

Master en Pharmacie

Travail Personnel de Recherche

Mise en place d'une seringue prête à l'emploi d'acétylcholine pour les tests de provocation des spasmes des artères coronaires

présenté à la

Faculté des sciences de
L'Université de Genève

par

Mehmeti Jeta

**Unité de recherche
Pharmacie centrale du CHUV**

**Directeur de l'unité :
Prof. Farshid Sadeghipour**

**Feka Alma
Dr Julian Pezzatti
Dr Laurent Carrez
William Bello**

Genève
Année académique 2023-2024

Remerciements

Pour commencer, je souhaiterais remercier le Professeur Farshid Sadeghipour, Pharmacien-Chef du service de la pharmacie du CHUV, pour son accueil au sein de son équipe et pour l'opportunité que représente ce travail de master.

Je souhaite tout particulièrement remercier le Docteur Julian Pezzatti pour sa disponibilité et ses précieux conseils tout au long de ce travail de recherche et ce jusqu'à la fin.

Je remercie la pharmacienne Alma Feka de m'avoir accompagnée pendant mes recherches, pour ses corrections et ses retours pertinents sur mon travail et ma rédaction.

Je remercie le Doctorant William Bello pour m'avoir introduit aux concepts statistiques de la validation avec beaucoup de passion.

Je remercie le Docteur Laurent Carrez, pharmacien responsable de l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV, pour sa supervision.

Je remercie le Docteur Stéphane Fournier, spécialiste en cardiologie au CHUV, pour le temps accordé à mes questions sur la partie clinique.

Je tiens à remercier toute l'équipe de la pharmacie centrale du CHUV pour leur accueil, l'équipe de production, le laboratoire de contrôle qualité, ainsi que la pharmacie clinique.

Pour finir, je ne saurais terminer ces remerciements sans un mot pour mes proches, ma famille, mes amis et toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin durant cette période. Merci à ma maman pour tous les repas que je n'ai pas eu besoin de préparer.

Merci tout particulièrement à Majda et Bilel, pour les longues discussions sur le sujet, votre aide, vos mots encourageants et vos sourires.

Résumé

Introduction

L'injection intracoronaire d'acétylcholine est utilisée dans les tests de provocation de spasmes des artères coronaires afin de diagnostiquer l'angine vasospastique. Puisque l'acétylcholine se dégrade très rapidement, les dilutions en production sont effectuées le jour-même de l'intervention, ceci pouvant mener à des erreurs de dosages et des difficultés de planification. Le but de cette étude est d'investiguer la stabilité du chlorure d'acétylcholine, afin de produire des seringues prêtes à l'emploi qui pourront être préparées en avance et en toute sécurité à la pharmacie centrale. Pour ce faire, la validation d'une méthode analytique, développée pour mener une étude de stabilité de l'acétylcholine dans des seringues prêtes à l'emploi, a été menée.

Matériels et méthodes

La dégradation forcée est effectuée afin de déterminer les produits de dégradation de l'acétylcholine. Les paramètres étudiés sont : les effets de l'oxydation, du pH et de la température. Ces échantillons sont stockés à 60°C. Un échantillon est stocké à température ambiante. Des échantillons de contrôle sont produits pour chaque condition.

La validation de la méthode est réalisée afin de démontrer que la méthode analytique choisie convient pour quantifier et identifier l'acétylcholine. Une droite d'étalonnage est réalisée, à l'aide de substances de référence dont la concentration exacte est connue. Puis, la concentration des échantillons d'ACh préparés à partir de Miochol® E est calculée à l'aide de la droite d'étalonnage. Les valeurs obtenues sont comparées avec les valeurs dites vraies. Pour pallier un effet de matrice, un standard interne deutéré est utilisé.

L'appareil utilisé pour ces deux études est un instrument de chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à un détecteur spectromètre de masse à haute résolution (UHPLC-HRMS). La technique de chromatographie employée est la chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC).

Résultats et discussion

L'étude de dégradation forcée montre que l'acétylcholine en solution aqueuse est immédiatement et entièrement dégradée en condition basique, et rapidement dégradée en condition acide et oxydative. À température ambiante ainsi qu'à 60°C, l'acétylcholine est bien plus stable, ne se dégradant que d'environ 20% après une période de 6 jours. Ces résultats sont encourageants et suggèrent une stabilité de quelques jours de l'acétylcholine en solution. Cette étude de dégradation accélérée a permis de mettre en évidence un produit de la dégradation de l'acétylcholine, à savoir la choline. La formation de choline dans les conditions accélérées semble proportionnelle à la dégradation de l'acétylcholine, suggérant qu'aucun autre produit de dégradation n'est formé.

La méthode développée a été validée, selon les recommandations ICH, de la FDA et SFSTP. Elle pourra être utilisée pour quantifier des échantillons d'acétylcholine pour des dosages supérieurs à 2.977 ng/mL, avec une limite d'acceptabilité de $\pm 30\%$.

Conclusion et perspective

Selon les résultats de l'étude de dégradation forcée, il semblerait que l'acétylcholine soit suffisamment stable pour étudier sa stabilité sur plusieurs jours. La méthode analytique développée pour cette étude a été validée. Le stockage dans des seringues prêtes à l'emploi permettrait de procéder systématiquement à un contrôle de qualité du produit, améliorant ainsi la prise en charge des patients soumis au test de provocation à l'acétylcholine.

Liste des abréviations

ACh : Acétylcholine

ACN : Acétonitrile

AGC : Automatic gain control

CHUV : Centre hospitalier universitaire vaudois

EMA : Agence Européenne du médicament

ESI : Ionisation par électrobuliseur

FDA : Food and Drug Administration

GC : Chromatographie en phase gazeuse

HESI-II : Ionisation par électrospray à chaud

HILIC : Chromatographie liquide à réaction hydrophile

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution

ICH : Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée

LC : Chromatographie liquide

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

MINOCA : Infarctus du myocarde sans maladie coronarienne obstructive

MS : Spectrométrie de masse

Ph. Eu. : Pharmacopée Européenne

PRM : Parallel reaction monitoring

RPLC : Chromatographie liquide en phase inverse

SI : Standard interne

UHPLC : Chromatographie liquide ultra-haute performance

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
1.1. MINOCA et spasmes coronariens	1
1.1.1. Physiopathologie	2
1.1.1.1. Pathogénèse	2
1.1.1.2. Symptômes et manifestations cliniques	2
1.1.2. Facteurs de risques.....	3
1.1.3. Prise en charge thérapeutique	3
1.1.3.1. Traitements pharmacologiques	3
1.1.3.2. Traitement non-pharmacologique.....	3
1.2. Test de provocation à l'acétylcholine	3
1.2.1. Molécule.....	4
1.2.2. Critères d'indication	4
1.2.3. Contre-indications et complications.....	4
1.2.4. Méthode.....	5
1.2.5. Lecture des résultats	5
1.3. Objectif de l'étude	6
1.3.1. Validation de la méthode analytique et étude de stabilité	6
1.3.2. Connaissances actuelles	6
1.3.3. Enjeux actuels.....	7
1.3.3.1. Production	7
1.3.3.2. Erreurs de production.....	7
1.3.3.3. Impact pour le patient	7
1.3.3.4. Intérêt des seringues prêtes à l'emploi	8
1.4. Méthode analytique	8
1.4.1. Chromatographie liquide ultra-haute performance.....	8
1.4.2. Spectrométrie de masse à haute-résolution	8
1.4.1. Dégradation forcée.....	9
1.4.1.1. Conditions de stress.....	9
1.4.1.2. Analyse des échantillons.....	9
1.4.1.3. Implications pour le test de provocation à l'ACh	9
1.4.2. Validation de la méthode	10
1.4.2.1. Droite d'étalonnage	10
1.4.2.2. Effet matrice	10
1.4.3. Étude de stabilité.....	10
1.4.4. Exigences réglementaires.....	10
2. MATÉRIELS ET INSTRUMENTS.....	12
2.1. UHPLC.....	12
2.2. HRMS.....	12
2.3. Substances de référence	12
2.4. Solvants.....	12
3. MÉTHODE	14
3.1. Dégradation forcée	14
3.1.1. Dégradation acide	14
3.1.2. Dégradation basique	14
3.1.3. Dégradation oxydative	14
3.1.4. Dégradation thermique.....	14
3.2. Validation de la méthode.....	14
3.2.1. Effet de matrice.....	14

3.2.2.	Standard d'étalonnage	15
3.2.3.	Échantillons de validation.....	15
4.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	16
4.1.	Dégradation forcée	16
4.1.1.	Séparation par UHPLC	16
4.1.3.	Évaluation des échantillons dans les différentes conditions de dégradation forcée	17
4.2.	Validation de la méthode.....	19
4.2.1.	Standard interne deutéré.....	19
4.2.2.	Fonction de réponse.....	21
4.2.3.	Justesse	22
4.2.4.	Fidélité.....	22
4.2.5.	LOD, LOQ.....	23
4.2.6.	Exactitude.....	23
4.2.7.	Limitations.....	24
4.2.7.1.	Droite d'étalonnage en 5 points	24
4.3.	Étude de stabilité.....	25
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	26
5.1.	Conclusion	26
5.2.	Perspective : plan d'étude de stabilité	26
5.2.1.	Points temporels	26
5.2.2.	Conditions de stockage	26
5.2.4.	Test de stabilité	27
5.2.4.1.	Aspect	27
5.2.4.2.	Particules visibles.....	27
5.2.4.3.	pH.....	27
5.2.4.4.	Concentration en ACh.....	27
5.2.4.5.	Concentration en produits de dégradation	27
5.2.4.6.	Stérilité : particules non-visibles	27
5.2.4.7.	Stabilité microbiologique	27
5.2.5.	Production	27
6.	BIBLIOGRAPHIE	29
7.	ANNEXES.....	31
7.1.	Annexe 1 : Protocole de dégradation forcée.....	31
7.2.	Annexe 2 : Protocole de validation de méthode	37
7.3.	Annexe 3 : Résultats de fonction de réponse.....	44
7.4.	Annexe 4 : Résultats de justesse	47
7.5.	Annexe 5 : Résultats de fidélité.....	49
7.6.	Annexe 6 : Résultats de l'exactitude.....	52
7.7.	Annexe 7 : Protocole de production des seringues (1 lot).....	55

Table des figures

Figure 1 : Structure chimique de l'acétylcholine (11)	4
Figure 3 : Chromatogramme dégradation forcée, échantillon ACh, H ₂ O ₂ 3%, J0.....	16
Figure 4 : Chromatogramme dégradation forcée, échantillon de contrôle, H ₂ O ₂ 3%, J0.....	16
Figure 5 : Chromatogramme dégradation forcée, échantillon ACh, H ₂ O ₂ 3%, J6.....	17
Figure 6 : Spectre HRMS dégradation forcée ACh, H ₂ O ₂ 3%, T6	17
Figure 7 : Spectre HRMS dégradation forcée Choline, H ₂ O ₂ 3%, T6	17
Figure 8 : Dégradation forcée de l'ACh (acide, base, oxydant, température) en aire par jour.....	18
Figure 9 : Dégradation forcée de l'ACh (acide, base, oxydant, température) mesurée en quantité restante d'ACh par jour	18
Figure 10 : Dégradation en choline (acide, base, oxydant, température) en aire par jour.....	18
Figure 11 : Chromatogramme ACh standard 25 ng/mL.....	19
Figure 12 : Chromatogramme Ach-d4 10 ng/mL	20
Figure 13 : Spectre HRMS ACh standard 25 ng/mL.....	20
Figure 14 : Spectre HRMS Ach-d4 10 ng/mL	21
Figure 15 : Droite d'étalonnage.....	22
Figure 16 : Profil relatif d'exactitude.....	23
Figure 17 : Profil absolu d'exactitude.....	24
Figure 18 : Profil relatif d'exactitude.....	25
Figure 19 : Profil absolu d'exactitude.....	25

Table des tableaux

Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse	12
Tableau 2 : Substances de référence	12
Tableau 3 : Solvants	13
Tableau 4 : Droite d'étalonnage par série.....	21
Tableau 5 : Justesse.....	22
Tableau 6 : Répétabilité et fidélité intermédiaire.....	22

1. INTRODUCTION

Les tests de provocation à l'acétylcholine jouent un rôle crucial dans le diagnostic de l'angine vasospastique et visent à induire délibérément des spasmes dans les artères coronaires. Cette introduction pose les fondations essentielles du sujet en explorant en premier lieu les caractéristiques de l'angine vasospastique, une entité pathologique complexe au sein des syndromes coronariens aigus et plus particulièrement dans le contexte des infarctus du myocarde sans maladie coronarienne obstructive (MINOCA). Elle établit le cadre nécessaire pour comprendre l'importance des tests de provocation à l'acétylcholine, dont la méthodologie sera présentée. Cependant, le cœur de cette étude réside dans la validation d'une méthode analytique, conçue pour mener une étude de stabilité de l'acétylcholine dans des seringues prêtes à l'emploi. Les objectifs de cette étude et ses implications viendront conclure cette introduction.

1.1. MINOCA et spasmes coronariens

L'angine de poitrine (ou angor) est une pathologie centrale dans les maladies coronariennes. Sa forme la plus commune est l'angine de poitrine stable, déclenchée par l'effort. Les patients atteints d'angine de poitrine ressentent généralement des douleurs ou une gêne dans la poitrine pendant une courte durée. Ces douleurs sont dues à une ischémie myocardique, c'est-à-dire une réduction de l'apport sanguin et donc d'oxygène au muscle cardiaque. Cette diminution du flux sanguin peut évoluer en infarctus du myocarde (nécrose des tissus myocardiques due à une ischémie prolongée) (1–3). Lorsqu'un patient présente un infarctus du myocarde ou des symptômes d'angor, une angiographie coronarienne est effectuée afin d'investiguer le niveau d'obstruction dans les artères coronaires. En effet, le rétrécissement des artères coronaires qui provoque l'angor est généralement dû à l'athérosclérose (2). Cependant, environ 6% des patients victimes d'infarctus du myocarde ne présentent pas d'obstruction fixe significative dans les coronaires épicaudiques ($\geq 50\%$ d'obstruction). Ces situations sont identifiées sous l'appellation de MINOCA, désignant les infarctus du myocarde sans maladie coronarienne obstructive (4). Le sujet n'a été approfondi et étudié que depuis peu, en effet, la première mention du terme MINOCA dans une étude date de 2013. Cet intérêt pour le sujet a permis de constater que les patients atteints de MINOCA étaient en fait associés à un risque élevé d'événements cardiovasculaires et une mortalité plus élevée (5).

Les MINOCA regroupent plusieurs pathologies et sont subdivisés en quatre catégories (5) :

- 1) Processus dans les vaisseaux coronariens épicaudiques : angine vasospastique, rupture/fissure d'une petite plaque non significative d'athérosclérose, dissection spontanée des artères coronaires, thrombose in situ.
- 2) Maladie coronarienne microvasculaire.
- 3) Augmentation de la demande en oxygène ou réduction de l'approvisionnement en oxygène.
- 4) Mécanismes inconnus.

De ce fait, l'angine vasospastique fait partie des MINOCA. Cette forme d'angor est à différencier de l'angor stable. Comme expliqué précédemment, l'angor stable est dû à une obstruction dans les artères coronaires, tandis que l'angine vasospastique ne l'est pas. Le rétrécissement des artères coronaires dans l'angine vasospastique est, quant à lui, causé par un spasme coronarien. Les cas de spasmes coronariens représentent 3.7% à 72.6% des cas de MINOCA, avec une grande variabilité parmi les rapports (4). Les spasmes coronariens sont des phénomènes hétérogènes, qui peuvent avoir lieu chez des patients avec ou sans athérosclérose, peuvent être diffus ou focaux et peuvent affecter les artères coronaires épicaudiques ou la circulation coronarienne microvasculaire. Dans ce dernier cas, l'angine est plus précisément nommée angine microvasculaire. Dans une étude prospective, parmi les patients avec symptômes angineux, 62% présentaient des spasmes coronariens, dont 45% étaient épicaudiques et 55% étaient microvasculaires (6). La caractéristique principale de l'angor vasospastique est une angine au repos qui s'améliore rapidement dès l'administration

d'anticalciques ainsi que de nitrates à courte durée d'action (7). Elle était initialement appelée angor de Prinzmetal, une dénomination désormais désuète, et plus récemment remplacés par les termes angor vasospastique, spastique ou variante (2,7). Les complications des spasmes coronariens sont un infarctus du myocarde, une arythmie potentiellement mortelle, un bloc atrioventriculaire ou une mort subite (6).

1.1.1. Physiopathologie

1.1.1.1. Pathogénèse

La régulation du flux sanguin dans les artères coronaires est médiée par des agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Les spasmes coronariens surviennent lors d'une vasoconstriction anormale. La pathogénèse de l'angine vasospastique ou microvasculaire n'a pas été totalement élucidée, cependant plusieurs mécanismes ont été proposés.

Tout d'abord, il existerait chez les patients atteints de spasmes coronariens une hyperréactivité des cellules du muscle lisse vasculaire. Ce phénomène est médié par la voie RhoA/Rho-kinase, et cause une sensibilisation du calcium face aux stimuli vasoconstricteurs. Cette sensibilisation induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, qui provoque une hypercontraction du muscle lisse vasculaire, c'est-à-dire un spasme coronarien (6).

Une dysfonction endothéliale est aussi une hypothèse de mécanisme d'action. L'endothélium régule la tonicité des vaisseaux coronariens, en relâchant plusieurs molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Il semble que l'endothélium relâche moins d'oxyde nitrique (NO) chez ces patients qu'à l'état normal, et les tissus myocardiques sont donc sensibles à la vasoconstriction (6).

Le spasme coronarien réduit le flux sanguin coronaire et peut conduire à une ischémie du myocarde. Il augmente aussi la coagulation, réduit l'activité fibrinolytique, promeut l'activation des plaquettes et la libération de molécules d'adhésion ce qui conduit à un état thrombogénique (4).

Les autres hypothèses incluent une carence en magnésium, une inflammation de faible intensité, une suractivité du système nerveux sympathique et parasympathique, une augmentation du stress oxydatif et des polymorphismes génétiques (6).

1.1.1.2. Symptômes et manifestations cliniques

Les symptômes d'angor sont ressentis par le patient comme un inconfort dans la poitrine, proche du sternum, et peut être localisé de l'épigastre à la mâchoire inférieure, aux dents, ainsi qu'entre les omoplates, dans le bras jusqu'au poignet et aux doigts. Le patient décrit cet inconfort comme une pression, une sensation de lourdeur, une constriction ou une brûlure. Certains patients évoquent uniquement une gêne et non une douleur à proprement parler. Ces symptômes sont de durée brève, de quelques minutes seulement, et peuvent être accompagnés de sueurs froides, nausées et parfois de malaises (4,6,8).

La nette différence entre une angine stable et l'angine vasospastique réside sur le moment de l'épisode. En effet, les spasmes coronariens ont lieu généralement au repos. Les symptômes peuvent suivre un rythme circadien et apparaissent préférentiellement la nuit ou le matin (6,7). Une différence de symptômes entre un spasme épicaudique ou microvasculaire n'est pas établie (8).

Durant un spasme coronarien, les patients atteints d'angine vasospastique peuvent présenter des électrocardiogrammes (ECG) variés : sus-décalage du segment ST, sous-décalage du segment ST, inversion de l'onde T ou aucune anomalie manifeste (5). L'angiographie peut révéler la présence ou non de sténoses coronariennes, qu'elles soient significatives ou non.

Le patient ne montre généralement pas de spasmes spontanés durant la consultation, c'est pourquoi il est crucial de procéder à un test de provocation de spasmes à l'acétylcholine afin d'avoir des données pertinentes à l'ECG ou par angiographie (7). Ce test est détaillé dans le sous-chapitre 1.2.

