

# **Master en Pharmacie**

## **Travail Personnel de Recherche**

### **Etude de faisabilité de formules de nutrition parentérale pour enfants prématurés destinées à un usage dans les pays en développement**

présenté à la

Faculté des sciences de  
L'Université de Genève

par

**Nathalie MORCOS**

**Responsables :**

**Dre Lucie Bouchoud, Prof. Pascal Bonnabry**

Genève  
2012

## ***Remerciements***

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail à mes côtés.

Je remercie très sincèrement la Doctoresse Lucie Bouchoud, responsable de l'unité cytostatique de la Pharmacie des Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG), pour sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse tout au long de ce projet et sans qui ce travail n'aurait pas été aussi agréable. Je remercie le Docteur Farshid Sadeghipour, responsable du secteur production, pour sa sympathie et sa disponibilité.

Je remercie également le Professeur Pascal Bonnabry, Pharmacien-Chef, pour son accueil à la Pharmacie des HUG et grâce à qui j'ai pu découvrir le milieu hospitalier.

Je remercie B.Braun, et plus précisément le Docteur Vincent Adamo et le Docteur Florian Wakenhut, grâce à qui le projet a pu prendre forme. Merci pour le temps que vous m'avez accordé, pour les produits que vous m'avez fourni et pour les analyses de colorimétrie effectuées dans vos laboratoires.

Je remercie le Docteur Riccardo Pfister, néonatalogue aux HUG, pour sa participation à l'élaboration de la formulation pour les nouveau-nés prématurés et pour l'intérêt porté à ce travail.

Je remercie le Docteur Pascal Furrer, enseignant à la section des Sciences Pharmaceutiques, pour les précieux renseignements galéniques fournis, pour sa gentillesse et pour sa disponibilité au cours du semestre. Merci également pour le prêt de l'agitateur automatique.

Je remercie les préparateurs de la Pharmacie des HUG pour le remplissage des flacons. Je tiens particulièrement à remercier Victor Herrera pour sa sympathie. Merci de m'avoir formée pour l'utilisation du matériel aseptique et merci de m'avoir fait découvrir les préparations pharmaceutiques en salle blanche, une belle expérience.

Je remercie Sandrine Fleury et Jean-Frédéric Saâdi pour les appareils mis à disposition dans le laboratoire de contrôle de qualité. Merci Jean-Frédéric pour les explications fournies et pour ta bonne humeur quotidienne. Je remercie Béatrice Matthey et Patricia Geyer pour la commande des produits et le cadre de travail agréable. Merci aussi pour les étuves mises à disposition.

Je remercie de tout cœur ma famille, mes amis et David qui m'ont encouragés durant tout le semestre et qui m'ont accordés des moments de détente. Merci pour votre soutien durant toutes mes années d'étude.

## **Résumé**

**Contexte :** Le système digestif des nouveau-nés prématurés n'est pas fonctionnel à leur naissance. De ce fait, il est nécessaire d'administrer à ce groupe de patients une alimentation parentérale contenant les éléments nutritifs essentiels à leur croissance, c'est-à-dire des glucides, des lipides et des protéines. Les pays en développement ne possèdent pas les infrastructures nécessaires à la fabrication des nutriments parentéraux (NP). L'achat et le transport de NP prêtes à l'emploi présentes sur le marché occidental est une solution trop onéreuse et pas forcément adaptée aux besoins locaux. Il est donc envisagé de produire des NP qui pourraient être acheminées à coût raisonnable dans les pays en développement. Les conditions climatiques des pays en développement est une des problématiques importantes à prendre en compte pour la conservation et le stockage des NP. Dans ce travail qui constituait une étude de faisabilité préliminaire, deux formulations ont été étudiées : une forme poudre à reconstituer et une NP sous forme de concentrats à diluer avant administration.

**Méthode :** La poudre de NP a été reconstituée directement dans 100 mL de glucose 10% ou après une étape intermédiaire (reconstitution) passant par un volume de 25 mL ou 10 mL, puis dilution jusqu'à un volume final de 100 mL. Le pH, l'osmolarité, la colorimétrie et la teneur en particules ont été mesurés directement après la reconstitution ou dilution dans un volume final de 100 mL de glucose 10%, puis une et 24 heures après la dilution. Les échantillons ont été stockés à une température de 34°C. Les mêmes paramètres ont été mesurés après une et quatre semaines de conservation de la poudre à 34°C. Trois concentrats ont été étudiés (12%, 24% et 48% d'acides aminés). Ils ont été dilués ad 100 mL avec du glucose 10% ou 20%. Les mêmes essais ont été effectués sur les différents concentrats, puis après leur dilution avec une solution de glucose, ainsi que 24 heures après dilution. Tous les échantillons (concentrats et concentrats dilués) ont été conservés à 34°C. Seule l'osmolarité n'a pas été mesurée sur les concentrats non dilués.

**Résultats :** Les essais sur les poudres reconstituées avec 10 mL de glucose 10% ainsi que le concentrat à 48% d'acides aminés ont été abandonnés pour cause de mauvaise solubilité. Le pH, l'osmolarité et les particules sont relativement stables après quatre semaines de conservation à 34°C pour les NP sous forme de poudre. Une différence de couleur des concentrats durant le stockage a été mise en évidence (plus marquée pour le concentrat à 24% d'acides aminés), contrairement aux poudres qui sont restées blanches. De plus, une légère diminution de l'osmolarité des concentrats à 24% d'acides aminés a été observée à la quatrième semaine de conservation à 34°C.

**Conclusion :** Il est envisageable d'envoyer aux pays en développement des NP sous forme sèche. La forme la plus adéquate est la NP sous forme de poudre à reconstituer dans 100 mL de glucose 10%. L'étude établie ne suffit pas à la mise en pratique des formulations étudiées. Un dosage des composants des NP doit être effectué. De plus, l'analyse des différents dispositifs pouvant contenir les NP doit être entreprise, tout en considérant le coût du transport ainsi que la facilité d'utilisation par le personnel soignant.

## *Liste des abréviations*

|           |  |
|-----------|--|
| BPF       | Bonnes Pratiques de Fabrication                                |
| Eau PPI   | Eau Pour Préparations Injectables                              |
| ELBW      | Extrem Low Birth Weight (Extrême Petit Poids de Naissance)     |
| EVA       | Ethylène-Vinyl-Acétate   |
| HUG       | Hôpitaux Universitaires de Genève                              |
| LBW       | Low Birth Weight (Petit Poids de Naissance)                    |
| LCT       | Long Chain Triglycerides (Triglycérides à Chaîne Longue)       |
| MCT       | Medium Chain Triglycerides (Triglycérides à Chaîne Moyenne)    |
| NP        | Nutrition Parentérale  |
| Ph. Eur.  | Pharmacopée Européenne   |
| Ph. Helv. | Pharmacopée Helvétique   |
| PPN       | Partial Parenteral Nutrition (Nutrition Parentérale Partielle) |
| TPN       | Total Parenteral Nutrition (Nutrition Parentérale Totale)      |
| VLBW      | Very Low Birth Weight (Très Petit Poids de Naissance)          |
| VVC       | Voie Veineuse Centrale   |
| VVP       | Voie Veineuse Périphérique                                     |

## ***Table des matières***

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Introduction   | 1  |
| 2       | Eléments de théorie  | 2  |
| 2.1     | Nutritions parentérales  | 2  |
| 2.1.1   | Généralités  | 2  |
| 2.1.2   | Composants de la NP  | 3  |
| 2.1.2.1 | Glucose  | 3  |
| 2.1.2.2 | Lipides  | 4  |
| 2.1.2.3 | Acides aminés  | 4  |
| 2.1.2.4 | Electrolytes et apport liquidien                               | 5  |
| 2.1.2.5 | Micronutriments  | 5  |
| 2.1.3   | Stabilité  | 5  |
| 2.1.3.1 | Stabilité physique   | 6  |
| 2.1.3.2 | Stabilité chimique   | 6  |
| 2.1.4   | Complications  | 7  |
| 2.2     | Prématurité  | 7  |
| 2.2.1   | Généralités  | 7  |
| 2.2.2   | Besoins des prématurés   | 8  |
| 2.3     | Caractérisation d'une NP                                       | 9  |
| 2.3.1   | Exigences légales  | 9  |
| 2.3.2   | Caractéristiques galéniques                                    | 10 |
| 2.4     | Production des nutritions parentérales                         | 10 |
| 2.4.1   | Méthodes de production des NP                                  | 10 |
| 2.4.2   | Mélange de poudre, mise en solution et remplissage des flacons | 10 |
| 2.5     | Bonnes Pratiques de Fabrication                                | 11 |
| 3       | Démarche du travail  | 12 |
| 3.1     | Réflexion préliminaire   | 12 |
| 3.2     | Analyse théorique des solutions imaginées                      | 12 |
| 3.2.1   | Poudre à reconstituer  | 12 |
| 3.2.2   | Concentrat à diluer  | 13 |
| 3.2.3   | Solution intégrale en petit volume                             | 14 |
| 3.3     | Pré-évaluation des options                                     | 14 |
| 3.4     | Formulation  | 14 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.4.1 | Adaptation de la formulation   | 15 |
| 4     | Méthode  | 18 |
| 4.1   | Expérience préliminaire  | 18 |
| 4.2   | Mélanges de poudres  | 18 |
| 4.3   | Poudre à reconstituer  | 18 |
| 4.3.1 | Récapitulatif des manipulations effectuées pour la forme poudre à reconstituer | 19 |
| 4.4   | Concentrats  | 20 |
| 4.4.1 | Récapitulatif des manipulations effectuées pour la forme concentrat à diluer   | 21 |
| 4.5   | Description des tests utilisés   | 22 |
| 4.5.1 | Contamination particulaire - Particules visibles                               | 22 |
| 4.5.2 | Contamination particulaire - Particules non visibles                           | 23 |
| 4.5.3 | Colorimétrie   | 23 |
| 5     | Résultats  | 24 |
| 5.1   | Expérience préliminaire  | 24 |
| 5.2   | Poudre à reconstituer  | 24 |
| 5.2.1 | Poudre reconstituée dans 100 mL de glucose 10%                                 | 24 |
| 5.2.2 | Poudre reconstituée dans 25 mL de glucose 10%                                  | 25 |
| 5.2.3 | Poudre reconstituée dans 10 mL de glucose 10%                                  | 26 |
| 5.3   | Concentrats à diluer   | 26 |
| 5.3.1 | Concentrat à 12% d'acides aminés   | 26 |
| 5.3.2 | Concentrat à 24% d'acides aminés   | 28 |
| 5.3.3 | Concentrat à 48% d'acides aminés   | 29 |
| 6     | Discussion   | 29 |
| 6.1   | Expérience préliminaire  | 29 |
| 6.2   | Poudre à reconstituer  | 29 |
| 6.3   | Concentrats à diluer   | 31 |
| 6.4   | Comparaison des deux formulations (poudre et concentrats)                      | 32 |
| 7     | Conclusion   | 34 |
| 8     | Perspectives   | 35 |
| 9     | Bibliographie  | 36 |
| 10    | Annexes  | 39 |

## 1 Introduction

Les nutritons parentérales (NP) permettent de fournir des nutriments à un individu par voie intraveineuse [1]. Ainsi, elles sont d'une grande utilité en milieu hospitalier pour les patients dont le tractus gastro-intestinal n'est pas fonctionnel. Elles présentent cependant un coût relativement important [2]. L'administration des nutriments permet de palier aux besoins nutritionnels des patients ayant un apport entéral insuffisant ou impossible. Les nutritons parentérales sont composées d'acides aminés, de glucose, d'électrolytes et de lipides qui, dans les formulations commercialisées pour les adultes, sont généralement répartis dans des poches à trois compartiments qui sont mélangés au moment de l'administration. Il existe également des poches où ces composants sont déjà mélangés au moment de la fabrication. Des vitamines et des oligo-éléments sont habituellement ajoutés juste avant administration pour des raisons de stabilité. Ces poches nutritionnelles permettent également d'apporter l'eau nécessaire à l'organisme [3].

La NP est particulièrement utile chez les prématurés, ceux-ci ne pouvant pas être nourris par voie orale. Un enfant est considéré comme prématuré si son âge gestationnel est inférieur à 37 semaines [4]. Sa nutrition peut se révéler compliquée à cause de l'immaturation de différents organes essentiels tels que les intestins, le foie ou les reins. C'est pourquoi un apport parentéral leur est nécessaire et celui-ci doit être spécifiquement adapté à leurs besoins [5, 6]. Les prématurés présentent par exemple des besoins nutritionnels supérieurs à ceux des nouveau-nés à terme aux niveaux énergétiques, protéiques et hydriques [3].

La fabrication des préparations parentérales doit se plier à différents critères. En effet, selon la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) 7.5, les préparations parentérales satisfont à différentes exigences telles que la stérilité, l'apyrogénicité, l'absence de particules visibles (solution limpide) et la stabilité dans le temps. Elles nécessitent donc des méthodes de préparations spécifiques aux produits stériles. De plus, selon la Pharmacopée Helvétique (Ph. Helv.) 10, la production des médicaments non soumis à une autorisation de mise sur le marché doit être conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), ce qui est le cas des NP préparées en milieu hospitalier.

Ce travail a pour objectif de réaliser une étude de faisabilité préliminaire de formules de nutrition parentérale pour enfants prématurés destinées à un usage dans les pays en développement. Les conditions nécessaires à la préparation des NP sont difficilement disponibles dans ces pays qui ont peu de moyens financiers pour acquérir le matériel adéquat à cette fabrication et qui ne disposent pas forcément des qualifications nécessaires à la fabrication de produits stériles complexes. C'est pourquoi il est envisagé de produire les NP dans les pays développés, puis de les envoyer dans les pays en développement. Ceci permettrait d'augmenter la survie d'enfants prématurés et de réduire les séquelles engendrées par une mauvaise nutrition à la naissance, telles qu'un retard de croissance [7].

## 2 Eléments de théorie

### 2.1 Nutritions parentérales

#### 2.1.1 Généralités

La nutrition parentérale apporte les éléments nutritifs à l'organisme en passant par la voie intraveineuse. Ainsi, il est possible de compléter une nutrition orale ou entérale inadéquate ou impossible à l'aide de tous les nutriments (glucose, lipides, acides aminés, vitamines et oligo-éléments) par voies intra-veineuse [8]. Différentes situations sont à l'origine d'indications à la NP. Chez les prématurés, l'immaturation du tractus gastro-intestinal et le syndrome de l'intestin court sont les principales indications [3].

Lorsque les nutriments sont fournis exclusivement par voie intraveineuse, il s'agit de nutrition parentérale totale (TPN). Le terme de nutrition parentérale partielle (PPN) est employé si elle s'accompagne d'une alimentation entérale [3].

La nutrition intraveineuse évite le passage par le tractus gastro-intestinal et ne nécessite donc pas de digestion et d'élimination fécale de la nourriture. De ce fait, l'énergie requise à travers une administration parentérale est inférieure de 10 à 20% à celle requise par une administration entérale [3, 5].

Afin d'augmenter la stabilité de ces mélanges complexes, les composants d'une NP sont répartis dans des poches souples à deux (NP binaire : glucose et acides aminés) ou trois compartiments (NP ternaire : glucose, acides aminés et lipides), les électrolytes étant répartis dans les compartiments glucose et acides aminés. Dans le cas des poches ternaires, le glucose, les acides aminés et les lipides sont mélangés dans les unités de soins et les vitamines et les oligo-éléments sont ajoutés juste avant l'administration [8]. Pour les poches binaires, les lipides, s'ils sont administrés, sont perfusés séparément (sur une autre voie) ou par une connexion en Y [9]. Dans le milieu hospitalier, les NP qui sont fabriquées sont généralement produites dans une poche unique qui contient tous les éléments (acides aminés, glucose, électrolytes pour du binaire, avec les lipides pour du ternaire). Ceci a le grand désavantage de limiter la stabilité des NP comme il sera discuté plus tard [10].

Il est possible d'administrer les NP par voie veineuse périphérique (VVP) ou centrale (VVC). L'utilisation des cathéters est donc nécessaire [11]. Il s'agit d'un tube en plastique creux, souple et fin, introduit dans une veine centrale ou périphérique [12]. Les veines centrales se caractérisent par leur gros calibre. Les plus couramment utilisées pour l'administration de NP sont la veine cave supérieure [11], la veine jugulaire, située au niveau du cou, et la veine sous-clavière, située au niveau de l'épaule [13]. Les veines périphériques se trouvent aux extrémités et sont dites superficielles ; l'avant-bras est le plus souvent utilisé. Les canules veineuses peuvent éventuellement être utilisées à la place des cathéters sur VVP [11]. La voie ombilicale (voie centrale) peut être utilisée chez les nouveau-nés en attendant qu'une VVC de plus longue durée soit installée [3].



La VVP est indiquée en cas de NP à court terme, si la VVC n'est pas envisageable à cause d'une contre-indication ou pour remplacer la VVC en cas d'infection du cathéter. L'osmolarité tolérée sur une VVP est généralement limitée (900 mosm/L) [5]. L'osmolarité correspond au nombre de particules de substances dissoutes dans un litre de solution [14]. Une solution hyperosmolaire peut causer des phlébites. De ce fait, à cause de leur haute osmolarité, les TPN ne peuvent pas être administrées sur VVP [15]. La VVC permet l'administration de hautes concentrations en nutriments (soit une haute osmolarité, généralement entre 1200 et 1500 mosm/L) sur de longues périodes [11, 16].

Les cathéters peuvent être la cause de nombreuses complications, telles que des thromboses ou des infections, ce qui oblige leur remplacement [11, 16]. Une étude a démontré que l'ajout d'héparine permet de prolonger la durée de vie du cathéter [17].

Une pompe à perfusion permet le contrôle du débit de la NP. Ainsi, un débit constant peut être maintenu, augmentant la tolérance métabolique à la NP. Chez l'adulte, l'administration des NP peut se faire en continu sur 24 heures ou en cyclique (discontinu) avec une administration de la NP durant la nuit [13].

Les nutritions parentérales peuvent être individualisées ou standardisées. Les NP dont la composition est standardisée sont indiquées pour couvrir les besoins nutritionnels de la majorité des patients, tandis que les NP individualisées ne sont prescrites qu'à certains patients avec des besoins spécifiques. Elles sont plus fréquemment rencontrées en pédiatrie. [3]. Les NP individualisées présentent l'avantage de permettre une adaptation de la composition de l'alimentation parentérale en fonction des besoins spécifiques de chaque patient [18, 19]. La préparation de ces NP demande alors un travail plus conséquent de la part des pharmacies hospitalières [18], et engendre ainsi un coût plus élevé. En effet, selon une étude, les NP standardisées permettent de diminuer les coûts liés à la production de 30% par rapport aux NP individualisées [20]. Grâce aux NP standardisées, l'alimentation d'un nouveau-né prématuré peut se faire très rapidement après sa naissance, puisqu'il n'y a pas de délai de prescription et de fabrication comme pour une NP individualisée [19]. De plus, ces nutritions permettent de diminuer différents types d'erreurs, tels que les erreurs lors des prescriptions ou du processus de fabrication [3]. La mise à disposition de NP standardisées et de NP individualisées permet aux hôpitaux de réduire la charge de travail tout en améliorant la sécurité des patients et la qualité des soins des patients qui nécessitent une formulation adaptée à leurs besoins spécifiques [19].

## **2.1.2 Composants de la NP**

### **2.1.2.1 Glucose**

Le glucose est un hydrate de carbone permettant l'apport en énergie à différentes cellules parmi lesquelles figurent les globules rouges et les cellules du système nerveux central [5, 11, 21]. Il s'agit de la source principale d'énergie des nutritions parentérales [11]. Elle est souvent utilisée sous forme de dextrose (D-glucose), dont chaque gramme apporte 3.4 kcal d'énergie dans la NP [5]. Il est recommandé de ne pas dépasser un flux de perfusion de 5 mg/kg/min de glucose afin d'éviter des problèmes respiratoires pouvant survenir suite à un excès de

production de dioxyde de carbone [5, 11]. L'osmolarité des NP est essentiellement déterminée par le glucose. Une solution concentrée à 5% de glucose correspond à 278 mosm/L. Lorsque l'administration se fait par la VVP, une osmolarité maximale de 900 mosm/L est tolérée. C'est pourquoi, il est recommandé que les NP contenant plus de 10% de glucose (osmolarité de 555 mosm/L) soient administrées par VVC [5, 22] car l'osmolarité dépasse 900 mosm/L avec la présence d'autres composants (acides aminés par exemple) dans la NP étant donné que le nombre de particules en solution augmente [14].

### **2.1.2.2 Lipides**

L'apport énergétique se fait aussi par l'administration de triglycérides sous forme d'émulsions lipidiques. Ainsi, il est possible de diminuer l'apport en glucose tout en maintenant un apport énergétique adéquat [5]. Un gramme de lipide permet un apport de 9 kcal [3]. Les émulsions lipidiques peuvent être constituées de triglycérides à chaîne longue (LCT), à chaîne moyenne (MCT), d'huile d'olive et/ou d'huile de poisson. Des combinaisons entre ces catégories sont commercialisées en Europe [5, 11, 23]. Les émulsions lipidiques principalement composées de LCT (émulsions lipidiques de première génération) sont responsables de différents effets indésirables, tels qu'une toxicité hépatique ou une perturbation de l'hémodynamique intrapulmonaire. C'est pourquoi, les émulsions lipidiques de deuxième génération, composées de LCT et de MCT, sont généralement indiquées chez les patients présentant des atteintes respiratoires ou hépatiques. Ces émulsions sont également recommandées en cas d'infection sanguine ou de besoins caloriques élevés [23].

### **2.1.2.3 Acides aminés**

Les acides aminés apportés par la NP devraient être destinés à la synthèse protéique uniquement. C'est pourquoi, l'apport d'énergie provenant du glucose et des lipides doit être suffisant [5, 24]. Un apport énergétique non protéique de 30 à 40 kcal par gramme d'acides aminés est recommandé. Les protéines sont essentielles à l'organisme car elles jouent un rôle fonctionnel et structurel au niveau cellulaire [24].

Chez l'adulte, la composition des nutriments parentéraux en acides aminés dépend de leur nécessité. Ainsi, ils sont considérés comme « essentiels » s'ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme, « semi-essentiels » s'ils ne sont que partiellement synthétisés, et « non essentiels » si le corps peut les synthétiser. Certains acides aminés appartiennent à une classe différente chez les nouveau-nés [24]. Par exemple, la taurine, la tyrosine et la cystéine sont considérées comme essentielles chez les enfants prématurés alors qu'elles sont semi-essentiels ou non-essentiels chez l'adulte [3, 25]. Les acides aminés utilisés dans les NP ont été classifiés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification des acides aminés utilisés dans les NP [24]

| Essentiels    | Semi-essentiels | Non-essentiels   |
|---------------|-----------------|------------------|
| Histidine     | Arginine        | Alanine          |
| Isoleucine    | Cystéine*       | Acide aspartique |
| Leucine       | Glycine         | Asparagine       |
| Lysine        | Proline         | Acide glutamique |
| Méthionine    | Tyrosine*       | Glutamine        |
| Phénylalanine |                 | Sérine           |
| Thréonine     |                 | Taurine*         |
| Tryptophane   |                 |                  |
| Valine        |                 |                  |

\* Acides aminés essentiels chez l'enfant prématuré

#### 2.1.2.4 Electrolytes et apport liquidien

Un apport d'électrolytes quotidien par les NP permet la conservation de l'homéostasie électrolytique [5]. Les électrolytes généralement concernés sont le sodium, le potassium, le magnésium, le phosphate et le calcium [11]. Les besoins du patient varient en fonction de son état physiopathologique [5].

Un apport liquidien est indispensable à toute NP. En effet, il s'agit du composant principal de la masse corporelle d'un individu [24]. Un volume d'environ 2000 mL par jour est recommandé chez l'adulte sain [5].

#### 2.1.2.5 Micronutriments

Les micronutriments regroupent les vitamines et les oligo-éléments. Les vitamines permettent le maintien d'un métabolisme et d'une fonction cellulaire normale. Ainsi, elles sont indispensables pour l'organisme. Les oligo-éléments servent au bon fonctionnement de nombreux systèmes enzymatiques [5]. Certaines réactions immunologiques en dépendent aussi [24]. Ils ne sont indispensables que pour les NP de longue durée [11] (après deux semaines de TPN [21]), seul le zinc devrait être introduit même pour une NP de courte durée [24] (à partir du premier jour de TPN [21]).

#### 2.1.3 Stabilité

Les NP sont des mélanges complexes qui peuvent être à l'origine de diverses interactions (physiques ou chimiques) [26]. Celles-ci sont le reflet d'une instabilité de la préparation parentérale.

### **2.1.3.1 Stabilité physique**

La stabilité physique concerne principalement la déstabilisation de l'émulsion lipidique, la précipitation d'électrolytes ou encore la coloration de la solution.

L'émulsion, thermodynamiquement instable, peut présenter une floculation, un crémage et/ou une rupture [11]. Ceci est fortement influencé par le pH ou la présence des électrolytes, principalement des cations, car la stabilité des émulsions lipidiques injectables dépend d'interactions ioniques négatives (charges négatives présentes sur la lécithine, émulgateur de l'émulsion) [26]. De plus, il est important de contrôler la taille des particules de l'émulsion. En effet, le diamètre des particules injectées ne doit pas excéder 5  $\mu\text{m}$  afin de permettre l'administration parentérale [5, 27]. Par ailleurs, l'augmentation du nombre de gros globules pourrait causer l'obstruction des artérioles pulmonaires, engendrant un risque d'embolie graisseuse [11].

La précipitation des électrolytes concerne essentiellement les ions di- et trivalents comme le phosphate et le calcium. Plusieurs paramètres peuvent influencer la solubilité de ces électrolytes. Tout d'abord, un pH élevé (basique) augmente le risque de précipitation. Le pH des NP dépend principalement de la concentration de glucose et de la composition en acides aminés. Une acidification consécutive à une concentration élevée en acides aminés et en glucose améliore la solubilité du phosphate de calcium. De plus, la concentration finale d'ions calcium a une influence sur la solubilité du phosphate de calcium. En effet, une faible quantité d'ion calcium par rapport au phosphate entraînerait la formation de sel de phosphate dibasique faiblement soluble [28]. Par ailleurs, l'utilisation de sels organiques de calcium et de phosphate diminue le risque de précipitation, permettant ainsi d'augmenter les concentrations de chacun des électrolytes [28, 29]. D'autres facteurs comme la température influencent la stabilité des électrolytes. Ainsi, des températures basses sont préférées afin de diminuer la dissociation des sels organiques de calcium [28]. La précipitation du phosphate de calcium peut entraîner différents types de complications, tels que l'occlusion du cathéter, un syndrome de détresse respiratoire ou une pneumonie interstitielle, qui peuvent se révéler mortelles [11].

### **2.1.3.2 Stabilité chimique**

Les nutriments peuvent également subir différentes sortes de dégradations chimiques.

Tout d'abord, la peroxydation des lipides peut avoir lieu lorsque les acides gras polyinsaturés sont au contact de l'oxygène. Le stress oxydatif est une des conséquences de cette réaction et peut être source de problèmes, notamment chez l'enfant prématuré. Des complications hépato-biliaires (cholestase) ou respiratoires (maladie chronique des poumons) peuvent survenir chez ce groupe de patient [3, 5]. La peroxydation des lipides peut être diminuée par l'effet antioxydant de la vitamine E [11].

La coloration des solutions de NP est généralement due à la réaction de Maillard qui entraîne une teinte jaune-brun [30]. Cette réaction est le reflet d'une interaction entre le glucose et les

acides aminés. Les risques des produits issus de cette réaction sont encore inconnus en administration intra-veineuse [31].

