaction chromatography (HILIC),

*phile (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC) avec une détection par barrette de photodiodes. La colonne contient une phase stationnaire particulière, la poly(2-hydroxyéthylaspartamide)-silice (colonne PolyHydroxyEthyl A). Elle est thermostatée à 50° C. La phase mobile est un mélange acétonitrile/acide phosphorique 65 : 35, v/v, à pH 2,8. Le débit est de 1,5 ml/min. Dans ces conditions, le temps de rétention de la metformine est de 2,9 min. Elle est isolée à partir de 250 µl de plasma déprotéinisé par 15 µl d'acide perchlorique. Le dosage est réalisé par rapport à une courbe d'étalonnage. Dans ces conditions, le temps de rétention de la metformine est de 2,9 min. La méthode est linéaire de 0,1 à 400 µg/ml. La limite de détection est 0,02 µg/ml, la limite de quantification de 0,1 µg/ml. Les variabilités sont plus importantes aux faibles concentrations qu'aux fortes concentrations. La récupération de la metformine plasmatique est quasiment totale (rendement de 99,5 %). Les autres antidiabétiques oraux ne donnent pas d'interférence. L'application à un cas de suicide par ingestion massive de Glucophage® montre une concentration plasmatique de 188 µg/ml, en accord avec l'hyperacidose lactique retrouvée pendant la tentative de réanimation.*

#### **MOTS-CLÉS**

*Metformine, chromatographie d'interaction hydrophile, plasma.*

## **Introduction**

Utilisés largement depuis près d'un demi-siècle, les antidiabétiques oraux de la famille des biguanides ne sont représentés en France que par la metformine (1,1-diméthylbiguanide), commercialisée sous forme de chlorhydrate (Glucophage®, Glucoless®) et de p-chlorophénoxyacétate (Glucinan®) ; l'embonate (Stagid®) n'est plus commercialisé. La posologie quotidienne usuelle va de 200 à 1500 mg de metformine base. Sa marge thérapeutique est très grande et même pour des doses de 85 g de metformine, aucune hypoglycémie n'a été observée (1) ; cependant une acidose lactique très sévère peut survenir en cas de surdosage. Le décès est alors fréquent. Le diagnostic différentiel de l'acidose métabolique peut être facilité par le dosage de la metformine sanguine. Cependant, c'est une petite molécule très polaire, difficile à extraire par les solvants classiques et à doser en chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse car cette molécule est très peu retenue sur les phases hydrophobes octyle ou octadécyle habituellement utilisées (2, 3). Nous donc avons mis au point et validé une méthode de dosage ultra-rapide et spécifique de la metformine plasmatique en chromatographie d'interaction hydrophile (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC), technique bien validée pour la séparation de petites molécules polaires (4, 5). Cette méthode a été appliquée dans un cas typique d'intoxication mortelle par la metformine avec acidose lactique sévère.

*with a PolyHydroxyEthyl stationary phase. Mobile phase is acetonitrile : phosphoric acid (65 : 35, v/v) at pH 2,8. Chromatography is achieved at 50° C, with a flow-rate at 1.5 ml/min. In these conditions the mean retention time of metformin is 2.9 min. It is isolated from 250 µl plasma by precipitating the proteins by 15 µl perchloric acid. The mean retention time is 2.9 min. The linearity of the method is very good from 0.1 to 400 µg/ml. The limit of detection is 0.02 µg/ml, the limit of quantification is 0.1 µg/ml. Intra-day and inter-day variabilities are higher at low concentrations than at high concentrations. Recovery is excellent, reaching 99.5 %. We verified that there is no analytical interference between metformin and other oral hypoglycemic agents. Using this new ultra-short method, we report a case of a suicide attempt with Glucophage®, with a severe lactic acidosis and a plasma metformin concentration of 188 µg/ml. The patient died 34 hours after ingestion.*

#### **KEY-WORDS**

*Metformin, hydrophilic interaction chromatography.*

## **Matériel et méthodes**

Tous les réactifs sont de qualité pour analyse ou pour chromatographie : acétonitrile et méthanol (Labscan), dihydrogénophosphate de sodium anhydre (Panréac), acétate de sodium et triéthylamine (Merck), acide orthophosphorique et acide perchlorique (Labosi), chlorhydrate de metformine (Merck). Le système CLHP est constitué par une pompe Waters 600, couplée à un détecteur à barrette de photodiodes Waters 996. Une vanne Rhéodyne® dont la boucle est de 20 µl permet d'assurer la reproductibilité des injections manuelles. La colonne HILIC de 200 x 4,6 mm contient une phase de poly(2-hydroxyéthylaspartamide)-silice (PolyHydroxyEthyl A, PolyLC, USA, fournie gracieusement par Cil Cluzeau Info Labo) avec des particules de 5 µm. Elle est maintenue à 50° C.