1.1.2. Facteurs de risques

Le tabac est un facteur de risque prédisposant à l'angine vasospastique, tandis que le diabète et l'hypertension ne le sont pas. Le rôle d'une dyslipidémie n'a pas encore été éclaircie (7). En termes d'ethnicité, il semble que la prévalence de l'angine vasospastique soit plus fréquente dans la population asiatique (6). Cependant, selon les plus récentes guidelines japonaises, une étude a mis en évidence que la population caucasienne obtenait plus souvent un résultat positif lors du test de provocation à l'acétylcholine. Il serait donc communément accepté qu'il n'y ait pas de différences raciales dans la fréquence des spasmes coronariens (4). Les patients atteints d'angine vasospastique sont souvent plus jeunes que les patients ayant un angor stable, et présentent moins de facteurs de risques cardiovasculaires (8). Les femmes sont plus souvent touchées que les hommes par les spasmes microvasculaires aux États-Unis et en Europe. La combinaison de spasmes épicaudiques et microvasculaires touche aussi plus souvent les femmes (4).

1.1.3. Prise en charge thérapeutique

1.1.3.1. Traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques sont composés principalement d'anticalciques et de nitrates. Plusieurs études ont démontré l'efficacité des anticalciques dans la réduction de la fréquence des douleurs, ils sont donc la première ligne de traitement. Les anticalciques dihydropyridines (nifédipine, amlodipine, etc.) sont préférables, puisque les non-dihydropyridines (vérapamil, diltiazem) causent plus d'effets indésirables. La combinaison de deux anticalciques n'a pas été étudiée. Les nitrates ont prouvé leur efficacité à réduire la fréquence des angines par plusieurs études, en combinaison avec des anticalciques ou seuls. L'administration d'aspirine est actuellement débattue. Les statines, les antagonistes α -adrénergiques, les inhibiteurs rho-kinase ainsi que le nicorandil ne sont pas recommandés en première ligne, mais pourraient potentiellement être utiles en cas d'angine vasospastique réfractaire (6). Les β -bloquants ne doivent pas être utilisés chez les patients présentant des spasmes épicaudiques, puisqu'ils peuvent induire des spasmes (4).

1.1.3.2. Traitement non-pharmacologique

Il est recommandé de pratiquer un exercice physique modéré à intense pendant 30 minutes 3 fois par semaine, préférablement tous les jours (4). Il est également fortement conseillé d'arrêter de fumer (6).

Les patients doivent de plus éviter les facteurs précipitants tels que : le stress, les carences en magnésium, la consommation d'alcool, les β -bloquants, les agents sympathomimétiques et parasymphomimétiques (6).

1.2. Test de provocation à l'acétylcholine

Le but du test de provocation à l'acétylcholine est de confirmer ou exclure la présence d'un spasme coronarien chez les patients avec des douleurs à la poitrine qui ne montrent pas de sténose coronarienne significative (4).

L'acétylcholine (ACh) est un agoniste non-sélectif des récepteurs muscariniques. Au niveau de l'endothélium, la liaison de l'ACh à ces récepteurs induit une vasodilatation, tandis qu'elle induit une vasoconstriction au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. La réponse physiologique nette dépend de l'état de l'endothélium et de la réactivité des cellules musculaires lisses vasculaires (9).

En 1972, le premier test de provocation de spasmes coronariens dans le monde a été effectué par injection intraveineuse d'ergonovine pendant un cathétérisme cardiaque. En 1974, un analogue de l'ACh est utilisé et provoque un spasme chez un patient atteint d'angor de Prinzmetal. Puis, une étude rapporte que l'injection intracoronaire d'ACh provoque un spasme coronaire chez un patient atteint d'angine variante. En 1987, l'injection intracoronaire a été jugée plus efficace que par administration intraveineuse. En 1988, l'efficacité de l'ACh est prouvée. Ainsi, le test de provocation par injection intracoronaire d'ACh devient le gold standard pour induire des spasmes coronaires. La sensibilité et spécificité du test de provocation à l'ACh sont très hautes, respectivement de 90% et 99% (7).

Ce test est surtout utilisé en Asie, et très peu en dehors, sauf dans quelques centres spécialisés (10). En effet, il est important d'effectuer ce test dans un environnement contrôlé avec du personnel médical expérimenté, en raison du potentiel risque d'induire des événements cardiaques graves. La production de la solution d'ACh injectable est donc effectuée dans la pharmacie hospitalière et l'administration se fait généralement dans un laboratoire de cathétérisme cardiaque.

Les guidelines actuelles du test de provocation à l'acétylcholine sont définies par l'European Society of Cardiology (ESC), publiée en 2015 (7), ainsi que par Japanese Circulation Society (JCS), dont la dernière édition a été publiée en 2023 (4).

1.2.1. Molécule

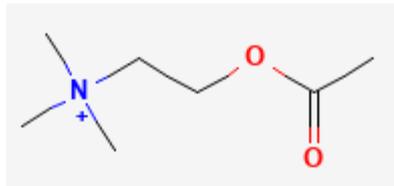


Figure 1 : Structure chimique de l'acétylcholine (11)

L'acétylcholine est un ester composé d'un acide acétique et d'une choline. Cette liaison ester est sujette à la dégradation en milieu aqueux. Son nom IUPAC est 2-acétyloxyethyl(triméthyl)azanium. Sa formule chimique est $C_7H_{16}NO_2^+$. Sa masse molaire est de 146.21 g/mol (11).

L'ACh est disponible sous forme chlorure. Il s'agit d'une poudre blanche cristallisée, extrêmement hygroscopique. Elle est très soluble dans l'eau et soluble dans l'éthanol. Sa stabilité dans l'eau n'est pas indiquée par la Ph. Eu. (12). Sa constante de dissociation acide (pKa) est de -7 et son log(P) de -2.9 (13).

1.2.2. Critères d'indication

Les critères d'indication au test de provocation sont les suivantes (4) :

- Forte indication : patients chez lesquels une angine vasospastique est suspectée sur la base des symptômes mais pas diagnostiquée à l'aide de méthodes non-invasives
- Bonne indication : patients chez lesquels un diagnostic a été posé à l'aide de méthodes non-invasives et pour lesquels les traitements thérapeutiques ne sont pas efficaces ou concluants
- Indication possible : patients chez lesquels un diagnostic a été posé à l'aide de méthodes non-invasives et pour lesquels les traitements thérapeutiques sont efficaces
- Pas recommandé : patients qui ne présentent pas de symptômes suggérant une angine vasospastique

1.2.3. Contre-indications et complications

Il est contre-indiqué d'effectuer le test de provocation chez les patients connus pour un de syndrome coronarien aigu récent (par exemple dissection spontanée des artères coronaires ou rupture de plaque) et pour qui des effets indésirables graves sont attendus lors du test de

provocation. Il est également contre-indiqué dans les situations suivantes : insuffisance cardiaque sévère, sténose du tronc commun ou maladie tritonculaire sévère (4,7).

Les spasmes induits par l'ACh peuvent être prolongés, surtout chez les patients dont les symptômes angineux sont fréquents ou qui ont des spasmes sur plusieurs vaisseaux. Les conséquences d'un spasme prolongé sont les suivantes : hypotension, choc cardiogénique, arythmie sévère et arrêt cardiaque. Une étude a démontré que la fréquence d'une sévère complication est de l'ordre de 0.89%, inclus un décès (0.006%) et deux cas d'infarctus du myocarde grave (0.01%). Lors de ces complications, il est nécessaire d'administrer des vasodilatateurs afin de dissiper le spasme (4).

1.2.4. Méthode

La méthode présentée dans ce chapitre fait référence à celle pratiquée au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), en Suisse, qui s'appuie sur les recommandations actuelles. Le test est généralement effectué le matin et les traitements du patient, tels que les anti-calciques et les nitrates, sont interrompus 24h avant le test afin de ne réduire la probabilité d'induire un spasme. Le patient est admis dans un laboratoire de cathétérisme cardiaque le jour du test. Un cathéter est inséré dans les artères coronaires par l'artère radiale ou fémorale. Le test s'effectue tout d'abord sur l'artère coronaire gauche, puis sur la droite, comme recommandé dans les guidelines (4). Des doses croissantes d'ACh sont administrées au patient, à savoir 2 µg, 20 µg et 100 µg. En effet, certains patients peuvent présenter un spasme coronarien avec de très faible dose, tandis que d'autres nécessitent des doses plus élevées. Il est donc important de procéder par l'administration de concentrations croissantes. La détection des spasmes se fait grâce à l'apparition de symptômes ou de modifications à l'ECG. Dès que le patient présente un spasme, les doses suivantes ne sont pas administrées et le résultat du test est considéré comme positif. L'interprétation du résultat est détaillée au point 1.2.5. Au CHUV, les doses plus élevées que 100 µg ne sont pas utilisées et cela afin d'éviter des faux positifs (spasmes iatrogène). Les nitrates sont utilisés systématiquement au CHUV pour relâcher le spasme induit, car malgré la courte demi-vie de l'ACh, il est préférable de soulager immédiatement la douleur ressentie par les patients, plutôt que de la prolonger inutilement.

1.2.5. Lecture des résultats

Selon l'ESC, un résultat positif au test de provocation à l'acétylcholine est démontré si les trois conditions suivantes sont atteintes (7):

- Symptômes angineux décrits par le patient
- Changements ischémiques à l'ECG : sus- ou sous-décalage du segment ST ou modifications de l'onde T
- Vasoconstriction visible à l'angiogramme de plus de 90%

Le spasme est appelé focal s'il y a lieu dans un seul segment isolé du vaisseau ou diffus s'il a lieu dans ≥ 2 segments (7).

Le diagnostic final de l'angine vasospastique doit remplir les critères cités sur la figure 2.

Table 1 Coronary Artery Vasospastic Disorders Summit diagnostic criteria for vasospastic angina^a
Vasospastic angina diagnostic criteria elements
(1) <i>Nitrate-responsive angina</i> —during spontaneous episode, with at least one of the following: (a) Rest angina—especially between night and early morning (b) Marked diurnal variation in exercise tolerance—reduced in morning (c) Hyperventilation can precipitate an episode (d) Calcium channel blockers (but not β -blockers) suppress episodes
(2) <i>Transient ischaemic ECG changes</i> —during spontaneous episode, including any of the following in at least two contiguous leads: (a) ST segment elevation ≥ 0.1 mV (b) ST segment depression ≥ 0.1 mV (c) New negative U waves
(3) <i>Coronary artery spasm</i> —defined as transient total or subtotal coronary artery occlusion ($>90\%$ constriction) with angina and ischaemic ECG changes either spontaneously or in response to a provocative stimulus (typically acetylcholine, ergot, or hyperventilation)

^aDefinitive vasospastic angina¹ is diagnosed if nitrate-responsive angina is evident during spontaneous episodes and either the transient ischaemic ECG changes during the spontaneous episodes or coronary artery spasm criteria are fulfilled. 'Suspected vasospastic angina' is diagnosed if nitrate-responsive angina is evident during spontaneous episodes but transient ischaemic ECG changes are equivocal or unavailable and coronary artery spasm criteria are equivocal.

Figure 2 : Critères diagnostiques pour l'angine vasospastique (7)

L'importance de diagnostiquer l'angine vasospastique est due au fait qu'il existe de nombreuses complications graves de cette pathologie, qui peuvent avoir lieu avant que le diagnostic ne soit posé. La possibilité de prévenir ces complications en évitant les facteurs aggravants comme les vasoconstricteurs et la possibilité d'instaurer une prise en charge thérapeutique adéquate sont essentiels (7).

1.3. Objectif de l'étude

1.3.1. Validation de la méthode analytique et étude de stabilité

L'objectif de cette étude est le développement et la validation d'une méthode analytique indiquant la stabilité de l'acétylcholine dans des seringues prêtes à l'emploi utilisées pour les tests de provocation de spasmes des artères coronaires, ainsi que d'effectuer une étude de stabilité. La dégradation forcée ainsi que la validation de la méthode ont été réalisées. Le plan d'expérience de l'étude de stabilité a été établie, mais pas encore mise en pratique. En effet, une rupture de stock chez le fabricant du médicament utilisé pour préparer les seringues prêtes à l'emploi a empêché l'étude de stabilité de se dérouler à temps pour ce travail de recherche. Cette étude sera menée ultérieurement par l'équipe de la pharmacie hospitalière du CHUV.

1.3.2. Connaissances actuelles

Le seul médicament contenant de l'ACh disponible en Suisse et approuvé par Swissmedic est le Miochol[®] E. L'ACh est sous forme lyophilisée et doit être reconstituée avec un solvant pour être administrée rapidement. Dans la monographie officielle du fabricant, il est mentionné que « l'acétylcholine n'est stable que peu de temps en solution aqueuse. L'acétylcholine lyophilisée avec le mannitol doit être dissoute avec la solution d'électrolytes juste avant l'utilisation » (14). Dans la littérature, nous retrouvons deux études de stabilité sur l'ACh. La première, publiée en 1998, avait pour conditions de stockage les températures suivantes : 37°C, 60°C et 80°C. Cette approche présente plusieurs lacunes. Les flacons d'ACh ont été congelées à -20°C en attendant d'être analysées. L'analyse consistait en une titration d'acide acétique, métabolite

de l'ACh, permettant ensuite de calculer inversement la quantité restante d'ACh (15). La méthode de titration n'était ni spécifique, ni sélective. Les conditions de stockage ou l'analyse des résultats par extrapolation des données ne respectent pas les recommandations de l'ICH (Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement) (16). La seconde étude a été publiée en 2005. L'analyse des vials après stockage a été effectuée en mesurant la quantité de choline via un standard interne, de nouveau afin de calculer inversement la quantité restante d'ACh. L'humidité relative des conditions de stockage n'était pas mentionnée, et il n'était pas indiqué si la méthode d'analyse par HPLC était validée ou non (17).

Ces études ne sont pas suffisantes pour se prononcer sur la stabilité de l'ACh en solution, il est important de refaire une étude de stabilité selon les recommandations actuelles. De plus, puisque l'objectif est de stocker l'ACh en solution dans des seringues, il est nécessaire de démontrer que le contenant est approprié pour un stockage à long terme.

1.3.3. Enjeux actuels

1.3.3.1. Production

Actuellement, les seringues sont préparées le matin-même du test de provocation, afin que l'ACh soit injectée le plus rapidement possible après la mise en solution, ceci dans le but de pallier son instabilité. Cependant, cette pression temporelle peut entraîner des difficultés dans la gestion des plannings de production, imposant aux équipes de production une organisation stricte et pouvant perturber d'autres activités hospitalières. Cette urgence dans la préparation des seringues d'ACh peut également accroître le stress au sein des équipes de production. La nécessité de respecter des délais très serrés peut restreindre la marge de manœuvre en cas de problèmes imprévus ou de complications techniques. Ce stress accru peut, par conséquent, augmenter le risque d'erreurs de fabrication, compromettant la qualité des seringues préparées et potentiellement affectant la sécurité et la prise en charge des patients (18).

1.3.3.2. Erreurs de production

Les médicaments injectables ont un haut potentiel de nuire à la santé du patient et sont environ 3 fois plus susceptibles de causer un préjudice ou un décès que d'autres formes de médicaments. Ce risque élevé est directement attribuable à la complexité du processus de production et d'administration. Les risques d'erreurs y sont considérables, tout comme l'impact critique que ces erreurs peuvent avoir sur le patient (19). Selon une étude menée sur des seringues non-utilisées en anesthésiologie, 29% des 500 seringues analysées ont montré une déviation de la dose du principe actif de $\pm 10\%$. De plus, des contaminations ont été retrouvées dans plusieurs médicaments injectables (20).

La fréquence des erreurs de production des médicaments injectables est donc élevée, et une gestion rigoureuse visant à réduire ce nombre d'erreurs doit être mise en place.

1.3.3.3. Impact pour le patient

Les erreurs de production qui surviennent dans ce contexte se divisent en deux catégories : des doses excessives ou des doses insuffisantes. Une dose réduite d'ACh peut engendrer des résultats faussement négatifs chez certains patients peu sensibles, car le spasme est intrinsèquement lié à la dose administrée. Ces faux négatifs impactent considérablement le diagnostic et la prise en charge des patients, comme détaillé précédemment au point 1.2.5. En revanche, un excès de dosage peut conduire à des résultats faussement positifs. Un patient qui n'est pas atteint d'angine vasospastique peut présenter un spasme iatrogène lors du test de provocation, entraînant un diagnostic erroné. Sur le plan clinique, une erreur de dilution de la dose la plus élevée peut rapidement multiplier par dix la quantité d'ACh administrée, avec des conséquences dramatiques pour le patient. En effet, un spasme pourrait devenir

irréversible malgré l'administration de vasodilatateurs, pouvant même conduire au décès du patient (4).

1.3.3.4. Intérêt des seringues prêtes à l'emploi

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les seringues prêtes à l'emploi contiennent un produit injectable qui ne nécessite pas de dilution ou de reconstitution ultérieure, et qui se présente dans son récipient ou dispositif final, prêt à être administré (21). Elles sont préparées à l'avance, stockées et disponibles pour les professionnels de santé. La production de ces seringues n'a plus lieu dans l'urgence et en conséquence les erreurs de fabrication diminuent. Un contrôle peut être instauré après chaque production en série, afin de garantir la qualité des seringues avant l'administration. Dernier avantage, les seringues non-utilisées pourraient être stockées et non jetées, ce qui est plus économique et éviterait le gaspillage (18).

Pour toutes ces raisons, si l'étude de stabilité effectuée sur les seringues prêtes à l'emploi d'ACh est menée et qu'un stockage est possible pendant plusieurs jours ou plus, la qualité de la prise en charge des patients atteints de MINOCA s'améliorera fortement.

1.4. Méthode analytique

1.4.1. Chromatographie liquide ultra-haute performance

L'analyse est effectuée à l'aide d'une plateforme analytique UHPLC-HRMS. L'UHPLC, pour ultra-high performance liquid chromatography (chromatographie liquide ultra-haute performance), est une technique permettant de séparer les composants d'un échantillon donné. Elle est caractérisée par une phase mobile liquide faisant avancer les molécules vers le détecteur, ainsi qu'une phase stationnaire dont la chimie permet la rétention des molécules d'intérêt. En fonction du type de phase stationnaire utilisée, différentes interactions chimiques peuvent avoir lieu. Ici, l'analyse se porte sur l'ACh et la choline, qui sont des molécules polaires ($\log(P)$ respectivement -2.9 et -3.6) (13,22). La technique de chromatographie choisie est donc l'HILIC, pour hydrophilic interaction liquid chromatography (chromatographie liquide à interactions hydrophiles). C'est une technique LC de choix pour l'analyse et la séparation des molécules polaires. Afin de séparer de façon sélective ces deux molécules, le choix de la colonne s'est porté sur une colonne amide. En HILIC, la phase mobile contient une proportion importante de solvant organique, généralement de l'acétonitrile avec une certaine proportion d' H_2O . Cette dernière est l'éluant le plus fort, contrairement à l'acétonitrile pour la RPLC. Différents types de tampons, tels que l'acétate d'ammonium ou le formate d'ammonium sont utilisés pour contrôler efficacement le pH, la force ionique et l'état d'ionisation des analytes (23,24). Le mécanisme de rétention HILIC est principalement basé sur le partage hydrophile des composés (polaires) entre la phase mobile et une couche riche en eau, partiellement immobilisée à la surface de la phase stationnaire. D'autres mécanismes de rétention peuvent également entrer en action, il s'agit d'interactions ioniques, interactions par liaison hydrogène et interactions dipôle-dipôle, cela en fonction de la nature de la phase stationnaire, de la phase mobile et des analytes (23,25).