En outre, certaines vitamines peuvent subir une photodégradation à cause de leur grande sensibilité à la lumière [28]. L'administration simultanée de lipides protège les vitamines de cette réaction [11]. De plus, les vitamines peuvent aussi être exposées à des phénomènes d'oxydation, comme la vitamine C. Il est donc important d'assurer un environnement sans oxygène pour permettre un stockage optimal [11, 32]. Pour cela, des poches multicouches sont préférées aux poches EVA (Ethylène-Vinyl-Acétate) car elles protègent mieux contre l'oxygène [32]. L'utilisation de flacons est également conseillée.

Enfin, toutes les réactions de dégradations présentées peuvent être catalysées par les oligo-éléments ; la dégradation de la vitamine C en est un exemple. C'est la raison pour laquelle les oligo-éléments sont introduits en dernier lieu lors de l'administration de la NP [32].

#### **2.1.4 Complications**

Différents types de complications peuvent survenir au cours de l'administration d'une NP. Elles peuvent être de types métaboliques, infectieuses ou encore mécaniques. Les plus fréquentes concernent les complications liées au cathéter. Ce dispositif peut notamment provoquer des infections au site d'insertion par exemple. Certaines pathologies sous-jacentes peuvent aussi être à l'origine d'infections. De nombreuses complications métaboliques peuvent survenir, l'hyperglycémie est la plus fréquente, mais les complications hépatiques, osseuses [5] ou encore neurologique ne sont pas exclues [11]. L'occlusion du cathéter causée par une thrombose ou une précipitation chimique est un exemple de complications mécaniques [11].

### **2.2 Pré maturité**

#### **2.2.1 Généralités**

Un enfant est considéré comme prématuré s'il naît avant la 37<sup>ème</sup> semaine de gestation. Il existe différentes classifications basées soit sur l'âge gestationnel, soit sur le poids à la naissance. Un enfant né avant la 32<sup>ème</sup> semaine de gestation est appelé « grand prématuré » alors que s'il naît avant la 28<sup>ème</sup> semaine de gestation, il s'agit d'un « extrême prématuré ». Le poids à la naissance permet de définir trois catégories de prématurés. Ainsi, un poids inférieur à 2.5 kg caractérise un petit poids de naissance (LBW). De même, des poids inférieurs à 1.5 kg et à 1 kg qualifient un très petit poids de naissance (VLBW) et un extrême petit poids de naissance (ELBW), respectivement [4].

La prématurité peut être causée par différents facteurs. Des anomalies utérines et des infections sont des causes maternelles responsables d'une naissance prématurée. De plus, les grossesses multiples ou une rupture prématurée des membranes peuvent être à l'origine de ces prématurités. Par ailleurs, un enfant peut naître prématurément suite à une décision médicale,

permettant ainsi de sauver la mère et/ou son enfant. Une pathologie vasculaire placentaire, des accidents hémorragiques, une souffrance fœtale ou une pathologie maternelle grave peuvent conduire le médecin à procéder à un accouchement prématuré [33].

Un enfant prématuré présente une immaturité au niveau de ses organes et de ses fonctions. Ainsi, il est exposé à de nombreux risques, notamment respiratoires, hépatiques, rénaux, cardiovasculaires et cérébraux. L'immaturité du système gastro-intestinal le rend intolérant à la nutrition entérale dans les premiers jours, c'est pourquoi la NP est nécessaire chez ces enfants [33].

L'incidence d'enfants prématurés dans le monde est de 11.1%. Ce chiffre est plus prononcé dans les pays pauvres (12% contre 9% dans les pays plus riches). Il est important de mettre en avant que la survie des extrêmes prématurés est très faible dans les pays à faible revenu (10%), contrairement au pays à plus grand revenu (90%). L'incidence de la prématurité est en constante augmentation depuis les vingt dernières années [34].

### **2.2.2 Besoins des prématurés**

Du fait de leur très faible réserve énergétique, il est important d'introduire les NP précocement chez les enfants prématurés, généralement dans les 24 heures après leur naissance [5, 21, 35].

Un enfant prématuré nécessite des apports liquidiens élevés à cause de l'immaturité de sa peau. Les recommandations sont de 140 à 160 mL/kg/j [24]. Lors de l'administration des NP, l'apport énergétique pour les prématurés doit se situer entre 110 et 120 kcal/kg/j [24], dont 85% concernent des contributions non protéiques (et plus précisément 35% des lipides et 50% des glucides) [3, 36]. Ces besoins énergétiques augmentent avec l'âge [24].

Entre 4 et 8 mg/kg/min de glucose doivent être fournis aux prématurés. Ces apports ne doivent cependant pas excéder 12 g/kg/jour chez ce groupe de patients [24]. Rarement, de l'insuline est administrée afin d'améliorer la tolérance au glucose chez les prématurés de poids inférieur à 1.5 kg (VLBW) [3, 35, 36].

Dès le premier jour de naissance, les lipides peuvent être administrés à raison de 0.5-1.0 g/kg/j [24, 37]. Cet apport peut atteindre 3 g/kg/j s'il est augmenté graduellement de 0.5 g/kg/j [3, 5, 24, 36]. Les émulsions lipidiques actuellement commercialisées sont concentrées à 10 ou 20%, mais ces dernières sont préférées pour les prématurés [3]. Toutes deux sont efficaces, mais l'émulsion lipidique à 20% permet de diminuer le volume administré et la quantité de phospholipides et ainsi d'éviter l'altération de l'activité de la lipoprotéine lipase, responsable de la dégradation des lipides [5].

L'apport en acides aminés chez les prématurés doit se situer entre 1.5 et 4.0 g/kg/j [24] et sert à la synthèse des protéines ; c'est pourquoi un apport énergétique adéquat doit être fourni par le glucose et les lipides [5].

Après la naissance, certains électrolytes sont nécessaires. Dès le premier jour de vie, le calcium (1-4 mmol/kg/j) et le phosphate (0.75-3 mmol/kg/j) peuvent être administrés dans la nutrition parentérale. Ces deux électrolytes sont importants pour la croissance osseuse et un rapport calcium/phosphate de 1.3-1.7 est recommandé. De plus, du magnésium (0.1-0.2 mmol/kg/j) est ajouté afin de permettre le contrôle de l'homéostasie calcique [24]. Il faudra cependant attendre la mise en place de la diurèse, généralement 24 heures après la naissance, pour administrer le sodium (2-5 mmol/kg/j) et le potassium (2-3 mmol/kg/j), qui sont les électrolytes principaux des compartiments extracellulaire et intracellulaire, respectivement [3, 24].

Quant aux vitamines, elles sont nécessaires dès les premiers jours de vie pour le développement et la croissance du nouveau-né [38].

Le tableau 2 synthétise les besoins en nutriments d'un enfant prématuré.

Tableau 2 : Résumé des besoins nutritionnels du prématuré [24]

|                                  |                   |
|----------------------------------|-------------------|
| <b>Liquide</b>                   | 140 à 160 mL/kg/j |
| <b>Energie</b>                   | 110-120 kcal/kg/j |
| <b>Glucose</b>                   | 4-8 mg/kg/min     |
| <b>Lipides</b>                   | 0.5-3.0 g/kg/j    |
| <b>Acides aminés (protéines)</b> | 1.5-4.0 g/kg/j    |
| <b>Calcium</b>                   | 1-4 mmol/kg/j     |
| <b>Phosphate</b>                 | 0.75-3 mmol/kg/j  |
| <b>Rapport calcium/phosphate</b> | 1.3-1.7           |
| <b>Magnésium</b>                 | 0.1-0.2 mmol/kg/j |
| <b>Sodium</b>                    | 2-5 mmol/kg/j     |
| <b>Potassium</b>                 | 2-3 mmol/kg/j     |

## 2.3 Caractérisation d'une NP

### 2.3.1 Exigences légales

Comme toute préparation à usage parentérale, les NP doivent satisfaire plusieurs critères qui sont décrits dans la Ph. Eur. 7.5 (monographie *Préparations parentérales*, chapitre 01/2008:0520). Tout d'abord, il est exigé que la solution soit limpide et pratiquement exempte de particules. Pour cela, des contrôles visuels peuvent être effectués afin d'identifier les particules de taille supérieure ou égale à 50 µm, et des essais sont réalisés pour contrôler les particules non visibles. Les essais décrits dans la Ph. Eur. (chapitres 2.9.19 et 2.9.20) précisent qu'aucune particule ne doit être visible à l'œil nu, et qu'il ne doit pas y avoir plus de 6000 particules de taille supérieure à ou égale 10 µm et pas plus de 600 particules de 25 µm ou plus. Les solutions parentérales doivent également être stériles et exemptes de pyrogènes. Il s'agit de substances responsables de fortes élévations de la température corporelle après injection. Elles proviennent principalement du solvant, des produits dissous et du matériel

utilisé. L'essai des endotoxines bactériennes décrit dans la Ph. Eur. (chapitre 2.6.14) permet de vérifier l'absence des substances pyrogènes [39]. Les procédés de stérilisation sont abordés ci-dessous.

### **2.3.2 Caractéristiques galéniques**

Il est important de contrôler le pH de la solution afin que cette dernière soit tolérée par l'organisme. Le pH sanguin se situe entre 7.35 et 7.40 et possède un pouvoir tampon lui permettant de tolérer des pH allant de 4 à 10. Ainsi, le pH de la solution injectable peut s'éloigner du pH sanguin afin d'assurer la stabilité des constituants, tout en limitant la douleur à l'injection. Ensuite, les NP doivent être isotoniques. Le terme isotonique signifie que les préparations parentérales doivent présenter la même pression osmotique que les liquides tissulaires, c'est-à-dire la même concentration molaire [39]. La pression osmotique est définie comme la pression que l'eau d'une solution exerce sur une membrane semi-perméable (perméable à l'eau mais qui empêche le passage de soluté) [14]. L'osmolarité se calcule de façon indirecte par la détermination de l'abaissement cryoscopique, appelé également abaissement du point de congélation. Celui du plasma possède une valeur de  $-0.52^{\circ}\text{C}$  et peut se mesurer grâce à un osmomètre ou un cryoscope. Si la solution est hypotonique, il est possible d'ajuster l'isotonie en ajoutant du chlorure de sodium ou du glucose. Les quantités additionnées se font de telle manière à obtenir une concentration finale de 279 mosm/kg de solution. L'organisme supporte des solutions hyperosmolaires comme les NP, mais une VVC est à privilégier lors de son administration [39].

## **2.4 Production des nutriments parentéraux**

### **2.4.1 Méthodes de production des NP**

Il existe différents moyens pour produire une NP. Ceux-ci dépendent des quantités produites. A l'hôpital, les NP sont produites à partir de matières premières en solution. En industrie, la production de NP se fait par la fabrication de solutions mères à partir de poudres mises en solution. Enfin, dans le cadre de ce travail, les NP ont été préparées à partir d'un mélange de poudre. Ce mélange a ensuite été réparti en monodoses puis mis en solution.

### **2.4.2 Mélange de poudre, mise en solution et remplissage des flacons**

La première étape de fabrication consiste à mélanger les poudres entre elles. Les poudres sont définies selon la norme ISO 3252 comme un ensemble de particules dont les dimensions sont habituellement inférieures à 1 mm [40]. Par définition, un mélange doit être homogène. Ce qui signifie que chaque prélèvement contient tous les composants du mélange dans les mêmes proportions que la préparation totale [39]. Ce paramètre est important afin d'assurer la reproductibilité de la dose [40]. Différents facteurs influencent le mélange de poudres et peuvent ainsi conduire à un état de non-mélange ou démixtion. C'est le cas de la densité des particules, de leur granulométrie et de leur forme qui peuvent causer ce phénomène. Il est possible que le démixtion se produise dans un certain type de mélangeurs, au moment où ce



dernier est vidé ou pendant le transport et le stockage. Afin de prévenir au mieux les démêlages, il est nécessaire de s'assurer que les constituants ont une granulométrie identique, en broyant et en tamisant les poudres par exemple. Les constituants en petite quantité sont difficiles à répartir de façon homogène dans le mélange. C'est pourquoi, il est conseillé de procéder au mélange de façon exponentielle, c'est-à-dire en mélangeant les composants en faible proportion entre eux et d'y ajouter progressivement les autres [39].

Il est possible de contrôler l'homogénéité du mélange en procédant à un dosage des constituants. Il est cependant difficile de conserver un mélange idéal à long terme. C'est pourquoi il est recommandé de le répartir en dose unitaire rapidement après sa préparation [39].

La prochaine étape de préparation consiste à dissoudre le mélange de poudres. La solubilité joue un rôle important à ce stade de la fabrication. Celle-ci est propre à chaque constituant et peut changer en fonction de différents facteurs comme le solvant, la température et le pH entre autre [39]. La taille des particules affecte également la solubilité. Ainsi, plus les particules sont de petites tailles, plus la solubilité sera grande [41]. De plus, il est possible d'améliorer la solubilité par différents moyens, notamment grâce à des excipients solubilisant. Il peut s'agir de modificateurs de pH, de solvants organiques hydrosolubles ou non, de surfactants, de MCT et LCT, de complexants (cyclodextrines) ou encore de phospholipides [42].

La vitesse de dissolution est un autre paramètre à prendre en compte lors de la mise en solution de poudres [39].

En milieu hospitalier, le remplissage des flacons peut se faire à l'aide d'une pompe péristaltique (type BAXA par exemple) ou par un remplissage manuel.

## **2.5 Bonnes Pratiques de Fabrication**

Selon la Ph. Eur. 7.5, une NP doit être stérile. C'est pourquoi, sa production doit suivre les *Méthodes de préparation des produits stériles*, décrites au chapitre 5.1.1 de la Ph. Eur. 7.0. Il existe différents moyens de stérilisation. Tout d'abord, la stérilisation terminale qui peut s'effectuer par la vapeur grâce à un autoclave, par la chaleur sèche, par irradiation ionisante ou encore par les gaz. Si ces méthodes de stérilisation ne sont pas applicables, la préparation médicamenteuse peut être filtrée à l'aide d'une membrane antibactérienne ayant des pores de 0.22 µm au minimum. Le produit est maintenu stérile grâce à une préparation dans des conditions aseptiques selon les BPF.

Ces normes imposent une production qui doit satisfaire à certaines exigences, concernant notamment le personnel, les locaux, les équipements, la documentation, la production ou encore le contrôle de la qualité. Ces critères sont décrits dans la Ph. Helv. 10.3 au chapitre 21.1 (*Commentaires concernant les Règles de Bonnes Pratiques de Fabrication de médicaments en petites quantités*). Des recommandations pour la préparation des mélanges de nutrition parentérale ont également été publiées par Corriol et al. [43].

### **3 Démarche du travail**

#### **3.1 Réflexion préliminaire**

Comme énoncé précédemment, la production des NP nécessite des infrastructures particulières. Toutes les contraintes de production engendrent donc des coûts non négligeables. En effet, les locaux et les équipements sont très spécifiques et les conditions de fabrication sont strictes afin d'assurer la qualité et la sécurité du médicament. Il faut donc des moyens financiers suffisants pour pouvoir s'approprier certains matériaux, comme une hotte. De plus, les pays en développement ne possèdent pas les compétences et la formation spécifique nécessaires à la production des NP. Pour ces raisons, il est pertinent de fournir aux pays en développement les préparations médicamenteuses qu'ils ne sont pas en mesure de fabriquer dans les conditions adéquates, comme c'est le cas pour les NP.

En plus des coûts de fabrications, les NP sont des produits chers, notamment à cause des acides aminés qui les composent [5]. Dans le cadre de ce travail, le coût du transport des NP dans les pays en développement a également été considéré en imaginant de réduire le poids des NP à transporter. Le but de ce travail est de trouver une formulation adaptée aux pays en développement pouvant être transportée facilement et stockée dans les conditions de ces pays. Ainsi, trois types de formulations ont été imaginés : une forme poudre à reconstituer avant l'administration de la NP, un concentrat à diluer au lit du patient et une solution intégrale stérilisée (petit volume) prête à l'emploi. Seules les deux premières solutions seront analysées dans ce travail à cause d'un manque de temps.

#### **3.2 Analyse théorique des solutions imaginées**

##### **3.2.1 Poudre à reconstituer**

La première formulation proposée se présente sous forme de poudre à reconstituer au lit du patient. Dans cette partie, trois possibilités sont envisageables.

Tout d'abord, il pourrait s'agir d'un mélange de poudre multidose. Dans ce cas, la préparation nécessiterait plusieurs étapes afin d'obtenir un mélange homogène. En effet, il faudrait tout d'abord mélanger les poudres de façon exponentielle, puis procéder à une granulation, avec du sirop de glucose par exemple, et enfin sécher les granulés dans une étuve. Le mélange de poudre serait alors reconstitué avec de l'eau pour préparations injectables (eau PPI) (100 mL). Un risque de démélange est évidemment très probable au cours du transport de la préparation et lors du stockage à cause des différentes densités des nombreux constituants.

La deuxième possibilité est la fabrication d'un mélange pulvérulent unidose. Dans ce cas, la poudre serait reconstituée dans 100 mL d'une solution de glucose concentrée à 10%. Cette forme présente moins d'inconvénients que la précédente. En effet, un problème de démélange n'influencera pas la concentration finale de la solution de NP.

Enfin, la dernière possibilité consiste à former un lyophilisat. Cette option a été rejetée à cause du coût qu'elle engendre [44].

Un risque de contamination ou une erreur de manipulations lors de la reconstitution ne sont pas négligeables dans les trois situations. De plus, les conditions aseptiques seront difficilement respectées dans les pays en développement, et plus particulièrement pour la première solution. Cependant, la stabilité de la préparation sous forme de poudre est bien meilleure que si elle se trouve en solution [45].

La deuxième formulation représente la forme de poudre la plus adéquate à reconstituer. Il s'agira donc de la formulation qui sera analysée dans le reste de l'étude. Trois volumes de reconstitution différents seront étudiés : 100 mL, 25 mL et 10 mL, et qui seront ensuite complétés à 100 mL. La reconstitution en deux étapes permettrait au personnel soignant de reconstituer la poudre dans un petit volume afin de l'extraire pour le transférer dans la poche de glucose qui servira à l'administration de la NP. Ainsi, le contenant de la poudre pourra être de taille inférieure, et donc de poids et de coût de transport plus faible. Le choix des volumes de reconstitution de 100 mL correspond au volume de la NP qui sera administré, le choix des volumes intermédiaires s'est porté sur de petits volumes.

### **3.2.2 Concentrat à diluer**

La deuxième formulation proposée est un concentrat à diluer avec une solution de glucose concentrée à 10 ou 20%. Dans ce cas, la solubilité peut poser un problème car le volume du concentrat sera faible. De plus, certains composants pourraient interagir plus fortement entre eux à cause de la proximité des molécules. Une issue serait alors de séparer les composants incompatibles en utilisant des poches à plusieurs compartiments, mais cela réduirait le volume du concentrat et augmenterait le coût du contenant de la NP.

La stabilité d'un concentrat semble plus problématique qu'une poudre car les composants sont en solution [45] et qu'un risque de précipitation existe et est d'autant plus marqué que la solution est concentrée. Enfin, le concentrat nécessiterait des manipulations par le personnel soignant des pays en développement, engendrant ainsi un risque de contamination de la préparation ou une erreur de manipulation.

Lors de ce travail, trois différents concentrats, avec trois concentrations en acides aminés, seront étudiés : 12%, 24% et 48%. La dilution avec les solutions de glucose permettra d'obtenir une concentration finale en acides aminés de 3%. Plus les solutions de NP seront concentrées, plus le volume du concentrat sera petit. Ainsi, le coût du transport sera inférieur. Les concentrations choisies sont des multiples de trois, correspondant à la concentration finale en acides aminés en pourcent qui sera administrée. Le choix des concentrations s'est orienté vers 48%. Cette concentration paraissant difficile à atteindre, elle a été divisée par deux (24% d'acides aminés) et par quatre (12% d'acides aminés).

### 3.2.3 Solution intégrale en petit volume

La troisième formulation imaginée est une solution intégrale de poche prête à l'emploi. Les NP auraient une faible stabilité si elles sont envoyées sous forme de flacons ou de poches à monocompartiment [10]. Pour cette raison, il faudrait que les composants soient séparés et les poches protégées de la lumière et de l'oxygène. Ainsi, la stabilité serait de plusieurs années. L'avantage principal repose sur le fait qu'aucune reconstitution ou dilution ne seront nécessaires à effectuer dans les pays en développement, réduisant ainsi toutes erreurs ou contaminations de la part du personnel soignant. Cependant, la fabrication et le transport seront coûteux. Cette option ne sera pas étudiée dans ce travail.

### 3.3 Pré-évaluation des options

L'annexe 1 p.40 décrit la pré-évaluation des options imaginées sous forme d'un tableau. Elle a été établie suite à des discussions avec les collaborateurs de B.Braun. Le contenu, le processus de fabrication, l'administration et le coût de la NP sont des aspects qui ont été abordés. Les informations qui en ressortent sont très subjectives mais permettent toutefois de comparer théoriquement les avantages et les inconvénients de chaque formulation.

### 3.4 Formulation

La composition de la NP à développer a été inspirée des NP standards réalisées aux Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG) pour les enfants prématurés. La composition finale de la NP est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composition de la NP

|                      |                |
|----------------------|----------------|
| <b>Acides aminés</b> | 3% (m/V)       |
| <b>Glucose</b>       | 10% (m/V)      |
| <b>Sodium</b>        | 2.0 mmol/100mL |
| <b>Potassium</b>     | 1.0 mmol/100mL |
| <b>Calcium</b>       | 1.1 mmol/100mL |
| <b>Phosphate</b>     | 0.9 mmol/100mL |

La composition en acides aminés est basée sur le contenu d'une NP destinée aux prématurés, aux nourrissons et aux petits enfants jusqu'à l'âge de trois ans, l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% [46], dont le détail est présenté dans le tableau 4. Pour cette étude de faisabilité, il a été choisi de ne pas introduire vitamines et oligo-éléments qui sont des éléments qui posent des difficultés de stabilité.

Tableau 4 : Composition de la formulation Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% [46]

| Acides aminés                    | Concentration [g/L] |
|----------------------------------|---------------------|
| L-isoleucine                     | 8.00                |
| L-leucine                        | 13.00               |
| Monoacétate de L-lysine corresp. | 12.00               |
| L-lysine                         | 8.50                |
| L-méthionine                     | 3.12                |
| L-phénylalanine                  | 3.75                |
| L-thréonine                      | 4.40                |
| L-tryptophane                    | 2.01                |
| L-valine                         | 9.00                |
| Arginine                         | 7.50                |
| L-histidine                      | 4.76                |
| Acide aminoacétique (glycine)    | 4.15                |
| L-alanine                        | 9.30                |
| L-proline                        | 9.71                |
| Acétylcystéine corresp.          | 0.70                |
| L-cystéine                       | 0.52                |
| Taurine                          | 0.40                |
| L-sérine                         | 7.67                |
| N-acétyl-L-tyrosine corresp.     | 5.18                |
| L-tyrosine                       | 4.20                |
| Acide L-malique                  | 2.62                |

Les constituants surlignés sont utilisés à la place de l'acide aminé correspondant si celui-ci n'est pas disponible ou pour des raisons de solubilité.

L'annexe 2 p.41 indique les concentrations en [mmol/L] et en [g/100mL] de chacun des composants de la formulation décrite dans le tableau 3.

L'utilisation des poudres d'acides aminés séparées a été privilégiée afin de permettre l'adaptation des quantités des constituants de la formulation. La concentration de certains acides aminés a été modifiée suite à des tests préliminaires de solubilité.

### 3.4.1 Adaptation de la formulation

La solubilité des composants de la NP à développer ont été recherchés. Les données sont répertoriées dans l'annexe 3 p.43. A l'aide de ce paramètre physico-chimique, il a été possible d'estimer théoriquement la solubilité des composants aux différentes concentrations de NP envisagées (3%, 12%, 24% et 48% d'acides aminés). Cette analyse est détaillée dans les annexes 4 et 5 p.46 et 48.

Cette analyse indique que la L-tyrosine est déjà insoluble lorsque la concentration totale d'acides aminés est de 3%. C'est pourquoi, ce composant sera remplacé par le N-acétyl-L-tyrosine, qui est facilement soluble dans l'eau selon la Ph. Eur. 7.0. A partir de 24% d'acides

aminés dans la formulation de NP, la L-leucine ne présente pas une solubilité suffisante. Enfin, l'étude sur le concentrat de 48% d'acides aminés indique que la L-isoleucine et le glycérophosphate de calcium deviennent insolubles et que le L-tryptophane atteint presque la limite de sa solubilité. Ainsi, pour l'adaptation de la composition en acides aminés, la L-leucine, la L-isoleucine et le L-tryptophane ont été diminués, tandis que les quantités d'autres acides aminés ont été augmentées afin de conserver la concentration finale d'acides aminés souhaitée. Le choix des acides aminés modifiés s'est tourné vers les acides aminés essentiels aux prématurés présentés dans le tableau 1, ainsi que sur leur solubilité et leur coût. De plus, la quantité de taurine dans la formulation a été diminuée à cause de son coût. Ces informations sont regroupées dans l'annexe 6 p.55.

La composition a été adaptée pour que la concentration de chacun des acides aminés ne dépasse pas sa solubilité dans le concentrat à 48%. L'annexe 7 p.56 présente l'adaptation de la formulation basée sur la préparation concentrée à 48% d'acides aminés. L'adaptation en acides aminés sera utilisée pour toutes les formulations de NP (3%, 12%, 24% et 48%). L'annexe 7 p.56 décrit également un exemple de calcul de l'adaptation de la formulation à 3% d'acides aminés. La composition finale en acides aminés est présentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Formulation de NP concentrée à 3% d'acides aminés avant et après l'adaptation des quantités d'acides aminés

| Acides aminés                    | Concentration [g/L] pour une concentration finale de 3% en acides aminés |                                    |
|----------------------------------|--|------------------------------------|
|                                  | Avant adaptation de la formulation                                       | Après adaptation de la formulation |
| Taurine                          | 0.120  | 0.036                              |
| L-cystéine                       | 0.156  | 1.304                              |
| Acétylcystéine corresp.          | 0.210  | 1.755                              |
| L-tryptophane                    | 0.603  | 0.446                              |
| Acide L-malique                  | 0.786  | 0.786                              |
| L-méthionine                     | 0.936  | 0.936                              |
| L-phénylalanine                  | 1.125  | 1.125                              |
| Acide aminoacétique (glycine)    | 1.245  | 1.245                              |
| L-tyrosine                       | 1.260  | 1.260                              |
| L-thréonine                      | 1.320  | 1.607                              |
| L-histidine                      | 1.428  | 1.428                              |
| N-acétyl-L-tyrosine corresp.     | 1.554  | 1.554                              |
| Arginine                         | 2.250  | 2.250                              |
| L-sérine                         | 2.301  | 2.301                              |
| L-isoleucine                     | 2.400  | 1.339                              |
| L-lysine                         | 2.550  | 4.464                              |
| L-valine                         | 2.700  | 2.700                              |
| L-alanine                        | 2.790  | 2.790                              |
| L-proline                        | 2.913  | 2.913                              |
| Monoacétate de L-lysine corresp. | 3.600  | 6.303                              |
| L-leucine                        | 3.900  | 1.071                              |

La quantité de glycérophosphate de calcium a été diminuée dans le mélange d'électrolytes uniquement pour le concentrat à 48% d'acides aminés, comme décrit dans le tableau 6. Les autres préparations ont été préparées sur la base de la formulation de départ, présentée dans l'annexe 2.2 p.42.

