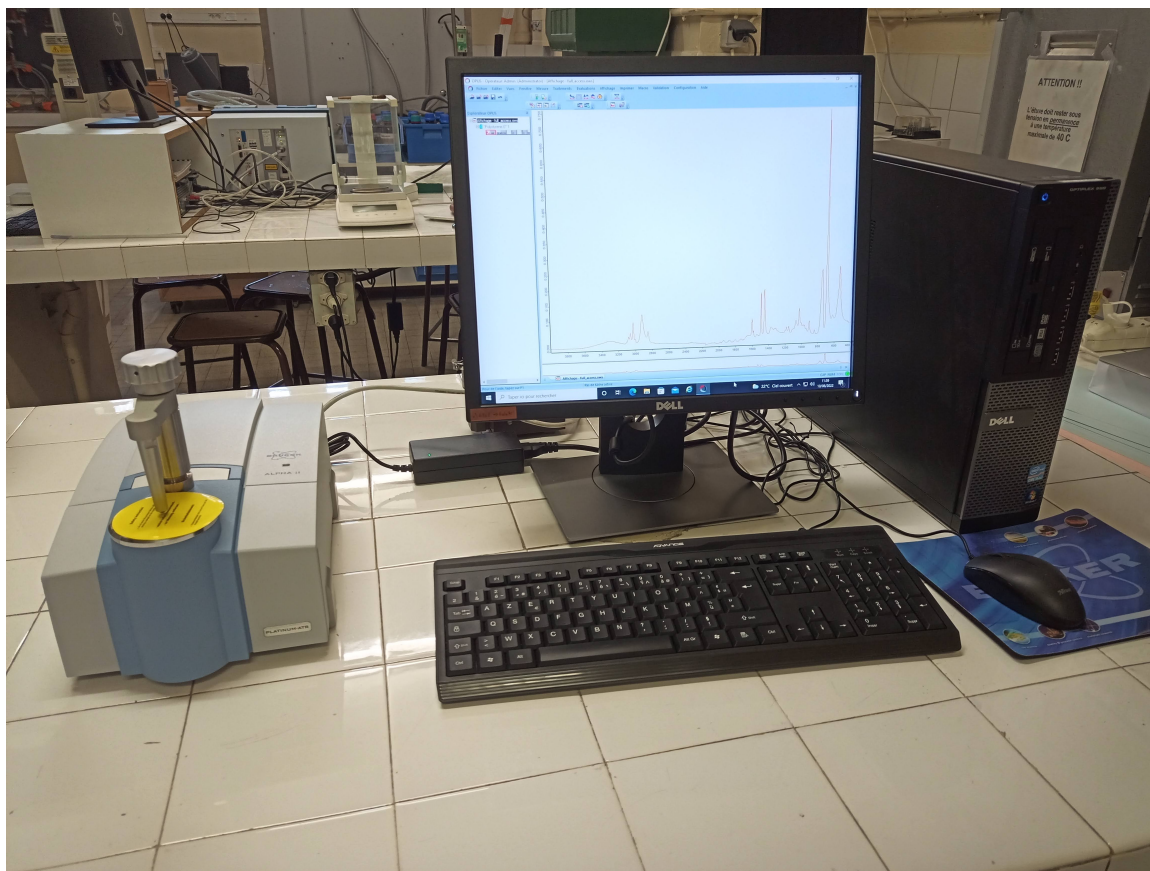


2<sup>ème</sup> année BTS Bioanalyses et Contrôles

# Notice Technique Spectromètre IRTF ALPHA II de Bruker



L. GODIN  
<http://ligodin.free.fr>

[godin.lionel@orange.fr](mailto:godin.lionel@orange.fr)

# TP n°3 : Dosage de la vitamine C dans une spécialité pharmaceutique par spectrophotométrie IRTF

---

<b>1. PRISE EN MAIN DU SPECTROPHOTOMETRE BRUKER ALPHA II</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Obtention de la position et de l'énergie, puis choix de la méthode d'acquisition</b>	<b>2</b>
1.1.1. Obtention de la position et de l'énergie de l'interférogramme	2
1.1.2. Choix de la méthode d'acquisition	5
<b>1.2. Acquisition des spectres</b>	<b>7</b>
1.2.1. Choix de la méthode d'acquisition	7
1.2.2. Acquisition et traitement des spectres	7
<b>2. ANALYSE QUANTITATIVE PAR REFLEXION</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Obtention du spectre moyen</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Obtention de droites d'étalonnage</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Détermination de la concentration de l'étalon de contrôle et de l'inconnue</b>	<b>14</b>
<b>3. ANALYSE QUALITATIVE DE SPECTRES IR PAR REFLEXION</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Acquisition du spectre IR de la vitamine C dans l'eau</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Acquisition du spectre IR de l'eau</b>	<b>17</b>
<b>4. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS</b>	<b>18</b>

# 1. PRISE EN MAIN DU SPECTROMETRE BRUKER ALPHA II AVEC MODULE ATR

## 1.1. Obtention de la position et de l'énergie (les valeurs sont à consigner dans le CL), puis choix de la méthode d'acquisition

### 1.1.1. Obtention de l'énergie

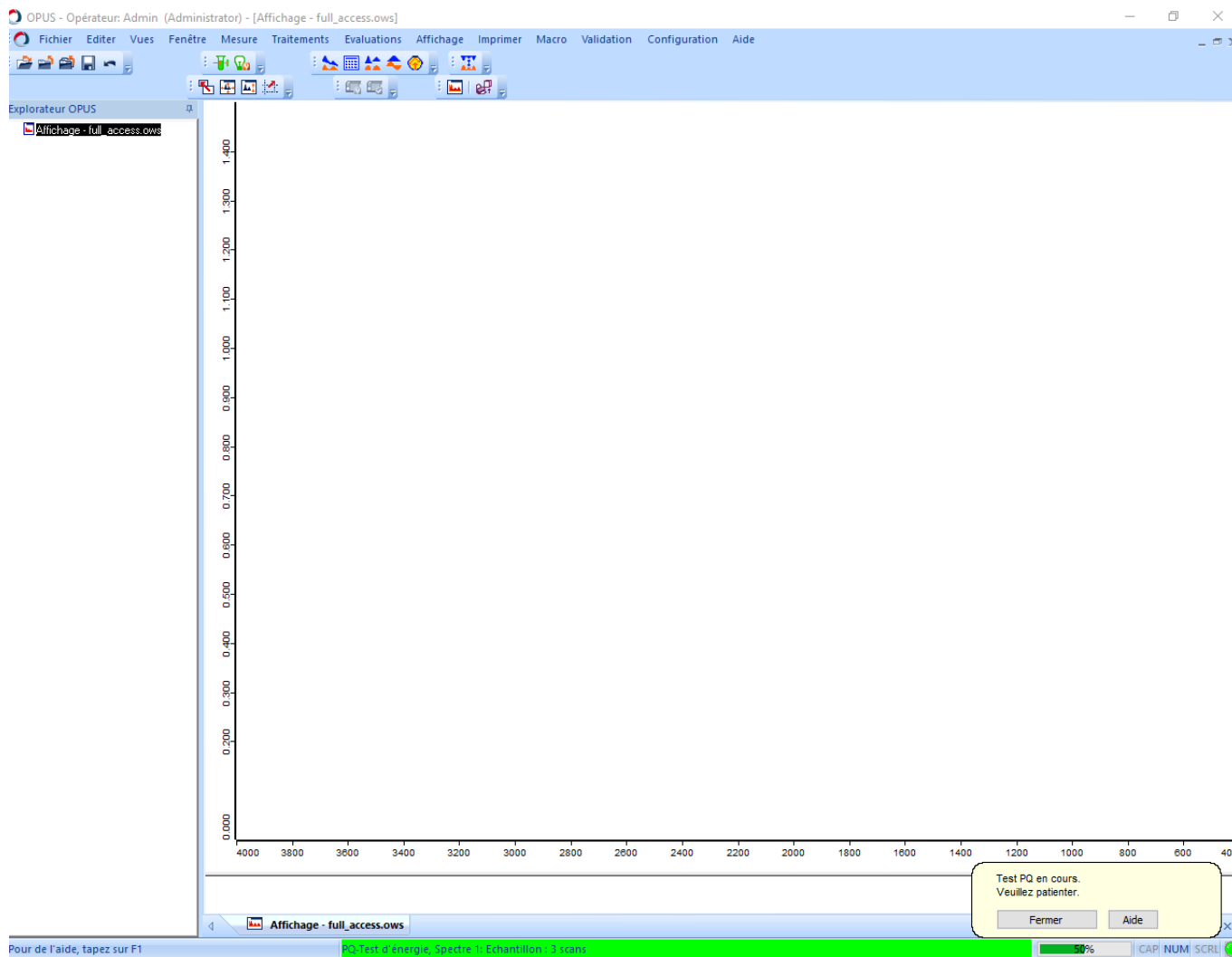
1. Ouverture du logiciel OPUS : double-cliquer sur l'icône du logiciel