1.4.2. Spectrométrie de masse à haute-résolution

Une fois séparés, les molécules sont détectées et quantifiées par un spectromètre de masse à haute-résolution (HRMS). Au cours des dernières décennies, les progrès réalisés dans le domaine des instruments HRMS ont permis d'accroître la sensibilité et la spécificité analytique, faisant de cette technique le premier choix pour les analyses de principes actifs de médicaments à très faibles concentrations et qui sont non-détectables par la méthode de détection conventionnelle par spectrophotométrie UV-visible. L'HRMS fournit des informations structurales importantes concernant les molécules analysées. Il s'agit du rapport masse/charge (m/z) et des fragments spécifiques qui peuvent être générés (26). L'HRMS se compose généralement de trois éléments principaux : une source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur. Les composés sont ionisés dans la source d'ionisation, ici un électrobulbeur

(ESI), puis sont dirigés dans l'analyseur, ici un Orbitrap, puis sont détectés, ici par la trappe de l'Orbitrap (24).

La résolution de masse qu'un instrument HRMS atteint est définie comme la différence minimale en m/z qui peut être détectée entre deux composés distincts. Plus la résolution de l'instrument est élevée, plus la séparation de deux composés ayant un m/z proche sera efficace (27). Le pouvoir de résolution que peuvent attendre les HRMS se situent entre 10'000 à 200'000 (28).

Un des principaux points faibles de l'HRMS est la reproductibilité de la réponse mesurée. Cette variabilité peut être causée par les molécules présentes dans la matrice analysée, qui peuvent interagir entre elles dans la source d'ionisation et/ou directement avec les parties internes de l'analyseur. Il est admis que la présence de composés interférents qui coéluent avec les composés d'intérêt peuvent induire une augmentation ou une diminution du signal mesuré. Ceci est connu sous le nom d'effet matrice. Ce phénomène n'est pas reproductible lors de l'analyse d'un échantillon à un autre. Ce problème peut être contourné en utilisant des standards internes marqués isotopiquement en remplaçant les atomes d'hydrogène (1H) ou de carbone (12C) par du deutérium (2H) ou du carbone (13C). Ces standards internes présentent des propriétés physicochimiques presque identiques à celles des composés d'intérêt et sont donc très utilisés dans les méthodes UHPLC-HRMS quantitatives (29,30). Dans le domaine de la bioanalyse, une méthode de quantification de l'ACh dans du fluide cérébro-spinal par LC-MS/MS a déjà été développée et validée (31).

1.4.1. Dégradation forcée

Les tests de dégradation forcée sont un élément crucial du développement de médicaments et du contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique et en pharmacie hospitalière. Il s'agit de soumettre une substance ou un produit médicamenteux à des conditions de stress plus sévères que celles susceptibles d'être rencontrées lors de son stockage ou de son utilisation. Le but des études de dégradation forcée est d'identifier et de caractériser les voies de dégradation potentielles et les produits de dégradation d'une substance ou d'un produit médicamenteux. Ces études fournissent des informations importantes pour le développement de formulations, d'emballages et de conditions de stockage robustes, ainsi que pour l'établissement de méthodes indiquant la stabilité pour le contrôle qualité, comme c'est le cas dans cette étude (16).

Voici les aspects clés des études de tests de dégradation forcée.

1.4.1.1. Conditions de stress

Les conditions de stress courantes comprennent l'exposition à la chaleur, à la lumière, à l'humidité, à l'hydrolyse acide/base, à l'oxydation et à la photolyse. Ces conditions sont choisies en fonction de la nature de la substance médicamenteuse et des voies de dégradation potentielles et doivent être adaptées pour accélérer la dégradation tout en évitant une décomposition excessive (16).

1.4.1.2. Analyse des échantillons

La chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (GC), la spectrométrie de masse (MS) et d'autres techniques spectroscopiques sont couramment utilisées pour analyser des échantillons. La spectrométrie de masse et les méthodes spectroscopiques aident à identifier et à caractériser les produits de dégradation.

1.4.1.3. Implications pour le test de provocation à l'ACh

Les informations tirées des études de dégradation forcée influencent l'étude de stabilité du médicament. Elles permettent d'identifier les voies de dégradation et donnent un profil de la qualité de l'ACh dans le temps après différentes dilutions.

1.4.2. Validation de la méthode

La validation de la méthode permet de démontrer que la méthode analytique choisie convient pour identifier et quantifier le principe actif et éventuellement ses produits de dégradation dans le temps. Pour convenir à cet objectif, la méthode doit répondre à certains critères de validation. Il est essentiel que la méthode soit spécifique et distingue clairement le principe actif des autres composés du produit, que ce soient les excipients, les impuretés ou les produits de dégradation. Afin de quantifier le principe actif, il est important de définir un intervalle de dosage dans lequel la méthode est linéaire, exacte et fiable. De même, une droite d'étalonnage doit être établie.

La méthode développée doit être validée statistiquement, par différents critères tels que la justesse, la fidélité, la répétabilité, la reproductibilité, l'exactitude et la linéarité. L'intervalle de dosage, la limite de détection et de quantification sont aussi évalués. Ces termes sont définis dans la partie résultats pour une meilleure lisibilité (16).

1.4.2.1. Droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage est réalisée à l'aide de standards d'étalonnage, dont la concentration exacte est connue. Son exactitude est évaluée en quantifiant indirectement des échantillons de validation dont la concentration est connue. Les échantillons de validation sont des échantillons préparés dans des conditions similaires à celles utilisées pour la préparation des échantillons durant l'étude de stabilité. La réponse de l'appareil et la droite d'étalonnage sont utilisées pour calculer indirectement la concentration théorique, qui sera comparée avec la valeur vraie (16).

1.4.2.2. Effet matrice

Un effet de matrice est un effet combiné de tous les composants d'un échantillon autres que l'analyte sur la quantification (32). Cet effet doit être évalué en reproduisant la matrice utilisée durant l'étude de stabilité dans les échantillons de validation, puis par comparaison avec les standards d'étalonnage. Comme détaillé au point 1.4.2., un standard interne peut être utilisé pour pallier cet effet.

1.4.3. Étude de stabilité

Un produit est considéré comme pratiquement stable durant une certaine période lorsque ses propriétés ne changent pas ou seulement dans des proportions tolérables. Les pharmaciens sont tenus de s'assurer que les préparations qu'ils produisent restent stables et qu'ils maintiennent leurs propriétés dès le stockage et jusqu'à l'administration au patient. L'instabilité est surtout causée par des réactions chimiques, comme l'hydrolyse ou l'oxydation. Dans les formes liquides, des phénomènes physiques peuvent conduire à la présence d'une turbidité, de précipités ou d'une séparation de phase. Si l'intégrité du contenant n'est pas maintenue, des instabilités microbiologiques peuvent aussi avoir lieu (16). Les études de stabilité consistent à stocker un produit dans diverses conditions et à analyser son évolution au cours du temps.

1.4.4. Exigences réglementaires

Les agences de réglementation, telles que la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis et l'Agence européenne des médicaments (EMA), s'appuient souvent sur des études de dégradation forcée et de stabilité, dans le cadre du processus de développement d'un médicament. Les résultats de ces études sont inclus dans le dossier de présentation pour démontrer la stabilité et l'innocuité du médicament. Les méthodes analytiques utilisées dans ces études doivent être validées.

L'étude de dégradation forcée ainsi que la validation de la méthode effectuée dans ce travail suivent les recommandations de l'ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) et d'autres guidelines (33–35).

2. MATÉRIELS ET INSTRUMENTS

2.1. UHPLC

Un instrument de chromatographie liquide à ultra-haute performance (UHPLC) Vanquish™ Horizon™ de Thermo Scientific™ a été utilisé pour effectuer les analyses. Les échantillons ont été maintenus à 10 °C dans l'autosampler durant les analyses. Un volume de 10 µL a été injecté. Les composés ont été séparés sur colonne HILIC Acquity™ Premier BEH Amide (2.1 mm X 50 mm, 1.7 µm) de Waters™ équipée de la précolonne correspondante. Le débit et la température de la colonne ont été fixés à 0.5 mL/min et 35 °C respectivement.

La phase mobile A était composée de H₂O + ammonium formate 10 mM à pH = 3.0. La phase mobile B était composée d'acétonitrile (ACN).

Les conditions du mode gradient sont présentées sur le tableau 1.

Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse

Temps (min)	%A	%B
0.0	5	95
0.5	5	95
3.0	50	50
4.0	50	50
4.5	5	95
6.5	5	95

2.2. HRMS

L'UHPLC a été couplée à un détecteur spectromètre de masse à haute résolution (HRMS), Orbitrap Q Exactive de chez Thermo Scientific™ équipé d'un système d'ionisation par électrospray (HESI-II). En ce qui concerne les paramètres HESI-II, le débit de gaz et le débit de gaz auxiliaire ont été fixés respectivement à 30 et 5 unités arbitraires. La température du capillaire a été fixée à 300 °C et celle du chauffage auxiliaire à 300 °C. Les composés ont été détectés en mode positif avec une tension du jet d'ions réglée à +3 kV.

Un mode d'acquisition « parallel reaction monitoring » (PRM) a été développé. Une résolution en masse à 17'500, l'AGC target de 2×10^5 et un temps de remplissage maximal de la C-trap de 50 ms ont été paramétrés. Une énergie de collision normalisée a été définie à 10%. Toutes les analyses ont été acquises en utilisant une tolérance m/z à 5 ppm. Une fenêtre d'isolement de 1 m/z a été définie sans d'isolation offset et de multiplexing count. Une calibration de masse de l'instrument a été effectuée une fois par semaine en polarité positive uniquement avec le mélange standard Pierce™ Velos ESI Ion Calibration standard mixture de Thermo Scientific™. Le traitement des données a été effectué sur le logiciel Chromeleon™ 7.2.7.

2.3. Substances de référence

Les substances de référence utilisées sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Substances de référence

Substance	Fournisseur	N° Lot	Origine	Usage
Acétylcholine chlorure	Sigma Aldrich Chemie GMBH®	A2661-25G	Suisse	Standard de référence
Choline chlorure	Sigma Aldrich Chemie GMBH®	C7017-5G	Suisse	Standard de référence
Acétylcholine chlorure d4	MedChemExpress	267098	USA	Standard interne
Choline chlorure triméthyl-d9	Sigma Aldrich Chemie GMBH®	492051-1G	Canada	Standard interne
Miochol® E	Bausch & Lomb Swiss AG	A000055281	Suisse	Standard de validation

2.4. Solvants

Les solvants utilisés sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Solvants

Substance	Fournisseur	N° Lot	Origine
Acétonitrile qualité ULC/MS	Biosolve	0010012020	Suisse
Eau qualité ULC/MS	Biosolve	0010010750	Suisse
Ammonium formate BioUltra 10 M in H ₂ O	Sigma-Aldrich	BCCF0981	Suisse
Acide formique 99% qualité ULC/MS	Biosolve	0010010653	Suisse
NaCl 0.9 % sol. perf. ecoflac 50mL	BBraun	L230477	Suisse

3. MÉTHODE

3.1. Dégradation forcée

L'objectif de la dégradation forcée est d'identifier les produits de dégradation de l'ACh et d'estimer la stabilité intrinsèque de l'ACh sous différentes conditions extrêmes. Les paramètres étudiés sont les effets de l'oxydation, du pH et de la température. La formulation utilisée de l'ACh est la suivante : ACh à 1.0 mg/mL préparée à partir de Miochol® E., médicament autorisé en Suisse contenant 20.0 mg d'ACh chlorure.

Les échantillons de Miochol® E ont été dilués avec différents solvants, puis de l'eau et de l'ACN pour atteindre une concentration finale de 1.0 mg/mL. Pour chaque échantillon, un témoin de contrôle est préparé avec la même méthode sans ACh. Les échantillons sont analysés à différents points temporels : J0, J1, J3, J6. Les échantillons sont stockés à l'étuve à 60°C en attendant l'analyse, sauf l'échantillon à température ambiante. Au moment de l'analyse, un prélèvement de 100 µL de l'échantillon a été effectué, puis neutralisé lorsque possible et enfin dilué avec 800 µL d'ACN. L'analyse est réalisée par UHPLC-HRMS.

Le protocole détaillé de cette méthode est présenté en Annexe 1.

3.1.1. Dégradation acide

Une ampoule de Miochol® E est diluée avec de l'HCl 0.1 M, une autre avec de l'HCl 0.5 M. Les échantillons sont neutralisés le jour de l'analyse avec du NaOH 0.1 et 0.5 M respectivement jusqu'à pH = environ 8.78.

3.1.2. Dégradation basique

Une ampoule de Miochol® E est diluée avec du NaOH 0.1 M, une autre avec du NaOH 0.5 M. Les échantillons sont neutralisés le jour de l'analyse avec du HCl 0.1 M et 0.5 M jusqu'à pH = environ 8.78.

3.1.3. Dégradation oxydative

Une ampoule de Miochol® E est diluée avec de l'H₂O₂ 3%, un solvant oxydant. Aucune neutralisation de l'effet oxydatif n'a été effectuée le jour de l'analyse.

3.1.4. Dégradation thermique

Une ampoule de Miochol® E est diluée avec de l'H₂O UHPLC-MS et stockée à température ambiante, une autre est stockée à l'étuve à 60°C.

3.2. Validation de la méthode

Pour valider une méthode de dosage, des droites d'étalonnage doivent être établies sur différents jours (séries) pour l'ACh. Ces droites sont établies à l'aide de la substance de référence ACh (Stds). Puis, une vérification est effectuée pour confirmer que les quantités d'ACh obtenues par les droites correspondent aux concentrations théoriques dans des solutions de validation (VStd) qui sont préparées à partir de Miochol® E. Dans chaque échantillon Std et VStd, la même quantité de standard interne (SI) est ajoutée : de l'ACh D4. Le protocole détaillé est présenté en Annexe 2.

3.2.1. Effet de matrice

L'ampoule de Miochol® E contient 20 mg d'ACh et 56 mg de mannitol (36). Le diluant fourni dans le Miochol® E n'est pas utilisé pour la préparation des seringues, il n'est donc pas pertinent de prendre en compte les excipients contenus dans le diluant. Il est important d'établir si la matrice (dans ce cas-ci, le mannitol) a un effet sur la quantification de l'ACh dans la méthode. En conséquence, du mannitol en proportion similaire au Miochol® E est ajouté à la préparation à quantifier. Dans chaque échantillon, la même quantité de standard interne (SI) est ajoutée : 10 mg/mL d'ACh d4.

3.2.2. Standard d'étalonnage

Les standards d'étalonnage sont préparés à partir d'ACh. Les concentrations sont de respectivement 25 ng/mL. Trois séries sont produites par concentration, avec 6 répétitions.

3.2.3. Échantillons de validation

Les échantillons de validation sont préparés à partir d'ACh et de mannitol. Les concentrations en ACh sont : 2.50 ng/mL, 5.00 ng/mL et 10.00 ng/mL.

Trois séries sont produites par concentrations avec 6 répétitions.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Dégradation forcée

La dégradation forcée a été effectuée afin d'investiguer les produits de dégradation que pouvait former l'ACh et de vérifier que la méthode UHPLC-HRMS utilisée soit capable de séparer les différents composés présents par chromatographie. C'est-à-dire que la spécificité de la méthode doit être démontrée.

4.1.1. Séparation par UHPLC

Le chromatogramme présenté en figure 3 montre la séparation des composés présents dans l'échantillon de dégradation forcée dans les conditions oxydatives (H_2O_2 3%) à J0. Le temps de rétention de l'ACh est de 1.52 minutes, tandis que celle de la choline est de 1.87 minutes. L'UHPLC sépare correctement l'ACh et la choline, puisque les pics sont séparés à la baseline. Trois autres composés sont présents, dont les temps de rétention sont 2.376 min, 2.513 min et 2.775 min. De même, ces composés sont présents dans le chromatogramme de l'échantillon de contrôle qui ne contient pas d'ACh, mais uniquement de l' H_2O_2 3% (figure 4). Ces produits sont donc des impuretés présentes dans de l' H_2O_2 3% et ne proviennent pas de la dégradation de l'ACh. À J0 à J6 (figure 5), aucun nouveau produit de dégradation n'est identifié. La choline est formée très rapidement dès J0.

Les impuretés n'interféreront pas avec l'ACh et la choline, en raison de leurs temps de rétentions nettement plus longs et distinguables des pics de l'ACh et la choline.

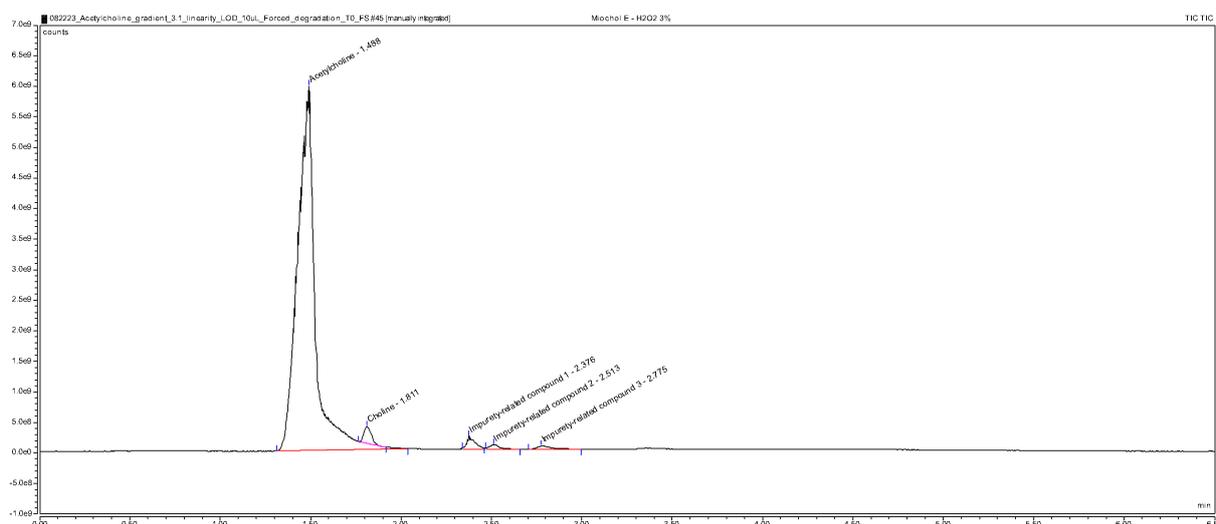


Figure 3 : Chromatogramme dégradation forcée, échantillon ACh, H_2O_2 3%, J0

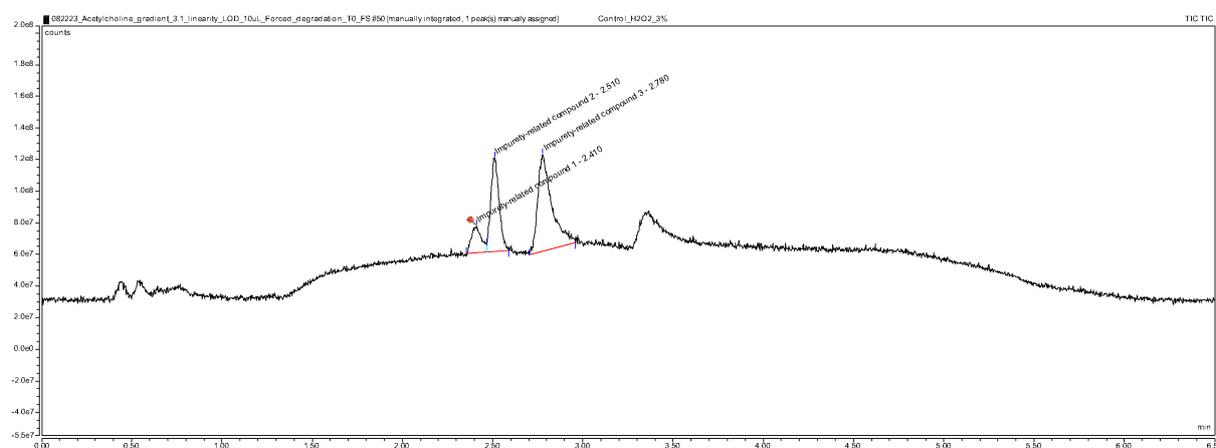


Figure 4 : Chromatogramme dégradation forcée, échantillon de contrôle, H_2O_2 3%, J0