Tableau 6 : Quantités d'électrolytes adaptées aux différentes NP

| Electrolytes                | NP à 3%, 12% et 24% d'acides aminés | NP à 48% d'acides aminés |
|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
|                             | Concentration [g/L]                 |                          |
| Chlorure de sodium (NaCl)   | 1.169                               | 1.169                    |
| Chlorure de potassium (KCl) | 0.746                               | 0.746                    |
| Glycérophosphate de calcium | 1.891                               | 0.893                    |

## **4 Méthode**

Dans l'annexe 8 p.58 sont répertoriés les produits et les appareils utilisés au cours des manipulations.

### **4.1 Expérience préliminaire**

Afin d'avoir une première approximation de la faisabilité des différents concentrats envisagés (12%, 24% et 48% d'acides aminés), l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% a été évaporée à l'aide d'un Rotavapor<sup>®</sup>, ainsi qu'à l'étuve à environ 34°C. Les flacons ont été pesés chaque heure jusqu'à observation visuelle d'un précipitat.

### **4.2 Mélanges de poudres**

Un mélange contenant tous les acides aminés ainsi qu'un mélange avec les quatre électrolytes ont été préparé. Avant d'être pesés, les composés ont été tamisés afin d'avoir une granulométrie la plus homogène possible. L'annexe 9 p.61 précise les masses pesées pour les deux mélanges ainsi que les tamis utilisés pour chacune des poudres. Les composants en faible proportion ont été mélangés entre eux en premier lieu, puis les autres constituants ont été ajoutés progressivement au mélange. Pour chaque étape, un mélangeur, la Turbula, a été utilisé pendant 30 minutes.

### **4.3 Poudre à reconstituer**

Tout d'abord, un mélange de base avec 277 g d'acides aminés et 32 g d'électrolytes a été réalisé. Il a été mélangé 30 minutes à la Turbula.

Puis, 81 échantillons de 3.6 g du mélange de base ont été répartis dans des flacons en verre de type 1 préalablement lavés et stérilisés. Ces derniers ont été fermés à l'aide de bouchon en caoutchouc et scellés. L'annexe 10 p.63 décrit les calculs effectués pour déterminer les masses à peser. Les échantillons ont été conservés quatre semaines dans une étuve entre 32 et 34°C pour simuler les conditions des pays en développement.

Neuf des échantillons prélevés ont été dissous dans 100 mL d'une solution de glucose 10%, neuf dans 25 mL et neuf dans 10 mL afin de mimer différents moyens de reconstitution que les pays en développement pourraient pratiquer et de déterminer un volume minimum nécessaire à la reconstitution.

Après reconstitution dans le volume prédéterminé, les poudres ont été solubilisées à l'aide d'un agitateur automatique Janke HS 500 jusqu'à dissolution visuelle. Un contrôle visuel a été effectué 5, 10, 15, 30 minutes, 1 et 2 heures après le début de l'agitation des flacons.



Ensuite, les solutions reconstituées dans 10 et 25 mL ont été diluées avec la solution de glucose 10% de façon à avoir un volume final de 100 mL.

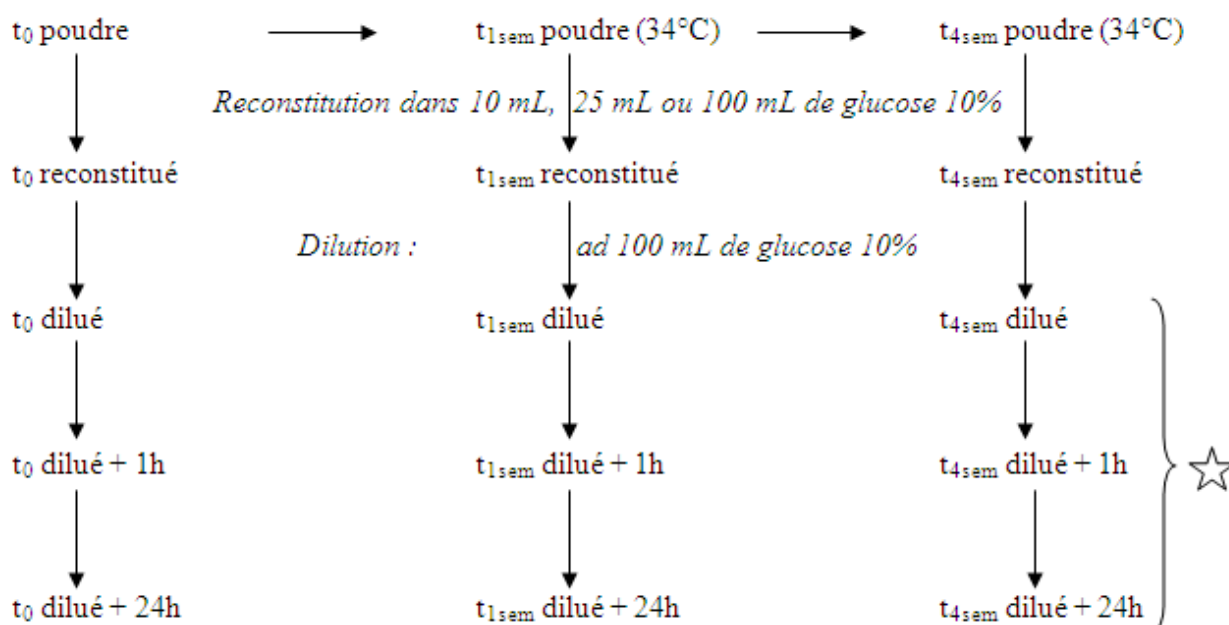
Trois échantillons de chaque catégorie de solution (100 mL, 25 mL et 10 mL) ont été observés visuellement. De plus, le pH a été relevé à l'aide d'un pH-mètre (trois mesures), l'osmolarité a été mesurée trois fois à l'aide d'un osmomètre et un contrôle des particules non visibles a été effectué. Par ailleurs, la coloration de ces échantillons a ultérieurement été analysée à l'aide du colorimètre Lico 400 dans les laboratoires de B.Braun (en moyenne entre trois jours et une semaine après le prélèvement des échantillons).

Ces essais ont été réalisés directement après la dilution des échantillons ( $t_0$  dilué), puis après 1 heures ( $t_0$  dilué + 1h) et 24 heures ( $t_0$  dilué + 24h).

Ces expériences ont été effectuées de manière identique, mais après le stockage du mélange de poudre réparti dans les flacons dans une étuve à 34°C pendant une ( $t_{1sem}$ ) et quatre semaines ( $t_{4sem}$ ).

#### **4.3.1 Récapitulatif des manipulations effectuées pour la forme poudre à reconstituer**

La figure 1 décrit les manipulations suivies ainsi que les analyses effectuées sur les échantillons de poudre préparés. Au temps «  $t_0$  poudre », 81 flacons contenant la NP sous forme sèche ont été préparés, dont 27 sont destinés à être reconstitués dans 100 mL de glucose 10%, 27 flacons dans 25 mL de glucose 10% et les 27 derniers échantillons dans 10 mL de glucose 10%.



☆ Paramètres mesurés/observés sur trois flacons :  
 Colorimétrie  
 Particules visibles  
 Comptage particulaire (particules non visibles)  
 pH  
 Osmolarité

Figure 1 : Schéma de manipulation de la NP sous forme de poudre à reconstituer dans du glucose 10%

#### 4.4 Concentrats

Trois solutions mères (SM) de concentrations différentes (12%, 24% et 48%) ont été préparées. Pour cela, 130.3 g d'acides aminés et 15.2 g d'électrolytes ont été pesés à trois reprises. Les poudres ont ensuite été dissoutes dans 1 L, 0.5 L et 0.25 L d'eau PPI par un chauffage à 50-60°C et sous agitation magnétique. Les solutions mères ont refroidi à température ambiante pendant la nuit. Le détail des préparations est présenté dans l'annexe 11 p.65.

Puis, à partir de chaque solution mère, 27 échantillons ont été prélevés selon les volumes suivants : 33 mL de la SM12%, 15 mL de la SM24% et 7 mL de la SM48%. Les solutions mères ont été réparties sous azote après filtration stérilisante sur filtre 0.22 µm dans des flacons en verre type 1 stériles avec fermeture en caoutchouc sous un flux de pesée située dans une salle à atmosphère contrôlée (classée C selon les BPF). Les échantillons ont été conservés quatre semaines dans une étuve entre 32 et 34°C pour simuler les conditions des pays en développement.

En fonction des formulations, les concentrations finales en glucose vont varier étant donné que le volume et la concentration de la solution de glucose utilisée pour diluer le concentrat

diffèrent. Celles-ci sont présentées dans le tableau 7. Le détail des calculs est décrit dans l'annexe 5 p.48.

Tableau 7 : Concentration finale d'acides aminés et de glucose des formulations

|                                   | Concentrations finale de glucose |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Concentrats à 12% d'acides aminés | 15.00%                           |
| Concentrats à 24% d'acides aminés | 8.69%                            |
| Concentrats à 48% d'acides aminés | 9.35%                            |

Un contrôle visuel des particules visibles a été effectué sur les trois échantillons de chaque concentrat. De plus, le pH a été mesuré et un comptage particulaire a été réalisé sur ces flacons. La colorimétrie a été évaluée ultérieurement par les laboratoires de B.Braun (en moyenne entre 3 jours et une semaine après le prélèvement des échantillons).

Six échantillons du concentrat à 12% ont été dilués avec 100 mL d'une solution de glucose 20%, et six échantillons des concentrats à 24% et 48% avec des solutions de glucose à 10%, permettant ainsi d'obtenir des solutions de NP de concentration finale d'environ 3% d'acides aminés.

Après la dilution dans du glucose ( $t_0$  dilué), puis après 24 heures à 34°C ( $t_0$  dilué + 24h), le pH et l'osmolarité ont été mesurés, la colorimétrie et la contamination particulaire ont été contrôlées sur trois échantillons.

De même, ces analyses ont été réalisées sur le même nombre d'échantillons une semaine ( $t_{1sem}$ ), puis quatre semaines ( $t_{4sem}$ ) après la préparation des SM de chaque concentrat.

#### 4.4.1 Récapitulatif des manipulations effectuées pour la forme concentrat à diluer

La figure 2 précise la démarche expérimentale suivie lors de l'analyse des différents échantillons de concentrat. Les informations fournies dans le tableau 8 décrivent le mode de préparation des échantillons de concentrat.

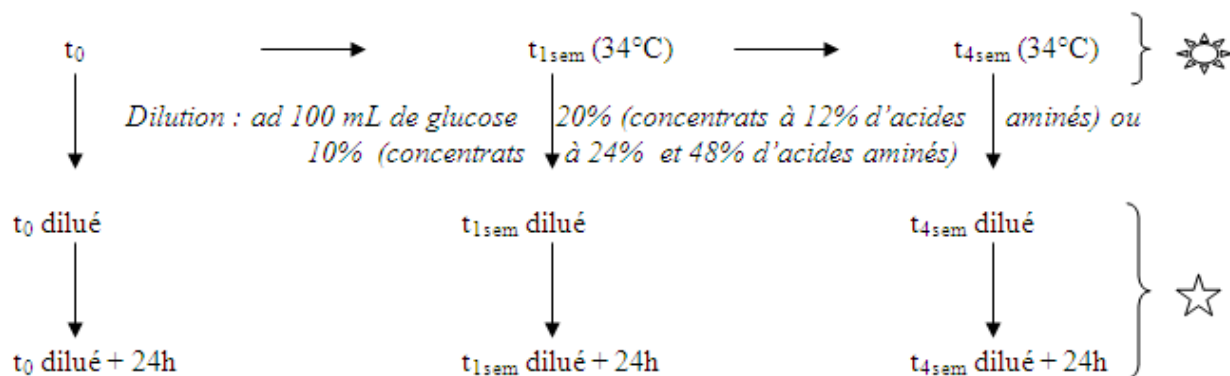
Tableau 8 : Préparation des concentrats

| Concentration en acides aminés | Volume des solutions mères | Nombre d'échantillon à $t_0$ | Volume dans les flacons |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 12%                            | 1.00 L                     | 27                           | 33 mL                   |
| 24%                            | 0.50 L                     | 27                           | 15 mL                   |
| 48%                            | 0.25 L                     | 27                           | 7 mL                    |

Les flacons utilisés ne pouvant contenir que 100 mL de solution, les volumes de concentrats mis dans les échantillons destinés à être analysés à  $t_x$  dilué et  $t_x$  dilué + 24h ont été réduits proportionnellement avec les solutions de glucose. Le tableau 9 décrit les volumes utilisés pour ces échantillons.

Tableau 9 : Adaptation des volumes utilisés pour les échantillons analysés à  $t_x$  dilué et  $t_x$  dilué + 24h

| Concentration en acides aminés | Volume des solutions mères | Volumes des solutions de glucose |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 12%                            | 25 mL                      | 75 mL                            |
| 24%                            | 13 mL                      | 87 mL                            |
| 48%                            | 6.5 mL                     | 93.5 mL                          |



☀ Paramètres mesurés/observés sur trois flacons :  
 Colorimétrie  
 Particules visibles  
 Comptage particulaire (particules non visibles)  
 pH

☆ Paramètres mesurés/observés sur trois flacons :  
 Colorimétrie  
 Particules visibles  
 Comptage particulaire (particules non visibles)  
 pH  
 Osmolarité

Figure 2 : Schéma de manipulation de la NP sous forme de concentrat à diluer avec du glucose

## 4.5 Description des tests utilisés

### 4.5.1 Contamination particulaire - Particules visibles

L'observation visuelle a été effectuée selon les recommandations de la Ph. Eur. 7.0 (chapitre 2.9.20).

L'analyse nécessite un appareillage particulier, constitué d'un panneau noir mat et d'un panneau blanc anti-éblouissant positionnés verticalement l'un à côté de l'autre, ainsi que d'une rampe d'éclairage orientable. Cet appareillage est représenté dans la figure 3.

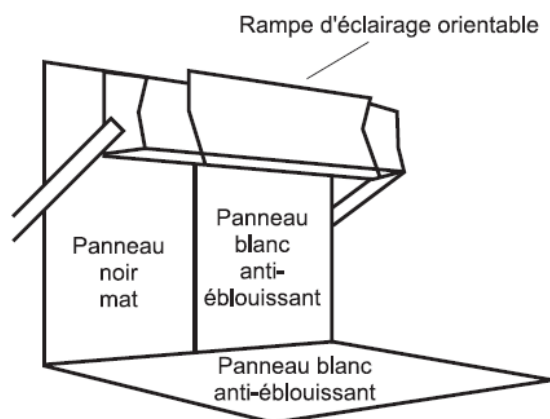


Figure 3 : Appareillage pour les particules visibles (tiré de la Ph.Eur. 7.0, chapitre 2.9.20)

Le principe repose sur l'observation du récipient pendant environ 5 secondes contre les panneaux blanc et noir successivement, après l'avoir délicatement agité ou prudemment renversé afin d'éviter la formation de bulles d'air. Aucune particule ne doit être visible pour que l'essai soit valide.

#### 4.5.2 Contamination particulaire - Particules non visibles

La Ph. Eur. 7.1 (chapitre 2.9.19) décrit l'essai pour les particules non visibles. L'analyse s'est faite à l'aide d'un compteur à particules automatique. Lors de cet essai, il s'agissait de retourner 20 fois chaque récipient de façon lente et successive, puis d'éliminer les bulles de gaz en laissant reposer le flacon deux minutes ou à l'aide d'ultrasons. Pour un volume de 100 mL, la préparation satisfait à l'essai si le nombre de particules de taille supérieure ou égale à 10  $\mu\text{m}$  et à 25  $\mu\text{m}$  ne dépasse pas 6000 et 600 respectivement.

Pour la partie poudre, un volume de 10 mL a été prélevé pour chaque analyse. Des prélèvements de 5 mL ont été effectués pour les concentrats à 12% d'acides aminés, 2 mL pour les concentrats à 24% et 1 mL pour les concentrats à 48%. Pour chaque échantillon, quatre comptages ont été effectués, le résultat final correspondant à la moyenne des trois dernières mesures.

#### 4.5.3 Colorimétrie

Le colorimètre est un instrument de mesure de la couleur dont le principe est basé sur l'absorbance de la lumière. Dans ce travail, l'appareil utilise des droites d'étalonnage basées sur les solutions standards décrites par la Ph. Eur., chapitre 2.2.2 (*Degré de coloration des liquides*) pour donner une valeur aux échantillons.

## 5 Résultats

### 5.1 Expérience préliminaire

Les résultats obtenus lors des deux essais d'évaporation à l'aide du Rotavapor sont répertoriés dans l'annexe 12.1 p.67. Le premier essai indique que les acides aminés présents dans l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% ne sont pas solubles dans 25.7% du volume de la NP. Après l'évaporation, les acides aminés étaient donc concentrés à 38.8%. Lors du deuxième essai, l'évaporation de 38.9% de l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% s'est effectuée. La concentration d'acides aminés était alors de 16.4%.

L'annexe 12.2 p.70 présente les résultats obtenus lors de l'évaporation de l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% à l'aide de l'étuve (34°C). Il est difficile d'interpréter ces résultats à cause de l'effet statique engendré par l'étuve.

### 5.2 Poudre à reconstituer

Lors de la conservation de la poudre à environ 34°C pendant quatre semaines, aucun changement visuel de la couleur n'a été relevé. La poudre a tout de même tendance à se compacter, mais une légère agitation du flacon permet la pulvérisation du contenu. La granulométrie de la poudre ne semble pas aussi fine qu'à l'état initial.

#### 5.2.1 Poudre reconstituée dans 100 mL de glucose 10%

Après reconstitution des poudres dans 100 mL de glucose 10% pendant 5-10 minutes d'agitation à la vitesse de 200 Hub/min et à température ambiante, la poudre était solubilisée, la solution limpide mais des particules blanches et noires ainsi que des fibres ont été observées dans les flacons. Ceci est probablement dû aux contaminations qui se sont produites lors des manipulations des différentes poudres, telles que le tamisage ou encore le mélange des composants qui ont été effectués à l'air libre. Afin d'éliminer les particules liées à la contamination, les solutions ont été filtrées sur un filtre de 15 µm. Ainsi, il a été possible de procéder au comptage particulaire des solutions préparées car, après filtration, les solutions étaient exemptes de particules visibles. L'interprétation des résultats sera faussée à cause de la filtration, mais cela permettra d'avoir une idée sur le nombre de particules de tailles plus petites que 15 µm. Un environnement aseptique est indispensable pour la préparation des poudres.

Les résultats obtenus sur les poudres à reconstituer dans 100 mL de glucose 10% sont présentés dans le tableau 10, le détail de ces résultats est répertorié dans l'annexe 13 p.72.

Tableau 10: Résultats de pH, osmolarité et comptage particulaire obtenus avec les échantillons de NP sous forme sèche à reconstituer dans 100 mL de glucose 10%

| Echantillons |                               | pH<br>(M + ET) | Osmolarité<br>[mosm/L]<br>(M + ET) | Comptage particulaire             |                                   | Colorimétrie |
|--------------|-------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|
|              |                               |                |                                    | Particules<br>> 10 µm<br>(M + ET) | Particules<br>> 25 µm<br>(M + ET) |              |
| 1 à 3        | t <sub>0</sub> dilué          | 5.46 ± 0.32    | 939 ± 19                           | 54.5 ± 7.5                        | 0.1 ± 0.1                         | B9           |
| 4 à 6        | t <sub>0</sub> dilué + 1h     | 5.47 ± 0.32    | 943 ± 5                            | 38.3 ± 7.7                        | 0.1 ± 0.1                         | B9           |
| 7 à 9        | t <sub>0</sub> dilué + 24h    | 5.74 ± 0.04    | 936 ± 12                           | 48.6 ± 5.1                        | 0.1 ± 0.0                         | B8-B9        |
| 10 à 12      | t <sub>1sem</sub> dilué       | 5.42 ± 0.35    | 946 ± 11                           | 25.7 ± 16.0                       | 0.0 ± 0.1                         | B9           |
| 13 à 15      | t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 5.44 ± 0.30    | 953 ± 10                           | 32.4 ± 14.9                       | 0.1 ± 0.1                         | B9           |
| 16 à 18      | t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.56 ± 0.17    | 941 ± 7                            | 47.8 ± 8.5                        | 0.2 ± 0.1                         | B9           |
| 19 à 21      | t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.81 ± 0.01    | 962 ± 3                            | 75.6 ± 3.5                        | 0.1 ± 0.1                         | B8-B9        |
| 22 à 24      | t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.66 ± 0.10    | 962 ± 2                            | 70.1 ± 11.3                       | 0.2 ± 0.1                         | B8-B9        |
| 25 à 27      | t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.83 ± 0.05    | 960 ± 3                            | 87.1 ± 8.0                        | 0.5 ± 0.2                         | B8           |

M = Moyenne, ET = Ecart-Type ; solution témoin B1 = la plus colorée, solution témoin B9 = la moins colorée (moins coloré que B9 serait incolore)

Quel que soit le temps de conservation de la poudre à 34°C (une ou quatre semaines), les paramètres mesurés n'ont pas évolués de manière marquée. Le nombre de particules non visibles, l'osmolarité et le pH augmentent tout de même légèrement après quatre semaines de conservation. Le nombre de particules compté est acceptable et correspond aux normes établies par la Ph. Eur. 7.1. La coloration des solutions ne varie que très peu dans le temps (B8-B9).

### 5.2.2 Poudre reconstituée dans 25 mL de glucose 10%

Les poudres ont été reconstituées dans 25 mL de glucose 10% après 20 minutes (t<sub>0</sub>) ou 30 minutes (t<sub>4sem</sub>) d'agitation à la vitesse de 200 Hub/min et à température ambiante. Puis, après solubilisation, elles ont été diluées pour obtenir un volume final de 100 mL de glucose 10%. Le tableau 11 présente les paramètres mesurés après cette dilution. L'annexe 14 p.77 décrit le détail de chacune des mesures effectuées. De même que pour les poudres reconstituées directement dans 100 mL de glucose 10%, une filtration (15 µm) a été effectuée avant le comptage particulaire à cause des particules encore visibles (contamination). Aucune particule n'était visible après la filtration.

Tableau 11 : Résultats de pH, osmolarité et comptage particulaire obtenus avec les échantillons de NP sous forme sèche à reconstituer dans 25 mL de glucose 10%

| Echantillons |                               | pH<br>(M + ET) | Osmolarité<br>[mosm/L]<br>(M + ET) | Comptage particulaire             |                                   | Colorimétrie<br>(M + ET) |
|--------------|-------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
|              |                               |                |                                    | Particules<br>> 10 µm<br>(M + ET) | Particules<br>> 25 µm<br>(M + ET) |                          |
| 1 à 3        | t <sub>0</sub> dilué          | 5.78 ± 0.01    | 893 ± 5                            | 51.8 ± 2.2                        | 0.1 ± 0.1                         | B9                       |
| 4 à 6        | t <sub>0</sub> dilué + 1h     | 5.73 ± 0.07    | 934 ± 11                           | 94.0 ± 41.8                       | 0.4 ± 0.2                         | B9                       |
| 7 à 9        | t <sub>0</sub> dilué + 24h    | 5.69 ± 0.09    | 941 ± 7                            | 57.7 ± 6.1                        | 0.1 ± 0.0                         | B9                       |
| 10 à 12      | t <sub>1sem</sub> dilué       | 5.79 ± 0.03    | 951 ± 3                            | 66.3 ± 10.4                       | 0.3 ± 0.1                         | B9                       |
| 13 à 15      | t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 5.70 ± 0.11    | 947 ± 9                            | 57.7 ± 5.5                        | 0.3 ± 0.1                         | B9                       |
| 16 à 18      | t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.79 ± 0.02    | 950 ± 5                            | 54.7 ± 5.0                        | 0.3 ± 0.1                         | B7                       |
| 19 à 21      | t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.85 ± 0.03    | 955 ± 3                            | 93.1 ± 11.1                       | 0.3 ± 0.1                         | B9                       |
| 22 à 24      | t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.61 ± 0.25    | 955 ± 2                            | 98.4 ± 36.9                       | 0.5 ± 0.5                         | B9                       |
| 25 à 27      | t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.74 ± 0.09    | 956 ± 5                            | 67.6 ± 11.6                       | 0.4 ± 0.1                         | B8                       |

M = Moyenne, ET = Ecart-Type ; solution témoin B1 = la plus colorée, solution témoin B9 = la moins colorée (moins coloré que B9 serait incolore)

Tout comme pour les poudres reconstituées dans 100 mL de glucose 10%, les variations observées sont très faibles. L'osmolarité et les particules sont légèrement supérieures après quatre semaines de conservation à 34°C. Les normes établies par la Ph. Eur. 7.1 concernant le nombre de particules compté sont respectées. La couleur des solutions reste relativement stable durant le stockage de la poudre (B7-B9).

### 5.2.3 Poudre reconstituée dans 10 mL de glucose 10%

Il n'a pas été possible de poursuivre les essais de reconstitution de la poudre de NP dans 10 mL de glucose 10%. En effet, après 4h40 d'agitation à la vitesse de 200 Hub/min et à température ambiante, les solutions n'étaient toujours pas limpides. De ce fait, ces essais ont été abandonnés.

## 5.3 Concentrats à diluer

### 5.3.1 Concentrat à 12% d'acides aminés

Les résultats obtenus avec les NP concentrées à 12% d'acides aminés sont décrits dans le tableau 12. Le détail de ces données est répertorié dans l'annexe 15 p.82.



Tableau 12 : Résultats de pH, osmolarité et comptage particulaire obtenus avec les échantillons de NP sous forme de concentrat à 12% d'acides aminés

| Echantillons |                               | pH<br>(M + ET) | Osmolarité<br>[mosm/L]<br>(M + ET) | Comptage particulaire             |                                   | Colorimétrie |
|--------------|-------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|
|              |                               |                |                                    | Particules<br>> 10 µm<br>(M + ET) | Particules<br>> 25 µm<br>(M + ET) |              |
| 1 à 3        | t <sub>0</sub>                | 5.71 ± 0.01    | -                                  | 6.2 ± 4.7                         | 0.2 ± 0.2                         | B9           |
| 4 à 6        | t <sub>0</sub> dilué          | 5.47 ± 0.01    | 1355 ± 3                           | 5.1 ± 3.2                         | 0.3 ± 0.2                         | B8           |
| 7 à 9        | t <sub>0</sub> dilué + 24h    | 5.43 ± 0.01    | 1354 ± 3                           | 3.7 ± 2.6                         | 0.1 ± 0.1                         | B8           |
| 10 à 12      | t <sub>1sem</sub>             | 5.70 ± 0.00    | -                                  | 7.6 ± 10.6                        | 0.1 ± 0.2                         | B9           |
| 13 à 15      | t <sub>1sem</sub> dilué       | 5.53 ± 0.00    | 1355 ± 4                           | 2.6 ± 0.4                         | 0.1 ± 0.1                         | B8           |
| 16 à 18      | t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.48 ± 0.02    | 1355 ± 3                           | 6.2 ± 1.1                         | 0.3 ± 0.3                         | B7           |
| 19 à 21      | t <sub>4sem</sub>             | 5.74 ± 0.01    | -                                  | 16.2 ± 18.0                       | 0.4 ± 0.4                         | B7           |
| 22 à 24      | t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.48 ± 0.01    | 1352 ± 4                           | 5.6 ± 1.0                         | 0.1 ± 0.2                         | B7           |
| 25 à 27      | t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.46 ± 0.03    | 1351 ± 2                           | 7.0 ± 3.8                         | 0.3 ± 0.1                         | B6-B7        |

M = Moyenne, ET = Ecart-Type ; solution témoin B1 = la plus colorée, solution témoin B9 = la moins colorée (moins coloré que B9 serait incolore)

Suite à l'observation visuelle des concentrats, il a été noté que les solutions étaient limpides et exemptes de particules visibles. Cependant, après la dilution des concentrats avec du glucose 20%, certaines fibres, et plus rarement de petites particules, étaient présentes. Quelques particules étaient visibles dans les échantillons de concentrat à t<sub>4sem</sub>, celles-ci étaient plus petites après la dilution. La colorimétrie révélait une légère modification visuelle de la couleur à t<sub>4sem</sub>, mais celle-ci n'était plus visible après dilution des concentrats, comme le montre la figure 4. La mesure de colorimétrie de la quatrième semaine de conservation ne révèle pas cette faible différence, probablement à cause du décalage de l'analyse.

