

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

CONTRÔLES ET ESSAIS REALISES DANS UNE INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

Durée : 3 H 30

BIOCHIMIE**(70 points)**

On se propose de vérifier la composition d'un sirop pharmaceutique utilisé comme traitement d'appoint des états congestifs de l'oropharynx.

L'étiquette porte les mentions suivantes :

- pholcodine ;
- excipients : saccharose (3,2 g / cuillère à café), parahydroxybenzoate de méthyle sodé, parahydroxybenzoate de propyle sodé, glycérol, éthanol, huile essentielle soluble de mandarine S 164, acide citrique monohydraté qsp pH 6,5 , eau.
- pourcentage volumique alcoolique : 5 % (V/V)

Donnée : une cuillère à café correspond à un volume de 5 mL.

L'analyse portera sur les points suivants :

- dosage du saccharose par méthode colorimétrique au DNS ;
- dosage du glycérol par méthode UV ;
- dosage de l'éthanol par oxydation nitrochromique.

1 - Dosage du saccharose par la méthode au dinitrosalicylate (DNS). (27 points)

Les glucides réducteurs peuvent être dosés grâce à leurs propriétés réductrices, en milieu alcalin et à chaud, vis-à-vis de l'acide 3-5 dinitrosalicylique (3-5 DNS). La réaction est non stoechiométrique. Le 3-5 DNS jaune est réduit en acide-3-amino-5 nitrosalicylique orangé-rouge, dosable par colorimétrie à 530 nm.

Le saccharose du sirop a été au préalable soumis à une hydrolyse enzymatique en présence de β -fructosidase, entraînant une dilution au 1/500.

On dispose du sirop hydrolysé.

1.1 - Matériel, réactifs :

- « Sirop hydrolysé » : 5 mL
- Solution de glucides réducteurs (glucose à 5 mmol.L⁻¹ et fructose à 5 mmol.L⁻¹) étiquetée « glucose + fructose » : 10 mL
- Réactif au 3-5 DNS : 30 mL
- Tubes à essais : 9
- Coton cardé ou papier aluminium
- Cuves de spectrophotomètre
- Chronomètre

1.2 - Protocole opératoire.**1.2.1 - Etalonnage.**

A partir de la solution de « glucose + fructose », réaliser en tubes à essais 7 étalons (dont le blanc réactif) selon les indications suivantes :

- solution de « glucose + fructose » : x mL (x compris entre 0 et 1,5 mL) ;
- H₂O : (3 - x) mL ;
- réactif au 3-5 DNS : 2 mL.

Boucher les tubes avec du coton cardé ou du papier aluminium.

Les porter au bain-marie bouillant pendant exactement 5 minutes ; refroidir dans un bain d'eau froide.

Ajouter dans chaque tube 15 mL d'eau déminéralisée.

Laisser reposer au moins 10 minutes.

Lire l'absorbance à 530 nm contre le blanc réactif.

Remarque : la coloration est stable plusieurs heures.

1.2.2 - Dosage du sirop hydrolysé (2 essais).

Opérer comme pour l'étalonnage, sur une prise d'essai de 1 mL de « sirop hydrolysé ».

1.3 - Résultats et compte rendu.

Remplir le tableau de colorimétrie (feuille de résultats).

Tracer sur ordinateur la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre. Valider les valeurs expérimentales.

Donner l'équation de la droite de régression et son coefficient de corrélation.

Calculer la concentration massique (en g.L⁻¹) de saccharose dans le sirop.

Comparer avec le résultat attendu. Conclure.

Données :

- Coefficient de variation du dosage : 2 %.
- M_{saccharose} = 342 g.mol⁻¹

2 - Dosage du glycérol par méthode UV. (18 points)**2.1 - Matériel, réactifs.**

- « Sirop » : 0,3 mL
- Solution 1 : 3,5 mL
- Suspension 2 : 40 µL
- Suspension 3 : 40 µL
- Eau déminéralisée
- Cuves de spectrophotomètre
- P 1000, P100, P20, P5000 + cônes
- Bécher de 25 mL

2.2 - Protocole opératoire.

Réaliser un témoin et deux essais à l'aide de la fiche technique donnée en **annexe 1**.

2.3 - Résultats.

Remplir le tableau (feuille de résultats).

Calculer la concentration molaire puis la concentration massique en glycérol du sirop.