Taper le mot de passe (en majuscule) : **OPUS**, puis cliquer sur login :

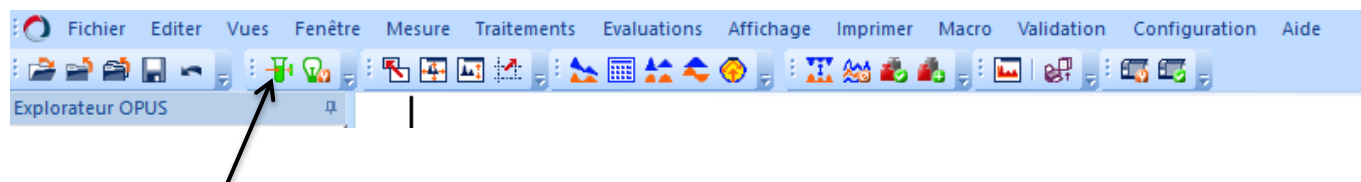
A screenshot of the "Login OPUS" dialog box. It has a title bar with a close button (X). The dialog contains three input fields: "Identifiant Utilisateur:" with a dropdown menu showing "Admin" and "ADMINISTRATOR" below it; "Mot de passe:" with an empty text box; and "Espaces de travail disponibles:" with a dropdown menu showing "ALPHA\_II - full\_access.ows". At the bottom, there are two buttons: "Login" and "Quitter OPUS". A black arrow points from the text above to the "Mot de passe:" field, and another black arrow points from the text above to the "Login" button.

Cliquer sur OK, puis laisser le test PQ se faire !



## 2. Contrôle du spectrophotomètre :

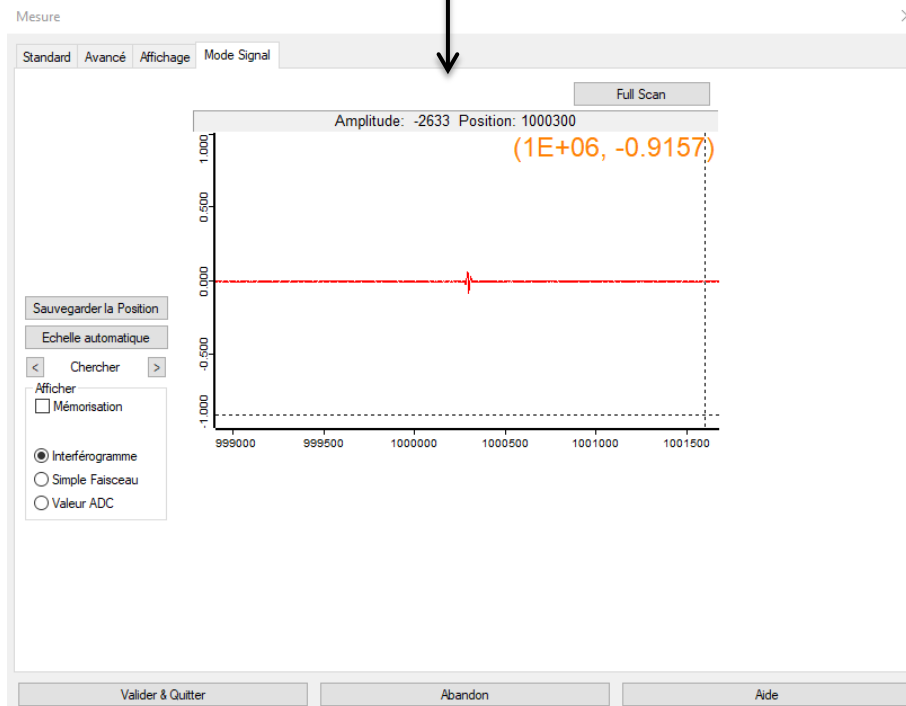
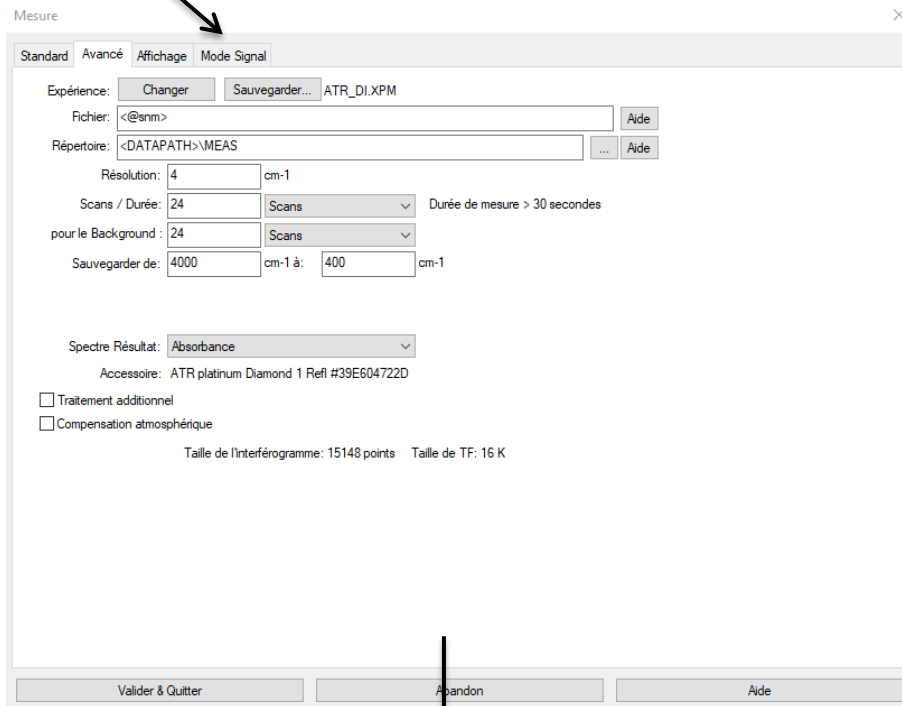
La fenêtre principale apparaît :



Cliquer sur l'éprouvette de mesure pour ouvrir la fenêtre de mesure.

## ☞ Vérification de l'énergie :

Cliquer sur l'onglet : **Mode Signal**, avec le module ATR, l'amplitude doit être de l'ordre de 2600 (lorsque la source IR est neuve). La position doit être d'environ 1300000.



Relever les valeurs obtenues dans le CL.