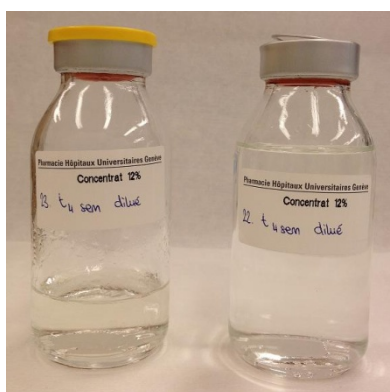


Figure 4 : Différence de couleur entre des échantillons de concentrat à 12% d'acides aminés après quatre semaines de conservation à 34°C avant (gauche) et après (droite) la dilution avec le glucose 20%

Une faible diminution du pH est observable après la dilution des concentrats avec 100 mL de glucose 20%. L'osmolarité diminue très légèrement à la quatrième semaine de conservation à 34°C. Quant au nombre de particules, il est conforme aux normes de la pharmacopée.

A part la colorimétrie, les paramètres mesurés sont stables après la conservation des concentrats à 12% d'acides aminés à 34°C pendant quatre semaines.

### 5.3.2 Concentrat à 24% d'acides aminés

Le tableau 13 synthétise les données obtenues lors de l'analyse des échantillons de NP concentrée à 24% d'acides aminés. L'annexe 16 p.87 décrit le détail de ces résultats.

Tableau 13 : Résultats de pH, osmolarité et comptage particulaire obtenus avec les échantillons de NP sous forme de concentrat à 24% d'acides aminés

| Echantillons |                               | pH<br>(M + ET) | Osmolarité<br>[mosm/L]<br>(M + ET) | Comptage particulaire             |                                   | Colorimétrie |
|--------------|-------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|
|              |                               |                |                                    | Particules<br>> 10 µm<br>(M + ET) | Particules<br>> 25 µm<br>(M + ET) |              |
| 1 à 3        | t <sub>0</sub>                | 5.66 ± 0.03    | -                                  | 1.9 ± 1.6                         | 0.0 ± 0.0                         | B8           |
| 4 à 6        | t <sub>0</sub> dilué          | 5.66 ± 0.00    | 903 ± 3                            | 4.7 ± 2.0                         | 0.3 ± 0.3                         | B9           |
| 7 à 9        | t <sub>0</sub> dilué + 24h    | 5.64 ± 0.01    | 902 ± 2                            | 8.0 ± 0.6                         | 0.6 ± 0.5                         | B9           |
| 10 à 12      | t <sub>1sem</sub>             | 5.67 ± 0.01    | -                                  | 17.7 ± 25.8                       | 0.7 ± 1.3                         | B6           |
| 13 à 15      | t <sub>1sem</sub> dilué       | 5.66 ± 0.01    | 901 ± 2                            | 8.5 ± 4.5                         | 0.2 ± 0.2                         | B8           |
| 16 à 18      | t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.64 ± 0.01    | 904 ± 3                            | 5.7 ± 2.1                         | 0.5 ± 0.3                         | B7-B8        |
| 19 à 21      | t <sub>4sem</sub>             | 5.69 ± 0.01    | -                                  | 7.4 ± 2.3                         | 0.1 ± 0.1                         | B3           |
| 22 à 24      | t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.69 ± 0.00    | 896 ± 2                            | 7.9 ± 3.3                         | 0.2 ± 0.2                         | B7           |
| 25 à 27      | t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.66 ± 0.01    | 895 ± 3                            | 12.0 ± 2.7                        | 0.2 ± 0.1                         | B6-B7        |

M = Moyenne, ET = Ecart-Type ; solution témoin B1 = la plus colorée, solution témoin B9 = la moins colorée (moins coloré que B9 serait incolore)

Le pH mesuré est très stable dans le temps. L'osmolarité est stable jusqu'à une semaine de conservation à 34°C, mais diminue légèrement à la quatrième semaine. Une légère augmentation du nombre de particules est observable pour les concentrats à t<sub>1sem</sub> et à t<sub>4sem</sub> dilué + 24h, mais il reste dans les normes de la Ph. Eur. 7.1.

L'observation visuelle des concentrats à 24% d'acides aminés est identique aux concentrats à 12% d'acides aminés. En effet, l'apparition de fibres a été relevée suite à la dilution des concentrats avec 100 mL de glucose 10%. Cependant, aucune particule n'était visible dans les échantillons de concentrats à t<sub>4sem</sub>.

A t<sub>1sem</sub>, la couleur des échantillons de concentrat est de moins en moins incolore (B6 au lieu de B8 à t<sub>0</sub>). De plus, après deux semaines de conservation à l'étuve (34°C), il était déjà possible d'observer une modification visuelle de la couleur des concentrats (non dilué). En effet, les solutions apparaissaient légèrement jaunes. A la semaine 4, les échantillons devenaient de plus en plus jaunes. La coloration s'était éclaircie après la dilution des concentrats, mais s'est de nouveau concentrée après 24 heures de conservation à 34°C. La

figure 5 montre l'évolution de la couleur. Les mesures de colorimétrie confirme cette observation.

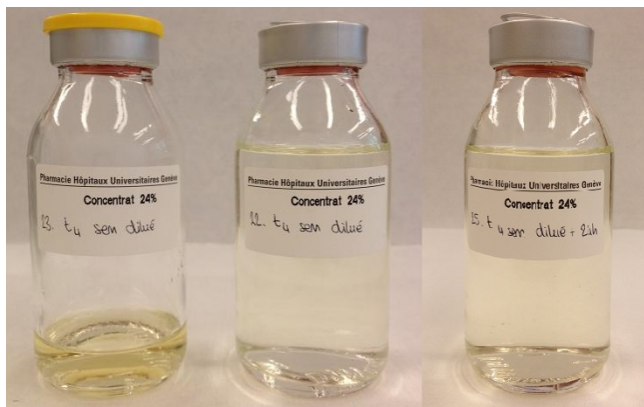


Figure 5 : Evolution de la couleur des concentrats à  $t_{4sem}$ , avant (gauche) et après (milieu) dilution, puis après 24 heures de conservation à 34°C (droite)

### 5.3.3 Concentrat à 48% d'acides aminés

Les essais sur les concentrats à 48% d'acides aminés n'ont pas pu être poursuivis à cause de l'insolubilité des composants dans la solution mère. En effet, après deux journées sous agitation magnétique et à une température de 60°C, de gros précipitats blancs pouvaient être observés.

## 6 Discussion

### 6.1 Expérience préliminaire

Les résultats obtenus après l'évaporation de l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% indiquent que la formulation nécessite d'être adaptée pour les concentrations d'acides aminés supérieures à 16.4%, en raison d'une perte de la solubilité de certains composants. C'est ce qui a été établi pour les concentrats à 24% et 48% au point 3.4.1.

### 6.2 Poudre à reconstituer

L'agglutination de la poudre est due à la température de conservation (34°C). Ce phénomène est difficile à éviter [47].

En comparant les résultats obtenus avec les poudres reconstituées dans 25 mL de glucose 10% et celles dans 100 mL, il est possible d'observer que le pH est légèrement supérieur pour les poudres reconstituées dans 25 mL (en moyenne 5.74 contre 5.60 pour les poudres reconstituées dans 100 mL). Les particules comptées sont également plus nombreuses pour ce plus petit volume de reconstitution (en moyenne 71.3 particules de taille supérieure à 10  $\mu$ m, contre 53.3 pour les poudres reconstituées dans 100 mL). Ceci est probablement dû au fait que

les poudres sont moins bien solubilisées dans 25 mL de glucose que 100 mL en quelques minutes. Les résultats sont toutefois dans les normes de la Ph. Eur.

Quant à l'osmolarité, les mesures sont équivalentes quel que soit le volume initial de reconstitution (en moyenne 946 mosm/L). Il est normal de mesurer des paramètres quasi-équivalents étant donné que les solutions analysées possédaient les mêmes quantités de NP sous forme sèche ainsi que le même volume de glucose 10% ; seule l'étape intermédiaire de reconstitution était différente.

Le pH, variant entre 5.42 et 5.85, sera toléré par l'organisme étant donné que les solutions de NP ne sont pas tamponnées. Il est possible de constater une légère augmentation du pH dans le temps pour les poudres reconstituées dans 100 mL de glucose 10% qui n'est pas observable pour les poudres reconstituées dans 25 mL de glucose 10%. Il se pourrait que le pH soit légèrement supérieur lorsque les poudres se solubilisent moins bien, ce qui est le cas pour les poudres reconstituées dans 25 mL de glucose et les poudres reconstituées dans 100 mL après quatre semaines de conservation. Ces dernières se solubilisent en effet plus difficilement à cause de la compaction de la poudre lors du stockage [41].

Les poudres reconstituées dans 100 mL de glucose 10% présentent un nombre de particules plus élevé à  $t_{4\text{sem}}$  (77.6 particules de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$ ) par rapport à  $t_0$  (47.1 particules de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$ ) et  $t_{1\text{sem}}$  (35.5 particules de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$ ), bien que le temps de solubilisation des poudres était identique entre  $t_0$  et  $t_{4\text{sem}}$ . Il s'agirait du reflet de la moins bonne solubilité de la poudre compacte par rapport à la poudre pulvérisée [41]. L'écart entre les résultats est minime et peut éventuellement être négligé. Il faudrait tout de même procéder à un dosage des composants (acides aminés et électrolytes) dans les solutions de NP après leur filtration (15  $\mu\text{m}$ ) afin d'affirmer qu'il n'y a effectivement pas de différences significatives lorsqu'une étape intermédiaire (reconstitution dans 25 mL de glucose) est effectuée. Ce dosage permettrait également de vérifier que les particules qui ont été filtrées avant le comptage particulaire ne sont que des contaminants, et non des composants de la NP. L'idéal serait tout de même de trouver une méthode de production du système poudre à reconstituer avec laquelle les NP seraient limpides avec un taux de particules conforme aux normes de la Ph. Eur. Ainsi, il ne serait pas nécessaire de filtrer les NP avant l'administration et les résultats de comptages particuliers ne seraient pas faussés.

Il serait intéressant d'étudier si la compaction de la poudre a un effet plus important à plus long terme (par exemple après 3, 6 et 12 mois de conservation à 34°C). Cet effet est moins marqué pour la poudre reconstituée dans 25 mL de glucose 10% mais reste tout de même observable. Ceci est probablement dû au fait que les poudres reconstituées dans 25 mL ont été agitées pendant 20 minutes à  $t_0$  alors que le temps de solubilisation à  $t_{4\text{sem}}$  était de 30 minutes. Ce temps de dissolution plus long pour la reconstitution est dû au fait que les particules étaient de taille plus grande après la conservation de la poudre à 34°C pendant quatre semaines [41, 45].

L'évolution de la couleur au cours du temps n'est que très faible (B7-B9), mais il devrait être observé sur une conservation de plus longue durée. Il n'y a pas de différence entre les deux

formulations testées. Un dosage des composants préciserait si cette variation de couleur est liée ou non à une dégradation.

Les essais sur les poudres reconstituées dans 100 mL et 25 mL de glucose 10% révèlent donc une bonne stabilité de la poudre pendant quatre semaines à 34°C. L'augmentation des paramètres mesurés (pH, osmolarité et particules non visibles) révèle que la poudre pourrait devenir instable à plus long terme. Il y a peu de variations, mais un dosage des composants est nécessaire afin d'affirmer si ces modifications sont acceptables.

Afin de contrôler l'absence de pyrogènes, les essais sur les endotoxines bactériennes devraient être effectués avant la mise en pratique de ces NP sous forme sèche. Si l'apyrogénicité et la stérilité sont confirmées, les deux formulations (poudre reconstituée dans 25 mL ou 100 mL de glucose 10%) pourraient être utilisées en pratique étant donné que les paramètres mesurés sont tolérés par l'organisme et pour autant qu'une étude de stabilité sur une plus longue durée garantisse leur conservation dans les conditions climatiques adéquates.

La préparation des poudres devrait être faite dans un environnement à atmosphère contrôlée selon les BPF, et non à l'air libre comme cela a été le cas lors de ce travail, afin de conserver des poudres propres.

La poudre reconstituée dans 25 mL de glucose 10% serait plus avantageuse économiquement, car le transport serait moins coûteux si la poudre est envoyée dans un flacon de plus petit volume, et donc de poids plus léger. Cependant, elle est moins applicable en réalité à cause du temps nécessaire qu'il faut pour solubiliser la poudre (20-30 minutes). La poudre à reconstituer dans 100 mL de glucose 10% est plus adéquate pour le personnel soignant (5-10 minutes d'agitation).

Par la suite, l'étude sur les NP sous forme sèche devrait être complétée par une étude de stabilité des composants et une validation de la production sans contamination particulière des poudres. De plus, il faudrait analyser les différents types de dispositifs d'administration afin de choisir le plus adéquat, tout en prenant en compte l'aspect financier du transport.

### **6.3 Concentrats à diluer**

La dilution des concentrats (12% et 24%) ad 100 mL de glucose semble contaminer les solutions de NP. En effet, les fibres visibles après la dilution n'étaient pas présentes dans le concentrat. Les manipulations effectuées lors du remplissage des flacons avec les solutions de glucose seraient la cause de cette contamination, cette étape ayant été effectuée à l'air libre.

Il semblerait qu'une légère précipitation se soit produite dans les concentrats à 12% d'acides aminés. Il est étonnant que ce phénomène ne se soit pas réalisé dans les échantillons de concentrats à 24% d'acides aminés.

La différence entre les valeurs d'osmolarité des deux formulations est due au fait que le concentrat à 12% d'acides aminés a été dilué à l'aide de glucose 20% (osmolarité de

1354 mosm/L en moyenne) alors que le concentrat à 24% a été dilué avec du glucose 10% (osmolarité de 900 mosm/L en moyenne). L'osmolarité est relativement stable pour les concentrats à 12%. Cependant, la légère diminution des valeurs d'osmolarités des concentrats à 24% d'acides aminés à la quatrième semaine de conservation (896 mosm/L contre 903 mosm/L à la première semaine) révélerait une certaine instabilité des NP à cette concentration. Par définition, la diminution de l'osmolarité serait due au nombre inférieur de particules en solution [14]. Il s'agirait peut-être d'une dégradation des composants, ce qui pourrait expliquer pourquoi les concentrats à 24% d'acides aminés ne présentaient pas de précipitats après quatre semaines de conservation à 34°C.

Le pH est stable, il varie seulement entre 5.43 et 5.74 pour le concentrat à 12%, et entre 5.64 et 5.69 pour le concentrat à 24% d'acides aminés. Ces valeurs de pH sont tolérées par l'organisme. Le nombre de particules compté ne varie que faiblement.

Visuellement, les NP sont moins stables à 24% d'acides aminés par rapport aux concentrats à 12% d'acides aminés. En effet, les échantillons de concentrat à 24% apparaissant jaune après deux semaines de conservation à 34°C, alors que les échantillons à 12% ne se coloraient qu'après quatre semaines. Les mesures de colorimétrie à la quatrième semaine de conservation à 34°C mettent aussi en avant l'instabilité plus marquée pour le concentrat à 24% d'acides aminés (B3-B6 contre B6-B7 pour le concentrat à 12%).

L'instabilité révélée par la coloration jaune des échantillons ainsi que par la diminution de l'osmolarité exclue la possibilité de produire des NP sous forme de concentrats à 24% d'acides aminés. La modification de la couleur des concentrats à 12% d'acides aminés observées à la quatrième semaine limite leur utilisation.

Tout comme pour la NP sous forme sèche, l'essai des endotoxines bactériennes devrait être effectué afin de contrôler l'absence de substances pyrogènes ou de contamination bactérienne. Une analyse des différents dispositifs d'administration et une étude de stabilité des composants devraient également être entreprise avant de pouvoir imaginer utiliser les concentrats.

#### **6.4 Comparaison des deux formulations (poudre et concentrats)**

En termes de stabilité, la NP sous forme de poudre est plus stable que les concentrats (pas de coloration marquée, de précipitations ou de diminution de l'osmolarité).

Au niveau des coûts, le transport des poudres est plus avantageux que celui d'un liquide du fait de son poids inférieur. Les manipulations à effectuer pour leur administration n'ont pas été évaluées dans ce travail mais sont un point essentiel dans le choix de la formule finale. Les conséquences d'une infection pouvant être fatale, le minimum de manipulations sur la NP est souhaitable.

Il est conseillé d'administrer les NP à l'aide d'une tubulure pédiatrique équipée d'un filtre

(15  $\mu\text{m}$ ) afin d'éviter une contamination particulaire qui surviendrait au moment de la préparation de la NP (due à un détachement d'un bout de septum par exemple).

L'utilisation des concentrats semblerait être plus pratique pour le personnel soignant des pays en développement. En effet, contrairement à la NP sous forme sèche, les poudres sont déjà solubilisées. Il n'y a donc pas besoin de considérer le délai pour la solubilisation des composants. L'administration de la NP pourrait donc se faire immédiatement après la dilution des concentrats. De plus, l'utilisation de concentrats réduirait l'effort fourni par le personnel soignant étant donné que l'étape d'agitation pour la solubilisation de la poudre est éliminée.

Inversement, la production des NP sous forme de concentrat demande plus de manipulations pour les pays qui les fabriquent. En effet, la préparation des concentrats nécessite la solubilisation des composants de la NP à 50-60°C et sous agitation magnétique. La durée de la préparation varie en fonction de la concentration d'acides aminés (environ 1h30 pour le concentrat à 12% et deux journées pour le concentrat à 24%). De plus, une filtration stérilisante avant le remplissage du contenant doit être effectuée dans des conditions adéquates (salle classée C selon les BPF) et par un personnel compétent. Dans le cas d'une production industrielle, la stérilisation des NP se ferait par autoclavage ou par un remplissage aseptique. Une étude ultérieure permettrait de définir si le changement du procédé de stérilisation a une influence sur la stabilité des NP. Les poudres devraient également être stérilisées, la méthode de stérilisation choisie ne doit pas dégrader les composants de la NP. Une étude comparative des coûts de production des NP sous forme sèche ou de concentrat devrait être entreprise afin d'estimer la formulation la plus économique.

Un dosage des composants serait utile afin de vérifier si les conditions de préparation des concentrats dégradent les composants de la NP. Ce dosage devrait également être réalisé après la filtration stérilisante des concentrats ( $t_0$ ), puis après une ( $t_{1\text{sem}}$ ) et quatre semaines ( $t_{4\text{sem}}$ ) de stockage à 34°C. Ainsi, la stabilité des NP sous forme de concentrat serait mieux évaluée.

## 7 Conclusion

L'apport d'une alimentation parentérale est essentiel aux nouveau-nés prématurés. Les NP sont largement utilisées dans les pays occidentaux. Cependant, les pays en développement ne possèdent pas les moyens financiers de s'approprier les matières premières et les infrastructures nécessaires à leur production. Le but de ce travail a donc été de chercher une formulation de NP qui pourrait être envoyée à ces pays afin d'améliorer la prise en charge nutritionnelles des prématurés.

Ainsi, trois formulations ont été imaginées. Une NP sous forme sèche à reconstituer dans une solution de glucose 10%, une NP sous forme de concentrat à diluer avec du glucose 10% et une solution intégrale stérilisée en petit volume. Seule les deux premières ont pu être étudiées dans ce travail. Différents paramètres tels que le pH, l'osmolarité et les particules non visibles, ont été mesurés directement après la préparation des NP, puis après une et quatre semaines de conservation à 34°C, la couleur étant mesurée en décalage par les laboratoires de B.Braun.

L'étude a révélé la limite de solubilité des constituants de la NP. En effet, il n'a pas été possible de poursuivre les essais sur les poudres à reconstituer dans 10 mL de glucose 10% et sur les concentrats à 48% d'acides aminés.

Ce travail a mis en évidence la meilleure stabilité des NP sous forme sèche par rapport aux concentrats. En effet, la modification de couleur des solutions de concentrats ainsi que la diminution de l'osmolarité des concentrats à 24% d'acides aminés après quatre semaines de conservation pourrait être un signe de dégradation des acides aminés. Les autres paramètres mesurés (pH et comptage particulaire) se sont révélés relativement stable dans le temps.

Sur le plan pratique, il semblerait que les NP sous forme de concentrat soient plus simples d'utilisation pour le personnel soignant et qu'elles soient plus rapides d'utilisation. Cependant, la forme poudre à reconstituer est plus stable dans le temps et le coût de son transport sera probablement plus faible. La stabilité et le coût des formulations étudiées sont des paramètres plus importants à prendre en compte dans le choix de la préparation la plus faisable par rapport à la facilité d'emploi et à la rapidité d'utilisation des NP.

Par conséquent, la poudre reconstituée dans 100 mL de glucose 10% représente la meilleure formulation étudiée dans ce travail grâce à sa stabilité dans le temps et à son faible temps de préparation par le personnel soignant (5-10 minutes d'agitation contre 20-30 minutes d'agitation pour les poudres reconstituées dans 25 mL de glucose). L'estimation du prix d'une NP sous forme sèche est de 2.33 CHF, sans prendre en compte le coût de la main d'œuvre et du transport. Il a été considéré que la NP serait envoyée dans un flacon en verre type 1 d'un volume de 100 mL. Le détail de cette estimation est présenté dans l'annexe 17 p.92.



## 8 Perspectives

Afin de compléter l'étude, un dosage des composants de la NP sous forme sèche devrait être effectué après conservation de la poudre à 34°C pendant plusieurs mois. Ainsi, la stabilité des acides aminés et des électrolytes pourra être suivie d'une manière plus rigoureuse et les éventuelles dégradations pourront être mises en avant. Une stabilité de 12 ou 18 mois serait l'idéal pour permettre l'envoi des NP dans les pays en développement. La stabilité des NP devrait aussi être contrôlée en fonction du procédé de stérilisation utilisé.

Il serait intéressant d'évaluer si la compaction de la poudre dans le temps a une influence sur la solubilité de celle-ci et si ce paramètre a une influence sur la faisabilité de la formulation sous forme sèche.

Il faudrait trouver une méthode de production du système poudre à reconstituer donnant des NP limpides et avec un taux de particules validé par les normes de la Ph. Eur. Puis, une validation de la production des NP selon les BPF devrait être réalisée afin d'assurer la stérilité des préparations. Le coût de la production devrait être estimé.

De plus, les dispositifs servant à reconstituer/diluer et administrer les différentes formulations de NP devrait être étudiés. La facilité d'utilisation ainsi que le coût doivent être pris en compte dans le choix du contenant de la NP.

Enfin, la solution intégrale stérilisée devrait être comparée aux deux formulations analysées lors de ce travail en termes de stabilité, de coût et de facilité d'administration.

## 9 Bibliographie

1. Gopalan, S., *Product availability for pediatric parenteral nutrition*. Indian J Pediatr, 1999. **66**(1 Suppl): p. S150-4.
2. Jaccard, S., et al., *Nutrition parentérale : I - Généralités*. 1999: p. 36-52.
3. Groh-Wargo, S., M. Thompson, and J. Hovasi Cox, *Nutritional Care for High-Risk Newborns*. 3e ed. 2000, Chicago: Precept Press.
4. Tucker, J. and W. McGuire, *Epidemiology of preterm birth*. BMJ, 2004. **329**(7467): p. 675-8.
5. Rombeau, J.L. and R.H. Rolandelli, *Clinical Nutrition: Parenteral Nutrition*. 3e ed. 2001, Philadelphia.
6. Beecroft, C., H. Martin, and J.W.L. Puntis, *How often do parenteral nutrition prescriptions for the newborn need to be individualized?* Clinical Nutrition, 1999. **18**(2): p. 83-85.
7. Embleton, N.E., N. Pang, and R.J. Cooke, *Postnatal malnutrition and growth retardation: an inevitable consequence of current recommendations in preterm infants?* Pediatrics, 2001. **107**(2): p. 270-3.
8. Velickovic, G., et al., *Nutrition intraveineuse : Le concept de la poche souple à trois compartiments*. Méd et Hyg, 1995. **53**(2087): p. 1976-1980.
9. Pichard, C., et al., *Prospective survey of parenteral nutrition in Switzerland: a three-year nation-wide survey*. Clin Nutr, 2001. **20**(4): p. 345-50.
10. Rey, J.B., C. Faure, and F. Brion, *Stability of all-in-one standard formulae for paediatric parenteral nutrition*. PDA J Pharm Sci Technol, 2005. **59**(3): p. 206-20.
11. Sobotka, L., *Basics in Clinical Nutrition*. 3e ed. 2004, Prague.
12. HUG. 2012 2012-03-09; Available from: [http://www.hugge.ch/\\_library/pdf/Actualite\\_sante/insuffisance\\_renale\\_14\\_fiches.pdf](http://www.hugge.ch/_library/pdf/Actualite_sante/insuffisance_renale_14_fiches.pdf).
13. Beliah, M., et al., *Méthode de nutrition parentérale*. Revue de l'infirmière, 1987(11): p. 41-44.
14. Eckert, R., et al., *Physiologie animale, mécanismes et adaptations*. 4e ed. 1999, Bruxelles, Paris.
15. Timmer, J.G. and H.G. Schipper, *Peripheral venous nutrition: the equal relevance of volume load and osmolarity in relation to phlebitis*. Clinical Nutrition, 1991. **10**(2): p. 71-75.
16. Childs, A.M., et al., *A prospective comparison of central and peripheral vein access for parenteral nutrition in the newborn*. Clin Nutr, 1995. **14**(5): p. 303-5.
17. Shah, P.S., et al., *A randomized, controlled trial of heparin versus placebo infusion to prolong the usability of peripherally placed percutaneous central venous catheters (PCVCs) in neonates: the HIP (Heparin Infusion for PCVC) study*. Pediatrics, 2007. **119**(1): p. e284-91.
18. Lenclen, R., et al., *Assessment of implementation of a standardized parenteral formulation for early nutritional support of very preterm infants*. Eur J Pediatr, 2006. **165**(8): p. 512-8.
19. Riskin, A., Y. Shiff, and R. Shamir, *Parenteral nutrition in neonatology--to standardize or individualize?* Isr Med Assoc J, 2006. **8**(9): p. 641-5.

