

Antidiabétique : Metformine et guanylurée

Liste de vigilance 2024 : metformine et guanylurée

Méthode d'analyse dans les eaux - fraction dissoute

| | |
|---|---|
| Généralités..... | 2 |
| Protocole analytique..... | 3 |
| — Prétraitement..... | 3 |
| — Analyse..... | 4 |
| Références de la méthode..... | 6 |
| Paramètres de validation de la méthode..... | 6 |
| Contacts..... | 8 |

AVERTISSEMENT : Il convient que l'utilisateur de cette méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Cette méthode n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur. Certains des solvants utilisés dans le mode opératoire sont toxiques et dangereux. Les manipuler avec précaution.

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

Généralités

▪ Nom de la famille de substances

Antidiabétique : metformine et son produit de dégradation guanylurée

▪ Nom des substances individuelles

Metformine Guanylurée

▪ Code SANDRE des substances individuelles

Metformine [6755] Guanylurée [7898]

▪ Matrice analysée

Eau [3] :

- Eau douce de surface
- Eau souterraine

▪ Principe de la méthode

Injection directe après filtration et analyse par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle avec une ionisation électrospray en mode positif.

La metformine et son produit de dégradation guanylurée sont des composés très polaires (Log D de -4 et -5.7, respectivement) et vont donc se trouver dans la phase aqueuse des eaux. La limite maximale de quantification mentionnée dans la liste de vigilance, 100 µg/L, n'est pas contraignante.

L'injection directe a donc été envisagée pour développer la méthode d'analyse. Des essais ont montré que ces composés ne sont pas retenus sur la phase des cartouches d'extraction HLB.

L'avis du 19/10/19 relatif aux limites de quantification des couples « paramètre-matrice » de l'agrément des laboratoires mentionne une LQ de 50 ng/L pour la metformine en eau douce. Pour améliorer la LQ de cette méthode, une étape de concentration sur cartouche d'échange cationique pourrait être envisagée comme mentionnée dans la littérature (Scheurer et al., 2012 ; doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.019).

▪ Acronyme : ID/LC/MSMS

▪ Domaine d'application

100 à 5000 ng/L

La méthode est validée jusqu'à un seuil de 50 mg/L de matière en suspension (MES) et de 7 mg/L de carbone organique dissous (COD).

▪ Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse

/

▪ Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode

Lors de l'analyse de l'eau, la présence de MES est un facteur limitant par rapport au mode d'injection directe ; les échantillons sont donc filtrés avant analyse.

▪ Interférents (préciser la matrice)

- Interférents identifiés : pas d'interférents identifiés lors des essais de validation
- Matrices testées : eaux de surface

NB : Pour l'ensemble des composés de la liste de vigilance 2024, consulter les fiches suivantes : MA88-2 (avobenzone, azoxystrobine, benzophénone-3, diflufénican et octocrylène), MA88-3 (azoxystrobine, clindamycine, clotrimazole, o-desméthylvenlafaxine, diflufénican, dimoxystrobine, fipronil, fluconazole, metconazole, miconazole, octocrylène, ofloxacine, penconazole, prochloraze, tébuconazole, tétraconazole, triméthoprime, venlafaxine), MA85-1 (sulfaméthoxazole, clotrimazole, fluconazole, imazalil, ipconazole, metconazole, miconazole, penconazole, prochloraze, tébuconazole, tétraconazole, dimoxystrobine) et MA85-2 (clotrimazole, dimoxystrobine, famoxadone, fluconazole, imazalil, ipconazole, metconazole, miconazole, penconazole, prochloraze, tébuconazole et tétraconazole).

Protocole analytique

— Prétraitement

▪ Fraction analysée

Eau :

- Phase dissoute

▪ Conditionnement et conservation des échantillons

En respect des recommandations du JRC ISPRA pour la mise en œuvre de la Watch List au niveau des Etats Membres et des décisions prises au niveau national, aucune spécification de conditionnement/stabilisation n'a été mise en place. Cependant, une étude de stabilité a été réalisée.

| Protocole

Les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4 ± 2 °C.