## 1.1.2. Choix de la méthode d'acquisition

☞ Cliquer sur l'onglet "Avancé" :

Nombre de scan, résolution, zone spectrale, sauvegarde des spectres, dossier de sauvegarde

Mesure

Standard Avancé Affichage Mode Signal

Expérience:   ATR\_DI.XPM

Fichier: <@snm>

Répertoire: <DATAPATH>\MEAS

Résolution: 4 cm-1

Scans / Durée: 24 Scans  Durée de mesure > 30 secondes

pour le Background: 24 Scans

Sauvegarder de: 4000 cm-1 à: 400 cm-1

Spectre Résultat: Absorbance

Accessoire: ATR platinum Diamond 1 Refl #39E604722D

Traitement additionnel

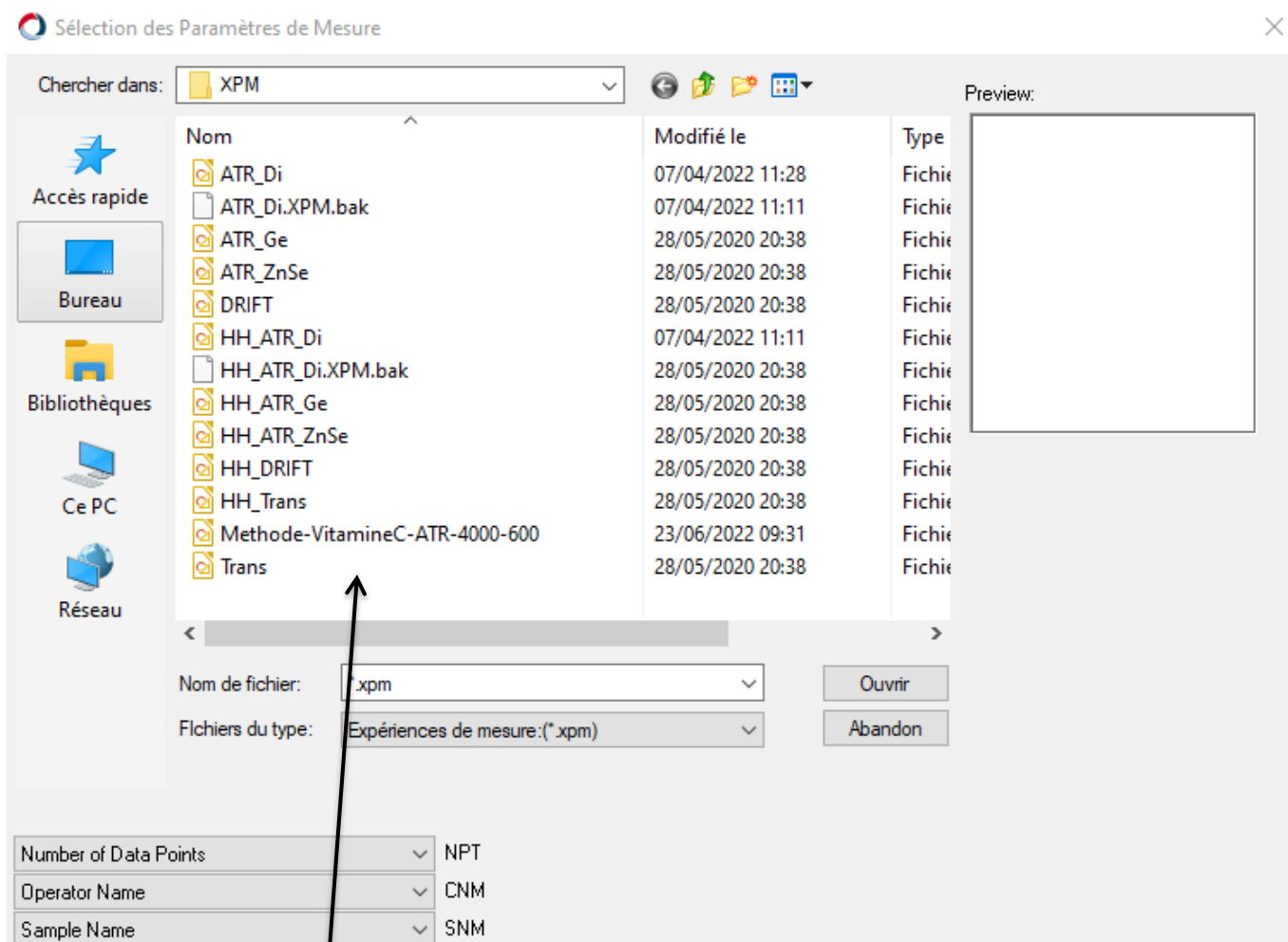
Compensation atmosphérique

Taille de l'interférogramme: 15148 points Taille de TF: 16 K

Dans Expérience : Vérifier que la "*Methode VitamineC-ATR-4000-600*" soit utilisée, si ce n'est pas le cas, il faut aller la charger (cf page suivante, s'il y a lieu).

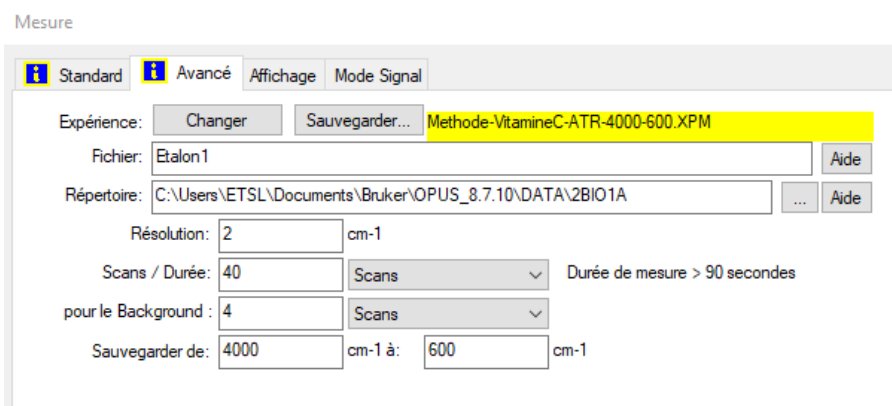
- Q Donner la définition de la résolution spectrale.
- Q Qu'est-ce qu'une fonction d'Apodisation ?
- Q Donner la définition du nombre d'onde.

Pour charger une méthode, cliquer dans **Changer**, la méthode se trouve dans le dossier XPM :



Dans le dossier des expériences Bruker (méthodes), on retrouve la "**Methode VitamineC-ATR-4000-600**" qui doit être utilisée.

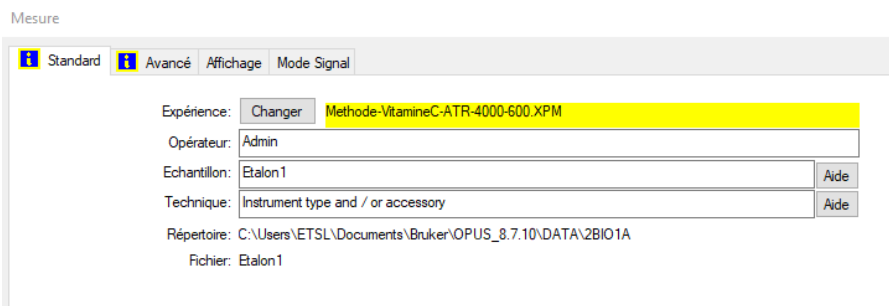
Dans Fichier : indiquer le nom de votre échantillon :



Dans Répertoire, indiquer le dossier dans lequel vos spectres seront enregistrés. Pour cela, suivre le chemin : CePC (C:\Users\ETSL) → Documents → Bruker → OPUS\_8.7.10 → DATA → le dossier de votre groupe.

☞ Cliquer sur l'onglet "Standard" :

Dans Echantillon : indiquer le nom de votre échantillon :



## 1.2. ACQUISITION DES SPECTRES

### 1.2.1. Choix de la méthode d'acquisition

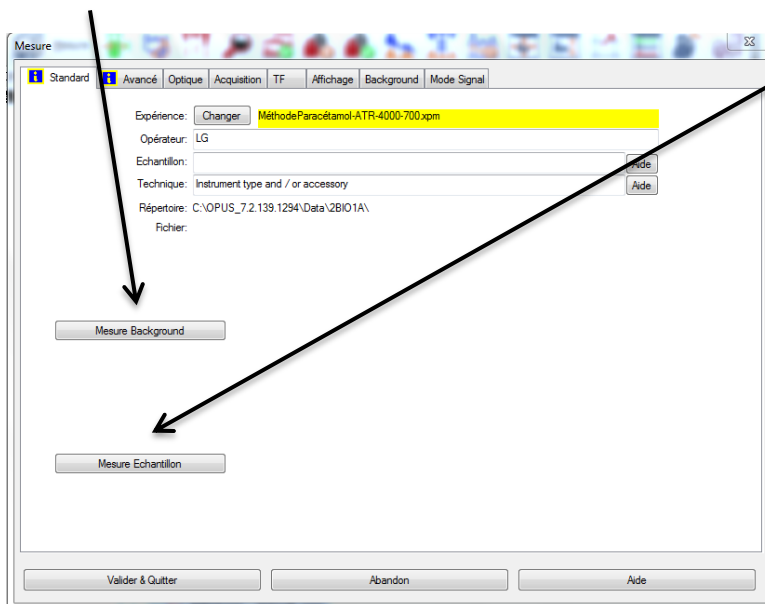
☞ Vous utilisez la méthode intitulée : Méthode-VitamineC-ATR-4000-600.xpm, pour laquelle, Les paramètres de scan sont les suivants :