20. Yeung, M.Y., et al., *Evaluation of standardized versus individualized total parenteral nutrition regime for neonates less than 33 weeks gestation*. J Paediatr Child Health, 2003. **39**(8): p. 613-7.
21. Brine, E. and J.A. Ernst, *Total parenteral nutrition for premature infants*. Newborn and Infant Nursing Reviews, 2004. **4**(3): p. 133-155.
22. *Glucosum «Bichsel» / Info professionnelle du compendium.ch, Compendium Suisse des Médicaments®*. 2012 2012-05-16; Available from: <http://www.compendium.ch/mpro/mnr/9051/html/fr>.
23. Chambrier, C., M. Lauverjat, and P. Boulétreau, *Émulsions lipidiques : indication des différentes émulsions lipidiques*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2006. **20**(2): p. 73-78.
24. Koletzko, B., et al., *Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR)*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41 Suppl 2**: p. S1-87.
25. Yarandi, S.S., et al., *Amino acid composition in parenteral nutrition: what is the evidence?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(1): p. 75-82.
26. Barnett, M.I., et al., *Parenteral nutrition. Pharmaceutical problems of compatibility and stability*. Drug Saf, 1990. **5 Suppl 1**: p. 101-6.
27. Driscoll, D.F., *Physicochemical assessment of total nutrient admixture stability and safety: quantifying the risk*. Nutrition, 1997. **13**(2): p. 166-7.
28. Allwood, M.C. and M.C.J. Kearney, *Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures*. Nutrition, 1998. **14**(9): p. 697-706.
29. Bouchoud, L., et al., *Maximizing calcium and phosphate content in neonatal parenteral nutrition solutions using organic calcium and phosphate salts*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2010. **34**(5): p. 542-5.
30. Knerr, T., et al., *Formation of a novel colored product during the Maillard reaction of D-glucose*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(4): p. 1966-70.
31. Fry, L.K. and L.D. Stegink, *Formation of Maillard reaction products in parenteral alimentation solutions*. J Nutr, 1982. **112**(8): p. 1631-7.
32. Dupertuis, Y.M., et al., *Physical characteristics of total parenteral nutrition bags significantly affect the stability of vitamins C and B1: a controlled prospective study*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2002. **26**(5): p. 310-6.
33. Bourrillon, A., et al., *Pédiatrie*. 5e ed. 2008, Paris.
34. *OMS / Quinze millions de bébés naissent prématurément chaque année*. WHO 2012 2012-05-03; Available from: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/preterm\\_20120502/fr/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/preterm_20120502/fr/index.html).
35. Ziegler, E.E., P.J. Thureen, and S.J. Carlson, *Aggressive nutrition of the very low birthweight infant*. Clin Perinatol, 2002. **29**(2): p. 225-44.
36. Anonymous, *American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: Nutritional needs of low-birth-weight infants*. Pediatrics, 1985. **75**(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): p. 976-86.

37. De Curtis, M. and J. Rigo, *The nutrition of preterm infants*. Early Human Development, 2012. **88, Supplement 1(0)**: p. S5-S7.
38. Lieou, A.E., et al., *Nutritional care of preterm neonates*. J. Pharm. Clin., 2008. **27**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 11-17.
39. Le Hir, A., J.-C. Chaumeil, and D. Brossard, *Pharmacie galénique - Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. 9e ed. 2009, Paris.
40. Guyot, J.-C., et al., *Galenica 6 Formes orales solides - I Poudres et formes unitaires obtenues par division ou agglutination*. 1984, Paris.
41. Martin, A., *Physical pharmacy : physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*. 4e ed. 1993, Philadelphia.
42. Yalkowsky, S.H., *Solubility and solubilization in aqueous media*. 1999, New York: Oxford University Press.
43. Corriol, O., et al., *Recommandations pour la préparation des mélanges de nutrition parentérale*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2005. **19(1)**: p. 30-55.
44. Rossetto, Y., *La lyophilisation*, in *Pharmacotechnie industrielle*, G. IMT, Editor. 1998: Vendôme. p. 91-114.
45. Bansal, A.K., *Product Development Issues of Powders for Injection*. Pharmaceutical Technology, 2002.
46. *Aminoven® infant 10% / Info professionnelle du compendium.ch, Compendium Suisse des Médicaments®*. 2012 2012-03-19; Available from: <http://www.compendium.ch/mpro/mnr/1581/html/fr>.
47. Freeman, T. *Understanding powder caking*. 2010.
48. *The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 13e ed. 2001, USA.
49. *Merck Chemicals*. 2012 2012-03-19; Available from: [www.merck-chemicals.com](http://www.merck-chemicals.com).
50. *Switzerland (Suisse) | Sigma-Aldrich.com*. 2012 2012-05-25; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/switzerland-suisse.html>.

## 10 Annexes

- Annexe 1 : Pré-évaluation des options imaginées
- Annexe 2 : Formulation de NP concentrée à 3% d'acides aminés
- Annexe 3 : Paramètres physico-chimiques des acides aminés et des électrolytes
- Annexe 4 : Analyse théorique de la solubilité des composants de la NP concentrée à 3% d'acides aminés
- Annexe 5 : Analyse théorique de la solubilité des composants de la NP à différentes concentrations d'acides aminés (12%, 24% et 48%)
- Annexe 6 : Informations utilisées pour l'adaptation des acides aminés de la formulation de NP
- Annexe 7 : Adaptation de la formulation de NP
- Annexe 8 : Appareils et produits utilisés au cours des manipulations
- Annexe 9 : Préparation du mélange d'acides aminés et du mélange d'électrolytes
- Annexe 10 : Calculs effectués pour la préparation des flacons de poudre à reconstituer dans du glucose 10%
- Annexe 11 : Préparation des solutions mères des NP concentrées à 12%, 24% et 48%
- Annexe 12 : Résultats de l'évaporation de l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10%
- Annexe 13 : Résultats obtenus lors des essais de NP sous forme sèche reconstituée dans 100 mL de glucose 10%
- Annexe 14 : Résultats obtenus lors des essais de NP sous forme sèche reconstituée dans 25 mL de glucose 10%
- Annexe 15 : Résultats obtenus lors des essais sur le concentrat à 12% d'acides aminés
- Annexe 16 : Résultats obtenus lors des essais sur le concentrat à 24% d'acides aminés
- Annexe 17 : Estimation du prix de la NP sous forme de poudre à reconstituer dans 100 mL de glucose

**Annexe 1 : Pré-évaluation des options imaginées**

Tableau 14: Pré-évaluation des options imaginées

|                                 |                                 | Poudre             | Concentrat                        | Solution (AA + Glc)      |                  |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------|
| <b>Contenant</b>                | Poche                           | monocompartiment   | --                                | +                        | -- (stabilité)   |
|                                 |                                 | bicompartiment     |                                   |                          | ++ (stabilité)   |
|                                 | Flacon                          |                    | +                                 | +                        |                  |
|                                 | Ampoule (?)                     |                    |                                   | -                        |                  |
|                                 | Matériau                        |                    |                                   |                          | +(film barrière) |
|                                 | Suremballage                    |                    |                                   |                          | +(film barrière) |
| <b>Contenu</b>                  | Solubilité - glucose 10% ou 20% |                    | à tester                          | solubilité<br>concentrat |                  |
|                                 | Stabilité                       |                    | +++                               | ---                      | --               |
|                                 | Homogénéisation                 | fabrication poudre | --                                |                          |                  |
|                                 | Hygroscopicité                  |                    | -                                 |                          |                  |
|                                 | Viscosité                       |                    |                                   | --                       |                  |
| <b>Processus de fabrication</b> | Remplissage                     |                    | +(flacon)                         | +                        | ++               |
|                                 | Dispositif                      |                    | +(flacon)                         | +                        | +                |
|                                 | Stérilisation                   |                    | --<br>(aseptique,<br>irradiation) | -                        | +                |
| <b>Administration</b>           | Reconstitution                  |                    | --                                | -                        |                  |
|                                 | Sécurité                        |                    | --                                | -                        | ++               |
|                                 | Hygiène                         |                    | --                                |                          | ++               |
|                                 | Stérilité                       |                    | --                                | --                       | ++               |
| <b>Coût</b>                     | Transport                       |                    | +                                 | -                        | ---              |
|                                 | Production                      |                    | non analysé                       |                          |                  |
|                                 | Contenant                       |                    | -(flacon)                         | -(flacon)<br>+(poche)    | +                |

AA= Acides aminés, Glc = glucose, + = avantage, - = inconvénient

**Annexe 2 : Formulation de NP concentrée à 3% d'acides aminés**

Annexe 2.1 : Concentration des acides aminés en [g/100mL] et en [mmol/L] pour une concentration de 3%

Tableau 15 : Concentration des acides aminés en [g/100mL] et en [mmol/L] pour une concentration finale de 3%

| Acides aminés                    | Masse molaire [g/mol] | Aminovent <sup>®</sup> Infant 10% | Acides aminés concentrés à 3% |                         |                        |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|
|                                  |                       | Concentration [g/L]               | Concentration [g/L]           | Concentration [g/100mL] | Concentration [mmol/L] |
| Taurine                          | 125.15                | 0.40                              | 0.12                          | 0.012                   | 0.96                   |
| L-cystéine                       | 121.16                | 0.52                              | 0.16                          | 0.016                   | 1.29                   |
| Acétylcystéine corresp.          | 163.20                | 0.70                              | 0.21                          | 0.021                   | 1.29                   |
| L-tryptophane                    | 204.23                | 2.01                              | 0.60                          | 0.060                   | 2.95                   |
| Acide L-malique                  | 134.09                | 2.62                              | 0.79                          | 0.079                   | 5.86                   |
| L-méthionine                     | 149.21                | 3.12                              | 0.94                          | 0.094                   | 6.27                   |
| L-phénylalanine                  | 165.19                | 3.75                              | 1.13                          | 0.113                   | 6.81                   |
| Acide aminoacétique (glycine)    | 75.07                 | 4.15                              | 1.25                          | 0.125                   | 16.58                  |
| L-tyrosine                       | 181.19                | 4.20                              | 1.26                          | 0.126                   | 6.95                   |
| L-thréonine                      | 119.12                | 4.40                              | 1.32                          | 0.132                   | 11.08                  |
| L-histidine                      | 155.16                | 4.76                              | 1.43                          | 0.143                   | 9.20                   |
| N-acétyl-L-tyrosine corresp.     |                       | 5.18                              | 1.55                          | 0.155                   |                        |
| Arginine                         | 174.20                | 7.50                              | 2.25                          | 0.225                   | 12.92                  |
| L-sérine                         | 105.09                | 7.67                              | 2.30                          | 0.230                   | 21.90                  |
| L-isoleucine                     | 131.18                | 8.00                              | 2.40                          | 0.240                   | 18.30                  |
| L-lysine                         | 146.19                | 8.50                              | 2.55                          | 0.255                   | 17.44                  |
| L-valine                         | 117.15                | 9.00                              | 2.70                          | 0.270                   | 23.05                  |
| L-alanine                        | 89.09                 | 9.30                              | 2.79                          | 0.279                   | 31.32                  |
| L-proline                        | 115.13                | 9.71                              | 2.91                          | 0.291                   | 25.30                  |
| Monoacétate de L-lysine corresp. |                       | 12.00                             | 3.60                          | 0.360                   |                        |
| L-leucine                        | 131.18                | 13.00                             | 3.90                          | 0.390                   | 29.73                  |

Exemple de calcul : taurine

Concentration dans la formulation Aminovent<sup>®</sup> Infant 10% : c = 0.40 g/L

0.40 g/L → 10%

x [g/L] → 3%

$$x = \frac{0.40 \cdot 3}{10} = 0.12 \quad \text{g / L} = 0.012 \quad \text{g / 100mL}$$

Calcul de la concentration en mmol/L :

Masse molaire : M = 125.15 g/mol

$$c = \frac{0.12 \quad \text{g / L}}{125.15 \quad \text{g / mol}} \cdot 10^3 = 0.96 \quad \text{mmol / L}$$

Annexe 2.2 : Calcul des concentration d'électrolytes

Tableau 16 : Calcul des concentrations d'électrolytes [g/100mL]

| Electrolytes | Sels                        | Masse molaire [g/mol] | Concentration [mmol/100mL] | Concentration [g/100mL] |
|--------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Sodium       | Chlorure de sodium (NaCl)   | 58.44                 | 2.0                        | 0.117                   |
| Potassium    | Chlorure de potassium (KCl) | 74.55                 | 1.0                        | 0.075                   |
| Calcium      | Gluconate de calcium        | 430.37                | 1.1                        | 0.473                   |
| Phosphate    | Glycérophosphate de calcium | 210.14                | 0.9                        | 0.189                   |

Les sels ont été sélectionnés en fonction des disponibilités du laboratoire.

Dans cette formulation, les sels sélectionnés indiquent que le calcium sera concentré à 2.0 mmol/100mL (1.1 mmol/100mL à partir du gluconate de calcium et 0.9 mmol/100mL à partir du glycérophosphate de calcium). C'est pourquoi le gluconate de calcium n'a pas été utilisé. La formulation adaptée est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 17 : Calcul des concentration d'électrolytes en [g/100mL] après adaptation de la formulation

| Electrolytes | Sels                        | Masse molaire [g/mol] | Concentration [mmol/100mL] | Concentration [g/100mL] |
|--------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Sodium       | Chlorure de sodium (NaCl)   | 58.44                 | 2.0                        | 0.117                   |
| Potassium    | Chlorure de potassium (KCl) | 74.55                 | 1.0                        | 0.075                   |
| Calcium      | Glycérophosphate de calcium | 210.14                | 0.9                        | 0.189                   |
| Phosphate    |                             |                       | 0.9                        |                         |
| <b>Somme</b> |                             |                       |                            | <b>0.381</b>            |

Exemple de calcul pour le sodium :

$$M = 58.44 \text{ g/mol}$$

$$c = 2 \text{ mmol/100mL} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/100mL}$$

$$V = 100 \text{ mL}$$

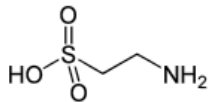
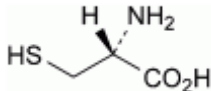
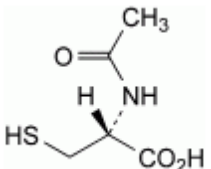
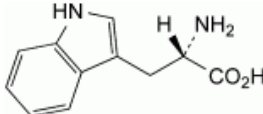
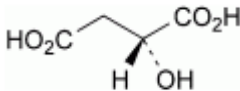
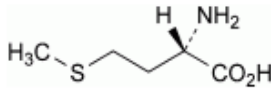
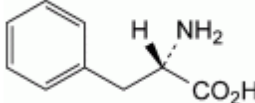

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M \cdot V} \Leftrightarrow m = c \cdot V \cdot M$$

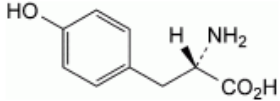
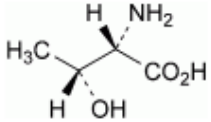
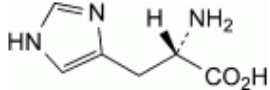
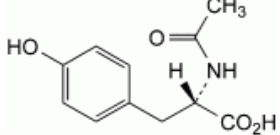
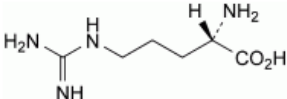
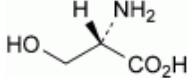
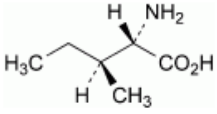
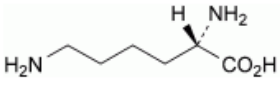
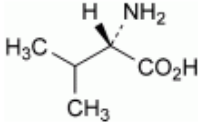
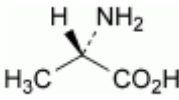
$$m = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/100mL} \cdot 100 \text{ mL} \cdot 58.44 \text{ g/mol} = 0.117 \text{ g}$$

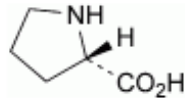
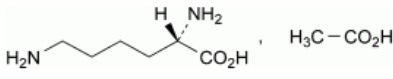
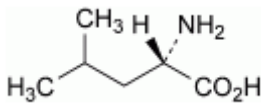


**Annexe 3 : Paramètres physico-chimiques des acides aminés et des électrolytes**

Tableau 18 : Solubilités et structures des acides aminés de l'Aminoven® Infant 10%

| Acides aminés                        | Solubilités   | Structures (*)  |
|--------------------------------------|---|---|
| <b>Taurine</b>                       | Soluble dans 15.5 parties d'eau à 12°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 65 g/L (12 °C) [49].  |    |
| <b>L-cystéine</b>                    | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>Soluble dans l'eau. En solution neutre ou légèrement alcaline, oxydation en cystine par l'air. Meilleure stabilité en solution acide [48].<br>Solubilité dans l'eau : 160 g/L (20°C) [49].  |    |
| <b>Acétylcystéine corresp.</b>       | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans l'eau : 200 g/L (20°C) [49].  |    |
| <b>L-tryptophane</b>                 | Assez soluble dans l'eau. Se dissout dans les solutions diluées d'acides minéraux et d'hydroxydes alcalins (*).<br>Solubilité dans l'eau : 8.23 g/L à 0°C, 10.57 g/L à 20°C, 11.36 g/L à 25°C, 17.06 g/L à 50°C, 27.95 g/L à 75°C, 49.87 g/L à 100°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 10 g/L (20°C) [49].   |   |
| <b>Acide L-malique</b>               | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>(Forme L) Solubilité dans l'eau : 36.35 g/100g à 20°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 160 g/L (20°C) [49].   |  |
| <b>L-méthionine</b>                  | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>Soluble dans l'eau, mais les cristaux repoussent un peu l'eau d'abord [48].<br>(Forme DL) Solubilité dans l'eau : 18.18 g/L à 0°C, 33.81 g/L à 25°C, 60.70 g/L à 50°C, 105.2 g/L à 75°C, 176.0 g/L à 100°C. Soluble dans les dilutions acides, alcalines [48].<br>Solubilité dans l'eau : 48 g/L (20°C) [49]. |  |
| <b>L-phénylalanine</b>               | Assez solubles dans l'eau. Se dissout dans les solutions diluées d'acides minéraux et d'hydroxydes alcalins (*).<br>Solubilité dans l'eau : 19.8 g/L à 0°C, 29.6 g/L à 25°C, 44.3 g/L à 50°C, 66.2 g/L à 75°C, 99.0 g/L à 100°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 27 g/L (20°C) [49].  |  |
| <b>Acide aminoacétique (glycine)</b> | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans 100 mL d'eau : 25 g à 25°C, 39.1 g à 50°C, 54.4 g à 75°C, 67.2 g à 100°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 225 g/L (20°C) [49].  |  |

| Acides aminés                       | Solubilités   | Structures  |
|-------------------------------------|---|---|
| <b>L-tyrosine</b>                   | Très peu soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans l'eau : 0.38 g/L (20°C) [49].   |    |
| <b>L-thréonine</b>                  | Soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans l'eau : 90 g/L (20°C) [49].  |    |
| <b>L-histidine</b>                  | Soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans l'eau à 25°C : 41.9 g/L. Insoluble dans les solvants ordinaires neutres excepté l'eau [48].<br>Solubilité dans l'eau : 38.2 g/L (20°C) [49].   |    |
| <b>N-acétyl-L-tyrosine corresp.</b> | Facilement soluble dans l'eau (*).  |    |
| <b>Arginine</b>                     | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>La solution aqueuse saturée contient en solution 21% (m/m) à 21°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 148.7 g/L (20°C) [49].   |   |
| <b>L-sérine</b>                     | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>(Forme DL) Solubilité dans l'eau : 22.04 g/L à 0°C, 50.23 g/L à 25°C, 103 g/L à 50°C, 192 g/L à 75°C, 322 g/L à 100°C. Insoluble dans les solvants ordinaires neutres [48].<br>Solubilité dans l'eau : 364 g/L (20°C) [49]. |  |
| <b>L-isoleucine</b>                 | Assez soluble dans l'eau (*).<br>(Forme DL) Solubilité dans l'eau : 18.3 g/L à 0°C, 22.3 g/L à 25°C, 30.3 g/L à 50°C, 46.1 g/L à 75°C, 78.0 g/L à 100°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 32.1 g/L (20°C) [49].  |  |
| <b>L-lysine</b>                     | Très soluble dans l'eau. Insoluble dans les solvants ordinaires neutres [48].<br>Solubilité dans l'eau : > 1500 g/L (20°C) (monohydraté) [49].  |  |
| <b>L-valine</b>                     | Soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans l'eau : 83.4 g/L à 0°C, 88.5 g/L à 25°C, 96.2 g/L à 50°C, 102.4 g/L à 65°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 85 g/L (20°C) [49].  |  |
| <b>L-alanine</b>                    | Facilement soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans l'eau : 127.3 g/L à 0°C, 166.5 g/L à 25°C, 217.9 g/L à 50°C, 285.1 g/L à 75°C, 373.0 g/L à 100°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 166.5 g/L (25°C) [49].  |  |

| Acides aminés                           | Solubilités  | Structures  |
|---|--|---|
| <b>L-proline</b>                        | Très soluble dans l'eau (*).<br>Solubilité dans 100 mL d'eau : 127.4 g à 0°C, 162.3 g à 25°C, 206.7 g à 50°C, 239 g à 65°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 1500 g/L (20°C) [49].  |  |
| <b>Monoacétate de L-lysine corresp.</b> | Facilement soluble dans l'eau (*).   |  |
| <b>L-leucine</b>                        | Assez soluble dans l'eau. La leucine se dissout dans les solutions diluées d'acides minéraux et d'hydroxydes alcalins (*).<br>Solubilité dans l'eau : 22.7 g/L à 0°C, 24.26 g/L à 25°C, 28.87 g/l à 50°C, 38.23 g/L à 75°C, 56.38 g/L à 100°C [48].<br>Solubilité dans l'eau : 24 g/l (20°C) [49]. |  |

(\*) : Pharmacopée Européenne 7.0

Les structures des acides aminés ne représentent pas nécessairement la configuration L mentionnée.

Tableau 19 : Masses molaires et solubilités des sels d'électrolytes

| Electrolytes     | Sels                               | Masse molaire [g/mol] [48] | Solubilité [g/L] à 20°C |
|------------------|------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <b>Sodium</b>    | <b>Chlorure de sodium (NaCl)</b>   | 58.44                      | 358.00 [49]             |
| <b>Potassium</b> | <b>Chlorure de potassium (KCl)</b> | 74.55                      | 347.00 [49]             |
| <b>Calcium</b>   | <b>Gluconate de calcium</b>        | 430.37                     | 33.30 [48]              |
| <b>Phosphate</b> | <b>Glycérophosphate de calcium</b> | 210.14                     | 20.00 [48]              |

**Annexe 4 : Analyse théorique de la solubilité des composants de la NP concentrée à 3% d'acides aminés**

Tableau 20 : Calcul du volume minimal de solubilité des composants de la NP concentrée à 3% d'acides aminés pour l'estimation de leur solubilité dans un volume de 100 mL.

|                                  | Composants                    | Concentration [g/100mL]       | Solubilité [g/L] à 20°C       | Volume minimal de solubilité [mL] |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Acides aminés concentrés à 3%    | Taurine                       | 0.012                         | 65.00                         | 0.18                              |
|                                  | L-cystéine                    | 0.016                         | 160.00                        | 0.10                              |
|                                  | Acétylcystéine corresp.       | 0.021                         | 200.00                        | 0.11                              |
|                                  | L-tryptophane                 | 0.060                         | 10.57                         | 5.70                              |
|                                  | Acide L-malique               | 0.079                         | 160.00                        | 0.49                              |
|                                  | L-méthionine                  | 0.094                         | 48.00                         | 1.95                              |
|                                  | L-phénylalanine               | 0.113                         | 27.00                         | 4.17                              |
|                                  | Acide aminoacétique (glycine) | 0.125                         | 225.00                        | 0.55                              |
|                                  | L-tyrosine                    | 0.126                         | 0.38                          | 331.58                            |
|                                  | L-thréonine                   | 0.132                         | 90.00                         | 1.47                              |
|                                  | L-histidine                   | 0.143                         | 38.20                         | 3.74                              |
|                                  | N-acétyl-L-tyrosine corresp.  | 0.155                         | Facilement soluble dans l'eau |                                   |
|                                  | Arginine                      | 0.225                         | 148.70                        | 1.51                              |
|                                  | L-sérine                      | 0.230                         | 364.00                        | 0.63                              |
|                                  | L-isoleucine                  | 0.240                         | 32.10                         | 7.48                              |
|                                  | L-lysine                      | 0.255                         | 1500.00                       | 0.17                              |
|                                  | L-valine                      | 0.270                         | 85.00                         | 3.18                              |
|                                  | L-alanine                     | 0.279                         | 166.50                        | 1.68                              |
| L-proline                        | 0.291                         | 1500.00                       | 0.19                          |                                   |
| Monoacétate de L-lysine corresp. | 0.360                         | Facilement soluble dans l'eau |                               |                                   |
| L-leucine                        | 0.390                         | 24.00                         | 16.25                         |                                   |
| Electrolytes                     | Chlorure de sodium (NaCl)     | 0.117                         | 358.00                        | 0.33                              |
|                                  | Chlorure de potassium (KCl)   | 0.075                         | 347.00                        | 0.21                              |
|                                  | Glycérophosphate de calcium   | 0.189                         | 20.00                         | 9.46                              |

En orange : Composé ayant un volume minimal de solubilité > 100 mL

Exemple de calcul pour le volume minimal de solubilité : taurine

La solution est saturée à 20 g/L.

65 g → 1 L = 1000 mL

0.012 g → x [mL]

Le volume de saturation pour une masse de 0.012 g de taurine est de :

$$x = \frac{0.012 \cdot 1000}{65} = 0.18 \text{ mL}$$

Cela signifie que la taurine sera soluble pour tout volume supérieur ou égal à 0.18 mL.

**Annexe 5 : Analyse théorique de la solubilité des composants de la NP à différentes concentrations d'acides aminés (12%, 24% et 48%)**

Le volume des concentrats a été calculé en fonction des volumes de solutions de glucose 10% ou 20% disponibles dans les pays en développement, soit 50 mL ou 100 mL.

Annexe 5.1 : Solution de NP avec 12% d'acides aminés

- 1) Volume du concentrat (12% d'acides aminés) : 33 mL  
Volume d'une solution de glucose 20% : 100 mL  
Solution de NP finale : 133 mL avec 2.98% d'acides aminés et 15% de glucose
  
- 2) Volume du concentrat (12% d'acides aminés) : 33 mL  
Volume d'une solution de glucose 10% : 100 mL  
Solution de NP finale : 133 mL avec 2.98% d'acides aminés et 7.52% de glucose

La formulation 1 est préférée (dilution avec du glucose 20%).

Exemple de calcul du volume de concentrat nécessaire pour obtenir une concentration finale de 3% d'acides aminés :

$$c_1V_1 = c_2V_2 \Leftrightarrow V_1 = \frac{c_2V_2}{c_1}$$

Avec  $c_1 = 12\%$ ,  $c_2 = 3\%$ ,  $V_2 = 100 \text{ mL} + V_1$

$$V_1 = \frac{3}{12} \cdot (100 + V_1) = 0.25 \cdot 100 + 0.25 \cdot V_1$$

$$0.75 \cdot V_1 = 25 \Leftrightarrow V_1 \cong 33 \text{ mL}$$

Tableau 21 : Calcul du volume minimal de solubilité des composants de la NP concentrée à 12% d'acides aminés pour l'estimation de leur solubilité dans un volume de 33 mL d'eau.

|                                  | Composants                    | Concentration [g/33mL]        | Solubilité [g/L] à 20°C       | Volume minimal de solubilité [mL] |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Acides aminés concentrés à 12%   | Taurine                       | 0.016                         | 65.00                         | 0.24                              |
|                                  | L-cystéine                    | 0.021                         | 160.00                        | 0.13                              |
|                                  | Acétylcystéine corresp.       | 0.028                         | 200.00                        | 0.14                              |
|                                  | L-tryptophane                 | 0.080                         | 10.57                         | 7.53                              |
|                                  | Acide L-malique               | 0.104                         | 160.00                        | 0.65                              |
|                                  | L-méthionine                  | 0.124                         | 48.00                         | 2.57                              |
|                                  | L-phénylalanine               | 0.149                         | 27.00                         | 5.50                              |
|                                  | Acide aminoacétique (glycine) | 0.164                         | 225.00                        | 0.73                              |
|                                  | L-tyrosine                    | 0.166                         | 0.38                          | 437.68                            |
|                                  | L-thréonine                   | 0.174                         | 90.00                         | 1.94                              |
|                                  | L-histidine                   | 0.188                         | 38.20                         | 4.93                              |
|                                  | N-acétyl-L-tyrosine corresp.  | 0.205                         | Facilement soluble dans l'eau |                                   |
|                                  | Arginine                      | 0.297                         | 148.70                        | 2.00                              |
|                                  | L-sérine                      | 0.304                         | 364.00                        | 0.83                              |
|                                  | L-isoleucine                  | 0.317                         | 32.10                         | 9.87                              |
|                                  | L-lysine                      | 0.337                         | 1500.00                       | 0.22                              |
|                                  | L-valine                      | 0.356                         | 85.00                         | 4.19                              |
|                                  | L-alanine                     | 0.368                         | 166.50                        | 2.21                              |
|                                  | L-proline                     | 0.385                         | 1500.00                       | 0.26                              |
| Monoacétate de L-lysine corresp. | 0.475                         | Facilement soluble dans l'eau |                               |                                   |
| L-leucine                        | 0.515                         | 24.00                         | 21.45                         |                                   |
| Electrolytes                     | Chlorure de sodium (NaCl)     | 0.154                         | 358.00                        | 0.43                              |
|                                  | Chlorure de potassium (KCl)   | 0.098                         | 347.00                        | 0.28                              |
|                                  | Glycérophosphate de calcium   | 0.250                         | 20.00                         | 12.48                             |

En orange : Composé ayant un volume minimal de solubilité > 33 mL

Exemple de calcul pour les masses à peser : taurine

Masse de taurine dans la solution concentrée à 3% d'acides aminés : 0.012 g/100 mL

Pour un volume de 33 mL :

0.012 g → 100 mL

x [g] → 33 mL

$$x = \frac{0.012 \cdot 33}{100} = 0.00396 \text{ g / 33mL}$$

Pour une concentration d'acides aminés de 12% :

0.00396 g → 3%

y [g] → 12%

$$y = \frac{0.00396 \cdot 12}{3} = 0.016 \text{ g / 33mL}$$

Le volume minimal de solubilité a été calculé de la même manière que l'exemple de calcul décrit dans l'annexe 4.