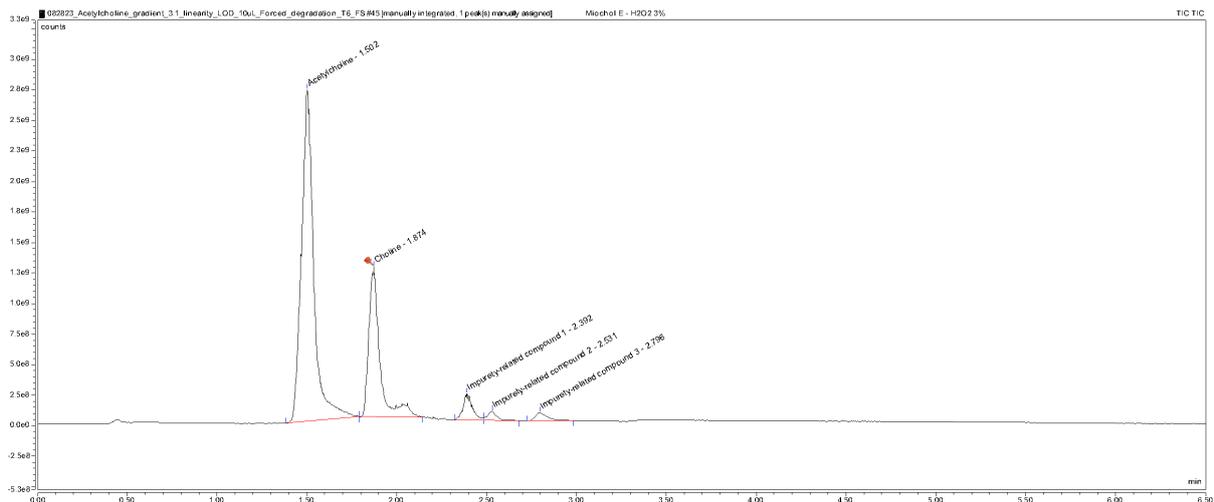


Figure 5 : Chromatogramme dégradation forcée, échantillon ACh, H₂O₂ 3%, J6

4.1.2. Identification par spectrométrie de masse

Les spectres obtenus par la HRMS montrent les rapports m/z de l'ACh (figure 6) et de la choline (figure 7).

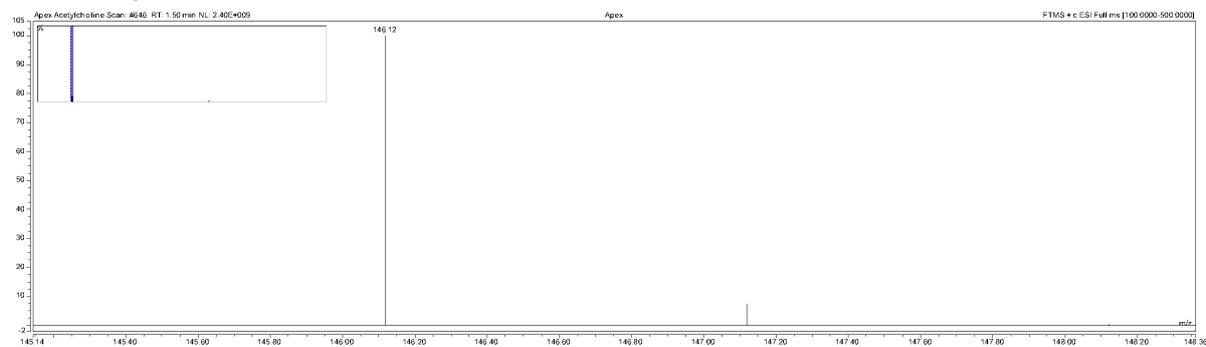


Figure 6 : Spectre HRMS dégradation forcée ACh, H₂O₂ 3%, T6

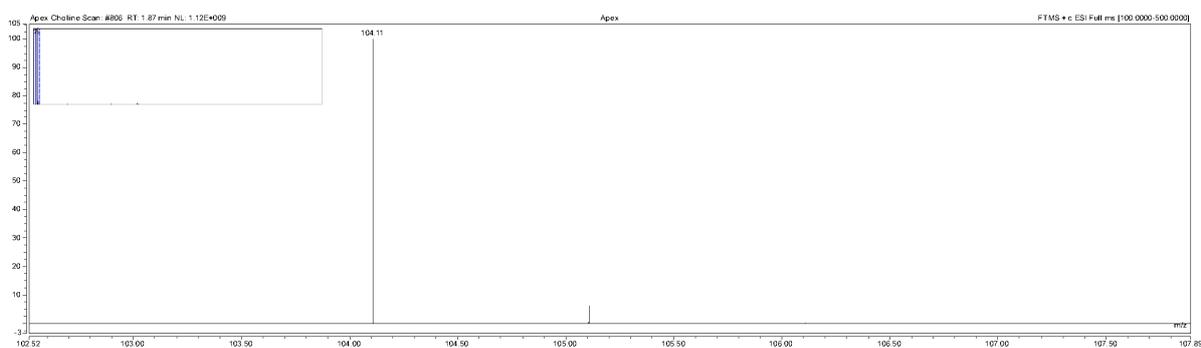


Figure 7 : Spectre HRMS dégradation forcée Choline, H₂O₂ 3%, T6

Le rapport m/z de l'ACh est 146.12, celui de la choline est de 104.11. Ces rapports m/z ne sont pas similaires et les deux molécules seraient détectés et identifiés même dans le cas d'une co-élution (absence de séparation) en UHPLC. La méthode est donc spécifique, car elle distingue clairement le principe actif des produits de dégradation.

4.1.3. Évaluation des échantillons dans les différentes conditions de dégradation forcée

Les résultats de la dégradation forcée de l'acétylcholine sont présentés dans les figures 8 et 9. La figure 8 représente l'aire mesurée du pic d'acétylcholine en fonction du temps, selon les différentes conditions extrêmes. La figure 9 représente la quantité restante d'acétylcholine en

pourcentage de l'aire initial mesuré en fonction du temps, selon les différentes conditions extrêmes.

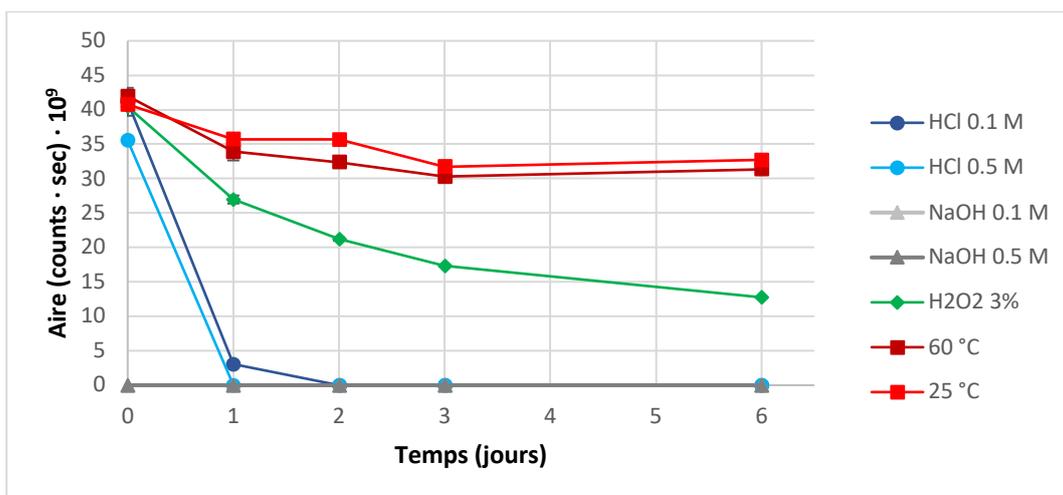


Figure 8 : Dégradation forcée de l'ACH (acide, base, oxydant, température) en aire par jour

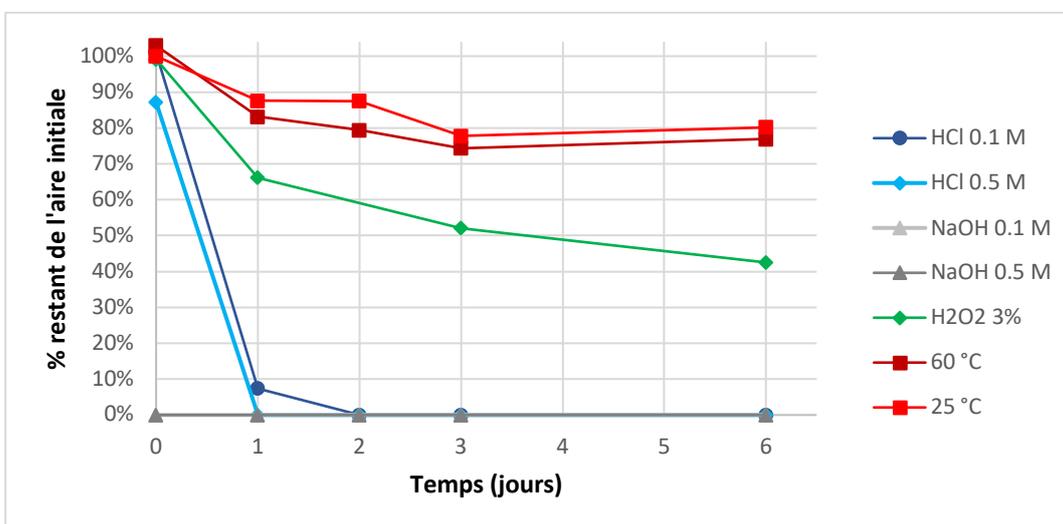


Figure 9 : Dégradation forcée de l'ACH (acide, base, oxydant, température) mesurée en quantité restante d'ACH par jour

La figure 10 représente l'aire mesurée de la choline en fonction du temps, selon les différentes conditions de dégradation.

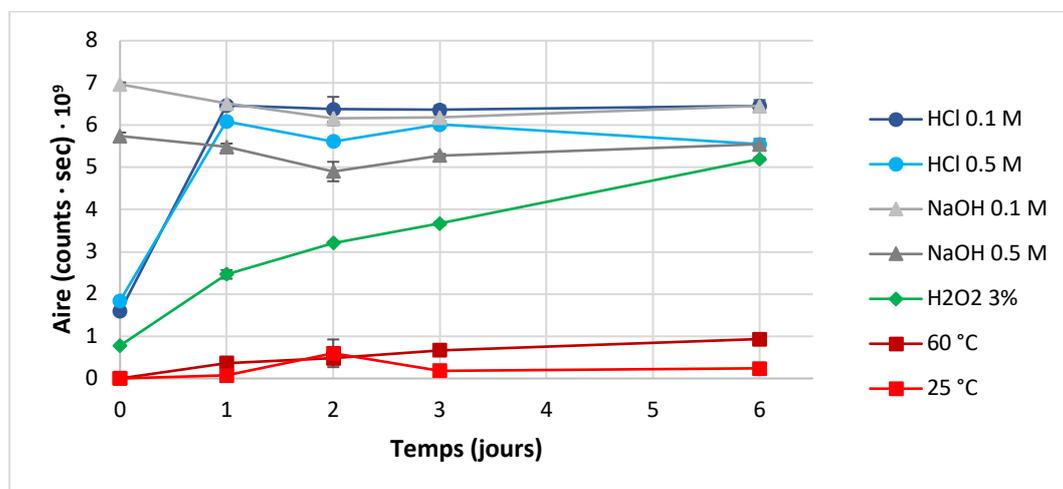


Figure 10 : Dégradation en choline (acide, base, oxydant, température) en aire par jour

L'ACh subit une dégradation croissante dans l'ordre suivant : température < oxydation < acidité < basicité. Dans les conditions basiques, l'hydrolyse est immédiate. En effet, la concentration en ACh est proche de zéro dès J0 et la choline est rapidement produite. Dans les conditions acides, l'ACh est un peu plus stable, mais complètement dégradée dès J1 à forte concentration d'acide, dès J2 pour l'HCl 0.1 M. La choline atteint la concentration des conditions basiques dès J1. Mélangé avec un fort oxydant comme l'H₂O₂, la dégradation de l'ACh est significative dès J1, avec une diminution de la quantité initiale de plus de 30%. À J6, l'ACh est dégradée à plus de 50% et la concentration de la choline rejoint presque celle des conditions acido-basiques (figure 10). À température ambiante et à 60°C, la dégradation de l'ACh est similaire, bien que légèrement plus forte à température élevée. À J1, la concentration en ACh reste proche de 90%. À J6 et pour les deux températures, les valeurs se situent autour de 80%. Ces chiffres suggèrent que l'ACh est stable pendant quelques jours à cette dilution et ces conditions, cependant une quantification avec une méthode validée doit être effectuée pour confirmer cette hypothèse. De plus, les conditions ICH indicatrices de la stabilité doivent être suivies. Cela signifie que pour la température ambiante, une enceinte climatique fixant la température et le taux d'humidité relative doit être utilisée. Les pistes à poursuivre sont un stockage, à température ambiante, au congélateur ainsi qu'au réfrigérateur.

La dégradation de l'ACh semble proportionnelle à la formation de choline, cela renforce l'hypothèse selon laquelle la choline serait le seul produit de dégradation obtenu dans les conditions testées.

La dégradation forcée a permis l'identification des différents composés devant être suivis durant la validation de la méthode. Puisque l'ACh a subi plus que 20% de dégradation en choline, les recommandations officielles demandent d'investiguer et de valider la méthode pour le dosage de la choline (16). Cette validation est en cours, mais ce travail de recherche ne se focalise pas dessus.

4.2. Validation de la méthode

4.2.1. Standard interne deutéré

Comme expliqué au point 1.4.2., un standard interne est utilisé afin de pallier un éventuel effet matrice. La figure 11 présente le chromatogramme d'une solution de 25 ng/mL d'ACh standard. La figure 13 est un spectre de masse de cette même solution. Les figures 12 et 14 représentent respectivement le chromatogramme et le spectre de masse d'une solution de 10 ng/mL d'ACh d4.