- **Nombre de Scans : 40**
- **Résolution : 2 cm<sup>-1</sup>**
- **Apodisation : Norton-Bier weak**
- **Range : 4000 - 600 cm<sup>-1</sup>**

### 1.2.2. Acquisition et traitement des spectres

☞ Cliquer sur l'onglet "Standard" :

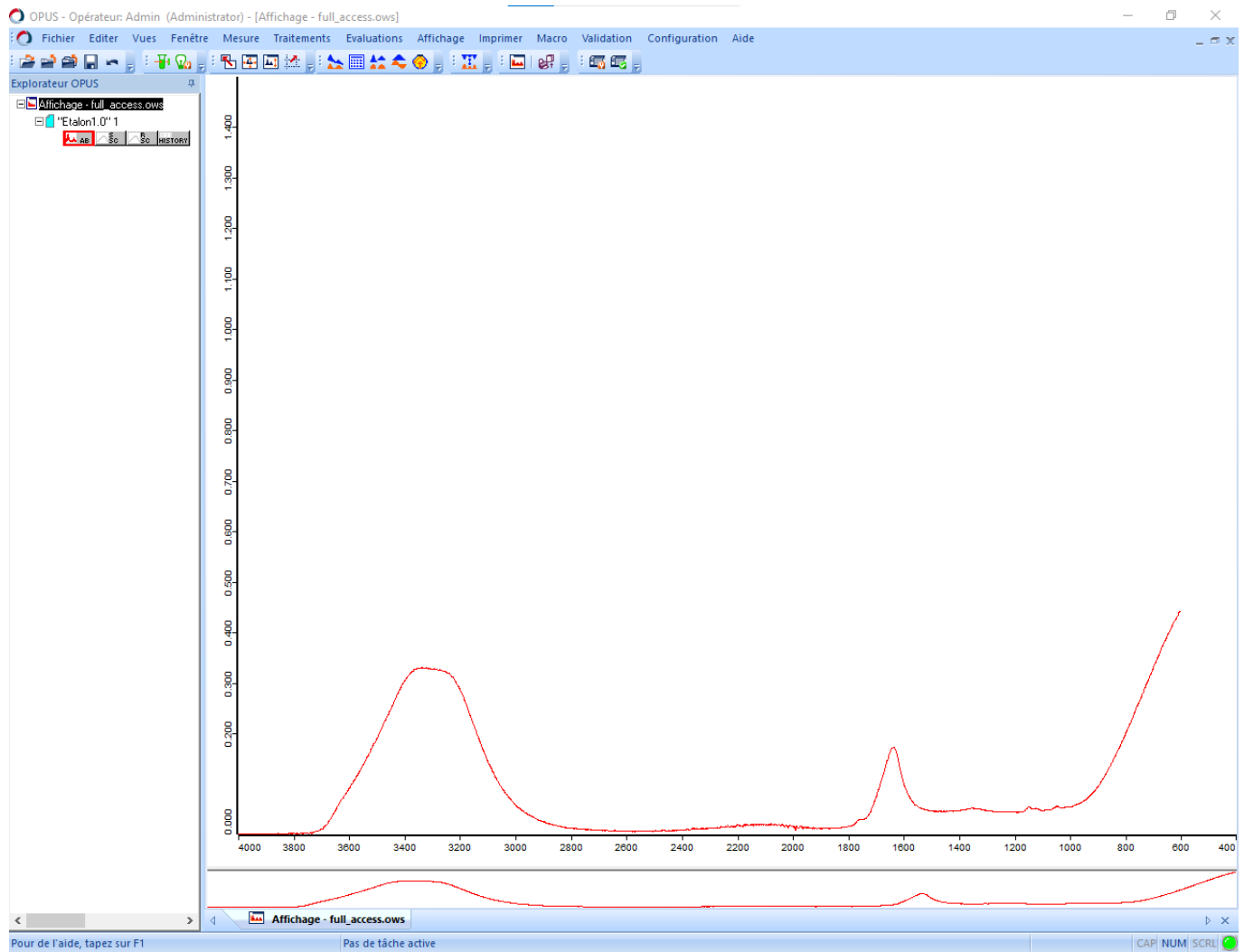
On acquiert d'abord le spectre de référence (pas d'échantillon sur le cristal), puis ensuite celui de l'échantillon :





Remarque : Une seule mesure Background suffit pour le Tp.

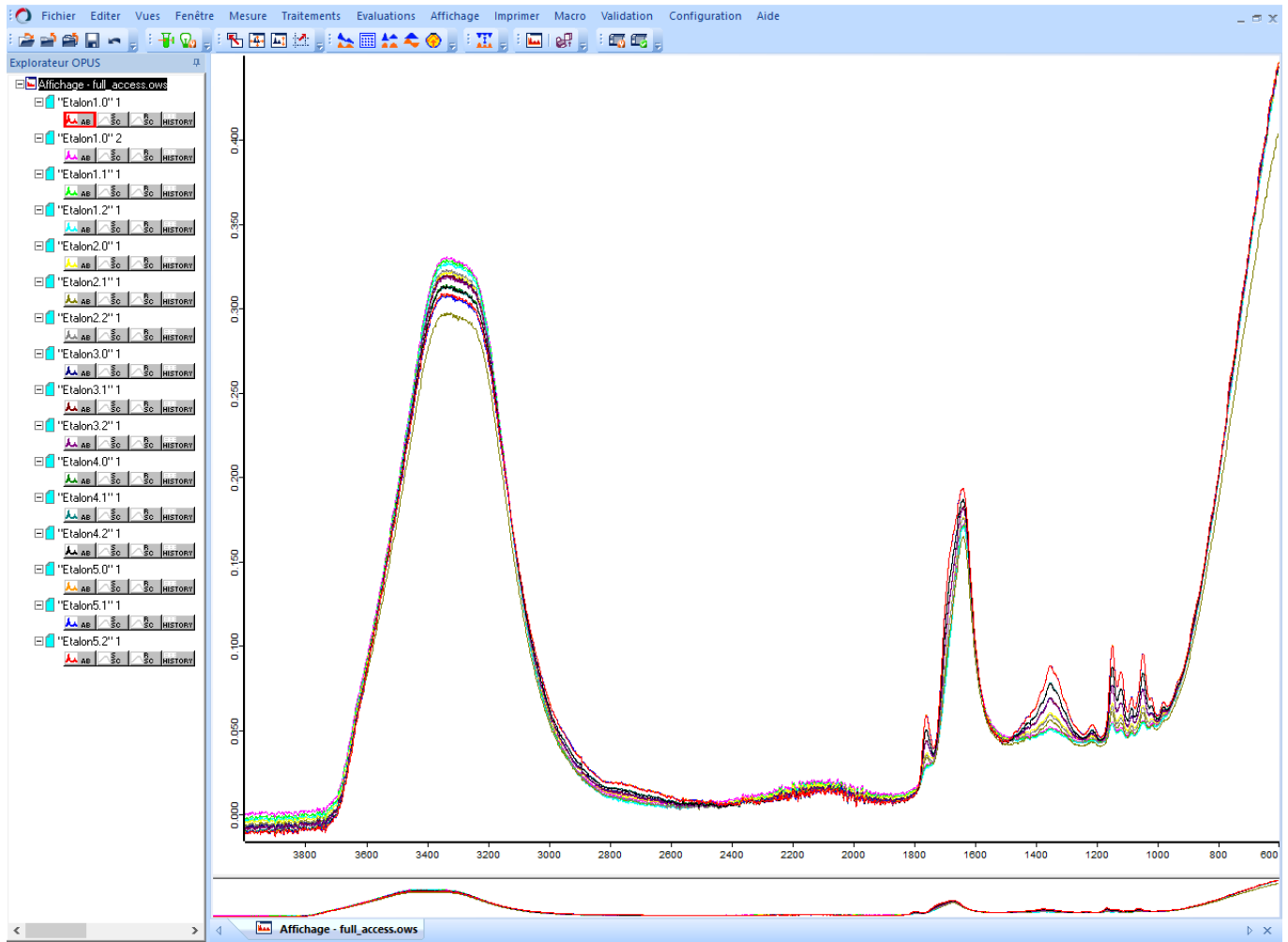
Il faut cliquer sur "*Démarrer la mesure*" (en bas de la fenêtre) pour obtenir le spectre désiré :



Remarque : 1 : pour zoomer sur le spectre : 2 clics droit (1 clic gauche pour sortir du zoom).