Données :

- M_{glycérol} = 92 g.mol⁻¹
- Coefficient de variation du dosage : 3 %
- ε_{NADH} à 340 nm = 6,3 x 10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹
- Variation d'absorbance corrigée : ΔA = ΔA_{essai} - ΔA_{témoin}

3 - Dosage de l'éthanol par oxydation nitrochromique. (25 points)

La manipulation se déroule en deux temps :

- distillation de l'éthanol : il s'agit d'une distillation simple, sous pression atmosphérique, qui a pour but d'éliminer des molécules qui pourraient interférer dans le dosage ;
- dosage de l'éthanol du distillat : l'éthanol du distillat est oxydé par un excès de dichromate de potassium en milieu acide. Le dichromate en excès est dosé par iodométrie.

Le résultat est exprimé en pourcentage volumique alcoolique (volume d'alcool pour 100 mL de sirop).

La distillation a été réalisée au préalable. A partir de 10 mL de sirop, on a recueilli le distillat dans une fiole jaugée de 100 mL ajustée au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée.

3.1 - Matériel, réactifs.

- « Distillat » : 6 mL
- Solution nitrochromique à $0,0250 \text{ mol.L}^{-1}$: 60 mL ; distributeur sous hotte
- Solution d'iodure de potassium à 100 g.L^{-1} : 100 mL
- Solution titrée de thiosulfate de sodium : 100 mL (concentration molaire volumique donnée en début d'épreuve)
- Thiodène en solution
- Eau déminéralisée bouillie refroidie (en pissette)
- 4 fioles d'Erlenmeyer bouchant émeri de 250 mL avec bouchons correspondants
- 1 pipette jaugée de 2 mL
- 1 pipette jaugée de 10 mL
- 2 éprouvettes (25 et 100 mL)
- 1 burette de 25 mL

3.2 - Protocole opératoire.**Dosage de l'éthanol du distillat (2 essais)**

Dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant émeri de 250 mL, introduire :

- E = 2 mL de distillat,
- 10 mL de solution nitrochromique.

Boucher. Agiter doucement et laisser reposer 20 à 30 minutes à l'obscurité.

Ajouter successivement dans la fiole :

- environ 100 mL d'eau déminéralisée bouillie et refroidie à l'abri de l'air,
- 20 mL de solution d'iodure de potassium à 100 g.L^{-1} .

Attendre 2 minutes à l'obscurité.

Doser le di-iodé formé par la solution titrée de thiosulfate de sodium.

Réaliser en parallèle à chaque essai un témoin en remplaçant le distillat E par un volume équivalent d'eau déminéralisée bouillie et refroidie à l'abri de l'air.

Remarque : l'indicateur de fin de réaction est le thiodène, ajouté en fin de dosage.

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

3.3 – Résultats. Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Calculer la concentration molaire d'éthanol du distillat.

Etablir la formule littérale donnant le pourcentage volumique alcoolique du sirop.

Faire l'application numérique.

Comparer ce pourcentage à celui donné sur l'étiquette.

Données :

- La concentration molaire d'éthanol du distillat, exprimée en mol.L^{-1} , correspond à :

$$c_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} \frac{(V_T - V_E)}{4E}$$

avec $c_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}}$: concentration molaire volumique du thiosulfate de sodium (mol.L^{-1})

V_T : chute de burette du témoin (mL)

V_E : chute de burette de l'essai (mL)

E : prise d'essai du distillat (mL)

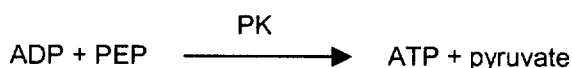
- $M_{\text{éthanol}} = 46,1 \text{ g.mol}^{-1}$
- Masse volumique de l'éthanol = $0,794 \text{ kg.L}^{-1}$
- Coefficient de variation de la manipulation : 2 %

ANNEXE N°1**DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLYCEROL (d'après Roche)****Principe**

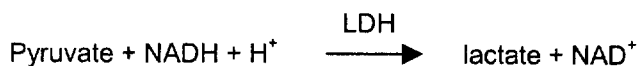
La glycérokinase (GK) catalyse la phosphorylation du glycérol en glycérol-3-phosphate par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) :



L'adénosine-5'-diphosphate (ADP) formé est à nouveau transformé en ATP par le phosphoénolpyruvate (PEP) en présence de pyruvate-kinase (PK) avec formation de pyruvate.



Le pyruvate est réduit en lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) en présence de lactate déshydrogénase (LDH).



La quantité de NAD^+ formé durant la réaction est proportionnelle à la quantité de glycérol. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 334 nm, 340 nm ou 365 nm.