L'étape de filtration a lieu au moment de l'analyse, après ajout des étalons internes.

| Nature du contenant de stockage

Verre ambré (certifié EPA) ou protégé de la lumière par une feuille d'aluminium, avec bouchons à vis à revêtement de PTFE (polytétrafluoroéthylène).

| Lavage du contenant

Contenant neuf à usage unique.

| Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température...)

La metformine et le guanylurée sont stables 20 jours à 4 °C ou à -18 °C.

L'étude de la stabilité a été réalisée avec une eau superficielle naturelle (Loiret ; MES = 5 mg/L, COT = 4,4 mg/L) dopée à 5000 ng/L avec les 2 composés, et conservée à 4 °C et -18 °C pendant 20 jours. Des triplicats ont été préparés pour toutes les conditions de conservation. La stabilité est vérifiée en comparant les concentrations à 20 jours à la concentration mesurée initialement, en prenant en compte l'incertitude de la méthode (le

critère d'instabilité maximale acceptable est de 10 % pour metformine et de 20 % pour guanylurée).

Des essais complémentaires avec 3 eaux superficielles (cours d'eaux ; MES de 2,6 à 17,3 mg/L et COT de 5,2 à 5,8 mg/L) conservées à 4 °C et analysés après 20 jours ne montrent aucune dégradation des composés.

▪ Filtration

Après l'ajout des étalons internes, filtrer 10 mL d'échantillon sur filtre seringue en éliminant les premiers mL puis récupérer le filtrat (8-9 mL environ) dans un flacon de 20 mL.

| Type de filtre et méthode de nettoyage

Filtre seringue CA 0,2 µm à usage unique.

— Analyse

▪ Volume ou masse de la prise d'essai

Eau :

- Eau douce surface 10 mL
- Eau souterraine 10 mL

▪ Réactifs

- Acétonitrile, méthanol et eau, de qualité HPLC/MS/MS.
- Hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) en solution à 35 %, de qualité HPLC.
- Acide formique de qualité LCMS.

▪ Extraction

| Injection directe

Prélever 1 mL de l'échantillon filtré, transférer dans un vial de 2 mL et ajouter 10 µL de NH₄OH à 10 % avant analyse.

▪ Conservation de l'extrait

L'échantillon préparé peut être conservé 2 jours à 4 ± 2 °C (délai supérieur non vérifié).

▪ Volume ou masse finale avant analyse

1,01 mL (échantillon + 10 µL de NH₄OH à 10 %)

▪ Méthode analytique utilisée

- Chromatographie :

Colonne Force Biphényl Restek (10 cm x 2,1 mm x 1,8 µm ; Waters), thermostatée à 40 °C.

Volume d'injection : 5 µL

Echantillon maintenu à 10 °C sur le passeur d'échantillons

Phase mobile :

Voie A : Eau avec 0,1 % d'acide formique (v/v)

Voie B : Acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique (v/v)

Débit : 0,3 mL/min

| Temps (min) | % A | % B |
|-------------|-----|-----|
| 0 | 100 | 0 |
| 2 | 100 | 0 |
| 6 | 0 | 100 |
| 7 | 0 | 100 |
| 7,1 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 0 |

- Spectrométrie de masse :

Mode d'ionisation : ionisation électrospray, mode positif (ESI+)

Capillaire = 3,5 KV

Température du tube de transfert d'ions = 325 °C

Température de vaporisation = 350 °C

Sheath Gas (Arb) : 50

Aux Gas (Arb) = 10

Sweep Gas (Arb) = 1

Débit gaz de désolvatation = 1100 L/h

Débit gaz du cône = 150 L/h

Nébuliseur = 7 Bar

Q1 résolution (FWHM) = 0,7

Q3 résolution (FWHM) = 1,2

CID gas = 1,5 mTorr

Tableau des ions utilisés en spectrométrie de masse, temps de rétention et conditions d'ionisation et de fragmentation :

| Compound | Tr (min) | Polarity | Q/q | Precursor (m/z) | Product (m/z) | Collision Energy (V) | RF Lens (V) |
|-----------------|----------|----------|-----|-----------------|---------------|----------------------|-------------|
| Guanyluree | 0,90 | Positive | Q | 102.9 | 59.9 | 13 | 30 |
| | | | q | 102.9 | 42.9 | 23 | 30 |
| Guanyluree 15N4 | 0,90 | Positive | Q | 106.9 | 62.9 | 13 | 30 |
| | | | q | 106.9 | 44.9 | 32 | 30 |
| Metformine | 1,38 | Positive | Q | 130.0 | 59.9 | 14 | 30 |
| | | | q | 130.0 | 84.9 | 16 | 30 |
| Metformine D6 | 1,33 | Positive | Q | 136.1 | 59.9 | 15 | 31 |
| | | | q | 136.1 | 84.9 | 17 | 31 |