Remarque : 2 : En faisant un clic droit dans la fenêtre du spectre, et en cliquant sur Properties, on peut ajuster les valeurs max et min de l'absorbance.

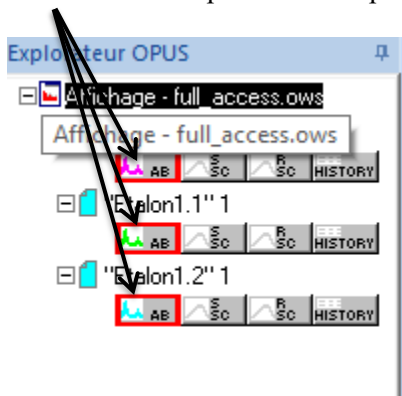
Exemple de spectres étalons (de 1 à 5) superposés en triplicata :



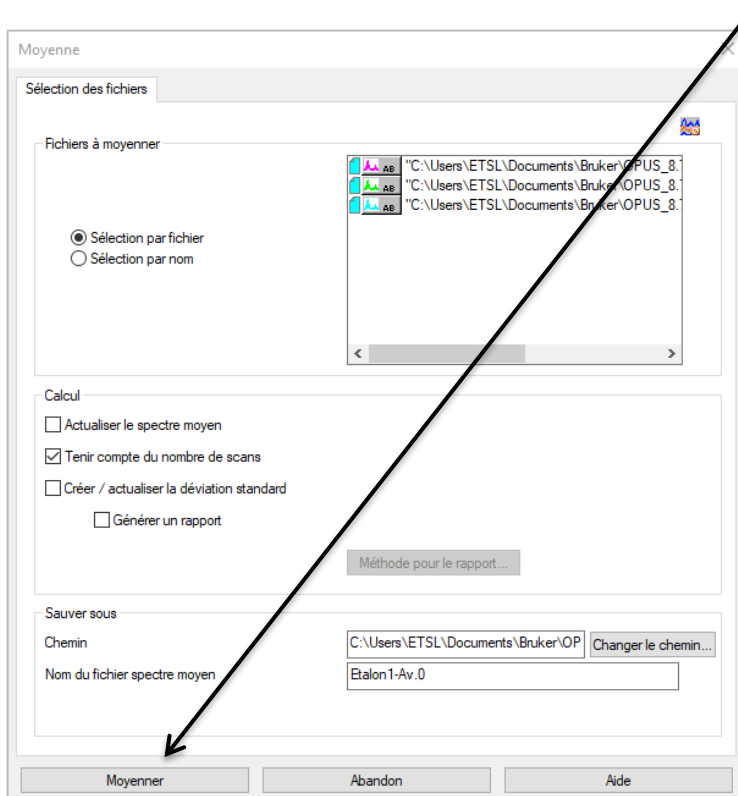
# 2. ANALYSE QUANTITATIVE PAR RÉFLEXION

## 2.1. OBTENTION DU SPECTRE MOYEN

Faire la **moyenne** de chaque étalon en sélectionnant les spectres correspondants (exemple pour l'étalon 1) :

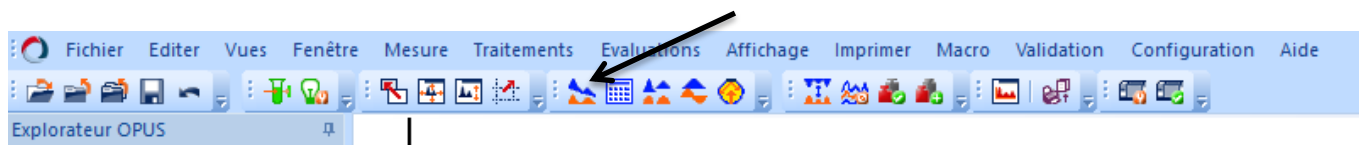


puis en cliquant sur l'icône « Moyenne » . Une fenêtre apparaît. Cliquer sur « Moyenner » :

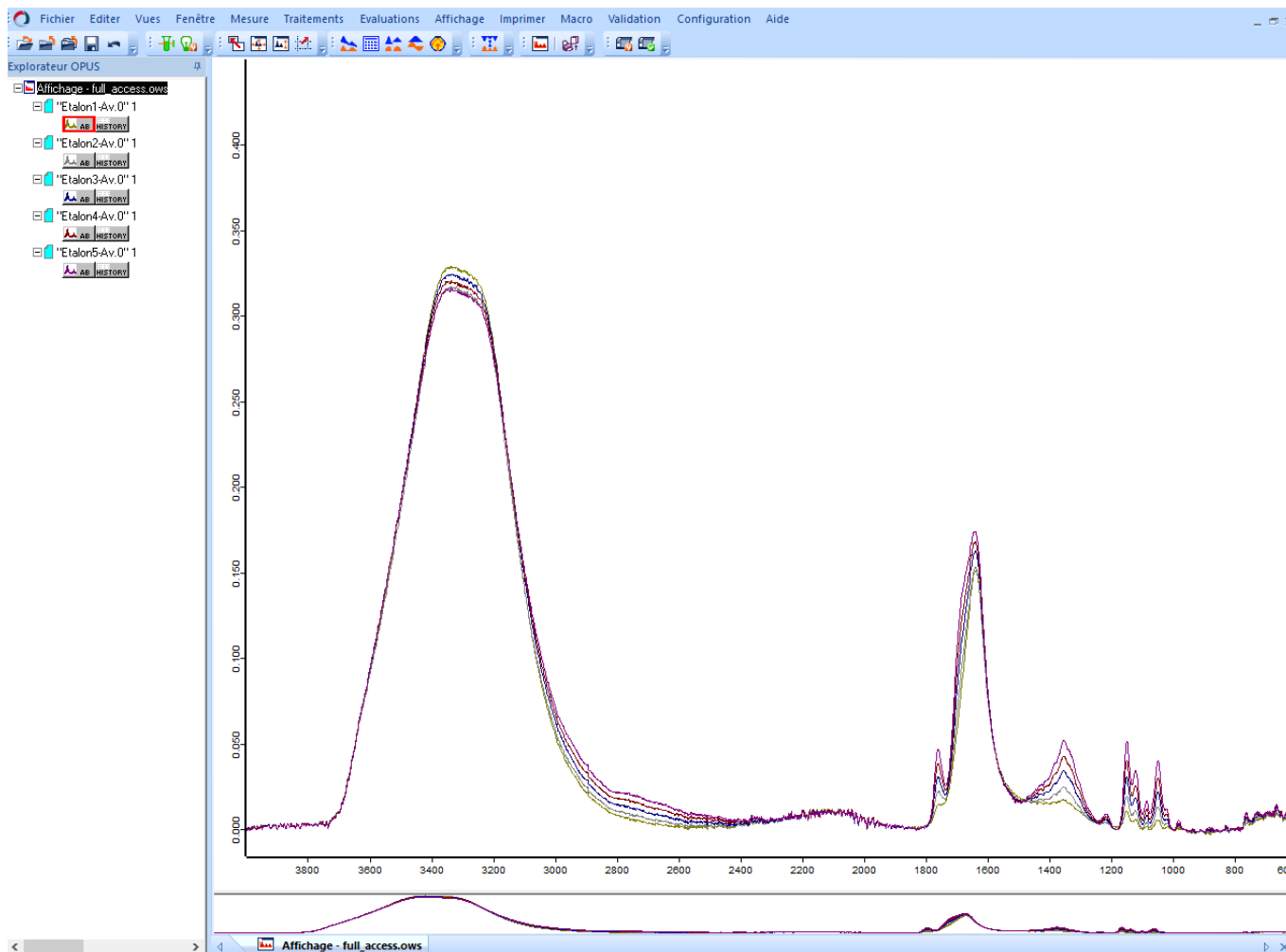


Le spectre moyen apparaît (avec la dénomination **Av**).