La phase mobile est constituée par 65 volumes d'acétonitrile et 35 volumes de phosphate de triéthylamine 50 mM (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentré : 3,4 ml ; eau distillée : qsp 100 ml ; pH ajusté à 2,8 avec de la triéthylamine ; dilution au 1/10<sup>ème</sup> avec de l'eau). Le débit est constant à 1,5 ml/min. On suit l'élution à 234,6 nm, longueur d'onde du maximum d'absorption de la metformine dans l'UV. Comme la metformine n'est quasiment pas fixée aux protéines plasmatiques, l'extraction se fait très simplement par déprotéinisation acide du plasma : à 250 µl de plasma, on ajoute 15 µl d'acide perchlorique à 50 %. L'agitation au vortex pendant 1 min est suivie par une centrifugation pendant 15 min à 10 000 t/min. On

injecte 20 µl du surnageant dans la boucle d'injection du système CLHP.

Le dosage est réalisé par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée après injection de concentrations croissantes de metformine en solution aqueuse (0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 et 5 µg/ml, puis 5 - 10 - 25 - 50 - 100 - 200 et 400 µg/ml).

Nous avons également vérifié l'absence d'interférences avec d'autres antidiabétiques oraux de prescription fréquente : glibenclamide, glicazide, glipizide, benfluorex.

Dans notre observation, le patient avait ingéré dans un but suicidaire une dose inconnue de metformine, prescrite pour le traitement de son diabète. Il présentait lors de son admission une acidose lactique sévère et devait décéder 34 heures après, malgré les soins prodigués, dont l'hémodialyse. Un prélèvement sanguin avait été effectué juste avant le décès et nous avait été transmis.

## Résultats et discussion

Dans les conditions opératoires décrites, le temps de rétention moyen de la metformine est de 2,90 min ± 0,24 min, avec un pic parfaitement symétrique. La limite de détection est de 0,02 µg/ml, et la limite de quantification de 0,1 µg/ml. La linéarité de la méthode a été vérifiée pour la zone thérapeutique (0,1 à 5 µg/ml), pour la zone toxique (5 à 400 µg/ml) et enfin pour toute la plage de mesures, avec des coefficients de régression respectifs de 0,97, 0,99 et 0,99. Chaque concentration a été testée 5 fois. Il n'y a pas de différence significative entre les pentes des droites de régression : cette linéarité continue permet donc de n'utiliser qu'une seule gamme d'étalonnage.

Le rendement de récupération de la metformine plasmatique a été calculé en comparant les résultats obtenus après déprotéinisation et après injection directe : il est de 99,5 %. La déprotéinisation en milieu acide permet donc une récupération quasiment totale, comme cela avait déjà montré (3, 6).

Le choix de la méthode chromatographique HILIC était parfaitement justifié car la CLHP en phase inverse sur une phase stationnaire C8 ou C18 impliquait une réduction drastique de la proportion de solvant organique, avec le risque de dénaturation de la phase stationnaire. Les autres alternatives étaient *a*) l'emploi de phases stationnaires possédant dans leurs structures un groupement fonctionnel polaire (Zorbax Bonus RP, Symmetry Shield, Discovery Amide ou Stability BS-C23) ou capables de supporter une phase mobile aqueuse à cent pour cent (Satisfaction C8+), mais sans garantie de résultat ; *b*) la chromatographie de paire d'ions, mais sa mise en œuvre reste assez délicate (7). La colonne PolyHydroxyEthyl A, spécialement conçue pour la chromatographie HILIC d'acides aminés et de

sucres (4), avait déjà été utilisée avec succès pour la séparation de petites molécules telles que l'urée, l'allantoïne ou la lysidone (5). Sa phase stationnaire présente un caractère polaire marqué et il suffit d'utiliser une phase mobile contenant les proportions adéquates d'acétonitrile et de tampon aqueux pour favoriser les interactions de nature hydrophile et augmenter ainsi la rétention de la metformine.