Les calculs ont été effectués de la même manière pour les annexes 5.2 et 5.3.



Annexe 5.2 : Solution de NP avec 24% d'acides aminés

- 1) Volume du concentrat (24% d'acides aminés) : 15 mL  
Volume d'une solution de glucose 20% : 100 mL  
Solution de NP finale : 115 mL avec 3.13% d'acides aminés et 17.39% de glucose
  
- 2) Volume du concentrat (24% d'acides aminés) : 15 mL  
Volume d'une solution de glucose 10% : 100 mL  
Solution de NP finale : 115 mL avec 3.13% d'acides aminés et 8.69% de glucose

La formulation 2 est préférée (dilution avec du glucose 10%).

Tableau 22 : Calcul du volume minimal de solubilité des composants de la NP concentrée à 24% d'acides aminés pour l'estimation de leur solubilité dans un volume de 15 mL d'eau.

|                                  | Composants                    | Concentration [g/15mL]        | Solubilité [g/L] à 20°C       | Volume minimal de solubilité [mL] |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Acides aminés concentrés à 24%   | Taurine                       | 0.014                         | 65.00                         | 0.22                              |
|                                  | L-cystéine                    | 0.019                         | 160.00                        | 0.12                              |
|                                  | Acétylcystéine corresp.       | 0.025                         | 200.00                        | 0.13                              |
|                                  | L-tryptophane                 | 0.072                         | 10.57                         | 6.85                              |
|                                  | Acide L-malique               | 0.094                         | 160.00                        | 0.59                              |
|                                  | L-méthionine                  | 0.112                         | 48.00                         | 2.34                              |
|                                  | L-phénylalanine               | 0.135                         | 27.00                         | 5.00                              |
|                                  | Acide aminoacétique (glycine) | 0.149                         | 225.00                        | 0.66                              |
|                                  | L-tyrosine                    | 0.151                         | 0.38                          | 397.89                            |
|                                  | L-thréonine                   | 0.158                         | 90.00                         | 1.76                              |
|                                  | L-histidine                   | 0.171                         | 38.20                         | 4.49                              |
|                                  | N-acétyl-L-tyrosine corresp.  | 0.186                         | Facilement soluble dans l'eau |                                   |
|                                  | Arginine                      | 0.270                         | 148.70                        | 1.82                              |
|                                  | L-sérine                      | 0.276                         | 364.00                        | 0.76                              |
|                                  | L-isoleucine                  | 0.288                         | 32.10                         | 8.97                              |
|                                  | L-lysine                      | 0.306                         | 1500.00                       | 0.20                              |
|                                  | L-valine                      | 0.324                         | 85.00                         | 3.81                              |
|                                  | L-alanine                     | 0.335                         | 166.50                        | 2.01                              |
|                                  | L-proline                     | 0.350                         | 1500.00                       | 0.23                              |
| Monoacétate de L-lysine corresp. | 0.432                         | Facilement soluble dans l'eau |                               |                                   |
| L-leucine                        | 0.468                         | 24.00                         | 19.50                         |                                   |
| Electrolytes                     | Chlorure de sodium (NaCl)     | 0.140                         | 358.00                        | 0.39                              |
|                                  | Chlorure de potassium (KCl)   | 0.089                         | 347.00                        | 0.26                              |
|                                  | Glycérophosphate de calcium   | 0.227                         | 20.00                         | 11.35                             |

En orange : Composés ayant un volume minimal de solubilité > 15 mL

Annexe 5.3 : Solution de NP avec 48% d'acides aminés

- 1) Volume du concentrat (48% d'acides aminés) : 7 mL  
Volume d'une solution de glucose 20% : 100 mL  
Solution de NP finale : 107 mL avec 3.14% d'acides aminés et 18.69% de glucose
  
- 2) Volume du concentrat (48% d'acides aminés) : 7 mL  
Volume d'une solution de glucose 10% : 100 mL  
Solution de NP finale : 107 mL avec 3.14% d'acides aminés et 9.35% de glucose

Il sera préférable d'utiliser la solution de glucose 10%.

Tableau 23 : Calcul du volume minimal de solubilité des composants de la NP concentrée à 48% d'acides aminés pour l'estimation de leur solubilité dans un volume de 7 mL d'eau.

|                                  | Composants                    | Concentration [g/7mL]         | Solubilité [g/L] à 20°C       | Volume minimal de solubilité [mL] |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Acides aminés concentrés à 48%   | Taurine                       | 0.013                         | 65.00                         | 0.21                              |
|                                  | L-cystéine                    | 0.017                         | 160.00                        | 0.11                              |
|                                  | Acétylcystéine corresp.       | 0.024                         | 200.00                        | 0.12                              |
|                                  | L-tryptophane                 | 0.068                         | 10.57                         | <b>6.39</b>                       |
|                                  | Acide L-malique               | 0.088                         | 160.00                        | 0.55                              |
|                                  | L-méthionine                  | 0.105                         | 48.00                         | 2.18                              |
|                                  | L-phénylalanine               | 0.126                         | 27.00                         | 4.67                              |
|                                  | Acide aminoacétique (glycine) | 0.139                         | 225.00                        | 0.62                              |
|                                  | L-tyrosine                    | 0.141                         | 0.38                          | <b>371.37</b>                     |
|                                  | L-thréonine                   | 0.148                         | 90.00                         | 1.64                              |
|                                  | L-histidine                   | 0.160                         | 38.20                         | 4.19                              |
|                                  | N-acétyl-L-tyrosine corresp.  | 0.174                         | Facilement soluble dans l'eau |                                   |
|                                  | Arginine                      | 0.252                         | 148.70                        | 1.69                              |
|                                  | L-sérine                      | 0.258                         | 364.00                        | 0.71                              |
|                                  | L-isoleucine                  | 0.269                         | 32.10                         | <b>8.37</b>                       |
|                                  | L-lysine                      | 0.286                         | 1500.00                       | 0.19                              |
|                                  | L-valine                      | 0.302                         | 85.00                         | 3.56                              |
|                                  | L-alanine                     | 0.312                         | 166.50                        | 1.88                              |
|                                  | L-proline                     | 0.326                         | 1500.00                       | 0.22                              |
| Monoacétate de L-lysine corresp. | 0.403                         | Facilement soluble dans l'eau |                               |                                   |
| L-leucine                        | 0.437                         | 24.00                         | <b>18.20</b>                  |                                   |
| Electrolytes                     | Chlorure de sodium (NaCl)     | 0.131                         | 358.00                        | 0.37                              |
|                                  | Chlorure de potassium (KCl)   | 0.083                         | 347.00                        | 0.24                              |
|                                  | Glycérophosphate de calcium   | 0.212                         | 20.00                         | <b>10.59</b>                      |

En orange : Composés ayant un volume minimal de solubilité > 7 mL ou très proche de 7 mL

**Annexe 6 : Informations utilisées pour l'adaptation des acides aminés de la formulation de NP**

Tableau 24 : Solubilité et prix des acides aminés essentiels aux prématurés

| Acides aminés essentiels | Solubilité [g/L] à 20°C | Prix [CHF] [50]  |
|--------------------------|-------------------------|------------------|
| L-histidine              | 38.20                   | 77.40 pour 1.0 g |
| L-lysine                 | 1500.00                 | 54.80 pour 1.0 g |
| L-méthionine             | 48.00                   | 67.50 pour 1.0 g |
| L-phénylalanine          | 27.00                   | 67.50 pour 1.0 g |
| L-thréonine              | 90.00                   | 67.50 pour 1.0 g |
| L-valine                 | 85.00                   | 77.40 pour 1.0 g |
| L-cystéine               | 160.00                  | 19.40 pour 2.5 g |
| Taurine                  | 65.00                   | 77.40 pour 1.0 g |

**Annexe 7 : Adaptation de la formulation de NP**

Tableau 25 : Adaptation des quantités d'acides aminés de la formulation de NP et volumes minimaux de solubilité correspondant

| Acides aminés concentrés à 48%          | Concentration [g/7mL] | Solubilité [g/L] à 20°C       | Volume minimal de solubilité [mL] |
|---|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Taurine</b>                          | 0.004                 | 65.00                         | 0.06                              |
| <b>L-cystéine</b>                       | 0.146                 | 160.00                        | 0.91                              |
| <b>Acétylcystéine corresp.</b>          | 0.197                 | 200.00                        | 0.98                              |
| <b>L-tryptophane</b>                    | 0.050                 | 10.57                         | 4.73                              |
| <b>Acide L-malique</b>                  | 0.088                 | 160.00                        | 0.55                              |
| <b>L-méthionine</b>                     | 0.105                 | 48.00                         | 2.18                              |
| <b>L-phénylalanine</b>                  | 0.126                 | 27.00                         | 4.67                              |
| <b>Acide aminoacétique (glycine)</b>    | 0.139                 | 225.00                        | 0.62                              |
| <b>L-tyrosine</b>                       | 1.260                 | 0.38                          | 1.260                             |
| <b>L-thréonine</b>                      | 0.180                 | 90.00                         | 2.00                              |
| <b>L-histidine</b>                      | 0.160                 | 38.20                         | 4.19                              |
| <b>N-acétyl-L-tyrosine corresp.</b>     | 0.174                 | Facilement soluble dans l'eau |                                   |
| <b>Arginine</b>                         | 0.252                 | 148.70                        | 1.69                              |
| <b>L-sérine</b>                         | 0.258                 | 364.00                        | 0.71                              |
| <b>L-isoleucine</b>                     | 0.150                 | 32.10                         | 4.67                              |
| <b>L-lysine</b>                         | 0.500                 | 1500.00                       | 0.33                              |
| <b>L-valine</b>                         | 0.302                 | 85.00                         | 3.56                              |
| <b>L-alanine</b>                        | 0.312                 | 166.50                        | 1.88                              |
| <b>L-proline</b>                        | 0.326                 | 1500.00                       | 0.22                              |
| <b>Monoacétate de L-lysine corresp.</b> | 0.706                 | Facilement soluble dans l'eau |                                   |
| <b>L-leucine</b>                        | 0.120                 | 24.00                         | 5.00                              |

En orange : composants diminués

En vert : composants augmentés

En bleu : composants non utilisés (utilisation des dérivés à la place)

Tableau 26 : Adaptation du glycérophosphate de calcium pour le mélange d'électrolytes correspondant à la NP concentrée à 48% d'acides aminés

| Electrolytes                           | Masse [g]<br>dans 7 mL | Solubilité [g/L]<br>à 20°C | Volume minimal<br>de solubilité [mL] |
|--|------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| Chlorure de sodium (NaCl)              | 0.131                  | 358.00                     | 0.37                                 |
| Chlorure de potassium<br>(KCl)         | 0.083                  | 347.00                     | 0.24                                 |
| <b>Glycérophosphate de<br/>calcium</b> | <b>0.100</b>           | <b>20.00</b>               | <b>5.00</b>                          |
| <b>Somme</b>                           | <b>0.314</b>           | <b>-</b>                   | <b>-</b>                             |

En orange : composants diminués

Exemple de calcul : taurine

0.004 g → 7 mL de NP à 48%

x [g] → 1000 mL de NP à 48%

$$x = \frac{0.004 * 1000}{7} = 0.57 \text{ g}$$

0.57 g → 1000 mL de NP à 48%

y [g] → 1000 mL de NP à 3%

$$y = \frac{0.57 * 3}{48} = 0.036 \text{ g}$$

**Annexe 8 : Appareils et produits utilisés au cours des manipulations**

Tableau 27 : Matériels utilisés lors des manipulations

| <b>Appareils</b>  | <b>Fournisseurs, villes pays</b>                                   | <b>Conditions d'utilisation</b>                                       |
|---|--|---|
| Balance analytique Mettler Toledo (modèle AG204 DeltaRange)             | Mettler Toledo, Greifensee, Suisse                                 | Température ambiante (21-22°C)  |
| Balance analytique Mettler Toledo (modèle PR203)                        | Mettler Toledo, Greifensee, Suisse                                 | Température ambiante (21-22°C)  |
| Balance analytique Mettler Toledo (modèle PR5002 DeltaRange)            | Mettler Toledo, Greifensee, Suisse                                 | Température ambiante (21-22°C)  |
| Rotavapor-R   | Büchi, Flawil, Suisse  | Vitesse 4, sous vide  |
| Bain-marie pour évaporation (modèle 1023)                               | GFL, Burgwedel, Allemagne  | Température : 30-60°C   |
| Etuve Heraeus Kelvitron® t (modèle Ut6200)                              | Kendro Laboratory Products SA, Carouge, Suisse                     | Température : 30-34°C   |
| Tamiseuse à vibration Analysette 3 PRO                                  | Fritsch, Idar-Oberstein, Allemagne                                 | Durée de tamisage 10 minutes, amplitude 1.5, tamis entre 63 et 500 µm |
| Mélangeur tridimensionnel Turbula® (modèle T2C)                         | Willy A. Bachofen AG, Bâle, Suisse                                 | Temps de mélange : 20 ou 30 minutes                                   |
| Mélangeur tridimensionnel Turbula® System Schatz (modèle T2F)           | Willy A. Bachofen AG, MuttENZ, Suisse                              | Temps de mélange : 30 minutes, vitesse : 34 rpm                       |
| pH-mètre SevenMulti   | Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Suisse                         | Température ambiante (21-22°C)  |
| Compteur de particules (modèle Liquid Syringe Sampler Hiac/Royco 3000A) | SKAN AG, Allschwil, Suisse   | Température ambiante (21-22°C), sous flux laminaire                   |
| Interface (modèle Hiac/Royco 9064)                                      | SKAN AG, Allschwil, Suisse   | Température ambiante (21-22°C)  |
| Osmomètre (modèle Advanced Instruments 3D3)                             | Advanced Instruments, Zurich, Suisse                               | Température ambiante (21-22°C)  |
| Agitateur Janke (modèle HS 500)   | Janke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA®-Labortechnik, Staufen, Allemagne | Température ambiante (21-22°C), vitesse : 200 Hub/min                 |
| Colorimètre Lico 400  | Dr Bruno Lange GmbH, Düsseldorf, Germany                           |   |



Tableau 28 : Produits utilisés lors des manipulations

| <b>Substances</b>                  | <b>Numéros de référence (numéros de lot)</b> | <b>Fournisseurs, villes, pays</b>       | <b>Utilisation lors des manipulations</b>  |
|------------------------------------|--|---|--|
| Aminoven <sup>®</sup> Infant 10%   | 16EA0183                                     | Fresenius Kabi AG, Stans, Suisse        | Evaporation de la NP au Rotavapor-R et à l'étuve                                   |
| Chlorure de sodium pour injectable | MP/11-173619                                 | Sintetica-Bioren SA, Couvet, Suisse     | Préparation des mélanges d'électrolytes  |
| Chlorure de potassium              | MP/11-293795                                 | Hänseler AG, Herisau, Suisse            | Préparation des mélanges d'électrolytes  |
| Glycérophosphate de calcium        | MP/11-192102                                 | Hänseler AG, Herisau, Suisse            | Préparation du mélange 1 d'électrolytes  |
| Glycérophosphate de calcium        | MP/12-303548                                 | Hänseler AG, Herisau, Suisse            | Préparation du mélange 2 d'électrolytes (pour le concentrat à 48% d'acides aminés) |
| Glucose 10%                        | 11022043                                     | Sintetica-Bioren SA, Couvet, Suisse     | Reconstitution/dilution des poudres de NP et des concentrats à 24% d'acides aminés |
| Glucose 20%                        | 11042101                                     | Sintetica-Bioren SA, Couvet, Suisse     | Dilution des concentrats à 12% d'acides aminés                                     |
| Taurine                            | S5507116                                     | Merck KgaA, Darmstadt, Germany          | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| N-acétyl-L-cystéine                | 986674                                       | PharmaZell GmbH, Raubling, Germany      | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| L-alanine                          | 987237                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Hofu, Japan    | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| L-arginine                         | 990094                                       | Ajinomoto Co. Inc., Kyushu, Japan       | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| Glycine                            | 923338                                       | Evonik Industries Ltd, (Nanning, China) | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| L-histidine                        | 987243                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Hofu, Japan    | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| L-isoleucine                       | 989947                                       | Evonik Industries Ltd, Nanning, China   | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| L-leucine                          | 983760                                       | Amino GmbH, Frellstedt, Germany         | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| Acétate de L-lysine                | 979437                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Hofu, Japan    | Préparation du mélange d'acides aminés   |
| Acide L-malique                    | 929333                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Hofu, Japan    | Préparation du mélange d'acides aminés   |

| <b>Substances</b>   | <b>Numéros de référence (numéros de lot)</b> | <b>Fournisseurs, villes, pays</b>     | <b>Utilisation lors des manipulations</b> |
|---------------------|--|---------------------------------------|---|
| L-méthionine        | 990110                                       | Evonik Industries Ltd, Nanning, China | Préparation du mélange d'acides aminés    |
| L-phénylalanine     | 990095                                       | Ajinomoto Co. Inc., Kyushu, Japan     | Préparation du mélange d'acides aminés    |
| L-proline           | 987239                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Ube, Japan   | Préparation du mélange d'acides aminés    |
| L-sérine            | 993735                                       | Ajinomoto Co. Inc., Kyushu, Japan     | Préparation du mélange d'acides aminés    |
| L-thréonine         | 979440                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Hofu, Japan  | Préparation du mélange d'acides aminés    |
| L-tryptophane       | 987241                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Hofu, Japan  | Préparation du mélange d'acides aminés    |
| L-valine            | 987245                                       | Kyowa Hakko Bio Co. Ltd, Hofu, Japan  | Préparation du mélange d'acides aminés    |
| N-acétyl-L-tyrosine | 862389                                       | Amino GmbH Frellstedt, Germany        | Préparation du mélange d'acides aminés    |

**Annexe 9 : Préparation du mélange d'acides aminés et du mélange d'électrolytes**

Tableau 29 : Masses des acides aminés pesés pour la fabrication du mélange d'acides aminés ainsi que les tamis utilisés

| Composants                              | Masse à peser [g]<br>pour 50L | Masses pesées<br>[g] | Tamis [ $\mu\text{m}$ ] |
|---|-------------------------------|----------------------|-------------------------|
| <b>Taurine</b>                          | 1.7857                        | 1.7860               | non tamisée             |
| <b>Acétylcystéine corresp.</b>          | 87.7404                       | 87.7435              | 125-250                 |
| <b>L-tryptophane</b>                    | 22.3214                       | 20.0903              | 250-315                 |
|   |                               | 2.2239               | 125-250                 |
| <b>Acide L-malique</b>                  | 39.3000                       | 39.3012              | 125-250                 |
| <b>L-méthionine</b>                     | 46.8000                       | 16.5627              | 250-315                 |
|   |                               | 30.2409              | 315-400                 |
| <b>L-phénylalanine</b>                  | 56.2500                       | 56.2517              | 250-315                 |
| <b>Acide aminoacétique (glycine)</b>    | 62.2500                       | 62.2522              | 250-315                 |
| <b>L-thréonine</b>                      | 80.3571                       | 80.3589              | 125-250                 |
| <b>L-histidine</b>                      | 71.4000                       | 71.4050              | < 355                   |
| <b>N-acétyl-L-tyrosine corresp.</b>     | 77.7000                       | 62.7009              | 315-400                 |
|   |                               | 10.9628              | 250-315                 |
|   |                               | 4.0388               | 400-500                 |
| <b>L-Arginine</b>                       | 112.5000                      | 50.7034              | 125-250                 |
|   |                               | 26.4922              | 250-315                 |
|   |                               | 35.3163              | 315-400                 |
| <b>L-sérine</b>                         | 115.0500                      | 77.3175              | 125-250                 |
|   |                               | 15.7640              | 250-315                 |
|   |                               | 21.9717              | 315-400                 |
| <b>L-isoleucine</b>                     | 66.9643                       | 66.9680              | 315-400                 |
| <b>L-valine</b>                         | 135.0000                      | 93.5436              | 125-250                 |
|   |                               | 10.4848              | 250-315                 |
|   |                               | 30.9733              | 63-125                  |
| <b>L-alanine</b>                        | 139.5000                      | 32.4390              | 315-400                 |
|   |                               | 17.4036              | 250-315                 |
|   |                               | 52.2914              | 125-250                 |
|   |                               | 37.3690              | 400-500                 |
| <b>L-proline</b>                        | 145.6500                      | 36.5312              | 250-315                 |
|   |                               | 30.4890              | 125-250                 |
|   |                               | 44.8666              | 315-400                 |
|   |                               | 33.7650              | < 355                   |
| <b>Monoacétate de L-lysine corresp.</b> | 315.1261                      | 230.3470             | 125-250                 |
|   |                               | 34.8519              | 250-315                 |
|   |                               | 49.9302              | 315-400                 |
| <b>L-leucine</b>                        | 53.5714                       | 30.1407              | 125-250                 |
|   |                               | 23.4342              | 63-125                  |

Somme des acides aminés pesés = **1629.3124 g**

Tableau 30 : Masses des électrolytes pesées pour la fabrication du mélange 1 d'électrolytes ainsi que les tamis utilisés

| Composants                         | Masse à peser [g]<br>pour 25L | Masses pesées [g] | Tamis [ $\mu\text{m}$ ] |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------|
| <b>Chlorure de sodium (NaCl)</b>   | 29.220                        | 29.222            | < 355                   |
| <b>Chlorure de potassium (KCl)</b> | 18.638                        | 18.638            | < 355                   |
| <b>Glycérophosphate de calcium</b> | 47.282                        | 47.283            | < 355                   |

Tableau 31 : Préparation du mélange d'électrolytes pour la NP concentrée à 48% d'acides aminés

|                                       | Composants                         | Masse à peser [g]<br>pour 25L | Masses pesées [g] | Tamis [ $\mu\text{m}$ ] |
|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------|
| <b>Mélange de sels d'électrolytes</b> | <b>Chlorure de sodium (NaCl)</b>   | 14.61                         | 14.61             | < 355                   |
|                                       | <b>Chlorure de potassium (KCl)</b> | 9.32                          | 9.32              | < 355                   |
|                                       | <b>Glycérophosphate de calcium</b> | 11.16                         | 11.16             | < 355                   |

**Annexe 10 : Calculs effectués pour la préparation des flacons de poudre à reconstituer dans du glucose 10%**

Tableau 32 : Données permettant le calcul de la masse à peser à partir du mélange d'acides aminés

| Acides aminés  | Concentration [g/L] | Concentration [g/50L] |
|--|---------------------|-----------------------|
| Taurine  | 0.0357              | 1.7857                |
| L-cystéine   | 1.3036              | 65.1786               |
| Acétylcystéine corresp.  | 1.7548              | 87.7404               |
| L-tryptophane  | 0.4464              | 22.3214               |
| Acide L-malique  | 0.7860              | 39.3000               |
| L-méthionine   | 0.9360              | 46.8000               |
| L-phénylalanine  | 1.1250              | 56.2500               |
| Acide aminoacétique (glycine)                                  | 1.2450              | 62.2500               |
| L-tyrosine   | 1.2600              | 63.0000               |
| L-thréonine  | 1.6071              | 80.3571               |
| L-histidine  | 1.4280              | 71.4000               |
| N-acétyl-L-tyrosine corresp.                                   | 1.5540              | 77.7000               |
| Arginine   | 2.2500              | 112.5000              |
| L-sérine   | 2.3010              | 115.0500              |
| L-isoleucine   | 1.3393              | 66.9643               |
| L-lysine   | 4.4643              | 223.2143              |
| L-valine   | 2.7000              | 135.0000              |
| L-alanine  | 2.7900              | 139.5000              |
| L-proline  | 2.9130              | 145.6500              |
| Monoacétate de L-lysine corresp.                               | 6.3025              | 315.1261              |
| L-leucine  | 1.0714              | 53.5714               |
| <b>Somme des acides aminés non dérivés</b>                     | <b>30.0019</b>      | <b>1500.0929</b>      |
| <b>Somme des acides aminés utilisés lors des manipulations</b> | <b>32.2913</b>      | <b>1614.5664</b>      |

En orange : acides aminés non dérivés

En vert : acides aminés utilisés lors des manipulations

Masse d'acides aminés à peser :

$$3\% = 3 \text{ g}/100 \text{ mL}$$

Or, des dérivés ont été utilisés pour la cystéine, la tyrosine et la lysine. De ce fait, les masses correspondantes ne sont pas identiques.

Masse totale réelle pesée d'acides aminés (avec les dérivés) = 1629.3124 g (Cf annexe précédent)

Masse totale qui aurait été pesée avec les acides aminés non dérivé = 1500.0929 g

3 g → 1500.0929 g

x [g] → 1629.3124 g

$$x = \frac{3 \cdot 1629.3124}{1500.0929} = 3.2584 \text{ g}$$

Masse à prélever du mélange d'acides aminés =  $85 \cdot 3.2584 \text{ g} = 276.9660 \text{ g}$

Masse pesée = 276.962 g

Masse d'électrolytes à peser : 0.381 g (détail des calculs dans l'annexe 2.2)

Masse à prélever du mélange d'acides aminés =  $85 \cdot 0.381 \text{ g} = 32.347 \text{ g}$

Masse pesée = 32.350 g

Masse à peser à partir du mélange d'acides aminés et d'électrolytes :

$$3.258 + 0.381 = \mathbf{3.639 \text{ g}}$$

Masses pesées pour les 81 flacons de poudre : 3.64 g

**Annexe 11 : Préparation des solutions mères des NP concentrées à 12%, 24% et 48%**

Tableau 33 : Préparation des solutions mères des concentrats de NP (12%, 24% et 48%)

| Solutions mères | Concentration en acides aminés | Volume de la solution mère [L] | Masses d'acides aminés [g] | Masse d'acides aminés pesées [g] | Masses d'électrolytes [g] | Masses d'électrolytes pesées [g] |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| SM12%           | 12%                            | 1.00                           | 130.34                     | 130.34                           | 15.22                     | 15.22                            |
| SM24%           | 24%                            | 0.50                           | 130.34                     | 130.34                           | 15.22                     | 15.22                            |
| SM48%           | 48%                            | 0.25                           | 130.34                     | 130.34                           | 11.23                     | 11.23                            |

Exemple de calcul : SM12%

1) Masse d'acides aminés

12% = 12 g/100mL

12.00 g → 100 mL

x [g] → 1000 mL

$$x = \frac{12.00 \cdot 1000}{100} = 120.00 \text{ g}$$

Or, des dérivés ont été utilisés pour la cystéine, la tyrosine et la lysine.