Protocole opératoire

Longueur d'onde : 340 nm

Cuve : 1 cm de trajet optique

Température : 20-25°C

Volume du test = 3,02 mL

Mesurer contre l'air ou contre l'eau.

Témoin

Mélange de réactifs : ATP, PEP, NADH, H^+ (solution 1)	1,00 mL
Eau déminéralisée	2,00 mL
PK et LDH (suspension 2)	0,01 mL
Mélanger. Après environ 5 à 7 minutes, lire l'absorbance de la solution (A1).	
GK (suspension 3)	0,01 mL
Mélanger. Attendre environ 10 minutes et lire l'absorbance de la solution (A2).	

Essai

Le sirop est analysé directement : volume de prise d'essai = 100 μL .

NUMERO DE POSTE :**FEUILLE DE RÉSULTATS**
(À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE)**1 - Dosage du saccharose par la méthode au dinitrosalicylate (DNS).**

Tubes	Blanc réactif	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 6	Essai 1	Essai 2
Solution de « glucose + fructose » (mL)									
« sirop hydrolysé » (mL)									
H ₂ O qsp 3 mL (mL)									
Nombre de moles de glucose + fructose par tube (μmol)									
A _{530 nm}									

2 - Dosage du glycérol par méthode UV.

	Témoin	Essai 1	Essai 2
A _{1 340 nm}			
A _{2 340 nm}			

3 - Dosage de l'éthanol par oxydation nitrochromique.

	Témoin 1	Essai 1	Témoin 2	Essai 2
Volume de thiosulfate de sodium (mL)				

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52

Réalisation pratique d'opérations techniques

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

LES NEUTRALISANTS

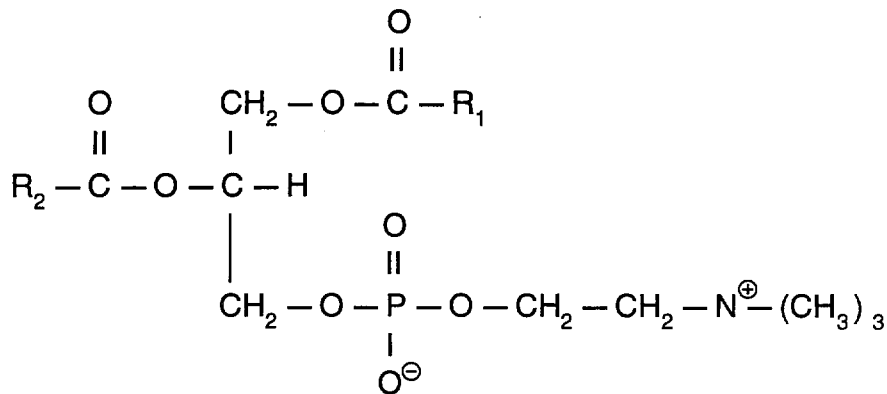
L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

Durée : 4 H

BIOCHIMIE

(80 points)

Les lécithines sont des glycérophospholipides et plus particulièrement des phosphatidylcholines. La formule développée d'une phosphatidylcholine est schématisée ci-dessous.



La lécithine extraite du jaune d'œuf peut être utilisée pour la fabrication de neutralisant ou encore comme émulsifiant. Une hydrolyse partielle de la lécithine réalisée grâce à des lipases peut améliorer la qualité émulsifiante du produit.

La manipulation comprend 3 parties :

- une détermination de la masse molaire de la lécithine par un dosage de phosphate après minéralisation ;
- une mesure de l'indice d'iode pour l'étude d'un acide gras constitutif de la lécithine ;
- une mesure d'activité lipase.

1 - Détermination de la masse molaire de la lécithine. (29 points)

On détermine la masse molaire en dosant les phosphates libres après minéralisation de la lécithine.

En présence d'une solution acide de molybdate d'ammonium (réactif sulfomolybdique), les phosphates forment un complexe qui, réduit par l'hydroquinone et le sulfite de sodium, est intensément coloré en bleu et absorbe à 700 nm.

1.1 - Réactifs.

- Echantillon "minéralisé" : 4 mL
- Solution mère de phosphore à 1 g/ L (soit 4,392 g de KH_2PO_4 /L) : 20 mL
- Réactif sulfomolybdique en distributeur
- Solution de sulfite de sodium en distributeur
- Solution d'hydroquinone en distributeur

1.2 - Protocole.**Gamme d'étalonnage.**

A partir de la solution mère de phosphore à 1g/L, préparer une solution fille permettant de réaliser une gamme d'étalonnage de 6 tubes contenant de 0 à 50 µg de phosphore par tube.