▪ Equipements¹ (modèles utilisés)

- Chromatographe UPLC Vanquish (Thermo Scientific)

- Spectromètre de masse en tandem (triple quadripôle) Altis Plus® (Thermo Scientific) en mode SRM (Selected Reaction Monitoring).

▪ Type d'étalonnage

Interne

▪ Modèle utilisé

Linéaire pondéré en 1/x

▪ Etalons / Traceurs utilisés

L'isotope marqué est utilisé comme étalon interne pour chaque composé : Metformine D₆ et Guanylurée ¹⁵N₄.

Une solution avec les 2 étalons internes est préparée à 50 µg/L dans l'eau. Un volume est ajouté dans l'échantillon d'eau avant filtration, avec un ratio de 1/100 (solution/eau, v/v) soit une teneur finale pour chaque étalon interne à 500 ng/L.

¹ Les matériels cités ici constituent des exemples d'application satisfaisante. Ces mentions ne constituent pas une recommandation exclusive, ni un engagement quelconque de la part du rédacteur ou d'AQUAREF

- **Domaine de concentration**

Etalonnage de 50 à 5000 ng/L

- **Méthodes de calcul des résultats**

Des contrôles qualité, blancs et échantillons dopés sont mis en œuvre à chaque série d'analyses.

| Rendement :

- Les étalons internes marqués permettent de corriger les concentrations mesurées en tenant compte du rendement.

| Blancs matrice :

- Matrice utilisée : eau HPLC
- Soustraction du blanc : non, il doit être inférieur à la limite de détection

Références de la méthode

- **La méthode est dérivée de la publication suivante**

/

- **Norme dont est tirée la méthode**

/

- **Niveau de validation selon Norman**

Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

- **Norme utilisée**

Protocole de validation adapté de NF T 90-210 (2018)

- **Domaine de validation**

100 à 5000 ng/L

- **Matériaux de référence utilisés**

Pas de matériau de référence

- **Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)**

Eau HPLC, concentration inférieure à la limite de détection

- **Rendement**

L'étude de rendement (ou taux de recouvrement) est réalisée dans des conditions de fidélité intermédiaire avec 3 eaux dopées chacune à trois niveaux de concentration (100, 300 et 5000 ng/L) en triplicat (3 eaux × 3 niveaux × 3 réplicats).

Les eaux utilisées sont préparées à partir de l'eau d'Evian ® :

- Evian ®
- Evian ® avec ajout de 3 mg/L de COD
- Evian ® avec ajout de 7 mg/L de COD et 50 mg/L de MES

Les 3 eaux sont analysées indépendamment sur 3 jours différents. Les rendements relatifs correspondent aux rendements corrigés à l'aide des étalons internes.

| Par type de matrice :

Rendement pour les eaux de surface :

| Substances | [C] (ng/L) | R moyen (n = 9) et écart-type (%) | [C] (ng/L) | R moyen (n = 9) et écart-type (%) | [C] (ng/L) | R moyen (n = 9) et écart-type (%) |
|------------|------------|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|
| Metformine | 100 | 101 ± 2 | 300 | 100 ± 7 | 5000 | 89 ± 3 |
| Guanylylée | 100 | 99 ± 4 | 300 | 104 ± 5 | 5000 | 98 ± 5 |

▪ **Limite de quantification (LQ) et limite de détection (LD)**

La limite de quantification a été vérifiée par dopage dans 3 eaux, en triplicat (voir rendement).

LQ = 100 ng/L pour chaque composé.