Corriger la ligne de base du spectre moyen, en cliquant sur l'icône adéquate, puis dans Fichier, Sauvegarder sous.



Une fois que tous les fichiers étalons sont corrigés, voici le résultat :

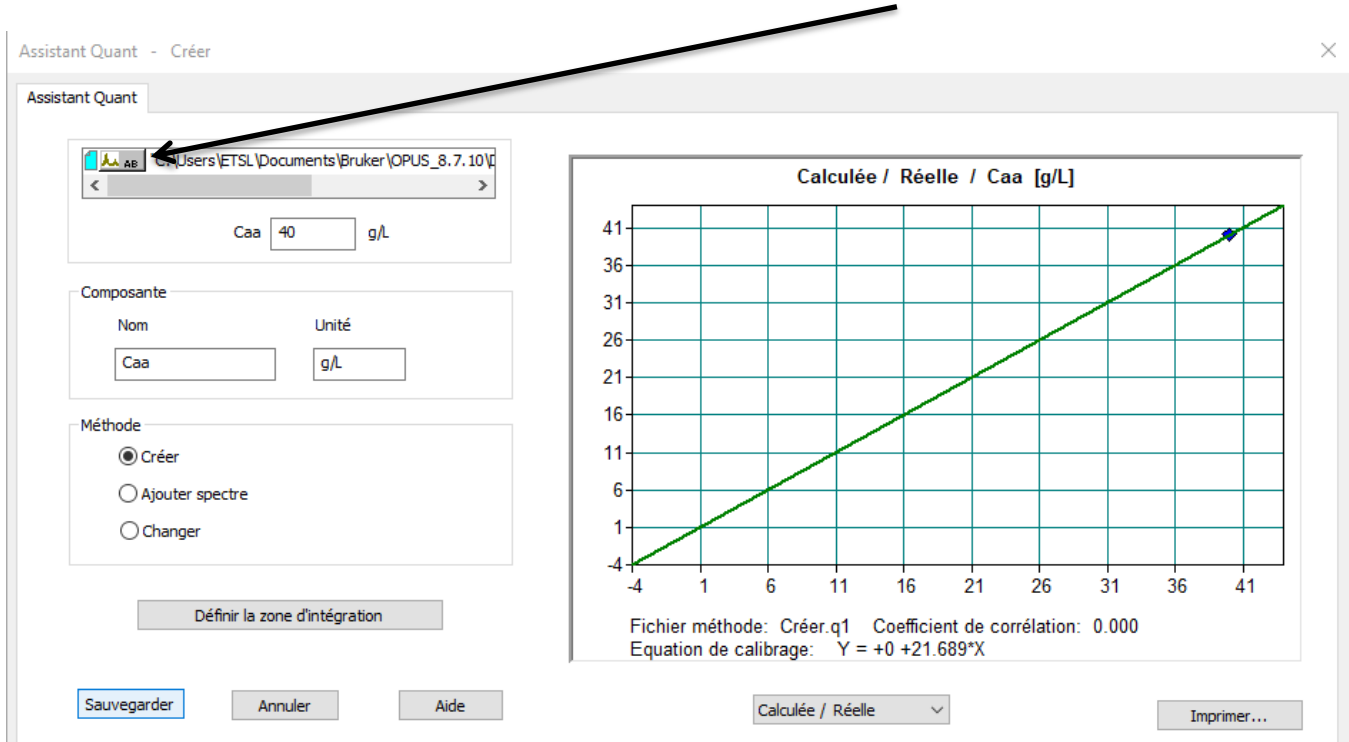


## 2. OBTENTION DE DROITES D'ÉTALONNAGE

Dans la barre des menus : cliquer sur l'icône *Assistant Quant (Concepteur Quant)* :

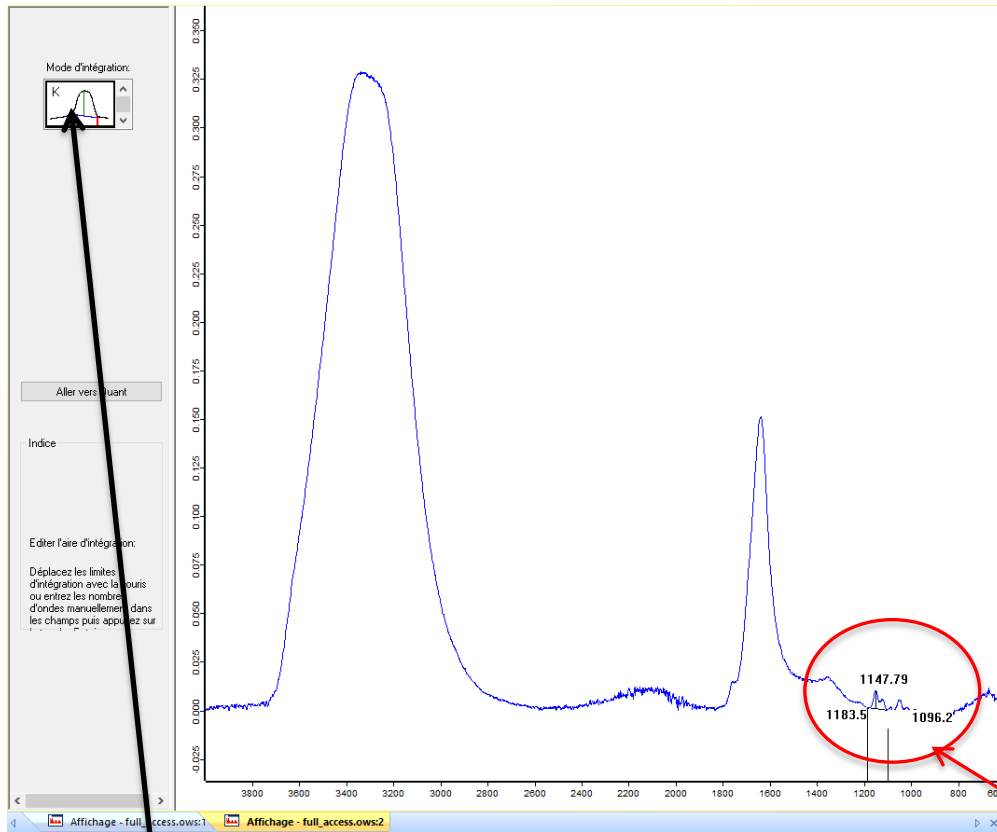


Une fenêtre apparaît : dans Méthode, sélectionner « Créer », glisser-déposer le spectre de l'étalon 1,



Définir le nom et l'unité de la composante et indiquer la concentration exacte (pratique) de l'acide ascorbique pour l'étalon 1.

Cliquer ensuite dans « Définir la zone d'intégration », une fenêtre s'ouvre :



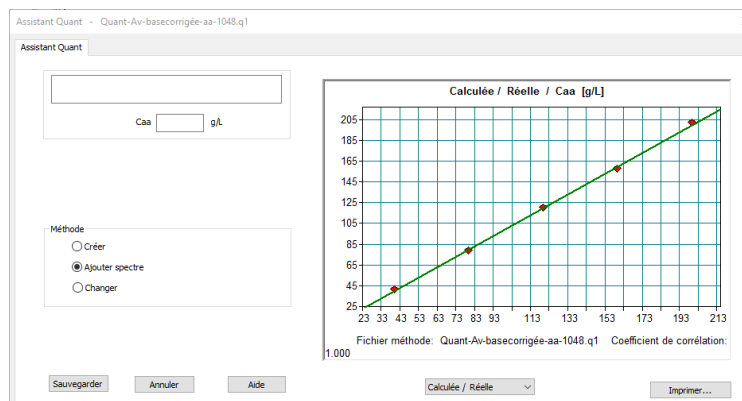
Sélectionner le « mode d'intégration K », puis à l'aide de la souris, déplacer le curseur principal sur la bande située vers 1148  $\text{cm}^{-1}$ .

Le logiciel mesurera, par la suite, l'absorbance correspondante à cette bande-là, quel-que-soit l'étalon !

Cliquer ensuite dans « Aller vers Quant », afin de retourner sur la fenêtre précédente, puis cliquer sur sauvegarder. Vous donnerez un nom de fichier pour lequel, vos noms et la bande de mesure sont spécifiés.