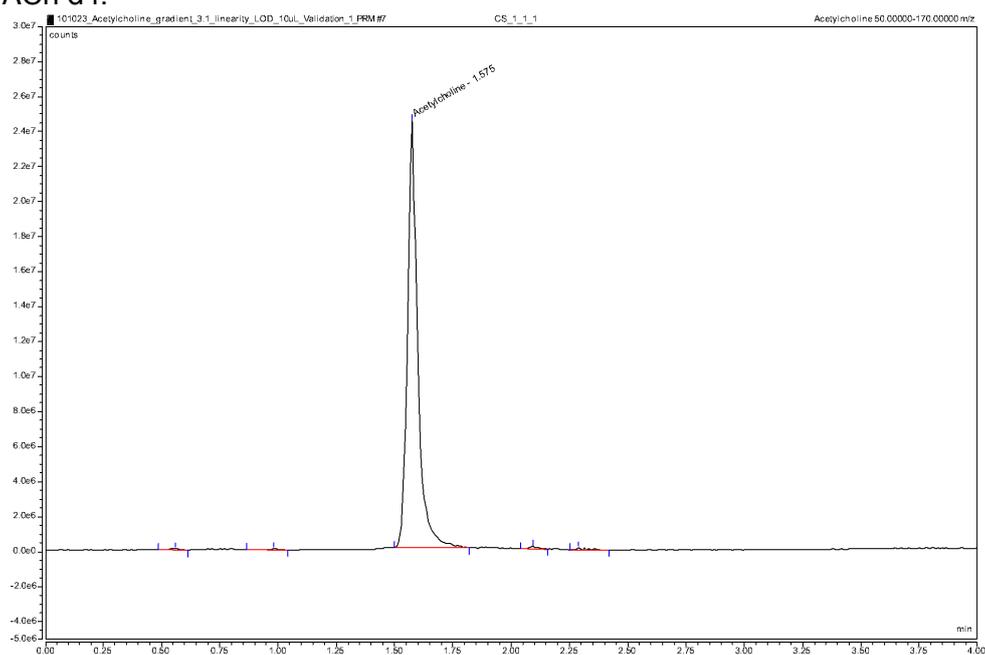


Figure 11 : Chromatogramme ACh standard 25 ng/mL

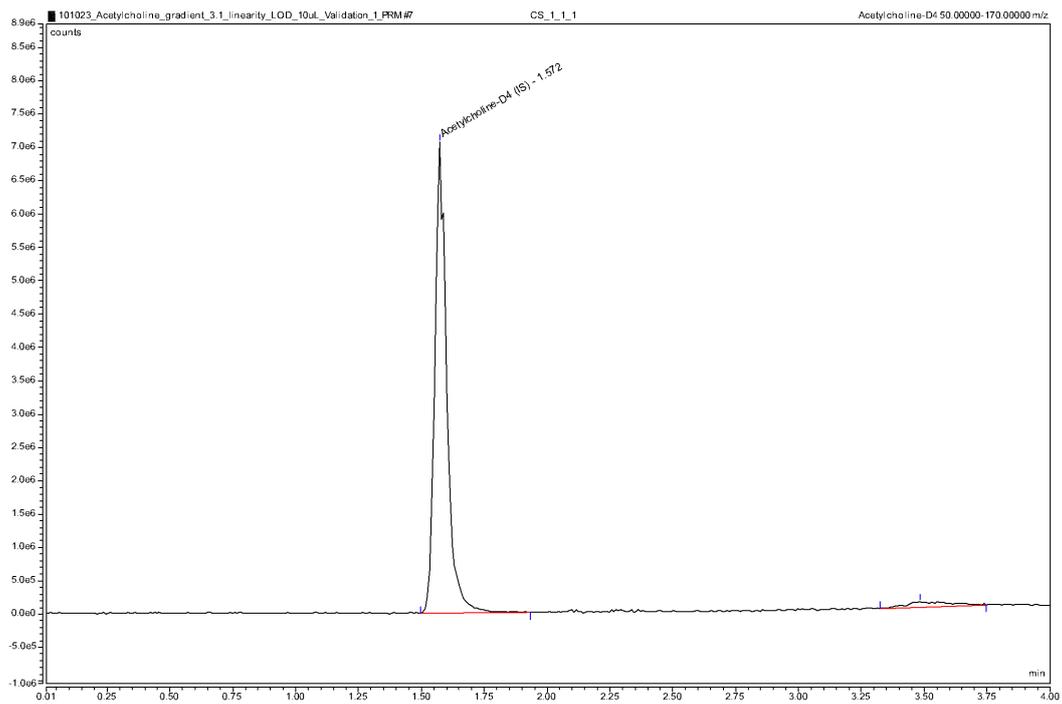


Figure 12 : Chromatogramme Ach-d4 10 ng/mL

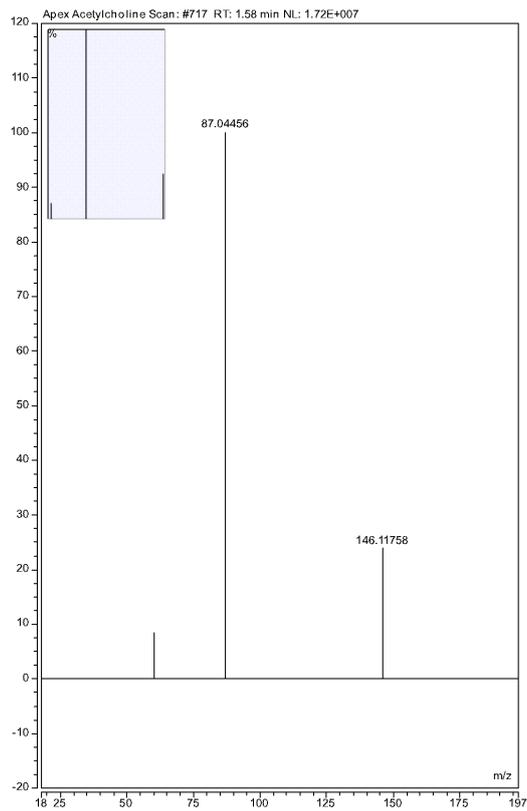


Figure 13 : Spectre HRMS ACh standard 25 ng/mL

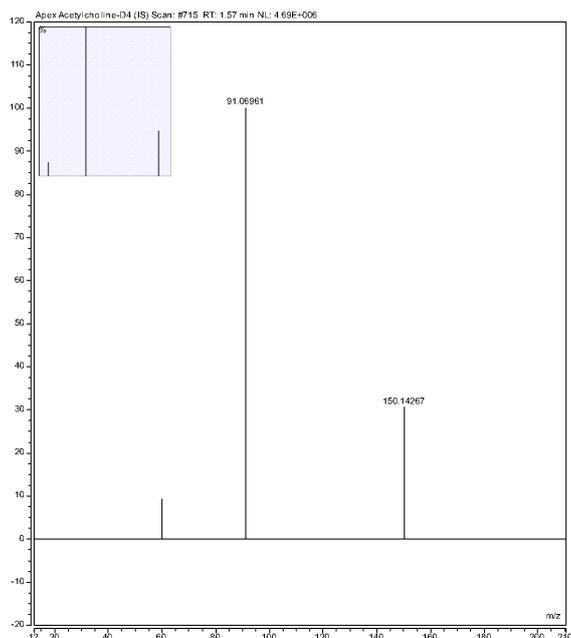


Figure 14 : Spectre HRMS Ach-d4 10 ng/mL

Le temps de rétention de l'ACh standard est de 1.575 minutes et est similaire au temps de rétention de l'ACh deutéré (1.572 minutes). Les spectres de masse montrent que l'ACh standard a un rapport m/z de 146.11758, tandis que celui de l'ACh d4 est de 150.15267. Ceci est expliqué par le fait que l'ACh deutéré possède 4 neutrons de plus que l'ACh standard. Les autres pics sont des produits de la fragmentation. Ces résultats montrent que le standard interne est adéquat pour compenser la variabilité des mesures du spectromètre. En effet, les composés sont introduits dans le spectromètre en même temps, ils sont donc identifiés et quantifiés dans les mêmes conditions. Cependant, puisque les rapports m/z sont différents, les composés peuvent être quantifiés individuellement.

4.2.2. Fonction de réponse

Dans une méthode analytique donnée, la relation entre la réponse (le signal) et la concentration de l'analyte dans l'échantillon est connue sous le nom de fonction de réponse. La droite d'étalonnage est la fonction la plus appropriée. Pour cette méthode, le modèle utilisé est une régression linéaire convergeant vers 0. La droite d'étalonnage obtenue est représentée par l'équation suivante :

$$y = ax + b$$

où y correspond au rapport des aires du standard Ach et du standard interne (Ach-d4) et x correspond à la concentration de l'échantillon standard Ach en (ng/mL).

Cette fonction de réponse est calculée à l'aide des standards d'étalonnage. Les résultats détaillés sont présentés en Annexe 3.

Le tableau 4 présente les résultats pour chaque série analysée.

Tableau 4 : Droite d'étalonnage par série

Série	Pente
1	$4.7563 \cdot 10^4$
2	$4.7264 \cdot 10^4$
3	$4.8305 \cdot 10^4$

La droite d'étalonnage finale est présentée dans la figure 15.

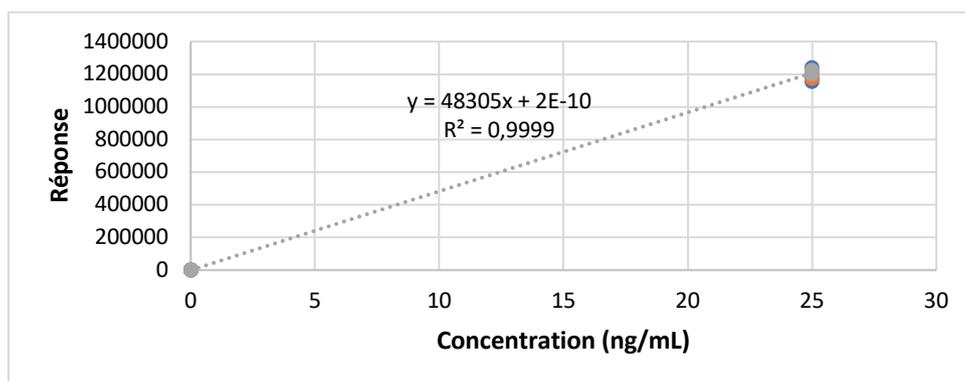


Figure 15 : Droite d'étalonnage

Les valeurs obtenues sont relativement proches et le coefficient de détermination R^2 est quasiment égal à 1. Un R^2 élevé indique une bonne adéquation entre le modèle et les données. L'ordonnée à l'origine est égale à $2 \cdot 10^{-10}$, ce qui est négligeable donc par approximation, il est possible d'affirmer que pour ce cas l'équation de la droite est de l'ordre de $y = ax$.

4.2.3. Justesse

La justesse est une expression de l'exactitude et fait référence à la proximité entre une valeur de référence et une moyenne expérimentale. Elle fournit des informations sur les erreurs systématiques. Elle s'exprime en termes de biais absolu (en ng/mL), en biais relatif (en %) ou en taux de recouvrement (en %) pour chaque niveau de concentration. Le tableau 5 présente les résultats de justesse. Les résultats détaillés sont présentés en Annexe 4.

Tableau 5 : Justesse

Concentration (ng/mL)	Biais absolu (ng/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)
2.50	- 0.02552	-0.8574	99.14
5.00	- 0.03840	-0.7496	99.25
10.00	- 0.06286	-0.6824	99.32

Les taux de recouvrement proches de 100% montrent que les valeurs de référence et les moyennes expérimentales sont très proches. Il faut noter que le biais relatif et le taux de recouvrement diminuent lorsque la concentration est plus faible, tandis que le biais absolu augmente. Ceci montre que la méthode est moins juste lorsque les concentrations sont plus faibles.

4.2.4. Fidélité

La fidélité est aussi une expression de l'exactitude, elle fournit des informations sur les erreurs aléatoires. Elle peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Elle s'exprime dans les deux cas soit par l'écart-type soit par le coefficient de variation. Certains résultats sont présentés dans le tableau 6. Le détail des résultats est présenté dans l'Annexe 5.

Tableau 6 : Répétabilité et fidélité intermédiaire

Concentration (ng/mL)	Concentration introduite moyenne (ng/mL)	Répétabilité (écart-type relatif %)	Fidélité intermédiaire (écart-type relatif %)
2.50	2.977	0.09277	1.489
5.00	5.123	0.02682	1.300
10.00	9.211	0.04077	1.184

Plus la concentration est faible, plus la répétabilité et la fidélité sont hautes. La méthode présente plus de variabilité à très faibles concentrations.

4.2.5. LOD, LOQ

La limite de détection (LOD) est la quantité la plus faible d'échantillon pouvant être détectée sans être correctement quantifiée.

La LOD est de 0.9020 ng/mL.

La limite de quantification inférieure est la quantité la plus faible d'échantillon pouvant être quantifiée avec une exactitude définie. La limite de quantification supérieure est la quantité la plus haute pouvant être quantifiée avec une exactitude définie.

La LOQ inférieure est de 2.977 ng/mL.

La LOQ supérieure est de 9.211 ng/mL.

L'intervalle entre ces deux valeurs représente l'intervalle de dosage avec laquelle la méthode fournira des résultats d'une exactitude acceptable.

4.2.6. Exactitude

L'exactitude est définie par le degré de concordance entre le résultat du test et la valeur de référence acceptée, c'est-à-dire ce qui est appelé conventionnellement la vraie valeur. Elle prend en compte les erreurs systématiques et aléatoires, respectivement la justesse et la fidélité. La limite d'acceptabilité a été fixée à 30%. Les résultats détaillés sont présentés en Annexe 6.

Le profil relatif d'exactitude est présenté dans la figure 16.

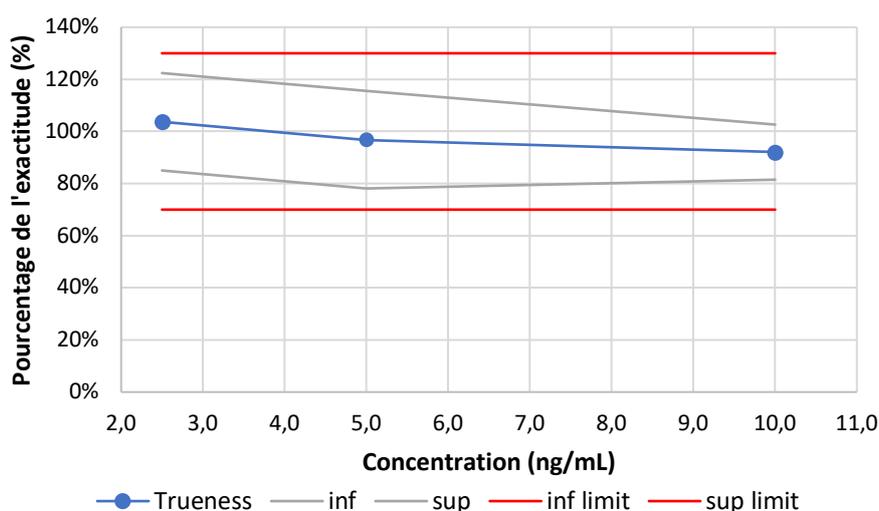


Figure 16 : Profil relatif d'exactitude

Le profil absolu d'exactitude est présenté dans la figure 17.

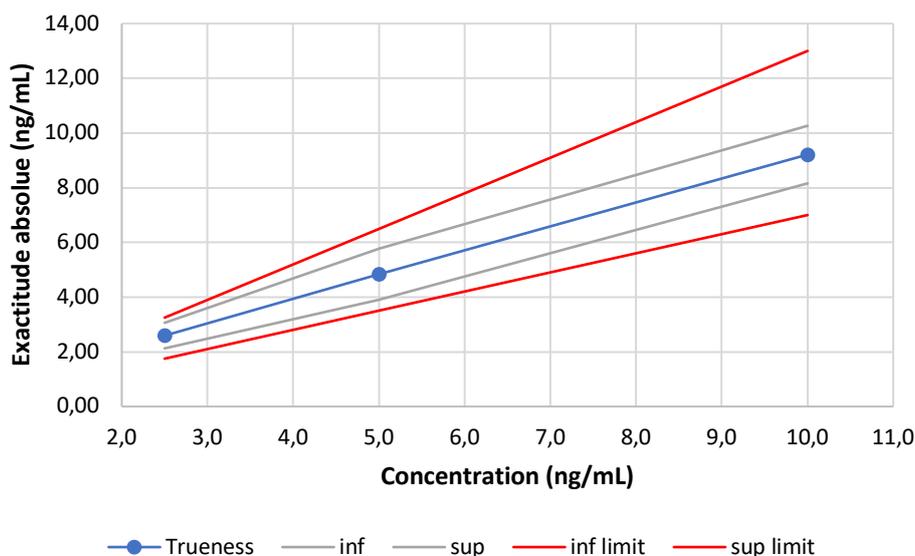


Figure 17 : Profil absolu d'exactitude

Les valeurs entrent dans les limites fixées, la méthode est donc validée.

Cependant, il faut souligner que plus la concentration est faible, plus les valeurs s'approchent des limites et sont moins exacts. Les concentrations plus élevées fournissent de meilleurs résultats. En effet, comme expliqué précédemment, la justesse et la fidélité (fidélité intermédiaire et répétabilité) de la méthode sont plus mauvaises lorsque les concentrations diminuent. Dans le même temps, l'exactitude, qui est exprimée par tous ces critères, régresse aussi. Il est important de rappeler que la LOQ inférieure est de 2.977 ng/mL, il ne faut donc en principe pas se situer en dessous de cette valeur. Il est donc logique que la concentration à 2.5 ng/mL ne fournisse pas de résultats très exacts.

4.2.7. Limitations

La droite d'étalonnage a été initialement effectuée à l'aide de 5 concentrations, cependant les résultats étaient insatisfaisants. Ces résultats sont présentés dans le sous-chapitre suivant. Cela a été attribuée à l'utilisation de l'ACN pour effectuer les séries de dilutions. En effet, les échantillons sont produits à l'aide d'une série de dilutions utilisant des micropipettes. Les micropipettes sont précises et adéquates lorsqu'elles sont utilisées pour prélever des solutions aqueuses, mais le sont beaucoup moins lorsque le solvant utilisé est de l'ACN, surtout sur plusieurs dilutions sérielles. En effet, l'ACN est plus volatil et moins visqueux que l'eau, donc cela cause des erreurs volumétriques. Tout d'abord, les dilutions par ACN ont été remplacées par des dilutions à l'eau et l'ACN a été introduit dans les échantillons uniquement à la fin. En effet, les échantillons doivent se trouver dans une proportion de 90% d'ACN pour être compatible avec l'analyse HILIC. Puis, la droite d'étalonnage a été effectuée à partir d'un seul point, par soucis pratique et de simplification de la méthode. Les droites d'étalonnage en un seul point sont possibles selon la SFSTP (37).

La limite d'acceptabilité est usuellement fixée à 5% en sciences pharmaceutiques. Cependant, pour des motifs justifiés, cette limite peut être élargie. L'imprécision des micropipettes, les concentrations très faibles d'ACh, qui descendent jusqu'au ng/mL et l'instabilité de l'ACh expliquent pourquoi la limite d'acceptabilité fixée à 30% est justifiable pour cette étude.

4.2.7.1. Droite d'étalonnage en 5 points

La droite d'étalonnage a été initialement effectuée à partir de 5 concentrations d'ACh : 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, et 25.0 ng/mL. Le profil relatif d'exactitude ainsi que le profil absolu d'exactitude sont présentés respectivement dans les figures 18 et 19.

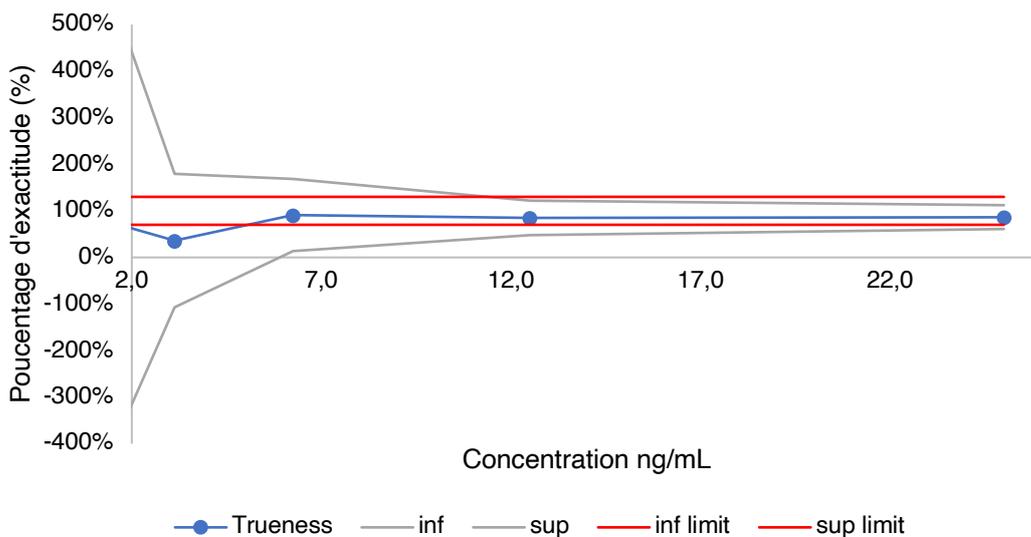


Figure 18 : Profil relatif d'exactitude

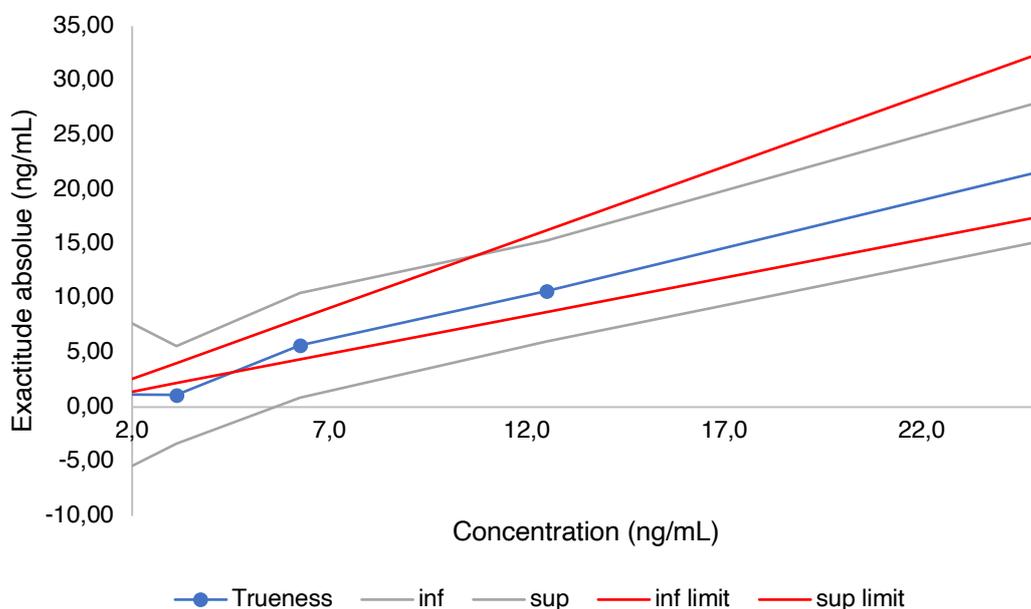


Figure 19 : Profil absolu d'exactitude

Ces résultats montrent que les concentrations faibles se situent en dehors des limites d'acceptabilité fixée à $\pm 30\%$. À mesure que la concentration augmente, les valeurs restent à l'intérieur de ces bornes.

4.3. Étude de stabilité

Au vu des résultats de la dégradation forcée, l'ACH semble toujours dans les limites d'acceptation à température ambiante et à 60°C après 6 jours. Ceci est prometteur pour l'étude de stabilité qui sera menée ultérieurement.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1. Conclusion

Une méthode analytique de chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute-résolution (UHPLC-HRMS) a été développée pour une étude de stabilité de l'acétylcholine dans des seringues prêtes à l'emploi. La technique de chromatographie employée est la chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC).

Cette méthode permet de quantifier l'acétylcholine en solution aqueuse, reconstituée à partir de Miochol® E, conditionnée dans des seringues prêtes à l'emploi.