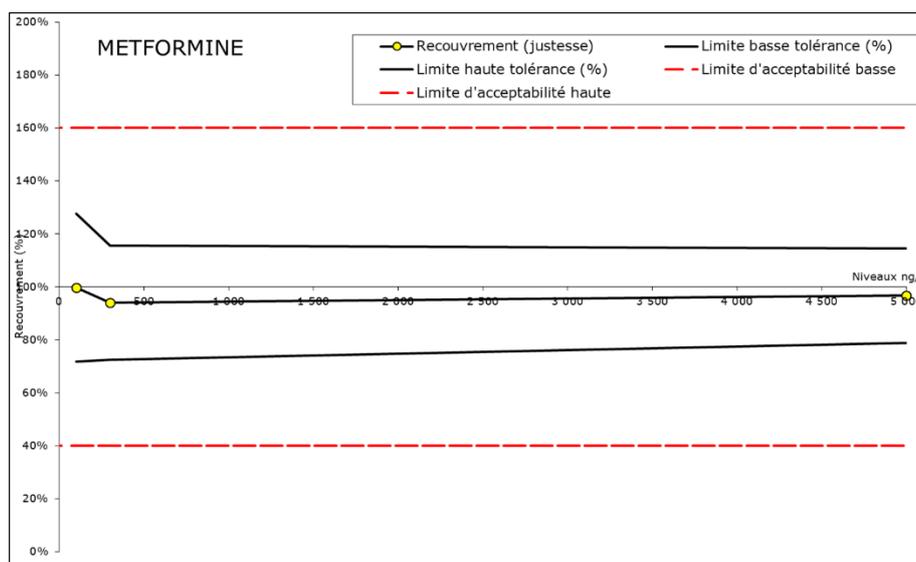
▪ **Incertitudes (%) sur les résultats**

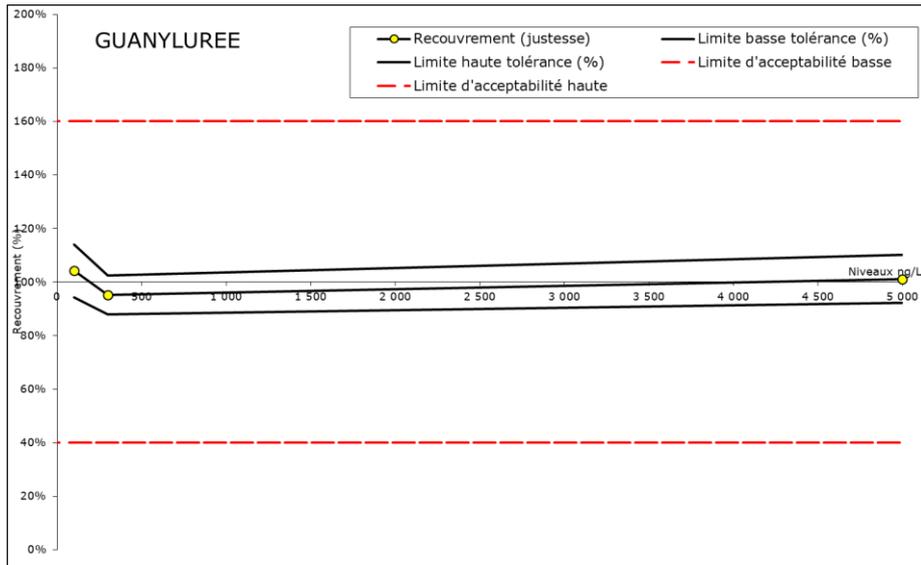
L'évaluation de l'incertitude est effectuée en utilisant la norme ISO 11352, lors de l'étude de rendement (ajout des composés dans 3 eaux avec réalisation de trois réplicats pendant 3 jours différents à 3 niveaux de concentration). Elle prend en compte l'incertitude liée au biais et l'incertitude liée à la fidélité, ainsi qu'une composante liée à l'étude de stabilité pour le guanylylée.

Facteur d'élargissement : k = 2

| | Incertitudes (%) (n = 9) | | |
|------------|--------------------------|----------|-----------|
| | 100 ng/L | 300 ng/L | 5000 ng/L |
| Metformine | 25 | 25 | 20 |
| Guanylylée | 20 | 20 | 20 |

Profil d'exactitude :





Contacts

- **Auteur**

Sébastien BRISTEAU (BRGM)

- **Contact**

s.bristeau@brgm.fr

- **Partenaire**

LNE