Dans chaque tube verser :

- x mL de solution fille de phosphore avec $x \leq 5$ mL
- (7 - x) mL d'eau déminéralisée
- 2 mL de réactif sulfomolybdique
- 1 mL d'hydroquinone
- 1 mL de sulfite de sodium.

Attendre 30 minutes et lire les absorbances à 700 nm.

Dosage (2 essais).

Réaliser les essais sur un volume d'échantillon « minéralisat » de 1 mL.

1.3 - Compte rendu et résultats.

Justifier la préparation de la solution fille de phosphore.

Dresser le tableau de préparation des tubes de la gamme d'étalonnage.

Compléter le relevé des valeurs expérimentales (feuille de résultats).

Exploiter les résultats à l'aide de l'outil informatique : valider les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression ; donner l'équation de cette droite ainsi que le coefficient de corrélation. Calculer la concentration massique de l'échantillon (« minéralisat ») en phosphore.

Justifier le volume de la prise d'essai d'échantillon sachant qu'on a effectué une minéralisation sulfonitrique de 70 mg de lécithine, que le minéralisat a été ajusté à 100 mL, que la teneur massique en phosphore de la lécithine est d'environ 4 % (m/m).

Déterminer la teneur massique de la lécithine en phosphore (en %).

Calculer la masse molaire de la lécithine.

Données : coefficient de variation de la méthode : 3%
 $M_p = 31$ g/mol

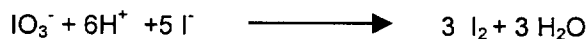
2 - Etude d'un acide gras constitutif de la lécithine. (30 points)

On se propose d'étudier le degré d'insaturation de la préparation de lécithine en mesurant l'indice d'iode des acides gras libres. Les acides gras sont obtenus par action des phospholipases A1 et A2. Le calcul des indices d'acide indique que l'acide gras à radical R_2 a une masse molaire de 282 g/mol.

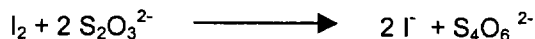
L'indice d'iode est la masse de di-iode en g qui se fixe par addition sur les doubles liaisons de 100 g de substance.

2.1 - Etalonnage de la solution de thiosulfate de sodium de concentration molaire voisine de 0,1 mol/L par pesée d'iodate de potassium (KIO₃).

En milieu acide, l'iodate de potassium oxyde les ions iodures I^- selon la réaction :



Le di-iode libéré est dosé par la solution de thiosulfate suivant la réaction :

**2.1.1 - Réactifs.**

- Iodate de potassium pur : environ 1g
- Solution de KI à 100 g/L
- H₂SO₄ dilué au 1/5
- Thiosulfate de sodium à environ 0,1 mol/L
- Thiodène

2.1.2 - Protocole.**Préparation de la solution étalon d'iodate de potassium.**

Réaliser deux pesées exactes voisines de 0,25 g d'iodate de potassium pur. Dissoudre dans de l'eau déminéralisée et transvaser quantitativement dans deux fioles jaugées de 50 mL. Compléter au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée.

Dosage.

Dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant émeri introduire :

- solution étalon d'iodate : 10 mL
- eau déminéralisée : 10 mL
- solution de KI à 100 g/L : 10 mL
- H₂SO₄ dilué au 1/5 : 5 mL

Boucher, agiter et laisser reposer 5 min.

Doser par la solution de thiosulfate jusqu'à virage à l'incolore.

Indicateur : thiodène à ajouter en fin de dosage.

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

2.2 - Détermination de l'indice d'iode de l'acide gras à radical R₂.

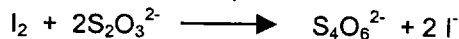
On mesure l'insaturation des acides gras par addition d'un excès connu de réactif à l'iode : ICl. ICl s'additionne sur les doubles liaisons de l'acide gras suivant la réaction :



L'excès d'ICl est transformé en I₂ suivant la réaction :



Le di-iode formé est alors dosé par le thiosulfate de sodium selon la réaction :

**2.2.1 - Réactifs.**

- Acide gras à radical R₂
- Cyclohexane
- Réactif de WIJS (ICl en solution acétique, tétrachlorure de carbone) en distributeur
- Solution de KI à 100 g/L
- Thiodène

2.2.2 - Protocole.

Essai : (2 essais)

Dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant émeri, verser :

- une masse d'acide gras voisine de 0,1 g et pesée précisément ;
- 20 mL de cyclohexane ;
- 10 mL de réactif de WIJS.