Cliquer, à nouveau sur l'icône *Assistant Quant*, puis glisser-déposer le spectre de l'étalon 2, en précisant la concentration en acide ascorbique correspondante, et cliquer sur sauvegarder.

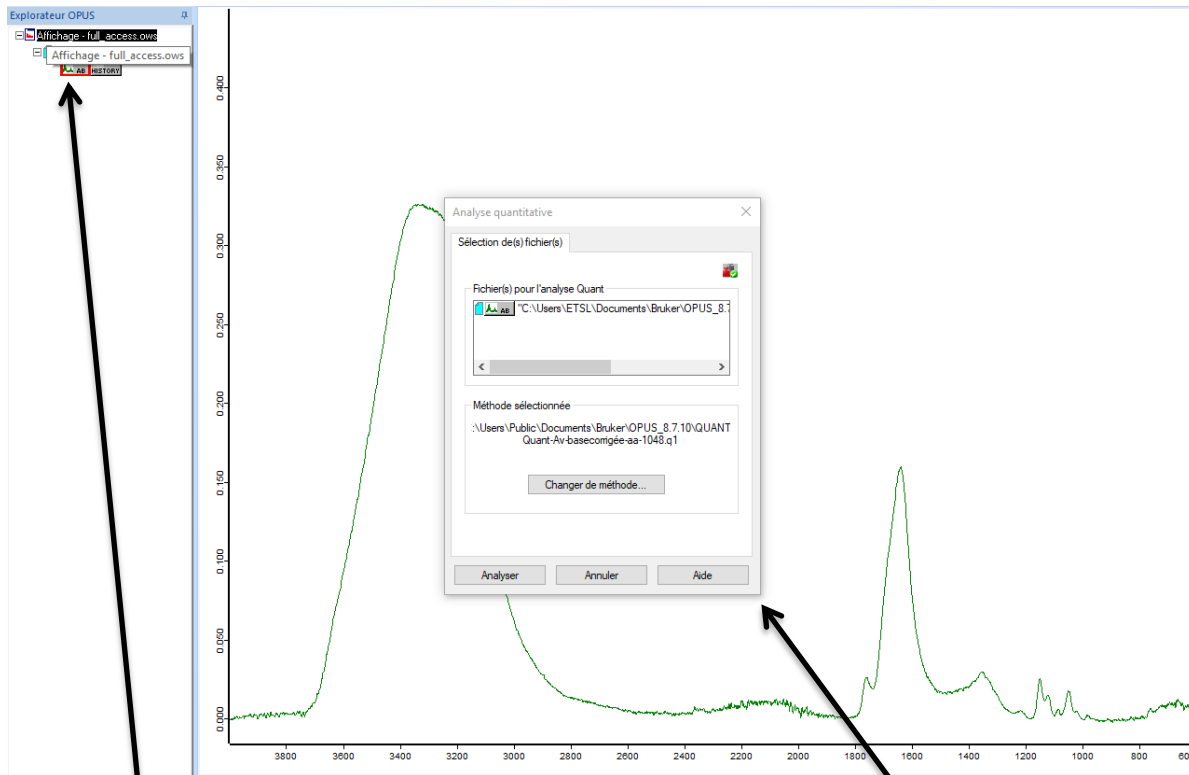
Réitérer le processus pour les étalons 3, 4 et 5, vous obtenez alors la droite d'étalonnage (exemple ci-dessous) :



Imprimer, puis sauvegarder. **Réitérer tout le processus pour la bande se situant vers 1048  $\text{cm}^{-1}$ .**

## 2.3. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE L'ÉTALON DE CONTRÔLE ET DE L'INCONNUE

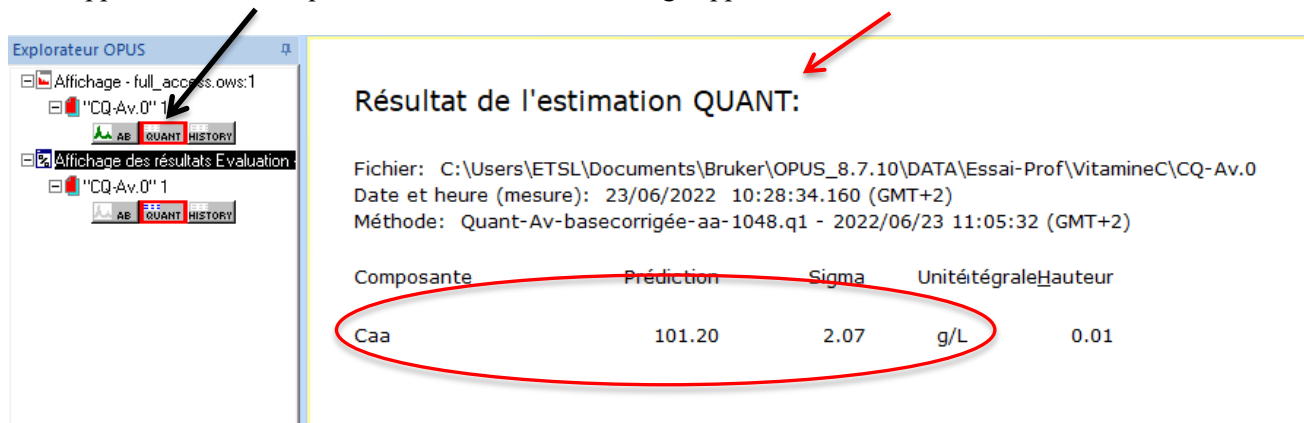
Le fichier CQ (Contrôle Qualité, encore appelé étalon de contrôle) doit être ouvert, si ce n'est pas le cas, charger le !



Sélectionner le spectre associé au fichier.

Dans la barre des menus : cliquer sur l'icône *Analyse Quantitative* , une fenêtre s'ouvre.

Vérifier que la Méthode sélectionnée soit la bonne ! Puis cliquer sur Analyser. Une case « Quant » apparaît, double-cliquer dessus, le résultat de dosage apparaît à droite de l'écran :



Relever la valeur de concentration (Prédiction) correspondante avec son écart-type (Sigma).

# 3. ANALYSE QUALITATIVE DE SPECTRE IR PAR RÉFLEXION

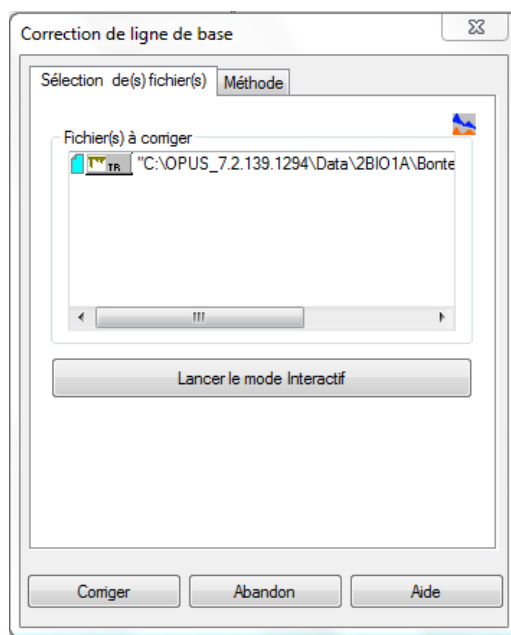
## 3.1. Acquisition du spectre IR de la vitamine C dans l'eau

☛ Vous utiliserez la méthode intitulée : Méthode VitamineC-ATR-4000-600.xpm, pour laquelle, Les paramètres de scan sont les suivants :

- **Nombre de Scans : 40**
- **Résolution : 2 cm<sup>-1</sup>**
- **Apodisation : Norton-Beer weak**
- **Range : 4000 - 600 cm<sup>-1</sup>**


☛ Faire l'acquisition du spectre IR de la solution de vitamine C, réalisée pour le dosage, et sélectionner la case spectrale.