L'étude de dégradation forcée montre que l'acétylcholine en solution aqueuse est immédiatement et entièrement dégradée en condition basique, et rapidement dégradée en condition acide et oxydative. À température ambiante ainsi qu'à 60°C, l'acétylcholine est bien plus stable, ne se dégradant que d'environ 20% après une période de 6 jours. Ces résultats sont encourageants et suggèrent une stabilité de quelques jours de l'acétylcholine en solution. Cette étude de dégradation accélérée a permis de mettre en évidence un produit de la dégradation de l'acétylcholine, à savoir la choline. La formation de choline dans les conditions accélérées semble proportionnelle à la dégradation de l'acétylcholine, suggérant qu'aucun autre produit de dégradation n'est formé.

La méthode développée a été validée, selon les recommandations ICH, de la FDA et SFSTP. Elle pourra être utilisée pour quantifier des échantillons d'acétylcholine pour des dosages supérieurs à 2.977 ng/mL, avec une limite d'acceptabilité de $\pm 30\%$.

L'étude de stabilité doit être menée afin de déterminer si un conditionnement dans des seringues prêtes à l'emploi est possible et dans quelles conditions précisément.

Un plan d'expérience a été établi et est présenté dans le sous-chapitre suivant.

Le stockage dans des seringues prêtes à l'emploi permettrait de procéder systématiquement à un contrôle de qualité du produit, améliorant ainsi la prise en charge des patients soumis au test de provocation à l'acétylcholine. Ce test est le gold standard dans le diagnostic des spasmes coronaires avec une sensibilité et spécificité très hautes, respectivement de 90% et 99%.

5.2. Perspective : plan d'étude de stabilité

L'étude de stabilité devait être initialement effectuée durant ce travail de recherche, cependant une rupture de stock chez le fournisseur a empêché l'étude de se dérouler à temps. C'est pourquoi le plan d'étude de stabilité a déjà été réalisé.

5.2.1. Points temporels

Les points temporels sont fixés à J0, J1, J2, J7, J14, J21, M1, M2, M3, M6. Il est attendu que l'ACh se dégrade rapidement, il est donc nécessaire de fixer des points temporels rapprochés les premières semaines.

5.2.2. Conditions de stockage

Les conditions de stockages répondent aux recommandations ICH :

- Température ambiante : $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ à 65% HR $\pm 5\%$
- Réfrigérateur : $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Congélateur : $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

5.2.3. Concentration en ACh

Les concentrations choisies pour l'étude de stabilité sont les mêmes que les trois concentrations utilisées pour les tests de provocation des spasmes des artères coronaires au CHUV. Le volume est fixé à 40 mL par seringue.

- Concentration 1 : 0.05 µg/mL
 - o Dose 1 : 2 µg
- Concentration 2 : 0.50 µg/mL
 - o Dose 2 : 20 µg
- Concentration 3 : 2.50 µg/mL
 - o Dose 3 : 100 µg

5.2.4. Test de stabilité

Les tests effectués sur les échantillons doivent répondre aux exigences de la Ph.Eu. (Pharmacopée Européenne) ainsi que celles de l'ICH.

5.2.4.1. Aspect

Les seringues d'ACh ne doivent pas contenir de précipités et doivent être incolore et limpide, elles doivent correspondre à la coloration de l'eau R, la méthode doit répondre aux exigences des essais 2.2.1 et 2.2.2 de la Ph.EU.

5.2.4.2. Particules visibles

Les seringues d'ACh ne doivent pas présenter de contamination particulaire après une évaluation visuelle. Le test est effectué selon les recommandations de l'essai 2.9.20. de la Ph.Eu.

5.2.4.3. pH

Le pH est mesuré et doit montrer une stabilité dans le temps. Il est mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Il doit continuer à correspondre au pH du NaCl 0.9% de B.Braun, pH de 5.3 (4.5 à 7.0), en plus de la variation amené par l'ACh (38).

5.2.4.4. Concentration en ACh

Les seringues d'ACh doivent contenir au maximum $\pm 30\%$ de la quantité prévue d'ACh. Ce dosage est effectué à l'aide de la méthode validée, à l'aide d'une UHPLC-HRMS.

5.2.4.5. Concentration en produits de dégradation

La choline est mesurée selon la méthode validée plus haut, à l'aide d'une UHPLC-HRMS.

5.2.4.6. Stérilité : particules non-visibles

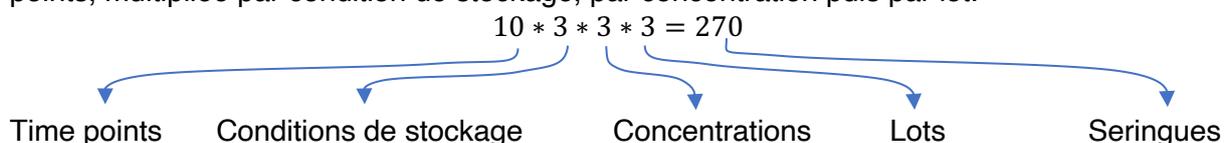
Les seringues d'ACh ne doivent pas présenter de contamination particulaire non-visible. Le test est effectué selon les recommandations de l'essai 2.9.19. de la Ph.Eu.

5.2.4.7. Stabilité microbiologique

Une évaluation microbiologique de la stérilité des seringues est effectuée, selon les recommandations de l'essai 2.6.1. de la Ph.Eu.

5.2.5. Production

Le nombre de seringues à produire a été calculé comme ceci : une seringue pour chaque time points, multipliée par condition de stockage, par concentration puis par lot.



Afin de palier à des pertes inattendues, 10% de seringues en plus sont produites. 297 seringues sont donc produites au total. Le protocole de production est présenté en Annexe 7.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. J.F. Argacha. Que savoir de l'ischémie myocardique ? [Internet]. Ligue Cardiologique Belge. 2023 [cité 29 nov 2023]. Disponible sur: <https://liguecardioliga.be/que-savoir-de-lischemie-myocardique/>
2. Angor - Troubles cardiovasculaires [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. [cité 29 nov 2023]. Disponible sur: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-cardiovasculaires/coronaropathie/angor>
3. Infarctus du myocarde aigu - Troubles cardiovasculaires [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. [cité 29 nov 2023]. Disponible sur: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-cardiovasculaires/coronaropathie/infarctus-du-myocarde-aigu>
4. Hokimoto S, Kaikita K, Yasuda S, Tsujita K, Ishihara M, Matoba T, et al. JCS/CVIT/JCC 2023 Guideline Focused Update on Diagnosis and Treatment of Vasospastic Angina (Coronary Spastic Angina) and Coronary Microvascular Dysfunction. *Circ J*. 25 mai 2023;87(6):879-936.
5. Lindahl B, Baron T, Albertucci M, Prati F. Myocardial infarction with non-obstructive coronary artery disease. *EuroIntervention*. déc 2021;17(11):875-87.
6. Picard F, Sayah N, Spagnoli V, Adjedj J, Varenne O. Vasospastic angina: A literature review of current evidence. *Archives of Cardiovascular Diseases*. janv 2019;112(1):44-55.
7. Beltrame JF, Crea F, Kaski JC, Ogawa H, Ong P, Sechtem U, et al. International standardization of diagnostic criteria for vasospastic angina. *Eur Heart J*. 4 août 2015;351.
8. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *European Heart Journal*. 14 janv 2020;41(3):407-77.
9. Ong P, Athanasiadis A, Sechtem U. Intracoronary Acetylcholine Provocation Testing for Assessment of Coronary Vasomotor Disorders. *JoVE*. 18 août 2016;(114):54295.
10. Sueda S, Kohno H, Ochi T, Uraoka T. Overview of the Acetylcholine Spasm Provocation Test. *Clinical Cardiology*. juill 2015;38(7):430-8.
11. PubChem. Acetylcholine [Internet]. [cité 5 nov 2023]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/187>
12. Acetylcholine chloride - European Pharmacopoeia 11.3 [Internet]. [cité 5 nov 2023]. Disponible sur: <https://pheur.edqm.eu/app/11-3/content/11-3/1485E.htm?highlight=on&terms=acetylcholine>
13. DrugBank. Acetylcholine [Internet]. [cité 30 nov 2023]. Disponible sur: <https://go.drugbank.com/drugs/DB03128>
14. Swissmedic. Monographie du Miochol E [Internet]. [cité 27 nov 2023]. Disponible sur: <https://www.swissmedicinfo.ch/ViewMonographie>
15. Carole F Naud, Christine Fernandez, Rania Azar, Alain Astier, Muriel Paul, Henri Mondor. Stability of Acetylcholine in Sterile Water. *Le journal canadien de la pharmacie hospitalière*. févr 1998;51(1).
16. Sautou V. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Clermont-Ferrand: SFCP GERPA; 2013.
17. Sletten DM, Nickander KK, Low PA. Stability of acetylcholine chloride solution in autonomic testing. *Journal of the Neurological Sciences*. juill 2005;234(1-2):1-3.
18. Malik P, Rangel M, VonBriesen T. Why the Utilization of Ready-to-Administer Syringes During High-Stress Situations Is More Important Than Ever. *Journal of Infusion Nursing*. janv 2022;45(1):27-36.
19. Proceedings of a summit on preventing patient harm and death from i.v. medication errors. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 15 déc 2008;65(24):2367-79.
20. Stucki C, Sautter A-M, Wolff A, Fleury-Souverain S, Bonnabry P. Accuracy of preparation of i.v. medication syringes for anesthesiology. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 15 janv 2013;70(2):137-42.

21. Glossary of Pharmaceutical Terms [Internet]. [cité 26 nov 2023]. Disponible sur: https://ppri.goeg.at/sites/ppri.goeg.at/files/inline-files/PHIS%20Glossary_Update2013_final_gesamt_5_0.pdf
22. DrugBank. Choline [Internet]. [cité 30 nov 2023]. Disponible sur: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00122>
23. Periat A, Krull IS, Guillard D. Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins: Liquid Chromatography. *J Sep Science*. févr 2015;38(3):357-67.
24. Rathod RH, Chaudhari SR, Patil AS, Shirkhedkar AA. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 31 oct 2019;5(1):6.
25. Pezzatti J, González-Ruiz V, Codesido S, Gagnebin Y, Joshi A, Guillard D, et al. A scoring approach for multi-platform acquisition in metabolomics. *Journal of Chromatography A*. mai 2019;1592:47-54.
26. Kaufmann A. High-resolution mass spectrometry for bioanalytical applications: Is this the new gold standard? *J Mass Spectrom*. sept 2020;55(9):4533.
27. Xian F, Hendrickson CL, Marshall AG. High Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 17 janv 2012;84(2):708-19.
28. Géhin C, Holman SW. Advances in high-resolution mass spectrometry applied to pharmaceuticals in 2020: A whole new age of information. *Analytical Science Advances*. avr 2021;2(3-4):142-56.
29. Orbitrap LC-MS - CH [Internet]. [cité 24 nov 2023]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms.html>
30. Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 4 juin 2013;85(11):5288-96.
31. Lamy E, Pilyser L, Paquet C, Bouaziz-Amar E, Grassin-Delyle S. High-sensitivity quantification of acetylcholine and choline in human cerebrospinal fluid with a validated LC-MS/MS method. *Talanta*. mars 2021;224:121881.
32. Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. juin 2010;1217(25):3929-37.
33. European Medicines Agency. Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. 2006;
34. Forced Degradation Study in Pharmaceutical Stability : Pharmaguideline [Internet]. [cité 14 nov 2023]. Disponible sur: <https://www.pharmaguideline.com/2014/08/forced-degradation-study-in-pharmaceutical-stability.html>
35. European Medicines Agency. Q1A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products. 2006;
36. Miochol™ - E (acetylcholine chloride intraocular™ solution) [Internet]. [cité 14 nov 2023]. Disponible sur: <https://www.bausch.com/globalassets/pdf/packageinserts/pharma/miochol-e-acetylcholine-chloride-intraocular-solution.pdf>
37. Visconti G, Olesti E, González-Ruiz V, Glauser G, Tonoli D, Lescuyer P, et al. Internal calibration as an emerging approach for endogenous analyte quantification: Application to steroids. *Talanta*. avr 2022;240:123149.
38. 0.9% Sodium Chloride Injection, USP [Internet]. [cité 23 nov 2023]. Disponible sur: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=fefc9ea8-a2de-49ab-8d79-d8337248ff0e&type=display>

7. ANNEXES

7.1. Annexe 1 : Protocole de dégradation forcée

PHA8 – Dégradation forcée de l'Acétylcholine en solution par UHPLC-MS

V4

Arborescence :

MQ : [PHA MQ 8000](#)

Processus : [PHA PROC 8008](#)

Procédure : [PHA PRO 8027](#)

1. OBJET

L'objectif de ce protocole est d'évaluer la dégradation forcée de l'acétylcholine de la formulation suivante :

- Acétylcholine CHUV 1.0 mg/mL (= 2000 fois la concentration du milieu de gamme).

Selon le site internet de Pharmaguideline : <https://www.pharmaguideline.com/2014/08/forced-degradation-study-in-pharmaceutical-stability.html>.

2. COMPOSITION

Principe actif : Acétylcholine chloride, (Miochol® E)

Excipients : NaCl 0.9%

3. PRINCIPE

L'échantillon est analysé par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse.

4. DÉFINITIONS

Abréviations :

ACN : Acétonitrile

C : Concentration

CV : Coefficient de variation

CVr : Coefficient de variation de répétabilité

CV = RSD : Relative standard deviation (terme anglais)

FRN : Fournisseur

H₂O : Eau

IC : Intervalle de confiance

LogP : Coefficient de partage

N° : Numéro

NS : Numéro de série

pKa : Constante de dissociation

QC : Contrôle Qualité

SCR : Substance chimique de référence

Std(s) : Standards

UHPLC : Chromatographie liquide à ultra haute performance

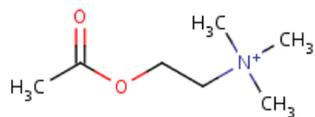
MS : Spectrométrie de Masse

5. SYNONYMES

Acétylcholine Miochol® E

6. NOM CHIMIQUE ET STRUCTURE

2-acetyloxy-N,N,N-trimethylethanaminium



$C_7H_{16}ClNO_2$

M_r 181.70 g/mol

CAS [51-84-3]

7. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

Constantes de dissociation : $pK_a = -7$ (ChemAxon)

Coefficient de partage : $\log P = -2.09$ (ALOGPS)

Point de fusion : 149-152°C

Solubilité dans l'eau : 1000 g/L (Cl) (PhEur)

8. MATÉRIEL

Standards :

Acetylcholine chloride, Sigma Aldrich Chemie GMBH® (N° FRN A2661)

Appareillage :

- UHPLC Vanquish UHPLC+ focused de ThermoScientific, équipé :
 - d'une pompe Pump
 - d'un injecteur Autosampler
 - d'un compartiment à colonne Column compartment
 - d'un spectromètre de masse Orbitrap Q Exactive
 - d'un logiciel Chromelion
- Colonne : 1 colonne BEH Amide (Acquity™ Premier VanGuard™ FIT, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm)
- Une précolonne correspondante (intégrée à la colonne)
- Balance semi-analytique
- Balance analytique
- Micropipettes 100 µL, 200 µL et 1000 µL
- Cylindres gradués

Réactifs :

- Acétonitrile qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 012041 (0001204102), ou qualité équivalente.
- Eau qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 232141 (0023214102), ou qualité équivalente.
- Ammonium formate BioUltra 10 M in H₂O 100 mL, Sigma-Aldrich, N° FRN 78314, ou qualité équivalente.
- Ammonium hydroxyde solution 25% qualité EMSURE® ISO, Reag. Ph Eur, Merck, N° FRN 1.05432.1000, ou qualité équivalente.
- Acide formique 99% qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 069141 (0006914143BS), ou qualité équivalente.
- NaCl 0.9 % sol. perf. ecoflac 50mL, (BBraun) N° FRN 534532 (GTIN 7680295542343), ou qualité équivalente.

9. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC

Colonne UHPLC : BEH Amide (Acquity™ Premier VanGuard™ FIT, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm), N° FRN 186009507 et la précolonne appropriée BEH Amide (Acquity™ Premier VanGuard FIT Cartridge, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 5 mm), N° FRN 186009510.

Détecteur : MS

Température du sampler : 10°C

Température de colonne : 35 °C

Phase mobile : La phase mobile est constituée d'une **phase mobile A** et d'une **phase mobile B**

Phase mobile **A**: H₂O + ammonium formate 10 mM à pH=3.0

Phase mobile **B**: ACN

En **mode gradient** selon le tableau 1.

Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse

Temps (min)	%B	%C
0.0	5	95
0.5	5	95
3.0	50	50
4.0	50	50
4.5	5	95
6.5	5	95

Durée totale de l'analyse : 6.5 min

Débit : 0.5 mL/min

Volume d'injection : 5 µL

Temps de rétention de l'acétylcholine : 1.55 ± 0.1 minutes

Temps de rétention de la choline : 1.92 ± 0.1 minutes

Needle Wash : MeOH/H₂O (10/90)

- Dans un duran de 250 mL, verser 225 mL d'H₂O et 25 mL de MeOH.

Rear Seal Wash : IPA / H₂O + 0.1% FA (75/25)

- Dans un cylindre gradué de 500 mL, verser 375 mL d'IPA et compléter à 500 mL avec H₂O. Ajouter 0.5 mL de FA.

Lavage de la colonne : ACN / H₂O (50/50)

Stockage de la colonne : ACN / H₂O (95/5)

10. PRÉPARATION DES SOLUTIONS, CONSERVATION, STABILITÉ

Phase Mobile B :

Prélever de l'H₂O UHPLC, transférer dans un ballon jaugé de 1 L et ajouter 1 mL d'Ammonium formate BioUltra 10 M (C = 10 mM). Ajuster le pH à 3.0 avec de l'ammonium hydroxyde 25% (possible de le diluer) ou de l'acide formique 99% (possible de le diluer). Mettre ac. formique 1.5 mL + 2-3 gouttes d'acide formique pur + ajuster avec l'acide formique dilué pour pH= 3.0. Compléter à 1 L au trait de jauge. Se conserve au maximum 2 semaines à température ambiante.

Diluant :

ACN / H₂O 90/10. Pour 1000 mL : prélever 900 mL d'ACN et ajouter 100 mL d'H₂O dans un duran de 1 L. Passer au bain ultrason pendant 2 min. Se conserve au maximum 1 mois à température ambiante.

Blanc : utiliser le diluant

11. DÉGRADATION FORCÉE

11.1. Hydrolyse :

11.1.1. Acide

- **HCl 0.1 M :** Diluer 1 ampoule de Miochol E avec 20 mL d'HCl 0.1 M (C_{Ach} = 1.0 mg/mL).

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 85 µL de NaOH 0.1 M pour neutraliser à pH = environ 8.78, ajouter 15 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN (C_{Ach} = 100 µg/mL).

- **HCl 0.5 M :** Diluer 1 ampoule de Miochol E avec 20.0 mL d'HCl 0.5 M (C_{Ach} = 1.0 mg/mL).

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 85 µL de NaOH 0.5 M pour neutraliser à pH = environ 8.78, ajouter 15 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN (C_{Ach} = 100 µg/mL).

- **Contrôle Acide HCl 0.1 M :** Prélever 20 mL de d'HCl 0.1 M.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 85 µL de NaOH 0.1 M, ajouter 15 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN.

- **Contrôle Acide HCl 0.5 M :** Prélever 20 mL d'HCl 0.5 M.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 85 µL de NaOH 0.5 M, ajouter 15 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN.

11.1.2. Base

- **NaOH 0.1 M :** Diluer 1 ampoule de Miochol E avec 20.0 mL de NaOH 0.1 M (C_{Ach} = 1.0 mg/mL).

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 75 µL de HCl 0.1 M pour neutraliser à pH = environ 8.78, ajouter 25 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN (C_{Ach} = 100 µg/mL).