Les études de variabilité intra-jour et inter-jour montrent des valeurs plus importantes aux faibles concentrations (CV = 20 % à 0,25 et 1 µg/ml) qu'aux fortes concentrations (CV = 5 % à 10 µg/ml et CV = 2 % à 50, 200 et 400 µg/ml). Le protocole opératoire que nous décrivons est donc mieux adapté au diagnostic d'intoxications aiguës qu'à la surveillance thérapeutique.

Les sulfamides hypoglycémisants et le benfluorex sont tous élués dans le front du solvant, entre 1,1 et 1,3 min : il n'y a donc pas d'interférence possible avec ces produits.

La concentration plasmatique retrouvée chez notre patient était de 188 µg/ml, mais elle devait être beaucoup plus élevée à l'admission, étant donné la courte demi-vie apparente d'élimination terminale de la metformine (1,5 à 6,5 h) (8, 9) et le traitement institué. La zone thérapeutique habituelle va de 0,75 à 3 µg/ml et la zone considérée comme toxique s'étend de 5 à 250 µg/ml (9, 10). Cependant, des observations récentes (11) montrent qu'il n'y a pas de lien fort entre la mortalité et la concentration plasmatique en metformine. C'est pourquoi il semblerait utile de doser la metformine érythrocytaire, car elle décroît beaucoup plus lentement et permettrait de mieux estimer la concentration sanguine initiale. (3, 11).

## Conclusion

Le choix de la chromatographie HILIC avec une colonne PolyHydroxyEthyl A convient donc parfaitement pour le dosage de la metformine plasmatique, apportant une grande sélectivité et permettant une analyse ultrarapide : la metformine est éluee en moins de 3 min. La méthode que nous proposons est simple et linéaire de 0,1 à 400 µg/ml. Elle est particulièrement bien adaptée au diagnostic des intoxications aiguës par la metformine.

**Remerciements** : Les auteurs remercient le docteur X. FORCEVILLE (Service de réanimation polyvalente, Centre Hospitalier de Meaux) pour nous avoir confié les prélèvements ; la société CIL CLUZEAU INFO LABO (33-35, rue Jean-Louis Faure, BP 88, 33220 Sainte-Foye-la-Grande) pour nous avoir fourni gracieusement la colonne PolyHydroxyEthyl A ; Mesdames M. PLOUVIER et S. DUCHATELLE pour leur aide technique.

## Références

1. Information relative au Glucophage®. Dictionnaire Vidal® : Les Editions du Vidal, 2001 ; 910-3.
2. Dolan J.W. Retaining polar compounds. LC-GC Europe. 2001 ; 14 : 724-8.
3. Lacroix C., Danger P., Wojciechowski F. Microdosage de la metformine plasmatique et intra-érythrocytaire par chromatographie en phase liquide. Ann. Biol. Clin. 1998 ; 338 : 265-6.
4. Alpert A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. J. Chromatogr. 1990 ; 499 : 177-196.
5. Dallet P., Labat L., Kummer E., Dubost J.P. Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. J. Chromatogr. B. 2000 ; 742 : 447-52.
6. Yuen K.H., Peh K.K. Simple high-performance liquid chromatography method for the determination of metformin in human plasma. J. Chromatogr. B. 1998 ; 710 : 243-6.
7. Keal J., Somogyi A. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatography assay for metformin in plasma and urine using ion-pair extraction techniques. J. Chromatogr. 1986 ; 378 : 503-8.
8. Anonyme. Interaction entre les produits de contraste iodés et la metformine. Brev. Pharmacovig. 2002 ; 5 : 3.
9. Baselt R.C. Metformin, *in* : Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Foster City : Chemical Toxicology Institute, 2000 : 522-3.
10. Stang M., Wysowski D.K., Butler-Jones D. Incidence of lactic acidosis in metformin users. Diabetes Care. 1999 ; 22 (6) : 925-7.
11. Lalau J.D., Lacroix C. How determining a drug concentration in blood could help to revise a package insert : the example of metformin. 40th International Meeting – TIAFT 2002, Paris, August 26-30.