Masse totale réelle pesée d'acides aminés (avec les dérivés) = 1629.3124 g

Masse totale qui aurait été pesée avec les acides aminés non dérivé = 1500.0929 g

$$x = \frac{12 \cdot 1629.3124}{1500.0929} = 130.3369 \text{ g}$$

2) Masse d'électrolytes

0.381 g d'électrolytes pour 100 mL → NP à 3% d'acides aminés

x [g/100mL] → NP à 12% d'acides aminés

$$x = \frac{0.381 \cdot 12}{3} = 1.522 \text{ g/100mL}$$

1.522 g → 100 mL

y [g] → 1000 mL

$$y = \frac{1.522 \cdot 1000}{100} = 15.222 \text{ g}$$

Exemple de calcul : SM48%

Masse d'électrolytes :

Après adaptation de la formulation : pour la NP à 48% d'acides aminés correspond une masse de 0.314 g d'électrolytes, pour un volume de 7 mL (cf annexe 5.3).

0.314 g d'électrolytes → 7 mL de NP à 48%

x [g] d'électrolytes → 100 mL de NP à 48%

$$x = \frac{0.314 \cdot 100}{7} = 4.491 \text{ g}$$

4.491 g → 100 mL

y [g] → 250 mL

$$y = \frac{4.491 \cdot 250}{100} = 11.229 \text{ g}$$

Conditions de solubilisation :

Tableau 34 : Conditions de solubilisation des poudres d'acides aminés et d'électrolytes pour la préparation des solutions mères de concentrats de NP

| Solutions mères | Conditions                                  | Durée                   |
|-----------------|---|-------------------------|
| SM12%           | Agitation magnétique + chauffage à 50-60°C  | 1h30                    |
| SM24%           | Agitation magnétique + chauffage à 50-60°C  | 14 heures               |
|                 | Agitation magnétique à température ambiante | 2 nuits (2 x 10 heures) |
|                 | Bain aux ultra-sons                         | 2 heures                |



**Annexe 12 : Résultats de l'évaporation de l'Aminoven® Infant 10%**

Annexe 12.1 : Résultats de l'évaporation à l'aide du Rotavapor

**Essai 1 :**

Tare du ballon : 111.38 g

Tableau 35 : Résultats obtenus lors de l'évaporation de l'Aminoven® Infant 10% avec le Rotavapor, essai 1

| Jour   | Temps              | Heure | Masse du ballon + NP [g] | Masse de la NP [g] | Volume de la NP [mL] | Pourcentage de la masse restante | Température du bain-marie [°C] | Remarques/ Observations                        |
|--------|--------------------|-------|--------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|--|
| Jour 1 | t <sub>0</sub>     | 9h47  | 229.88                   | 118.50             | 115.27               | 100.0%                           | 30.0                           | Aucun précipité, solution limpide              |
|        | t <sub>1</sub>     | 10h49 | 229.61                   | 118.23             | 115.01               | 99.8%                            | 36.0                           |  |
|        | t <sub>2</sub>     | 11h47 | 229.44                   | 118.06             | 114.84               | 99.6%                            | 33.0                           |  |
|        | t <sub>3</sub>     | 13h28 | 229.06                   | 117.68             | 114.47               | 99.3%                            | 33.0                           |  |
|        | t <sub>4</sub>     | 14h26 | 228.94                   | 117.56             | 114.36               | 99.2%                            | 33.0                           |  |
|        | t <sub>5</sub>     | 15h26 | 228.75                   | 117.37             | 114.17               | 99.0%                            | 32.5                           |  |
|        | t <sub>6</sub>     | 16h41 | 228.60                   | 117.22             | 114.03               | 98.9%                            | 30.0                           | Ballon retiré pendant la nuit                  |
| Jour 2 | t <sub>6</sub> bis | 9h20  | 228.60                   | 117.22             | 114.03               | 98.9%                            | 61.0                           | Aucun précipité, solution limpide              |
|        | t <sub>7</sub>     | 10h21 | 141.89                   | 30.51              | 29.68                | 25.7%                            | 56.0                           | Gros précipitat après refroidissement de la NP |

Exemple de calcul : t<sub>0</sub>

Masse de la NP = (Masse du ballon + NP) – Masse du ballon

Masse de la NP = 229.88 – 111.38 = 118.50 g

Densité de l'Aminoven<sup>®</sup> Infant 10% = 1.028

$$\text{Volume de NP} = \frac{\text{Masse de la NP}}{\text{Densité de la NP}} = \frac{118.50}{1.028} = 115.27 \text{ mL}$$

Calcul du pourcentage d'acides aminés après l'évaporation :

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \Leftrightarrow c_2 = \frac{c_1 V_1}{V_2} = \frac{10\% \cdot 115.27}{29.68} = 38.8\%$$

**Essai 2 :**

Tare du ballon : 111.47 g

Tableau 36 : Résultats obtenus lors de l'évaporation de l'Aminoven® Infant 10% avec le Rotavapor, essai 2

| Jour   | Temps              | Heure | Masse du ballon + NP [g] | Masse de la NP [g] | Volume de la NP [mL] | Pourcentage de la masse restante | Température du bain-marie [°C] | Remarques/ Observations                             |
|--------|--------------------|-------|--------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|
| Jour 1 | t <sub>0</sub>     | 11h17 | 245.21                   | 133.74             | 130.10               | 100.0%                           | 43.0                           | Aucun précipité, solution limpide                   |
|        | t <sub>1</sub>     | 11h44 | 245.09                   | 133.62             | 129.98               | 99.9%                            | 41.0                           |   |
|        | t <sub>2</sub>     | 12h25 | 243.57                   | 132.10             | 128.50               | 98.8%                            | 40.0                           |   |
|        | t <sub>3</sub>     | 13h47 | 233.55                   | 122.08             | 118.75               | 91.3%                            | 42.0                           | Pas de précipitation après refroidissement de la NP |
|        | t <sub>4</sub>     | 15h14 | 233.22                   | 121.75             | 118.43               | 91.0%                            | 42.0                           | Vide oublié   |
|        | t <sub>5</sub>     | 16h13 | 221.28                   | 109.81             | 106.82               | 82.1%                            | 42.0                           | Ballon retiré pendant la nuit                       |
| Jour 2 | t <sub>5</sub> bis | 8h55  | 221.28                   | 109.81             | 106.82               | 82.1%                            | 41.0                           | NP refroidie : aucun précipité, solution limpide    |
|        | t <sub>6</sub>     | 9h55  | 221.02                   | 109.55             | 106.57               | 81.9%                            | 41.0                           | Vide oublié   |
|        | t <sub>7</sub>     | 9h55  | 193.15                   | 81.68              | 79.46                | 61.1%                            | 40.5                           | Apparition d'un précipité après refroidissement     |

Calcul du pourcentage d'acides aminés après l'évaporation :  $c_1V_1 = c_2V_2 \Leftrightarrow c_2 = \frac{c_1V_1}{V_2} = \frac{10\% \cdot 130.10}{79.46} = 16.4\%$

Annexe 12.2 : Résultats de l'évaporation à l'aide de l'étuve

Tare de flacons :

- Flacon 1 : 99.521 g
- Flacon 2 : 99.259 g
- Flacon 3 : 99.131 g

Tableau 37 : Résultats obtenus lors de l'évaporation de l'Aminoven® Infant 10% à l'aide de l'étuve (34°C)

| Jour   | Temps           | Heure | Température [°C] | Masse du flacon 1 [g] | Masse du flacon 2 [g] | Masse du flacon 3 [g] |
|--------|-----------------|-------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Jour 1 | t <sub>0</sub>  | 10h42 | 31.5             | 199.477               | 198.714               | 198.010               |
|        | t <sub>1</sub>  | 11h42 | 32.6             | 199.097               | 198.406               | 197.763               |
|        | t <sub>2</sub>  | 13h21 | 33.2             | 198.334               | 197.760               | 197.238               |
|        | t <sub>3</sub>  | 14h20 | 32.7             | 197.899               | 197.388               | 196.933               |
|        | t <sub>4</sub>  | 15h20 | 32.7             | 197.509               | 197.009               | 196.626               |
|        | t <sub>5</sub>  | 16h46 | 33.1             | 196.821               | 196.489               | 196.169               |
| Jour 2 | t <sub>6</sub>  | 8h12  | 34.0             | 190.107               | 190.080               | 190.994               |
|        | t <sub>7</sub>  | 9h12  | 32.7             | 189.722               | 189.675               | 190.670               |
|        | t <sub>8</sub>  | 10h12 | 32.6             | 189.322               | 189.303               | 190.364               |
|        | t <sub>9</sub>  | 11h47 | 31.7             | 188.735               | 188.747               | 189.908               |
|        | t <sub>10</sub> | 13h49 | 33.4             | 187.938               | 187.96                | 189.267               |
|        | t <sub>11</sub> | 16h17 | 33.5             | 186.907               | 186.957               | 188.447               |
| Jour 3 | t <sub>12</sub> | 8h14  | 34.0             | 179.828               | 181.209               | 183.226               |
|        | t <sub>13</sub> | 9h58  | 33.5             | 179.109               | 180.604               | 182.689               |
|        | t <sub>14</sub> | 11h54 | 33.4             | 178.362               | 179.945               | 182.106               |
|        | t <sub>15</sub> | 15h00 | 33.7             | 177.077               | 178.886               | 181.110               |
|        | t <sub>16</sub> | 17h06 | 33.6             | 176.172               | 178.146               | 180.383               |
| Jour 4 | t <sub>17</sub> | 8h16  | 33.0             | 170.553               | 173.180               | 175.951               |
|        | t <sub>18</sub> | 10h55 | 33.6             | 169.631               | 172.278               | 175.163               |
|        | t <sub>19</sub> | 13h31 | 33.7             | 168.670               | 171.419               | 174.308               |
|        | t <sub>20</sub> | 16h06 | 33.6             | 167.767               | 170.587               | 173.524               |
| Jour 5 | t <sub>21</sub> | 8h13  | 34.4             | 163.733               | 165.069               | 168.403               |
|        | t <sub>22</sub> | 11h23 | 33.6             | 162.658               | 164.187               | 167.483               |
|        | t <sub>23</sub> | 15h49 | 33.7             | 161.104               | 163.007               | 166.106               |

Tableau 38 : Traitement des résultats obtenus lors de l'évaporation de l'Aminoven® Infant  
 10% à l'aide de l'étuve (34°C)

| Temps           | Masse de la NP 1 [g] | Masse de la NP 2 [g] | Masse de la NP 3 [g] | Pourcentage de la masse restante de la NP 1 | Pourcentage de la masse restante de la NP 2 | Pourcentage de la masse restante de la NP 3 |
|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|---|---|---|
| t <sub>0</sub>  | 99.956               | 99.455               | 98.879               | 100.0%                                      | 100.0%                                      | 100.0%                                      |
| t <sub>1</sub>  | 99.576               | 99.147               | 98.632               | 99.6%                                       | 99.7%                                       | 99.8%                                       |
| t <sub>2</sub>  | 98.813               | 98.501               | 98.107               | 98.9%                                       | 99.0%                                       | 99.2%                                       |
| t <sub>3</sub>  | 98.378               | 98.129               | 97.802               | 98.4%                                       | 98.7%                                       | 98.9%                                       |
| t <sub>4</sub>  | 97.988               | 97.750               | 97.495               | 98.0%                                       | 98.3%                                       | 98.6%                                       |
| t <sub>5</sub>  | 97.300               | 97.230               | 97.038               | 97.3%                                       | 97.8%                                       | 98.1%                                       |
| t <sub>6</sub>  | 90.586               | 90.821               | 91.863               | 90.6%                                       | 91.3%                                       | 92.9%                                       |
| t <sub>7</sub>  | 90.201               | 90.416               | 91.539               | 90.2%                                       | 90.9%                                       | 92.6%                                       |
| t <sub>8</sub>  | 89.801               | 90.044               | 91.233               | 89.8%                                       | 90.5%                                       | 92.3%                                       |
| t <sub>9</sub>  | 89.214               | 89.488               | 90.777               | 89.3%                                       | 90.0%                                       | 91.8%                                       |
| t <sub>10</sub> | 88.417               | 88.701               | 90.136               | 88.5%                                       | 89.2%                                       | 91.2%                                       |
| t <sub>11</sub> | 87.386               | 87.698               | 89.316               | 87.4%                                       | 88.2%                                       | 90.3%                                       |
| t <sub>12</sub> | 80.307               | 81.950               | 84.095               | 80.3%                                       | 82.4%                                       | 85.0%                                       |
| t <sub>13</sub> | 79.588               | 81.345               | 83.558               | 79.6%                                       | 81.8%                                       | 84.5%                                       |
| t <sub>14</sub> | 78.841               | 80.686               | 82.975               | 78.9%                                       | 81.1%                                       | 83.9%                                       |
| t <sub>15</sub> | 77.556               | 79.627               | 81.979               | 77.6%                                       | 80.1%                                       | 82.9%                                       |
| t <sub>16</sub> | 76.651               | 78.887               | 81.252               | 76.7%                                       | 79.3%                                       | 82.2%                                       |
| t <sub>17</sub> | 71.032               | 73.921               | 76.820               | 71.1%                                       | 74.3%                                       | 77.7%                                       |
| t <sub>18</sub> | 70.110               | 73.019               | 76.032               | 70.1%                                       | 73.4%                                       | 76.9%                                       |
| t <sub>19</sub> | 69.149               | 72.160               | 75.177               | 69.2%                                       | 72.6%                                       | 76.0%                                       |
| t <sub>20</sub> | 68.246               | 71.328               | 74.393               | 68.3%                                       | 71.7%                                       | 75.2%                                       |
| t <sub>21</sub> | 64.212               | 65.810               | 69.272               | 64.2%                                       | 66.2%                                       | 70.1%                                       |
| t <sub>22</sub> | 63.137               | 64.928               | 68.352               | 63.2%                                       | 65.3%                                       | 69.1%                                       |
| t <sub>23</sub> | 61.583               | 63.748               | 66.975               | 61.6%                                       | 64.1%                                       | 67.7%                                       |

Tableau 39 : Observations visuelles des flacons durant l'évaporation de l'Aminoven® Infant  
 10% à l'aide de l'étuve

| Temps                             | Observations  |
|-----------------------------------|---|
| t <sub>12</sub>                   | Petit précipité lors de l'agitation du flacon dans les flacons 1 et 2 → cause : effet statique  |
| t <sub>17</sub> à t <sub>20</sub> |   |
| t <sub>21</sub> à t <sub>23</sub> | Précipitation à la surface et au fond du flacon 1<br>Précipitation à la surface du flacon 2<br>Cause : effet statique et/ou mauvaise solubilité des acides aminés |

**Annexe 13 : Résultats obtenus lors des essais de NP sous forme sèche reconstituée dans 100 mL de glucose 10%**

Tableau 40 : pH mesuré sur les échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 100 mL de glucose 10%

| Echantillons                            | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|---|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| <b>1. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.02     | 5.03     | 5.03     | 5.03    | 0.01       | 0.11% | 5.46    | 0.32       | 5.92% |
| <b>2. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.69     | 5.69     | 5.70     | 5.69    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>3. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.65     | 5.65     | 5.65     | 5.65    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>4. t<sub>0</sub> dilué + 1h</b>      | 5.63     | 5.63     | 5.64     | 5.63    | 0.01       | 0.10% | 5.47    | 0.32       | 5.85% |
| <b>5. t<sub>0</sub> dilué + 1h</b>      | 5.72     | 5.72     | 5.73     | 5.72    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>6. t<sub>0</sub> dilué + 1h</b>      | 5.04     | 5.04     | 5.05     | 5.04    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| <b>7. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.70     | 5.70     | 5.70     | 5.70    | 0.00       | 0.00% | 5.74    | 0.04       | 0.74% |
| <b>8. t<sub>0</sub> dilué + 24 h</b>    | 5.73     | 5.74     | 5.74     | 5.74    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>9. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.79     | 5.80     | 5.80     | 5.80    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>10. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.57     | 5.57     | 5.57     | 5.57    | 0.00       | 0.00% | 5.42    | 0.35       | 6.44% |
| <b>11. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.72     | 5.73     | 5.73     | 5.73    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>12. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 4.95     | 4.97     | 4.97     | 4.96    | 0.01       | 0.23% |         |            |       |
| <b>13. t<sub>1sem</sub> dilué + 1h</b>  | 5.34     | 5.35     | 5.35     | 5.35    | 0.01       | 0.11% | 5.44    | 0.30       | 5.55% |
| <b>14. t<sub>1sem</sub> dilué + 1h</b>  | 5.82     | 5.82     | 5.82     | 5.82    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>15. t<sub>1sem</sub> dilué + 1h</b>  | 5.14     | 5.14     | 5.14     | 5.14    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>16. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.38     | 5.39     | 5.39     | 5.39    | 0.01       | 0.11% | 5.56    | 0.17       | 3.14% |
| <b>17. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.52     | 5.52     | 5.52     | 5.52    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>18. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.78     | 5.78     | 5.79     | 5.78    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>19. t<sub>4sem</sub> dilué</b>       | 5.78     | 5.8      | 5.81     | 5.80    | 0.02       | 0.26% | 5.81    | 0.01       | 0.22% |
| <b>20. t<sub>4sem</sub> dilué</b>       | 5.82     | 5.82     | 5.82     | 5.82    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>21. t<sub>4sem</sub> dilué</b>       | 5.81     | 5.81     | 5.81     | 5.81    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |

| Echantillons                      | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.54     | 5.54     | 5.54     | 5.54    | 0.00       | 0.00% | 5.66    | 0.10       | 1.84% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.78     | 5.78     | 5.78     | 5.78    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.67     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.83     | 5.86     | 5.87     | 5.85    | 0.02       | 0.36% | 5.83    | 0.05       | 0.87% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.86     | 5.86     | 5.87     | 5.86    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.76     | 5.76     | 5.76     | 5.76    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |

Tableau 41 : Osmolarité mesurée sur les échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 100 mL de glucose 10%

| Echantillons                   | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|--------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 1. t <sub>0</sub> dilué        | 943                 | 955      | 953      | 950     | 6          | 0.68% | 939     | 19         | 2.00% |
| 2. t <sub>0</sub> dilué        | 914                 | 914      | 917      | 915     | 2          | 0.19% |         |            |       |
| 3. t <sub>0</sub> dilué        | 958                 | 950      | 951      | 953     | 4          | 0.46% |         |            |       |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h   | 942                 | 950      | 946      | 946     | 4          | 0.42% | 943     | 5          | 0.53% |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h   | 936                 | 938      | 937      | 937     | 1          | 0.11% |         |            |       |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h   | 946                 | 946      | 947      | 946     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h  | 922                 | 922      | 921      | 922     | 1          | 0.06% | 936     | 12         | 1.32% |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24 h | 932                 | 935      | 946      | 938     | 7          | 0.79% |         |            |       |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h  | 946                 | 950      | 950      | 949     | 2          | 0.24% |         |            |       |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué    | 941                 | 947      | 951      | 946     | 5          | 0.53% | 946     | 11         | 1.12% |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué    | 956                 | 958      | 958      | 957     | 1          | 0.12% |         |            |       |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué    | 932                 | 936      | 933      | 934     | 2          | 0.22% |         |            |       |

| Echantillons                      | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 940                 | 939      | 943      | 941     | 2          | 0.22% | 953     | 10         | 1.01% |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 966                 | 958      | 958      | 961     | 5          | 0.48% |         |            |       |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 958                 | 957      | 956      | 957     | 1          | 0.10% |         |            |       |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 954                 | 938      | 933      | 942     | 11         | 1.16% | 941     | 7          | 0.73% |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 932                 | 939      | 942      | 938     | 5          | 0.55% |         |            |       |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 946                 | 945      | 944      | 945     | 1          | 0.11% |         |            |       |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | 957                 | 959      | 960      | 959     | 2          | 0.16% | 962     | 3          | 0.33% |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | 962                 | 963      | 965      | 963     | 2          | 0.16% |         |            |       |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | 967                 | 964      | 964      | 965     | 2          | 0.18% |         |            |       |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 960                 | 962      | 965      | 962     | 3          | 0.26% | 962     | 2          | 0.17% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 963                 | 962      | 960      | 962     | 2          | 0.16% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 960                 | 962      | 962      | 961     | 1          | 0.12% |         |            |       |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 954                 | 958      | 957      | 956     | 2          | 0.22% | 960     | 3          | 0.36% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 961                 | 962      | 959      | 961     | 2          | 0.16% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 964                 | 964      | 963      | 964     | 1          | 0.06% |         |            |       |

Tableau 42 : Comptages particulières effectués sur les échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 100 mL de glucose 10%

| Echantillons                 | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|------------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                              | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 1. t <sub>0</sub> dilué      | 47.0               | 54.5    | 7.5        | 0.0                | 0.1     | 0.1        |
| 2. t <sub>0</sub> dilué      | 62.0               |         |            | 0.1                |         |            |
| 3. t <sub>0</sub> dilué      | 54.5               |         |            | 0.1                |         |            |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h | 46.7               | 38.3    | 7.7        | 0.2                | 0.1     | 0.1        |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h | 36.6               |         |            | 0.1                |         |            |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h | 31.5               |         |            | 0.1                |         |            |



| Echantillons                      | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|-----------------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                                   | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 45.8               | 48.6    | 5.1        | 0.1                | 0.1     | 0.0        |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24 h    | 45.5               |         |            |                    |         |            |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 54.5               |         |            |                    |         |            |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué       | 44.1               | 25.7    | 16.0       | 0.1                | 0.0     | 0.1        |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué       | 16.9               |         |            |                    |         |            |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué       | 16.0               |         |            |                    |         |            |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 25.8               | 32.4    | 14.9       | 0.1                | 0.1     | 0.1        |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 22.0               |         |            |                    |         |            |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 49.5               |         |            |                    |         |            |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 39.2               | 47.8    | 8.5        | 0.2                | 0.2     | 0.1        |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 48.2               |         |            |                    |         |            |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 56.1               |         |            |                    |         |            |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | 78.5               | 75.6    | 3.5        | 0.1                | 0.1     | 0.1        |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | 71.8               |         |            |                    |         |            |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | 76.6               |         |            |                    |         |            |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 60.9               | 70.1    | 11.3       | 0.3                | 0.2     | 0.1        |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 82.7               |         |            |                    |         |            |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 66.6               |         |            |                    |         |            |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 80.0               | 87.1    | 8.0        | 0.5                | 0.5     | 0.2        |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 95.7               |         |            |                    |         |            |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 85.5               |         |            |                    |         |            |

Tableau 43 : Mesure de colorimétrie des échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 100 mL de glucose 10%

| Echantillons                      | Colorimétrie |
|-----------------------------------|--------------|
| 1. t <sub>0</sub> dilué           | < B9         |
| 2. t <sub>0</sub> dilué           | < B9         |
| 3. t <sub>0</sub> dilué           | < B9         |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | B9           |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24 h    | B9           |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | B8           |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué       | < B9         |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué       | < B9         |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué       | < B9         |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | < B9         |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | < B9         |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | < B9         |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | B9           |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | B9           |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | B9           |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | < B8         |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | B9           |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | B9           |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | < B8         |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | B9           |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | B9           |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | B8           |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | B8           |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | B8           |

< B9 signifie "moins coloré que la solution témoin B9"

> B8 signifie "plus coloré que la solution témoin B8"

Sachant que B1 est le plus coloré et B9 le moins coloré, moins coloré que B9 serait incolore.