- **NaOH 0.5 M :** Diluer 1 ampoule de Miochol E avec 20.0 mL de NaOH 0.5 M.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 90 µL de HCl 0.5 M pour neutraliser à pH = environ 8.78, ajouter 10 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN (C_{Ach} = 100 µg/mL).

- **Contrôle Base NaOH 0.1 M :** Prélever 20 mL de NaOH 0.1 M.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 75 µL de HCl 0.1 M, ajouter 25 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN.

- **Contrôle Base NaOH 0.5 M :** Prélever 20 mL de NaOH 0.5 M.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 90 µL de HCl 0.5 M, ajouter 10 µL d'H₂O UHPLC-MS, et ajouter 800 µL d'ACN.

11.2. Oxydation :

11.2.1. H₂O₂

- **H₂O₂ 3%** : Diluer 1 ampoule de Miochol E avec 20.0 mL d'H₂O₂ 3 % (C_{Ach} = 100 µg/mL).

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 100 µL d'H₂O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN (C_{Ach} = 100 µg/mL).

- **Contrôle Base H₂O₂ 3 %** : Prélever 20 mL de H₂O₂ 3 %.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 100 µL d'H₂O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN.

11.3. Thermique :

- **Témoin 60 °C** : Diluer 1 ampoule de Miochol E avec 20.0 mL d'H₂O UHPLC-MS (C_{Ach} = 1.0 mg/mL).

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 100 µL d'H₂O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN (C_{Ach} = 100 µg/mL).

- **Témoin T ambiante** : Diluer 1 ampoule de Miochol E avec 20.0 mL d'H₂O UHPLC-MS (C_{Ach} = 1.0 mg/mL).

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 100 µL d'H₂O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN (C_{Ach} = 100 µg/mL).

- **Contrôle Témoin 60°C** : Prélever 20 mL d'H₂O UHPLC-MS.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 100 µL d'H₂O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN.

- **Contrôle Témoin T ambiante** : Prélever 20 mL d'H₂O UHPLC-MS.

À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution, ajouter 100 µL d'H₂O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN.

12. DÉROULEMENT

- Equilibrer la colonne pendant au moins 15 minutes (phases mobiles et température de colonne appropriées).
- Les données de la courbe d'étalonnage dans la méthode pour les stds sont exprimées en **ng/mL**.
- La séquence analytique est présentée en annexe 2 dans le rapport Chroméléon.
- Conditionner le système avec des blancs avant de lancer la séquence de validation.

13. RÉFÉRENCES

- Stability of acetylcholine in sterile water. DOI: [10.4212/cjhp.v51i1.1896](https://doi.org/10.4212/cjhp.v51i1.1896).
- ICH Topic Q1 A (R2) stability testing of new drugs substances and products. [CPMP/ICH/2736/99](https://www.ich.org/quality/ICH/2736/99).
- Site Internet de Pharmaguideline: Forced degradation study in pharmaceutical stability. <https://www.pharmaguideline.com/2014/08/forced-degradation-study-in-pharmaceutical-stability.html>
- Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Partie 1 : préparations liquides. ISBN : [978-2-9526010-6-1](https://doi.org/10.1002/9782952601061).

7.2. Annexe 2 : Protocole de validation de méthode

PHA8 – DOSAGE de l'Acétylcholine en solution par UHPLC-MS

V9

Arborescence :

MQ : [PHA MQ 8000](#)

Processus : [PHA PROC 8008](#)

Procédure : [PHA PRO 8027](#)

1. OBJET

L'objectif de cette méthode est d'identifier et de quantifier l'acétylcholine dans les formulations suivantes :

- Acétylcholine CHUV 0.05 µg/mL - 40 mL
- Acétylcholine CHUV 0.50 µg/mL - 40 mL
- Acétylcholine CHUV 2.50 µg/mL - 40 mL

2. COMPOSITION

Principe actif : Acétylcholine chloride, (Miochol® E)

Excipients : NaCl 0.9%

3. PRINCIPE

L'échantillon est dilué et dosé par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) avec une droite d'étalonnage externe.

4. DÉFINITIONS

Abréviations :

ACN : Acétonitrile

C : Concentration

CV : Coefficient de variation

CVr : Coefficient de variation de répétabilité

CV = RSD : Relative standard deviation (terme anglais)

FRN : Fournisseur

H₂O : Eau

IC : Intervalle de confiance

LogP : Coefficient de partage

N° : Numéro

NS : Numéro de série

pKa : Constante de dissociation

QC : Contrôle Qualité

SCR : Substance chimique de référence

Std(s) : Standards

UHPLC : Chromatographie liquide à ultra haute performance

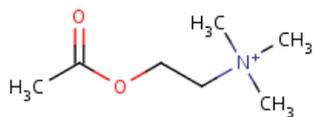
MS : Spectrométrie de Masse

5. SYNONYMES

Acétylcholine Miochol® E

6. NOM CHIMIQUE ET STRUCTURE

2-acetyloxy-N,N,N-trimethylethanaminium



$C_7H_{16}ClNO_2$

M_r 181.70 g/mol

CAS [51-84-3]

m/z (Chemcalc) $C_7H_{16}O_2N^+$ = 146.11756

7. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

Constantes de dissociation : pK_a = -7 (ChemAxon)

Coefficient de partage : $\log P$ = -2.09 (ALOGPS)

Point de fusion : 149-152°C

Solubilité dans l'eau : 1000 g/L (Cl) (PhEur)

8. MATÉRIEL

Standards :

Acetylcholine chloride, Sigma Aldrich Chemie GMBH® (N° FRN A2661)

Choline chloride, Sigma Aldrich Chemie GMBH® (N° FRN C7017)

Appareillage :

- UHPLC Vanquish UHPLC+ focused de ThermoScientific, équipé :
 - d'une pompe Pump
 - d'un injecteur Autosampler
 - d'un compartiment à colonne Column compartment
 - d'un spectromètre de masse à haute résolution Orbitrap Q Exactive
 - d'un logiciel Chromelion
- Colonne : 1 colonne BEH Amide (Acquity™ Premier VanGuard™ FIT, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm)
- Une précolonne correspondante (intégrée à la colonne)
- Balance semi-analytique
- Balance analytique
- Micropipettes 100 µL, 200 µL et 1000 µL
- Cylindres gradués

Réactifs :

- Acétonitrile qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 012041 (0001204102), ou qualité équivalente.
- Eau qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 232141 (0023214102), ou qualité équivalente.
- Ammonium formate BioUltra 10 M in H₂O 100 mL, Sigma-Aldrich, N° FRN 78314, ou qualité équivalente.
- Ammonium hydroxyde solution 25% qualité EMSURE® ISO, Reag. Ph Eur, Merck, N° FRN 1.05432.1000, ou qualité équivalente.
- Acide formique 99% qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 069141 (0006914143BS), ou qualité équivalente.
- NaCl 0.9 % sol. perf. ecoflac 50mL, (BBraun) N° FRN 534532 (GTIN 7680295542343), ou qualité équivalente.

9. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC

Colonne UHPLC : BEH Amide (Acquity™ Premier VanGuard™ FIT, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm), N° FRN 186009507 et la précolonne appropriée BEH Amide (Acquity™ Premier VanGuard FIT Cartridge, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 5 mm), N° FRN 186009510.

Détecteur : HRMS - Orbitrap

Température du sampler : 10°C

Température de colonne : 35 °C

Phase mobile : La phase mobile est constituée d'une **phase mobile A** et d'une **phase mobile B**

Phase mobile **A**: H₂O + ammonium formate 10 mM à pH=3.0

Phase mobile **B**: ACN

En **mode gradient** selon le tableau 1.

Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse

Temps (min)	%B	%C
0.0	5	95
0.5	5	95
3.0	50	50
4.0	50	50
4.5	5	95
6.5	5	95

Durée totale de l'analyse : 6.5 min

Débit : 0.5 mL/min

Volume d'injection : 5 µL

Temps de rétention de l'acétylcholine : 1.55 ± 0.1 minutes

Temps de rétention de la choline : 1.92 ± 0.1 minutes

Needle Wash : ACN/H₂O (10/90)

- Dans un duran de 500 mL, verser 450 mL d'H₂O et 50 mL d'ACN.

Rear Seal Wash : IPA / H₂O + 0.1% FA (75/25)

- Dans un cylindre gradué de 500 mL, verser 375 mL d'IPA et compléter à 500 mL avec H₂O. Ajouter 0.5 mL de FA.

Lavage de la colonne : ACN / H₂O (50/50)

Stockage de la colonne : ACN / H₂O (95/5)

10. PARAMÈTRES HRMS

Les paramètres HESI-II utilisés sont les suivants :

- Polarity: positive
- Spray voltage: 3 kV
- Auxilary heater temperature: 300 °C
- Sheath gas pressure: 50 mTorr
- Auxiliary gas pressure: 30 mTorr
- Capillary temperature: 300 °C

Le spectromètre de masse a été calibré à l'aide du mélange Pierce Vélos ESI (Thermo Scientific, réf N°).

Les data ont été générées pour le développement en mode data-independent acquisition (DIA). Les paramètres suivant ont été appliqués :

Aiguille source placée en position entre B et C.

Une fois la méthode développée, les data ont été générées en mode product reation monitoring (PRM). Les paramètres suivants ont été appliqués :

- Ion source was set to gas flow 48 / 12 / 0 a. u.
- Capillary and heater temperature at 300°C
- ESI was performed at 3 kV for positive.

11. PRÉPARATION DES SOLUTIONS, CONSERVATION, STABILITÉ

Phase Mobile B :

Transférer environ 400-450 mL d'H₂O UHPLC dans un ballon jaugé de 1 L et ajouter 1 mL d'Ammonium formate BioUltra 10 M (C = 10 mM). Ajuster le pH à 3.0 avec de l'ammonium hydroxyde 25% (possible de le diluer) ou de l'acide formique 99% (possible de le diluer). Ajouter 1.5 mL d'acide formique + 2-3 gouttes d'acide formique pur + ajuster avec l'acide formique dilué pour pH= 3.0. Compléter à 1.0 L au trait de jauge avec l'H₂O UHPLC. Se conserve au maximum 2 semaines à température ambiante.

Diluant :

ACN / H₂O 90/10. Pour 1000 mL : prélever 900 mL d'ACN et ajouter 100 mL d'H₂O dans un duran de 1 L. Passer au bain ultrason pendant 2 min. Se conserve au maximum 1 mois à température ambiante.

Blanc : Utiliser le diluant

Préparation des standards :

Standard Interne Acétylcholine et Choline (SI) : Peser exactement environ **30.0 mg d'acétylcholine chloride D4** et **30.0 mg de choline chloride D9**, compléter à **150 mL** avec de l'**H₂O UHPLC** (C_M = 200 µg/mL). Prélever **1.0 mL** et diluer ad. **200 mL** avec le **diluant** (C_{int} = 1.0 µg/mL = 1000 ng/mL). Prélever **5.0 mL** et diluer ad. **100 mL** avec de l'**ACN 100%** (C_F = 50 ng/mL).

Préparation Acétylcholine :

Solution Mère (SM) : Peser exactement environ **50.0 mg d'acétylcholine** chloride et compléter à **100 mL** avec de l'**H₂O UHPLC** (C_M = 0.5 mg/mL, C_M = 500.0 µg/mL).

Solution Intermédiaire (Sint) : Prélever 1.0 mL de **SM** et compléter à 10 mL de l'**H₂O UHPLC** (C_{Sint} = 50.0 µg/mL = 50 000 ng/mL)

Solution Fille (SF) : Prélever 1.0 mL de **Sint** et compléter à 100 mL de l'**H₂O UHPLC** (C_{SF} = 500 ng/mL)

SF5 : Prélever **5.00 mL** de **SF** et diluer ad 10.0 mL avec de l'**H₂O UHPLC** (C_{SF5} = 250.0 ng/mL)
Attention prélever les 5.00 mL avec une pipette jaugée.

Std5 : Prélever **1.00 mL** de **SF5** + 2.0 mL de **SI** ad 10.0 mL d'ACN (C_{Std4} = 25.00 ng/mL), (C_{SI} = 10.0 ng/mL)
Attention prélever les 2.0 mL de **SI** avec une pipette jaugée. **Attention**, ajouter environ 5 mL d'ACN et attendre que le solvant se réchauffe à température ambiante évitant ainsi une erreur due à la contraction de volume.

Tableau 2 : Solutions standards

Concentration des stds (ng/mL)	Volume final total (mL)
Std5	10

12. PRÉPARATION LOT TEST ACÉTYLCHOLINE

• Préparation Miochol E « Like »

Préparation solution mère **SM**: peser exactement environ **200.0 mg d'acétylcholine chlorure** et **1120 mg de mannitol** et compléter à 20 mL avec du NaCl 0.9% ($C_M = 10 \text{ mg/mL} = 10\,000 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Vortexer pendant 15s.

Préparation de la solution intermédiaire **Sint** : Prélever **1.0 mL** de **SM** et diluer ad 200 mL avec le NaCl 0.9% ($C_{Sint1} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL} = 50\,000 \text{ ng/mL}$).

Préparation de la solution fille **SF** : Prélever **1.0 mL** de **Sint** et diluer ad 100 mL avec le NaCl 0.9% ($C_{Sint1} = 500 \text{ ng/mL}$).

VSF4 : Prélever **2.00 mL** de **SF** et diluer ad 10.0 mL de NaCl 0.9% ($C_{VSF5} = 100.0 \text{ ng/mL}$)

Attention prélever les 2.0 mL avec une pipette jaugée

VSF3 : Prélever **1.00 mL** de **SF** et diluer ad 10.0 mL de NaCl 0.9% ($C_{VSF5} = 50.0 \text{ ng/mL}$)

VSF2 : Prélever **500** μL de **SF** et diluer ad 10.0 mL de NaCl 0.9% ($C_{VSF5} = 25.0 \text{ ng/mL}$)

• Préparation des échantillons de validation

VStd4 : Prélever **1.0 mL** de **SF4** + 2.0 mL de SI ad 10.0 mL d'ACN ($C_{Std3} = 10.00 \text{ ng/mL}$), ($C_{SI} = 10.0 \text{ ng/mL}$)

VStd3 : Prélever **1.0 mL** de **SF3** + 2.0 mL de SI ad 10.0 mL d'ACN ($C_{Std3} = 5.00 \text{ ng/mL}$), ($C_{SI} = 10.0 \text{ ng/mL}$)

VStd2 : Prélever **1.0 mL** de **SF2** + 2.0 mL de SI ad 10.0 mL d'ACN ($C_{Std3} = 2.50 \text{ ng/mL}$), ($C_{SI} = 10.0 \text{ ng/mL}$)

Attention prélever les 2.0 mL de SI avec une pipette jaugée. **Attention**, ajouter environ 5 mL d'ACN et attendre que le solvant se réchauffe à température ambiante évitant ainsi une erreur due à la contraction de volume.

13. DÉROULEMENT

- Equilibrer la colonne pendant au moins 15 minutes (phases mobiles et température de colonne appropriées).
- Les données de la courbe d'étalonnage dans la méthode pour les stds sont exprimées en **ng/mL**
- La séquence analytique est présentée en annexe 1 dans le rapport Chroméléon.
- Conditionner le système avec des blancs avant de lancer la séquence de validation.

14. RÉFÉRENCES

- High-sensitivity quantification of acetylcholine and choline in human cerebrospinal fluid with a validated LC-MS/MS method. DOI: [10.1016/j.talanta.2020.121881](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121881).
- Stability of acetylcholine in sterile water. DOI: [10.4212/cjhp.v51i1.1896](https://doi.org/10.4212/cjhp.v51i1.1896).
- LC-MS/MS method for the analysis of choline and acetylcholine using a synchronis HILIC 1.7 μm column. [Thermo Scientific Application Note 20498](#).
- ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures. [CPMP/ICH/381/95](#).
- ICH Topic Q 3 A (R2) impurities in new drug substances. [CPMP/ICH/2737/99](#).
- Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Partie 1 : préparations liquides. ISBN : [978-2-9526010-6-1](#).

7.3. Annexe 3 : Résultats de fonction de réponse



Name: Julian Pezzatti
Company: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Department: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Reference Number: N/A

3 RESPONSE FUNCTION

The response function of an analytical method is, within the range, the existing relationship between the response (signal) and the concentration of the analyte sample. The calibration curve is the most appropriate response function.

[Table 3:1](#) presents all selected regression models that have been sorted according to the Accuracy Index (cf. [Appendix 2](#)).

Table 3:1. Sorting of the Calibration Models

Model	Accuracy Index	Lower and upper limits of quantitation (LOQ) (ng/mL)	Dosing Range Index	Precision Index	Trueness Index
Linear Regression Through 0. Using the Highest Level only (3)	0.8248	[2.977 , 9.211]	1.000	0.5644	0.9941
Linear Regression Through 0. Fitted using the level 3 only	0.8248	[2.977 , 9.211]	1.000	0.5644	0.9941

Explanation of Accuracy Index, Dosing Range Index, Precision Index, and Trueness Index can be found in [Appendix 7](#).