Boucher la fiole et porter à l'obscurité 15 minutes.

Ajouter 100 mL d'eau déminéralisée puis 20 mL d'iodure de potassium à 100g/L.

Doser le di-iode par la solution de thiosulfate de sodium préalablement étalonnée.

Indicateur : thiodène à ajouter en fin de dosage.

Témoin : (1 témoin)

Procéder de la même manière sans ajouter l'acide gras.

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

2.3 - Compte rendu et résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Etablir la formule littérale permettant de calculer la concentration molaire de la solution de thiosulfate sachant qu'une mole d'iodate réagit indirectement avec 6 moles de thiosulfate. Effectuer l'application numérique.

Calculer l'indice d'iode de l'acide gras.

En déduire le nombre de doubles liaisons par mole d'acide gras à radical R₂.

Proposer un nom pour cet acide gras.

Données :

coefficient de variation de l'étalonnage : 1%

coefficient de variation pour la détermination de l'indice d'iode : 3%

 $M_{\text{KIO}_3} = 214,1 \text{ g/mol}$ $M_i = 127 \text{ g/mol}$ L'indice d'iode correspond à
$$\frac{C_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} (V_T - V_E) \cdot M_i}{2 \cdot m \cdot 10}$$
avec $C_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}}$: concentration molaire du thiosulfate (mol.L^{-1}) V_T, V_E : chutes de burette, témoin et essai (mL)

m : masse d'acide gras pesée (g)

3 - Détermination de l'activité enzymatique d'une lipase par méthode cinétique. (21 points)

On procède à une mesure d'activité lipase.

Le dosage est réalisé par action de la lipase sur un substrat chromogène dont chaque molécule est hydrolysée en une molécule de produit coloré (chromophore). On suit par mesure de l'absorbance à 570 nm l'apparition du produit coloré. L'intensité de coloration développée est directement proportionnelle à l'activité de la lipase.

3.1 - Réactifs.

- R1 : tampon + activateur (à conserver à l'abri de la lumière) : 2,5 mL
- R2 : substrat chromogène + tampon + activateur (à conserver à l'abri de la lumière) : 1,5 mL
- « étalon lipase » à 2 U/mL : 200 μL
- « essai lipase » : 300 μL

3.2 - Protocole.

Température : 37°C

Longueur d'onde : 570 nm

Trajet optique de la microcuve de spectrophotomètre : 1cm

Lire contre l'air

Réaliser deux essais sur l'« essai lipase » et un essai sur l'« étalon lipase ».

Préincuber les réactifs et les solutions de lipase quelques minutes à 37 °C.

Dans une microcuve, introduire :

- 750 μL de R1 ;
- 450 μL de R2.

Déclencher la réaction par ajout de 100 μL de solution de lipase, puis placer la cuve dans le compartiment thermostaté du spectrophotomètre.

30 secondes après l'ajout de la lipase, relever les absorbances toutes les 15 s pendant 2 minutes.

Remarque : l'utilisation d'un système d'acquisition et d'exploitation des cinétiques enzymatiques est autorisé.**3.3 - Compte rendu et résultats.**

Compléter la feuille de résultats.

Tracer, à l'aide de papier millimétré, les graphes $A(570 \text{ nm}) = f(\text{temps en minutes})$.

Déterminer les variations d'absorbance par minute pour l'étalon et les essais.

En déduire la concentration d'activité catalytique des « essais lipase » en U/mL.

Donnée : coefficient de variation de la méthode : 5%.

NUMERO DE POSTE :
FEUILLE DE RÉSULTATS
(À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE)

1 - Détermination de la masse molaire de la léthicine.

Tubes	1	2	3	4	5	6	E	E
Masse de P par tube (μg)								
A (700 nm)								

2 - Etude d'un acide gras constitutif de la lécithine.

2.1 - Etalonnage de la solution de thiosulfate de sodium de concentration molaire voisine de 0,1 mol/L par pesée d'iodate de potassium (KIO_3).

Essai	1	2
Masse d'iodate pesée (g)		
Volume de thiosulfate versé (mL)		

2.2 - Détermination de l'indice d'iode de l'acide gras à radical R_2 .

	Témoin	Essai 1	Essai 2
Masse d'acide gras pesée (g)			
Volume de thiosulfate versé (mL)			

3 - Détermination de l'activité enzymatique d'une lipase par méthode cinétique.

Temps (s)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
A (570 nm) « Essai lipase » Essai 1									
A (570 nm) « Essai lipase » Essai 2									
A (570 nm) « Etalon lipase »									