**Annexe 14 : Résultats obtenus lors des essais de NP sous forme sèche reconstituée dans 25 mL de glucose 10%**

Tableau 44 : pH mesuré sur les échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 25 mL de glucose 10%

| Echantillons                      | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 1. t <sub>0</sub> dilué           | 5.76     | 5.78     | 5.78     | 5.77    | 0.01       | 0.20% | 5.78    | 0.01       | 0.23% |
| 2. t <sub>0</sub> dilué           | 5.78     | 5.78     | 5.78     | 5.78    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 3. t <sub>0</sub> dilué           | 5.80     | 5.80     | 5.80     | 5.80    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | 5.81     | 5.81     | 5.81     | 5.81    | 0.00       | 0.00% | 5.73    | 0.07       | 1.24% |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | 5.72     | 5.72     | 5.72     | 5.72    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | 5.64     | 5.65     | 5.65     | 5.65    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 5.69     | 5.70     | 5.70     | 5.70    | 0.01       | 0.10% | 5.69    | 0.09       | 1.64% |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 5.56     | 5.58     | 5.58     | 5.57    | 0.01       | 0.21% |         |            |       |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 5.78     | 5.79     | 5.79     | 5.79    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué       | 5.82     | 5.83     | 5.83     | 5.83    | 0.01       | 0.10% | 5.79    | 0.03       | 0.44% |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué       | 5.78     | 5.79     | 5.79     | 5.79    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué       | 5.77     | 5.77     | 5.77     | 5.77    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 5.57     | 5.58     | 5.59     | 5.58    | 0.01       | 0.18% | 5.70    | 0.11       | 1.98% |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 5.67     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 5.83     | 5.84     | 5.84     | 5.84    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.80     | 5.80     | 5.80     | 5.80    | 0.00       | 0.00% | 5.79    | 0.02       | 0.39% |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.80     | 5.81     | 5.82     | 5.81    | 0.01       | 0.17% |         |            |       |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.75     | 5.77     | 5.77     | 5.76    | 0.01       | 0.20% |         |            |       |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.89     | 5.89     | 5.89     | 5.89    | 0.00       | 0.00% | 5.85    | 0.03       | 0.59% |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.83     | 5.84     | 5.84     | 5.84    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.81     | 5.81     | 5.82     | 5.81    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |

| Echantillons                      | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.68     | 5.68     | 5.69     | 5.68    | 0.01       | 0.10% | 5.61    | 0.25       | 4.48% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.29     | 5.29     | 5.29     | 5.29    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 5.85     | 5.86     | 5.86     | 5.86    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.69     | 5.69     | 5.70     | 5.69    | 0.01       | 0.10% | 5.74    | 0.09       | 1.55% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.85     | 5.86     | 5.86     | 5.86    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.66     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |

Tableau 45 : Osmolarité mesurée sur les échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 25 mL de glucose 10%

| Echantillons                   | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|--------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 1. t <sub>0</sub> dilué        | 897                 | 886      | 885      | 889     | 7          | 0.75% | 893     | 5          | 0.60% |
| 2. t <sub>0</sub> dilué        | 897                 | 892      | 902      | 897     | 5          | 0.56% |         |            |       |
| 3. t <sub>0</sub> dilué        | 891                 | 894      | 892      | 892     | 2          | 0.17% |         |            |       |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h   | 947                 | 919      | 919      | 928     | 16         | 1.74% | 934     | 11         | 1.13% |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h   | 934                 | 932      | 932      | 933     | 1          | 0.12% |         |            |       |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h   | 932                 | 945      | 946      | 941     | 8          | 0.83% |         |            |       |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h  | 943                 | 940      | 952      | 945     | 6          | 0.66% | 941     | 7          | 0.75% |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24 h | 943                 | 943      | 946      | 944     | 2          | 0.18% |         |            |       |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h  | 932                 | 937      | 929      | 933     | 4          | 0.43% |         |            |       |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué    | 953                 | 955      | 958      | 955     | 3          | 0.26% | 951     | 3          | 0.35% |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué    | 949                 | 948      | 949      | 949     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué    | 949                 | 950      | 952      | 950     | 2          | 0.16% |         |            |       |

| Echantillons                      | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 936                 | 938      | 940      | 938     | 2          | 0.21% | 947     | 9          | 0.96% |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 941                 | 943      | 947      | 944     | 3          | 0.32% |         |            |       |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 958                 | 958      | 958      | 958     | 0          | 0.00% |         |            |       |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 951                 | 950      | 953      | 951     | 2          | 0.16% | 950     | 5          | 0.57% |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 942                 | 950      | 943      | 945     | 4          | 0.46% |         |            |       |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 950                 | 957      | 958      | 955     | 4          | 0.46% |         |            |       |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | 953                 | 955      | 955      | 954     | 1          | 0.12% | 955     | 3          | 0.26% |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | 953                 | 953      | 954      | 953     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | 958                 | 957      | 960      | 958     | 2          | 0.16% |         |            |       |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 953                 | 955      | 955      | 954     | 1          | 0.12% | 955     | 2          | 0.22% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 953                 | 953      | 954      | 953     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 957                 | 957      | 959      | 958     | 1          | 0.12% |         |            |       |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 948                 | 950      | 952      | 950     | 2          | 0.21% | 956     | 5          | 0.48% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 960                 | 959      | 960      | 960     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 957                 | 958      | 959      | 958     | 1          | 0.10% |         |            |       |

Tableau 46 : Comptages particulières effectués sur les échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 25 mL de glucose 10%

| Echantillons            | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|-------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                         | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 1. t <sub>0</sub> dilué | 53.2               | 51.8    | 2.2        | 0.1                | 0.1     | 0.1        |
| 2. t <sub>0</sub> dilué | 52.9               |         |            | 0.1                |         |            |
| 3. t <sub>0</sub> dilué | 49.3               |         |            | 0.0                |         |            |

| Echantillons                      | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|-----------------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                                   | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | 86.4               | 94.0    | 41.8       | 0.3                | 0.4     | 0.2        |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | 56.5               |         |            | 0.2                |         |            |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | 139.1              |         |            | 0.6                |         |            |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 58.1               | 57.7    | 6.1        | 0.1                | 0.1     | 0.0        |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24 h    | 63.6               |         |            | 0.1                |         |            |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 51.5               |         |            | 0.1                |         |            |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué       | 73.3               | 66.3    | 10.4       | 0.3                | 0.3     | 0.1        |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué       | 54.4               |         |            | 0.2                |         |            |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué       | 71.2               |         |            | 0.4                |         |            |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 62.0               | 57.7    | 5.5        | 0.2                | 0.3     | 0.1        |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 59.7               |         |            | 0.2                |         |            |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | 51.5               |         |            | 0.4                |         |            |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 60.5               | 54.7    | 5.0        | 0.4                | 0.3     | 0.1        |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 51.8               |         |            | 0.2                |         |            |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 51.9               |         |            | 0.2                |         |            |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | 82.6               | 93.1    | 11.0       | 0.3                | 0.3     | 0.1        |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | 104.6              |         |            | 0.4                |         |            |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | 92.2               |         |            | 0.3                |         |            |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 140.9              | 98.4    | 36.9       | 1.0                | 0.5     | 0.5        |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 79.4               |         |            | 0.1                |         |            |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | 74.9               |         |            | 0.3                |         |            |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 81.0               | 67.6    | 11.6       | 0.4                | 0.4     | 0.1        |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 61.1               |         |            | 0.3                |         |            |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 60.6               |         |            | 0.4                |         |            |

Tableau 47 : Mesure de colorimétrie des échantillons de NP sous forme sèche reconstitués dans 25 mL de glucose 10%

| Echantillons                      | Colorimétrie |
|-----------------------------------|--------------|
| 1. t <sub>0</sub> dilué           | < B9         |
| 2. t <sub>0</sub> dilué           | < B9         |
| 3. t <sub>0</sub> dilué           | < B9         |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | B9           |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24 h    | B9           |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | B9           |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué       | < B9         |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué       | < B9         |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué       | < B9         |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | < B9         |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | < B9         |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | < B9         |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | < B7         |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | > B7         |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | < B7         |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | B9           |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | >B9          |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | >B9          |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | B9           |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | <B9          |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | >B9          |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | >B8          |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | B8           |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | B8           |

< B9 signifie "moins coloré que la solution témoin B9"

> B8 signifie "plus coloré que la solution témoin B8"

Sachant que B1 est le plus coloré et B9 le moins coloré, moins coloré que B9 serait incolore.

**Annexe 15 : Résultats obtenus lors des essais sur le concentrat à 12% d'acides aminés**

Tableau 48 : pH mesuré sur les échantillons de NP sous forme de concentrat à 12% d'acides aminés

| Echantillons                            | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|---|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| <b>1. t<sub>0</sub></b>                 | 5.71     | 5.72     | 5.72     | 5.72    | 0.01       | 0.10% | 5.71    | 0.01       | 0.12% |
| <b>2. t<sub>0</sub></b>                 | 5.70     | 5.70     | 5.71     | 5.70    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>3. t<sub>0</sub></b>                 | 5.71     | 5.71     | 5.71     | 5.71    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>4. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.48     | 5.48     | 5.48     | 5.48    | 0.00       | 0.00% | 5.47    | 0.01       | 0.10% |
| <b>5. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.47     | 5.47     | 5.48     | 5.47    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| <b>6. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.47     | 5.47     | 5.47     | 5.47    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>7. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.43     | 5.44     | 5.44     | 5.44    | 0.01       | 0.11% | 5.43    | 0.01       | 0.14% |
| <b>8. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.42     | 5.43     | 5.43     | 5.43    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| <b>9. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.42     | 5.42     | 5.43     | 5.42    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| <b>10. t<sub>1sem</sub></b>             | 5.70     | 5.70     | 5.70     | 5.70    | 0.00       | 0.00% | 5.70    | 0.00       | 0.06% |
| <b>11. t<sub>1sem</sub></b>             | 5.70     | 5.70     | 5.70     | 5.70    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>12. t<sub>1sem</sub></b>             | 5.69     | 5.70     | 5.70     | 5.70    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>13. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.53     | 5.53     | 5.54     | 5.53    | 0.01       | 0.10% | 5.53    | 0.00       | 0.06% |
| <b>14. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.53     | 5.53     | 5.53     | 5.53    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>15. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.53     | 5.53     | 5.53     | 5.53    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>16. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.45     | 5.46     | 5.46     | 5.46    | 0.01       | 0.11% | 5.48    | 0.02       | 0.30% |
| <b>17. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.48     | 5.49     | 5.49     | 5.49    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| <b>18. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.49     | 5.49     | 5.49     | 5.49    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>19. t<sub>4sem</sub></b>             | 5.74     | 5.75     | 5.75     | 5.49    | 0.01       | 0.11% | 5.74    | 0.01       | 0.15% |
| <b>20. t<sub>4sem</sub></b>             | 5.73     | 5.73     | 5.73     | 5.48    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| <b>21. t<sub>4sem</sub></b>             | 5.73     | 5.73     | 5.73     | 5.47    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |



| Echantillons                      | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.48     | 5.49     | 5.49     | 5.49    | 0.01       | 0.11% | 5.48    | 0.01       | 0.14% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.47     | 5.48     | 5.48     | 5.48    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.47     | 5.47     | 5.48     | 5.47    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.48     | 5.49     | 5.50     | 5.49    | 0.01       | 0.18% | 5.46    | 0.03       | 0.49% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.46     | 5.47     | 5.47     | 5.47    | 0.01       | 0.11% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.43     | 5.43     | 5.43     | 5.43    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |

Tableau 49 : Osmolarité mesurée sur les échantillons de NP sous forme de concentrat à 12% d'acides aminés

| Echantillons                      | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 4. t <sub>0</sub> dilué           | 1350                | 1354     | 1354     | 1353    | 2          | 0.17% | 1355    | 3          | 0.19% |
| 5. t <sub>0</sub> dilué           | 1352                | 1358     | 1357     | 1356    | 3          | 0.24% |         |            |       |
| 6. t <sub>0</sub> dilué           | 1357                | 1356     | 1356     | 1356    | 1          | 0.04% |         |            |       |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 1347                | 1353     | 1353     | 1351    | 3          | 0.26% | 1354    | 3          | 0.22% |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 1354                | 1354     | 1356     | 1355    | 1          | 0.09% |         |            |       |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 1355                | 1357     | 1357     | 1356    | 1          | 0.09% |         |            |       |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué       | 1345                | 1352     | 1354     | 1350    | 5          | 0.35% | 1355    | 4          | 0.31% |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué       | 1354                | 1356     | 1355     | 1355    | 1          | 0.07% |         |            |       |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué       | 1358                | 1359     | 1358     | 1358    | 1          | 0.04% |         |            |       |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 1349                | 1353     | 1354     | 1352    | 3          | 0.20% | 1355    | 3          | 0.22% |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 1353                | 1356     | 1359     | 1356    | 3          | 0.22% |         |            |       |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 1356                | 1357     | 1357     | 1357    | 1          | 0.04% |         |            |       |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué       | 1348                | 1347     | 1352     | 1349    | 3          | 0.20% | 1352    | 4          | 0.26% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué       | 1349                | 1352     | 1356     | 1352    | 4          | 0.26% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué       | 1350                | 1356     | 1356     | 1354    | 3          | 0.26% |         |            |       |

| Echantillons                      | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 1347                | 1347     | 1351     | 1348    | 2          | 0.17% | 1351    | 2          | 0.18% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 1350                | 1351     | 1352     | 1351    | 1          | 0.07% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 1352                | 1353     | 1354     | 1353    | 1          | 0.07% |         |            |       |

Tableau 50 : Comptages particuliers effectués sur les échantillons de NP sous forme de concentrat à 12% d'acides aminés

| Echantillons                  | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|-------------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                               | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 1. t <sub>0</sub>             | 6.3                | 6.2     | 4.7        | 0.4                | 0.2     | 0.2        |
| 2. t <sub>0</sub>             | 1.5                |         |            |                    |         |            |
| 3. t <sub>0</sub>             | 10.9               |         |            |                    |         |            |
| 4. t <sub>0</sub> dilué       | 1.9                | 5.1     | 3.2        | 0.3                | 0.3     | 0.2        |
| 5. t <sub>0</sub> dilué       | 8.2                |         |            |                    |         |            |
| 6. t <sub>0</sub> dilué       | 5.3                |         |            |                    |         |            |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h | 6.3                | 3.7     | 2.6        | 0.1                | 0.1     | 0.1        |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24h | 3.7                |         |            |                    |         |            |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h | 1.1                |         |            |                    |         |            |
| 10. t <sub>1sem</sub>         | 19.8               | 7.6     | 10.6       | 0.3                | 0.1     | 0.2        |
| 11. t <sub>1sem</sub>         | 0.5                |         |            |                    |         |            |
| 12. t <sub>1sem</sub>         | 2.5                |         |            |                    |         |            |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué   | 2.5                | 2.6     | 0.4        | 0.1                | 0.1     | 0.1        |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué   | 2.3                |         |            |                    |         |            |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué   | 3.1                |         |            |                    |         |            |

| Echantillons                      | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|-----------------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                                   | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 5.1                | 6.2     | 1.1        | 0.1                | 0.3     | 0.3        |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 6.2                |         |            | 0.3                |         |            |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 7.3                |         |            | 0.6                |         |            |
| 19. t <sub>4sem</sub>             | 37.0               | 16.2    | 18.0       | 0.8                | 0.4     | 0.4        |
| 20. t <sub>4sem</sub>             | 6.2                |         |            | 0.2                |         |            |
| 21. t <sub>4sem</sub>             | 5.3                |         |            | 0.1                |         |            |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.0                | 5.6     | 1.0        | 0.1                | 0.1     | 0.2        |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué       | 6.7                |         |            | 0.0                |         |            |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.0                |         |            | 0.3                |         |            |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 2.7                | 7.0     | 3.8        | 0.2                | 0.3     | 0.1        |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 9.9                |         |            | 0.3                |         |            |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 8.3                |         |            | 0.3                |         |            |

Tableau 51 : Mesure de colorimétrie des échantillons de NP sous forme de concentrat à 12% d'acides aminés

| Echantillons                      | Colorimétrie |
|-----------------------------------|--------------|
| 1. t <sub>0</sub>                 | < B9         |
| 2. t <sub>0</sub>                 | < B9         |
| 3. t <sub>0</sub>                 | < B9         |
| 4. t <sub>0</sub> dilué           | B8           |
| 5. t <sub>0</sub> dilué           | B8           |
| 6. t <sub>0</sub> dilué           | B8           |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | > B8         |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | > B8         |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | > B8         |
| 10. t <sub>1sem</sub>             | B9           |
| 11. t <sub>1sem</sub>             | <B9          |
| 12. t <sub>1sem</sub>             | B9           |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué       | B8           |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué       | B8           |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué       | B8           |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | B7           |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | <B7          |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | <B7          |
| 19. t <sub>4sem</sub>             | <B7          |
| 20. t <sub>4sem</sub>             | <B7          |
| 21. t <sub>4sem</sub>             | >B7          |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué       | <B7          |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué       | <B7          |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué       | <B7          |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | >B7          |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | >B7          |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | <B6          |

< B9 signifie "moins coloré que la solution témoin B9"

> B8 signifie "plus coloré que la solution témoin B8"

Sachant que B1 est le plus coloré et B9 le moins coloré, moins coloré que B9 serait incolore.

**Annexe 16 : Résultats obtenus lors des essais sur le concentrat à 24% d'acides aminés**

Tableau 52 : pH mesuré sur les échantillons de NP sous forme de concentrat à 24% d'acides aminés

| Echantillons                            | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|---|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| <b>1. t<sub>0</sub></b>                 | 5.58     | 5.68     | 5.68     | 5.65    | 0.06       | 1.02% | 5.66    | 0.03       | 0.54% |
| <b>2. t<sub>0</sub></b>                 | 5.66     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>3. t<sub>0</sub></b>                 | 5.65     | 5.66     | 5.66     | 5.66    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>4. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.67     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.00       | 0.00% | 5.66    | 0.00       | 0.09% |
| <b>5. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.66     | 5.66     | 5.66     | 5.66    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>6. t<sub>0</sub> dilué</b>           | 5.66     | 5.66     | 5.66     | 5.66    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>7. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.64     | 5.65     | 5.65     | 5.65    | 0.01       | 0.10% | 5.64    | 0.01       | 0.13% |
| <b>8. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.64     | 5.64     | 5.64     | 5.64    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>9. t<sub>0</sub> dilué + 24h</b>     | 5.63     | 5.63     | 5.64     | 5.63    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>10. t<sub>1sem</sub></b>             | 5.68     | 5.68     | 5.68     | 5.68    | 0.00       | 0.00% | 5.67    | 0.01       | 0.20% |
| <b>11. t<sub>1sem</sub></b>             | 5.66     | 5.66     | 5.67     | 5.66    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>12. t<sub>1sem</sub></b>             | 5.65     | 5.66     | 5.66     | 5.66    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>13. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.67     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.00       | 0.00% | 5.66    | 0.01       | 0.09% |
| <b>14. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.66     | 5.66     | 5.67     | 5.66    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>15. t<sub>1sem</sub> dilué</b>       | 5.66     | 5.66     | 5.66     | 5.66    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>16. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.65     | 5.65     | 5.65     | 5.65    | 0.00       | 0.00% | 5.64    | 0.01       | 0.14% |
| <b>17. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.64     | 5.64     | 5.64     | 5.64    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| <b>18. t<sub>1sem</sub> dilué + 24h</b> | 5.63     | 5.63     | 5.64     | 5.63    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>19. t<sub>4sem</sub></b>             | 5.69     | 5.70     | 5.70     | 5.70    | 0.01       | 0.10% | 5.69    | 0.01       | 0.20% |
| <b>20. t<sub>4sem</sub></b>             | 5.68     | 5.69     | 5.69     | 5.69    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| <b>21. t<sub>4sem</sub></b>             | 5.67     | 5.67     | 5.68     | 5.67    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |

| Echantillons                      | pH       |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1 | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.69     | 5.69     | 5.69     | 5.69    | 0.00       | 0.00% | 5.69    | 0.00       | 0.08% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.69     | 5.69     | 5.69     | 5.69    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué       | 5.68     | 5.68     | 5.69     | 5.68    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.65     | 5.66     | 5.66     | 5.66    | 0.01       | 0.10% | 5.66    | 0.01       | 0.13% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.67     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.00       | 0.00% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 5.66     | 5.67     | 5.67     | 5.67    | 0.01       | 0.10% |         |            |       |

Tableau 53 : Osmolarité mesurée sur les échantillons de NP sous forme de concentrat à 24% d'acides aminés

| Echantillons                      | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 4. t <sub>0</sub> dilué           | 897                 | 901      | 901      | 900     | 2          | 0.26% | 903     | 3          | 0.37% |
| 5. t <sub>0</sub> dilué           | 907                 | 906      | 907      | 907     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 6. t <sub>0</sub> dilué           | 904                 | 905      | 903      | 904     | 1          | 0.11% |         |            |       |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 898                 | 900      | 901      | 900     | 2          | 0.17% | 902     | 2          | 0.24% |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 901                 | 903      | 905      | 903     | 2          | 0.22% |         |            |       |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | 903                 | 903      | 904      | 903     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué       | 897                 | 899      | 901      | 899     | 2          | 0.22% | 901     | 2          | 0.24% |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué       | 899                 | 900      | 901      | 900     | 1          | 0.11% |         |            |       |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué       | 903                 | 903      | 903      | 903     | 0          | 0.00% |         |            |       |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 897                 | 902      | 903      | 901     | 3          | 0.36% | 904     | 3          | 0.31% |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 905                 | 904      | 907      | 905     | 2          | 0.17% |         |            |       |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 905                 | 904      | 905      | 905     | 1          | 0.06% |         |            |       |

| Echantillons                      | Osmolarité [mosm/L] |          |          |         |            |       |         |            |       |
|-----------------------------------|---------------------|----------|----------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|
|                                   | Mesure 1            | Mesure 2 | Mesure 3 | Moyenne | Ecart-type | CV    | Moyenne | Ecart-type | CV    |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué       | 896                 | 895      | 894      | 895     | 1          | 0.11% | 896     | 2          | 0.24% |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué       | 895                 | 895      | 896      | 895     | 1          | 0.06% |         |            |       |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué       | 898                 | 898      | 901      | 899     | 2          | 0.19% |         |            |       |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 895                 | 896      | 893      | 895     | 2          | 0.17% | 895     | 3          | 0.34% |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 895                 | 894      | 903      | 897     | 5          | 0.55% |         |            |       |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 893                 | 894      | 894      | 894     | 1          | 0.06% |         |            |       |

Tableau 54 : Comptages particuliers effectués sur les échantillons de NP sous forme de concentrat à 24% d'acides aminés

| Echantillons                  | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|-------------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                               | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 1. t <sub>0</sub>             | 3.8                | 1.9     | 1.6        | 0.0                | 0.0     | 0.0        |
| 2. t <sub>0</sub>             | 1.2                |         |            |                    |         |            |
| 3. t <sub>0</sub>             | 0.8                |         |            |                    |         |            |
| 4. t <sub>0</sub> dilué       | 4.5                | 4.7     | 2.0        | 0.3                | 0.3     | 0.3        |
| 5. t <sub>0</sub> dilué       | 2.8                |         |            |                    |         |            |
| 6. t <sub>0</sub> dilué       | 3.8                |         |            |                    |         |            |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h | 7.3                | 8.0     | 0.6        | 0.5                | 0.6     | 0.5        |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24h | 8.5                |         |            |                    |         |            |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h | 8.3                |         |            |                    |         |            |
| 10. t <sub>1sem</sub>         | 47.5               | 17.7    | 25.8       | 2.2                | 0.7     | 1.3        |
| 11. t <sub>1sem</sub>         | 2.8                |         |            |                    |         |            |
| 12. t <sub>1sem</sub>         | 2.8                |         |            |                    |         |            |

| Echantillons                      | Particules > 10 µm |         |            | Particules > 25 µm |         |            |
|-----------------------------------|--------------------|---------|------------|--------------------|---------|------------|
|                                   | Mesures            | Moyenne | Ecart-type | Mesures            | Moyenne | Ecart-type |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué       | 3.7                | 8.5     | 4.5        | 0.0                | 0.2     | 0.2        |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué       | 12.7               |         |            | 0.3                |         |            |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué       | 9.2                |         |            | 0.3                |         |            |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 6.8                | 5.7     | 2.1        | 0.8                | 0.5     | 0.3        |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 7.0                |         |            | 0.5                |         |            |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | 3.3                |         |            | 0.3                |         |            |
| 19. t <sub>4sem</sub>             | 4.7                | 7.4     | 2.3        | 0.0                | 0.1     | 0.1        |
| 20. t <sub>4sem</sub>             | 8.7                |         |            | 0.0                |         |            |
| 21. t <sub>4sem</sub>             | 8.7                |         |            | 0.2                |         |            |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué       | 6.0                | 7.9     | 3.3        | 0.0                | 0.2     | 0.2        |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué       | 6.0                |         |            | 0.2                |         |            |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué       | 11.7               |         |            | 0.3                |         |            |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 9.8                | 12.0    | 2.7        | 0.2                | 0.2     | 0.1        |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 11.2               |         |            | 0.2                |         |            |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | 15.0               |         |            | 0.3                |         |            |



Tableau 55: Mesure de colorimétrie des échantillons de NP sous forme de concentrat à 24% d'acides aminés

| Echantillons                      | Colorimétrie |
|-----------------------------------|--------------|
| 1. t <sub>0</sub> dilué           | > B8         |
| 2. t <sub>0</sub> dilué           | B8           |
| 3. t <sub>0</sub> dilué           | < B8         |
| 4. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 5. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | B9           |
| 6. t <sub>0</sub> dilué + 1h      | < B9         |
| 7. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | B9           |
| 8. t <sub>0</sub> dilué + 24 h    | B9           |
| 9. t <sub>0</sub> dilué + 24h     | B9           |
| 10. t <sub>1sem</sub> dilué       | <B6          |
| 11. t <sub>1sem</sub> dilué       | <B6          |
| 12. t <sub>1sem</sub> dilué       | <B6          |
| 13. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | >B8          |
| 14. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | B8           |
| 15. t <sub>1sem</sub> dilué + 1h  | B8           |
| 16. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | <B7          |
| 17. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | <B7          |
| 18. t <sub>1sem</sub> dilué + 24h | >B8          |
| 19. t <sub>4sem</sub> dilué       | <B3          |
| 20. t <sub>4sem</sub> dilué       | <B3          |
| 21. t <sub>4sem</sub> dilué       | <B3          |
| 22. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | >B6          |
| 23. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | >B6          |
| 24. t <sub>4sem</sub> dilué + 1h  | <B6          |
| 25. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | >B6          |
| 26. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | >B6          |
| 27. t <sub>4sem</sub> dilué + 24h | >B6          |

< B9 signifie "moins coloré que la solution témoin B9"

> B8 signifie "plus coloré que la solution témoin B8"

Sachant que B1 est le plus coloré et B9 le moins coloré, moins coloré que B9 serait incolore.

**Annexe 17 : Estimation du prix de la NP sous forme de poudre à reconstituer dans 100 mL de glucose**

Tableau 56 : Prix des composants de la NP sous forme sèche

| Composants                       | Concentration [g/L] | Prix Ph.Eur. en €<br>(*) | Prix Ph.Eur. en CHF<br>(taux de change le<br>25.05.2012 :<br>1€= 1.23 CHF) | Quantités<br>correspondantes [g] | Coût par rapport à<br>la formulation |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|
| Taurine                          | 0.036               | 13.60                    | 16.73  | 50                               | 0.01                                 |
| Acétylcystéine corresp.          | 1.755               | 18.20                    | 22.39  | 100                              | 0.39                                 |
| L-tryptophane                    | 0.446               | 43.10                    | 53.01  | 100                              | 0.24                                 |
| Acide L-malique                  | 0.786               | 87.00                    | 107.01   | 500                              | 0.17                                 |
| L-méthionine                     | 0.936               | 12.30                    | 15.13  | 100                              | 0.14                                 |
| L-phénylalanine                  | 1.125               | 13.90                    | 17.10  | 100                              | 0.19                                 |
| Acide aminoacétique (glycine)    | 1.245               | 3.75                     | 4.61   | 100                              | 0.06                                 |
| L-thréonine                      | 1.607               | 17.10                    | 21.03  | 100                              | 0.34                                 |
| L-histidine                      | 1.428               | 28.90                    | 35.55  | 100                              | 0.51                                 |
| N-acétyl-L-tyrosine corresp.     | 1.554               |                          | 60.30 (**)   | 10                               | 9.37                                 |
| Arginine                         | 2.250               | 20.30                    | 24.97  | 250                              | 0.22                                 |
| L-sérine                         | 2.301               | 23.50                    | 28.91  | 100                              | 0.67                                 |
| L-isolectine                     | 1.339               | 26.20                    | 32.23  | 100                              | 0.43                                 |
| L-valine                         | 2.700               | 22.70                    | 27.92  | 250                              | 0.30                                 |
| L-alanine                        | 2.790               | 92.50                    | 113.78   | 1000                             | 0.32                                 |
| L-proline                        | 2.913               | 52.50                    | 64.58  | 250                              | 0.75                                 |
| Monoacétate de L-lysine corresp. | 6.303               |                          | 20.45 (***)  | 1000                             | 0.13                                 |
| L-leucine                        | 1.071               | 23.50                    | 28.91  | 250                              | 0.12                                 |

| Composants                         | Concentration [g/L] | Prix Ph.Eur. en €<br>(*) | Prix Ph.Eur. en CHF<br>(taux de change le<br>25.05.2012 :<br>1€= 1.23 CHF) | Quantités<br>correspondantes [g] | Coût par rapport à<br>la formulation en<br>CHF |
|------------------------------------|---------------------|--------------------------|--|----------------------------------|--|
| <b>Chlorure de sodium (NaCl)</b>   | 1.169               |                          | 25.90 [50]   | 1000                             | 0.03   |
| <b>Chlorure de potassium (KCl)</b> | 0.746               |                          | 43.30 [50]   | 1000                             | 0.03   |
| <b>Glycérophosphate de calcium</b> | 1.891               | 22.10                    | 22.10  | 250                              | 0.17   |
| <b>Somme</b>                       |                     |                          |  |                                  | <b>14.59</b>                                   |

(\*) Prix Fagron 2009 (\*\*) Prix Fluka 2003-2004 ; (\*\*\*) Prix fourni par B.Braun

Exemple de calcul : Taurine

Prix pour 50 g = 13.60 € = 13.60 · 1.23 = 16.73 CHF

Quantité de taurine dans la formulation : 0.036 g pour 1L de NP

Coût par rapport à la formulation : 50 g de taurine → 16.73 CHF

0.036 g de taurine → x CHF

$$x = \frac{0.036 \cdot 16.73}{50} = 0.01 \text{ CHF}$$

La somme de 14.59 CHF correspond au prix des composants pour 10 NP sous forme sèche à reconstituer dans 100 mL.

Prix des composants pour une NP sous forme sèche = 1.46 CHF

Tableau 57 : Prix du contenant de la formulation de NP sous forme sèche

| Contenant  | Prix en CHF (*) |
|--|-----------------|
| Bouteille perfusion DIN léger type 1 100 mL      | 0.505           |
| Bouchon perfusion p/bouteille DIN légère-rouge   | 0.192           |
| Capsule alu jaune 32 mm arrachable Flip Cap NW32 | 0.172           |
| <b>Somme</b>                                     | <b>0.869</b>    |

(\*) Prix du fournisseur des HUG

Prix total estimé de la NP sous forme sèche à reconstituer dans 100 mL de glucose :

$$\text{Prix} = 1.46 + 0.869 = \underline{\underline{2.33 \text{ CHF}}}$$