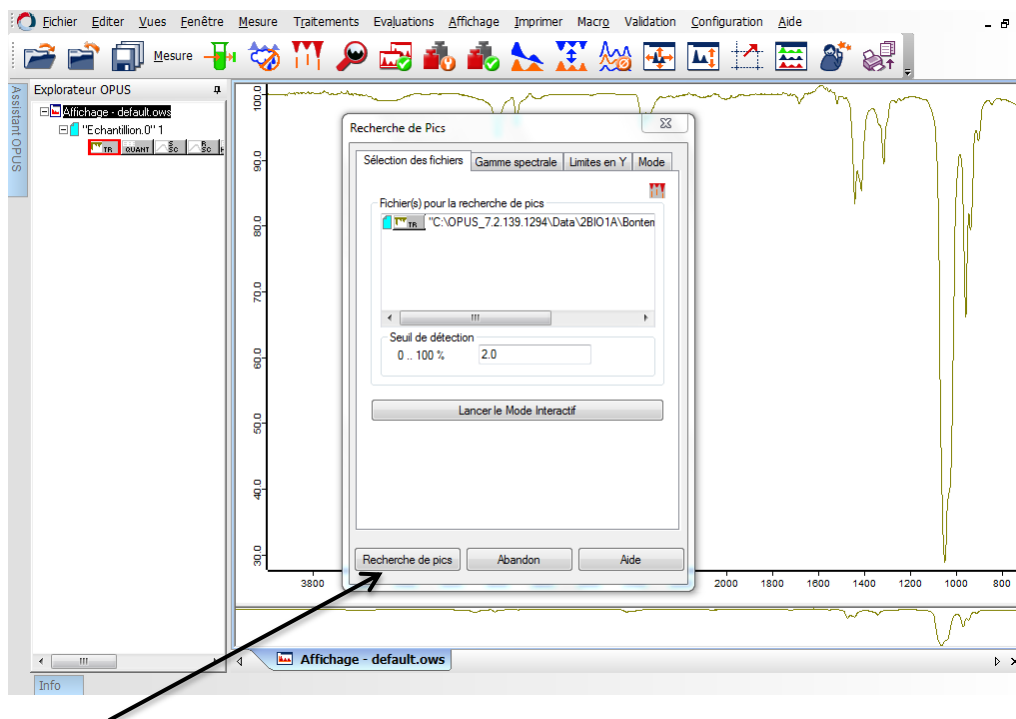
☛ Pour **corriger la ligne de base** : cliquer sur l'icône :  , une fenêtre s'ouvre :



Le fichier à corriger doit apparaître dans la fenêtre « *Fichier(s) à corriger* », si ce n'est pas le cas, sélectionner la case spectrale du fichier et le glisser-déposer dans la fenêtre de fichier à corriger. Cliquer sur **Corriger**, le résultat donnera un spectre calé à 0 %A. Le spectre se cale à 100 % de transmittance. Enregistrer le fichier corrigé.



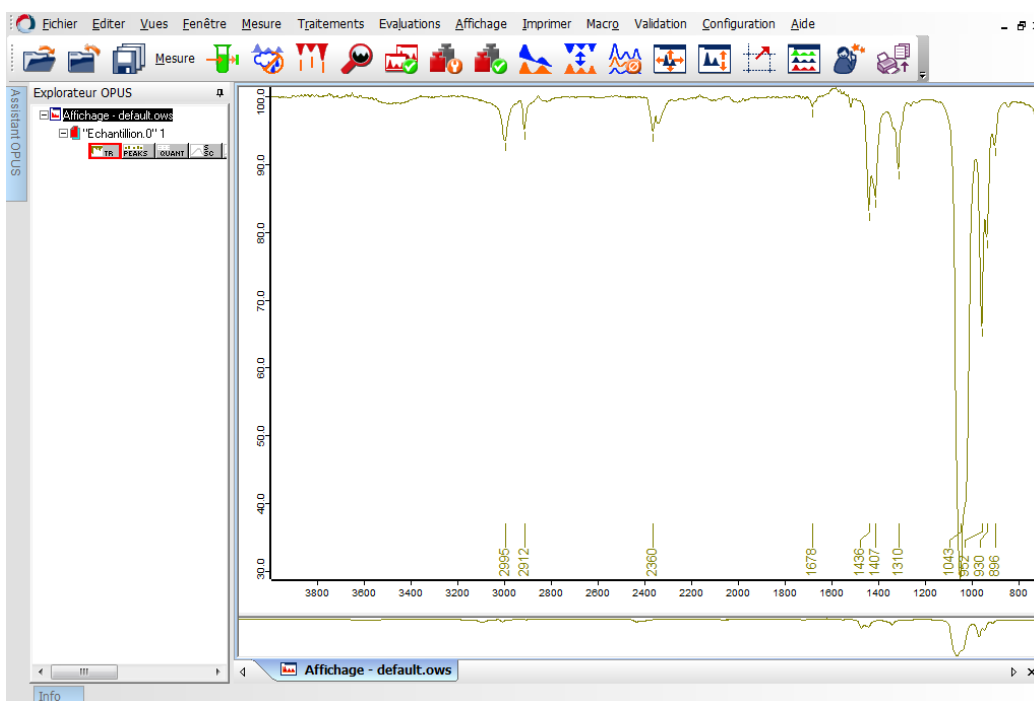
☞ Pour **obtenir la position des bandes** : cliquer sur l'icône :  , une fenêtre s'ouvre :



Cliquer sur Recherche de pics

Remarque : on peut aussi faire une recherche interactive en augmentant ou en diminuant le seuil, ce qui permet d'obtenir plus ou moins de valeurs !

On obtient alors la fenêtre de résultat ci-dessous :



Remarque : on peut supprimer certaines valeurs en les sélectionnant et en faisant un clic droit et delete.

- ☛ Nettoyer le cristal à l'aide de papier imbibé d'un peu d'eau distillée ou d'éthanol.

## 3.2. Acquisition du spectre IR de l'eau

- ☛ Faire l'acquisition du spectre du solvant seul, l'eau.
- ☛ Traiter de la même façon le spectre obtenu, sauvegarder, puis imprimer.

## 4. ELEMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS

**Q** Donner la définition de la résolution spectrale.

La résolution est l'aptitude d'un spectromètre à séparer les signaux caractéristiques de deux bandes voisines. Ainsi une résolution de  $2 \text{ cm}^{-1}$  signifie que deux bandes dont les centres sont séparés d'au moins  $2 \text{ cm}^{-1}$  apparaîtront distinctes sur le spectre.

**Q** Qu'est-ce qu'une fonction d'Apodisation ?

Les spectres calculés peuvent faire apparaître des "ailes" (lobes) à la base des bandes. Ces ailes constituent des "artéfacts numériques". Pour les limiter, on peut employer une fonction de correction appelée **fonction d'apodisation**, qui va avoir pour effet d'éliminer tout ou partie de ces lobes. Malheureusement, l'utilisation de ce type de fonction entraîne une perte d'énergie non négligeable, surtout lorsque l'on travaille en réflexion, ce qui n'est pas le cas dans cette manipulation.

**Q** Donner la définition du nombre d'onde.

Définition du nombre d'onde :  $\bar{\nu} = \sigma = \frac{1}{\lambda}$

Le nombre d'onde est donc homogène à l'inverse d'une longueur d'onde et s'exprime dans le S.I en  $\text{m}^{-1}$ . Les spectroscopistes IR ont plutôt l'habitude d'utiliser le  $\text{cm}^{-1}$  (tous les spectrophotomètres IR ont leur abscisse en nombres d'onde exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ )

**Q** Pourquoi mesure-t-on les absorbances à la longueur d'onde d'absorbance maximale de la bande d'absorption considérée ?

A la longueur d'onde d'absorbance maximale, la sensibilité est meilleure. L'erreur est donc la plus faible pour ce dosage.

**Q** Un écart autour de la longueur d'onde d'absorbance maximale de la bande d'absorption considérée a-t-il une incidence sur le dosage lorsqu'on travaille avec une gamme d'étalonnage ?

Elle ne se voit pas mais on perd en précision et en sensibilité pour la mesure.

**Q** Comment, à partir de la droite d'étalonnage, peut-on obtenir la concentration de la vitamine C dans l'échantillon préparé à partir du comprimé ?

Il suffit d'utiliser la droite d'étalonnage de la vitamine C, et par lecture directe d'en déduire la concentration de celle-ci.

On peut aussi utiliser directement l'équation de la droite d'étalonnage pour calculer la concentration en vitamine C considérée.