The selected calibration model is: **Linear Regression Through 0. Using the Highest Level only (3)**

The calibration curves obtained from this regression model (cf. [Table 3:2](#) and [Figure 3:1](#), [Figure 3:2](#), [Figure 3:3](#)) are represented by the following equation:

$Y = bX$ where Y = Analytical response (in Counts*sec) and X = Introduced concentration (in ng/mL)

Table 3:2. Regression Parameters

Series	Slope	r ²	Residual d.f.	RSS
1	4.7563E+04	ND	5	4.5510E+09
2	4.7264E+04	ND	5	1.7536E+08
3	4.8305E+04	ND	5	4.6937E+08

r² = coefficient of determination; d.f. = degrees of freedom; RSS = residual sum of squares

Figure 3:1. Calibration Curves - Serie 1

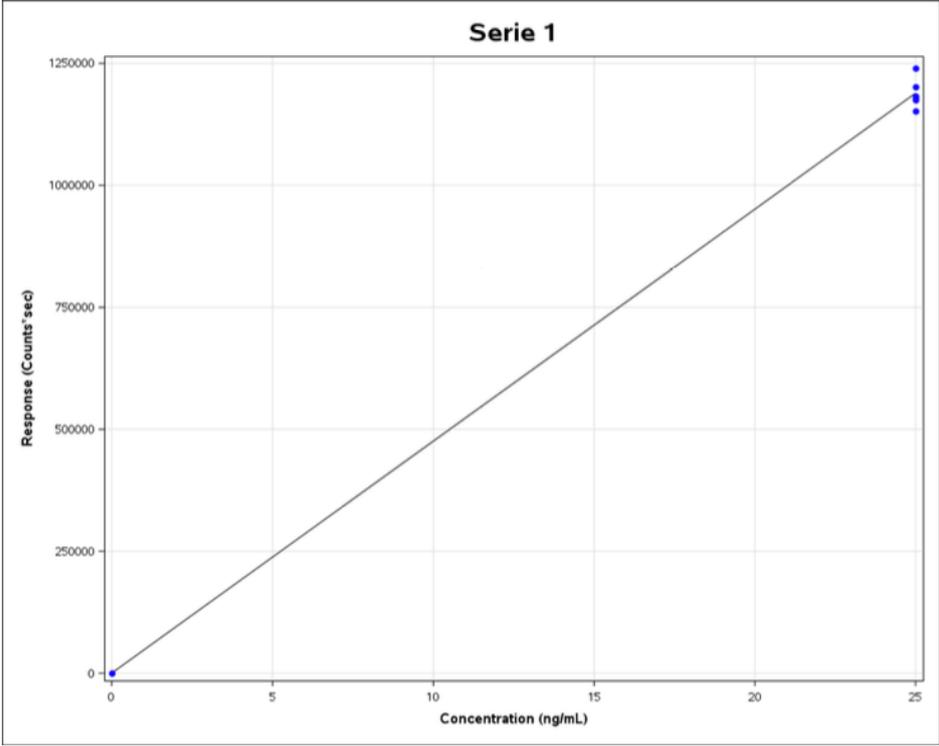


Figure 3:2. Calibration Curves - Serie 2

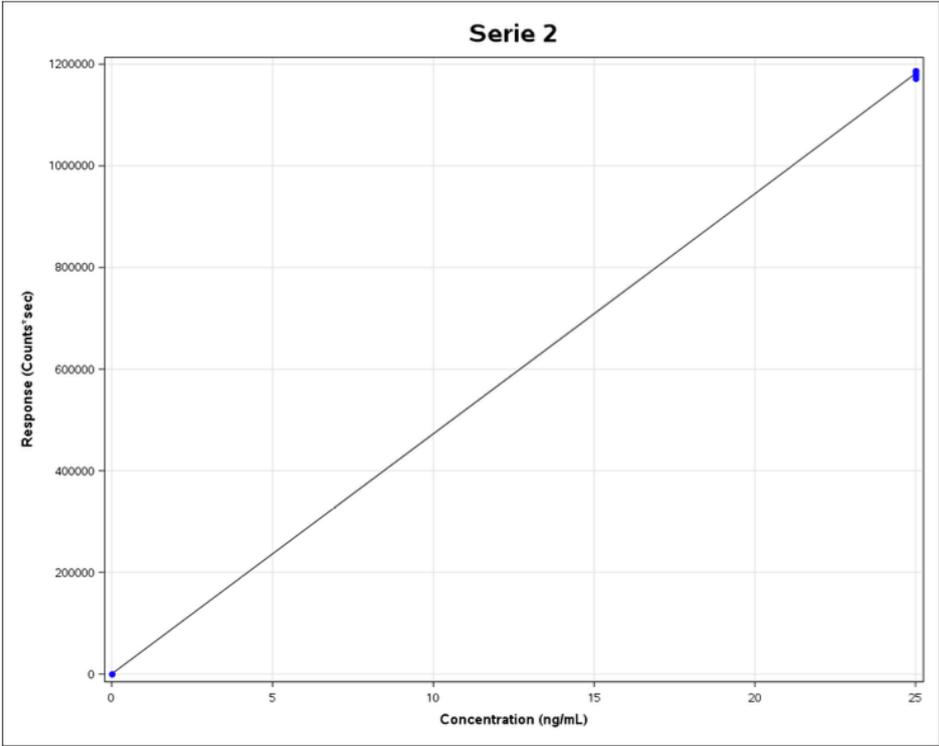
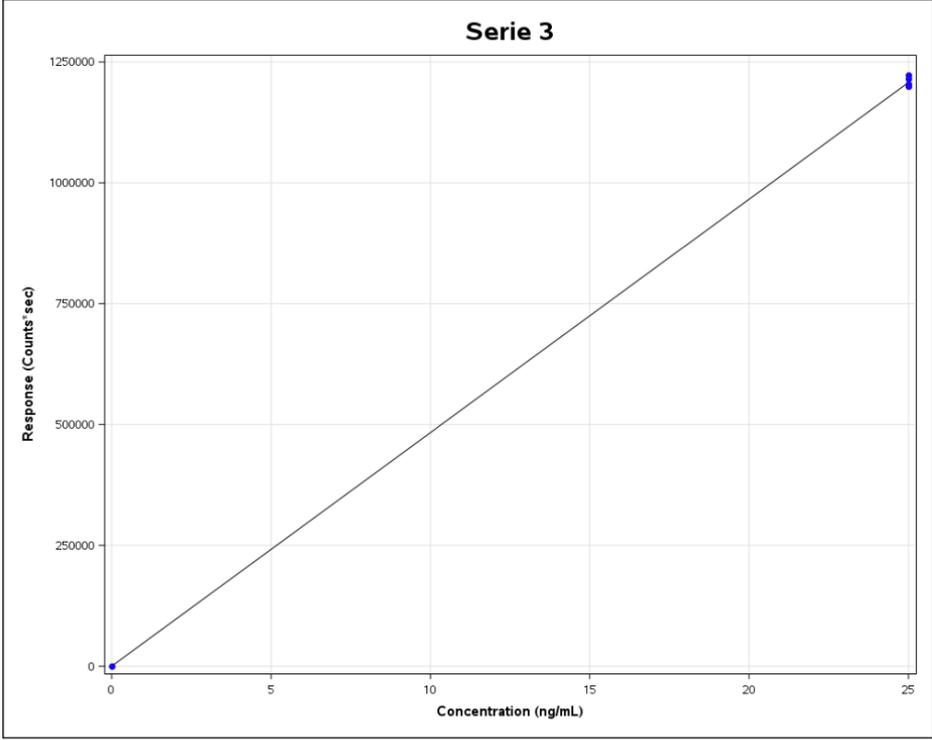


Figure 3:3. Calibration Curves - Serie 3



7.4. Annexe 4 : Résultats de justesse

4 TRUENESS

Trueness refers to the closeness of agreement between a conventionally accepted value or reference value, and a mean experimental one. It gives information on systematic error.

As shown in [Table 4:1](#), trueness is expressed in terms of absolute bias (in ng/mL), relative bias (%), or recovery (%) at each concentration level of the validation standards.

If, for a concentration level, $\hat{\mu}$ is the mean of the introduced concentrations and \bar{x} is the estimate of the mean concentration obtained from calculated concentrations then we have:

$$\text{Absolute bias} = \bar{x} - \hat{\mu}$$

$$\text{Relative bias (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x} - \hat{\mu}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Recovery (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x}}{\hat{\mu}}$$

The 95% confidence interval for the recovery is as follows:

$$L_{\text{recovery}} = \left[\frac{\text{lower} \cdot 100}{\hat{\mu}}, \frac{\text{upper} \cdot 100}{\hat{\mu}} \right]$$

Where *lower* and *upper* are the normal confidence limits for the mean of the concentration as follow:

$$\bar{x} \pm t_{np-1; 1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{np}}$$

Where:

t is the quantile of a Student t distribution with np-1 degree of freedom

$\alpha = 0.05$

$\hat{\sigma}$ is the empirical standard deviation of the concentrations

n is the number of repetitions per series

p is the number of series

Table 4:1. Trueness

Concentration level (ng/mL)	Mean introduced concentration (ng/mL)	Mean back-calculated concentration (ng/mL)	Absolute bias (ng/mL)	Relative bias (%)	Recovery (%)	95% Confidence Interval of Recovery (%)
1.0	2.977	2.951	-0.02552	-0.8574	99.14	[98.52 , 99.76]
2.0	5.123	5.084	-0.03840	-0.7496	99.25	[98.71 , 99.79]
3.0	9.211	9.148	-0.06286	-0.6824	99.32	[98.82 , 99.81]

7.5. Annexe 5 : Résultats de fidélité

5 PRECISION

Precision is the closeness of agreement among measurements from multiple sampling of a homogeneous sample under the recommended conditions. It gives information on random errors and can be evaluated at two levels: repeatability and intermediate precision.

As can be seen in [Table 5:1](#) and [Table 5:2](#), precision is expressed in terms of standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) values for repeatability and intermediate precision.

The estimates of variance components are obtained by the iterative approach of restricted maximum likelihood (REML).

The intermediate precision standard deviation is equal to $\hat{\sigma}_{IP}^2 = \sqrt{\hat{\sigma}_B^2 + \hat{\sigma}_W^2}$

The equation to compute the 95% upper confidence limit of the intermediate precision standard deviation is as follows:

$$L_{U,\hat{\sigma}_{IP}} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 + \sqrt{\left(\frac{n-1}{\chi_{\alpha,n-1}^2} - 1\right)^2 \cdot \left(\frac{MSM}{p}\right)^2 + \left(\frac{JK-J}{\chi_{\alpha,np-n}^2} - 1\right)^2 \cdot \left(1 - \frac{1}{p}\right)^2 \cdot MSE^2}}$$

The equation to compute the 95% upper confidence limit of the repeatability standard deviation is as follows:

$$L_{U,\hat{\sigma}_W} = \sqrt{\nu \cdot \frac{\hat{\sigma}_W^2}{\chi_{\nu,1-\alpha}^2}}$$

Where:

MSE is the mean square error to estimate the repeatability variance

MSM is the model mean square used to estimate the between - series variance

n is the number of repetitions per series

p is the number of series

$\chi^2_{\nu, 1-\alpha}$ is the Chi-Square distribution quantile at $1-\alpha = 0.95$ with ν degrees of freedom

$\hat{\sigma}_B^2$ is the estimate of the between - series variance

$\hat{\sigma}_W^2$ is the estimate of the within - series variance

ν is the number of degrees of freedom computed using the Satterthwaite method

Table 5:1. Relative Intermediate Precision and Repeatability

Concentration level (ng/mL)	Mean introduced concentration (ng/mL)	Repeatability (RSD%) ¹	Intermediate precision (RSD%) ¹
1.0	2.977	0.09277	1.489
2.0	5.123	0.02682	1.300
3.0	9.211	0.04077	1.184

¹ The RSD% for repeatability and intermediate precision has been obtained by dividing the corresponding SD by the "mean introduced concentration".

Table 5:2. Absolute Intermediate Precision and Repeatability

Concentration level (ng/mL)	Mean introduced concentration (ng/mL)	Repeatability (SD - ng/mL)	Between-series (SD - ng/mL)	Ratio of Variance components (between / within)	Intermediate precision (SD - ng/mL)
1.0	2.977	0.002761	0.04422	256.4	0.04431
2.0	5.123	0.001374	0.06656	2347	0.06658
3.0	9.211	0.003755	0.1090	842.1	0.1090

Table 5:3. 95% Upper Confidence Limit

Concentration level (ng/mL)	Mean introduced concentration (ng/mL)	95% Upper Confidence Limit Repeatability (SD - ng/mL)	95% Upper Confidence Limit Intermediate Precision (SD - ng/mL)
1.0	2.977	0.003969	0.1953
2.0	5.123	ND	0.2939
3.0	9.211	0.005397	0.4812

In addition, the recovery of each series as well as for all the series is reported in the [Table 5:4](#).

Table 5:4. By Series Recovery of the Samples

Concentration level (ng/mL)	Series	Mean introduced concentration (ng/mL)	Back-calculated concentrations (ng/mL)	Recovery (%)
1.0	1	2.725	2.977	100.0
1.0	2	2.652	2.977	100.0
1.0	3	3.553	2.900	97.43
1.0	Mean of all series	2.977	2.951	99.14
2.0	1	5.207	5.123	100.0
2.0	2	4.815	5.123	100.0
2.0	3	5.347	5.008	97.75
2.0	Mean of all series	5.123	5.084	99.25
3.0	1	9.425	9.211	100.0
3.0	2	9.455	9.211	100.0
3.0	3	8.753	9.022	97.95
3.0	Mean of all series	9.211	9.148	99.32

7.6. Annexe 6 : Résultats de l'exactitude

7 ACCURACY

Accuracy refers to the closeness of agreement between the test result and the accepted reference value, namely the conventionally true value. The accuracy takes into account the total error, i.e. systematic and random errors, related to the test result. It is assessed from the accuracy profile illustrated in [Figure 7:1](#).

The acceptance limits have been set at $\pm 10 \%$, selected according to the intended use of the analytical procedure.

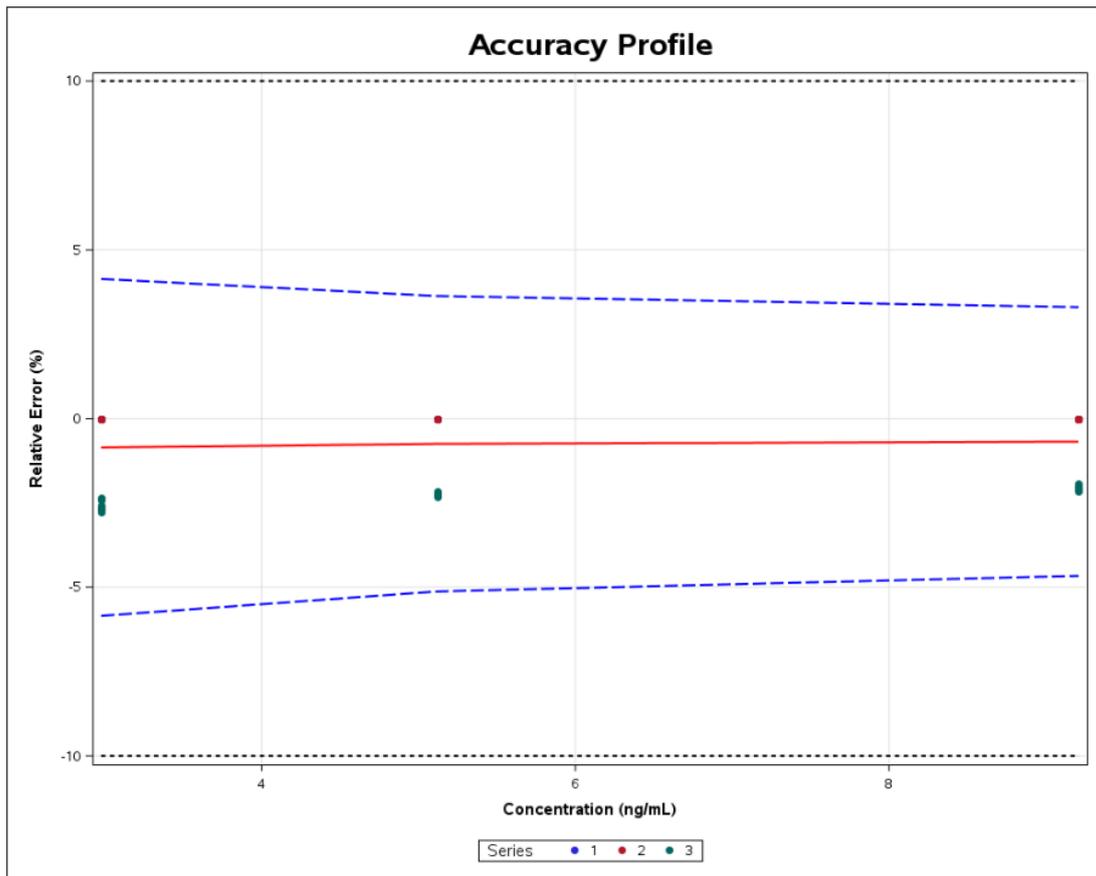
An accuracy profile is obtained by linking on one hand the lower bounds and on the other hand the upper bounds of the β -expectation tolerance intervals calculated at each concentration level. The formula for calculating these β -expectation tolerance intervals is:

$$bias (\%) \pm kRSD_{IP} (\%)$$

Explanation about k and RSD_{IP} can be found in [Appendix 7](#).

The method is considered as valid within the range for which the accuracy profile is within the acceptance limits. This approach gives the guarantee that each further measurement of unknown samples is included within the tolerance limits at the 10.0 % level.

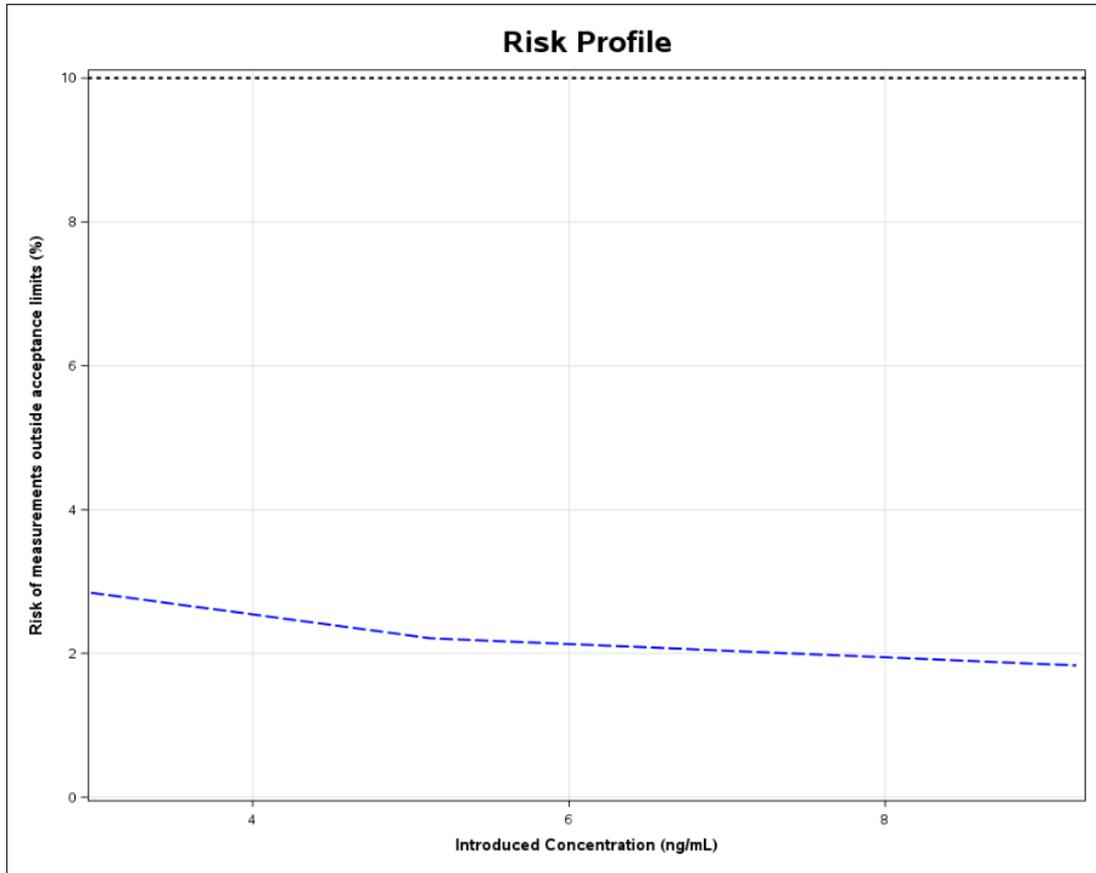
Figure 7:1. Accuracy Profile Obtained by Considering Linear Regression Through 0. Using the Highest Level only (3)



The plain red line is the relative bias, the dashed blue lines are the β -expectation tolerance limits, and the dashed black lines represent the acceptance limits. The dots represent the relative error of the back-calculated concentrations and are plotted with respect to their targeted concentration.

The upper and lower β -expectation tolerance limits expressed in relative error are also presented in [Table 7:1](#) as a function of the introduced concentrations. Risk of measurements at each level are only estimated when there are at least two replicates per series for at least one series.

Figure 7:2. Risk Profile by Considering Linear Regression Through 0. Using the Highest Level only (3)



The dotted line represents the maximum risk level chosen: 10.0 %.

Table 7:1. Method Accuracy Obtained by Considering Linear Regression Through 0. Using the Highest Level only (3)

Concentration level (ng/mL)	Mean introduced concentration ¹ (ng/mL)	Beta-expectation tolerance limits (ng/mL)	Relative Beta-expectation tolerance limits (%)	Risk ² (%)
1.0	2.977	[2.802 , 3.100]	[-5.852 , 4.137]	2.842
2.0	5.123	[4.860 , 5.309]	[-5.129 , 3.630]	2.209
3.0	9.211	[8.781 , 9.515]	[-4.668 , 3.303]	1.831

¹ Introduced concentration and associated responses may have been subjected to transformation to align all the data to an average concentration value by concentration level (cf. [Appendix 1](#)).

² Risk of having measurements falling outside of the acceptance limits.

7.7. Annexe 7 : Protocole de production des seringues (1 lot)

