

2^{ème} année BTS Bioanalyses et Contrôles

Notice Technique du Spectrofluorimètre RF 1501 de Shimadzu



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

godin.lionel@orange.fr

TP n°5 : DOSAGE DE LA CIPROFLOXACINE® PAR SPECTROFLUORIMÉTRIE

1. MISE EN FONCTIONNEMENT DU SPECTROFLUORIMETRE	2
2. GÉNÉRALITÉS SUR LE PARAMÉTRAGE DU SPECTROFLUORIMETRE	3
2.1. Acquisition des données	4
2.2. Gestion des données	4
2.1. Impression des résultats	5
3. UTILISATION EN MODE SPECTRE	5
4. UTILISATION EN MODE QUANTITATIF	6
ANNEXE 1 : SCHEMA DU SPECTROFLUORIMETRE RF-1501 SHIMADZU	8
ANNEXE 2 : SYSTEME OPTIQUE DU SPECTROFLUORIMETRE RF-1501 SHIMADZU	9

1. Mise en fonctionnement du spectrofluorimètre (en principe déjà réalisé !)

Avertissement : lors du fonctionnement du spectrofluorimètre, la lampe au xénon dégage une forte chaleur. Il faut faire attention au couvercle du compartiment de la lampe et d'une façon générale au dessus et sur le côté droit de l'appareil. **Rien ne sera donc laissé sur l'appareil et sur son côté droit** (cuves, stylo, carnet de laboratoire, sac) qui, de toute façon, n'est pas une paille.

OPÉRATIONS à RÉALISER par le PROF ou le TECHNICIEN(NE)

Insérer la carte (face avant de l'appareil) puis le mettre en fonctionnement grâce à l'interrupteur qui se trouve à l'avant de celui-ci.

Attendre que le checkup complet de l'appareil soit réalisé
Appuyer sur la touche 3 du spectrofluorimètre

☞ Allumer le PC et son écran, puis double-cliquer sur l'icône du logiciel de pilotage du FLUORIMÈTRE PC 150X

Le spectrofluorimètre est alors piloté par le logiciel, il ne faut plus utiliser le clavier de celui-ci sous peine de faire rentrer en conflit ordinateur et spectrofluorimètre !

☞ Dans **Configure Instruments**, cocher « Auto Shutter ».

Avant de lancer une mesure, quelle qu'elle soit, il faut paramétrer l'appareil, cliquer dans la barre des menus, sur :

Configure Parameters

Indiquer le type de spectre que vous voulez faire.

La longueur d'onde d'excitation (EX Wavelength)

La gamme de longueur d'onde d'émission (EM Wavelength)

Toujours Indiquer une sensibilité basse du détecteur (Low Sensitivity), sauf dans le cas où vous avez besoin de déterminer une limite de détection.

Pour réaliser une mesure, il faut passer dans l'ordre les étapes suivantes :

- Paramétrage du spectrofluorimètre
- Acquisition des données
- Gestion des données
- Impression des résultats

2. Généralités sur le paramétrage du spectrofluorimètre RF-1501 Shimadzu

- **Mode d'acquisition** : les données peuvent être acquises sous forme de spectre (« Spectrum »), de dosage (« Quantitative ») ou de cinétique (« Time course »). Jusqu'à 10 spectres peuvent être sauvegardés simultanément dans des canaux (« Channels ») de la mémoire temporaire.
- **Type de spectre** : il faut spécifier le type de spectre voulu : excitation ou émission.
- **Pour un spectre d'émission**, il faut préciser la longueur d'onde d'excitation et la plage de longueur d'onde d'émission balayée (entre 220 et 800 nm). Les longueurs d'onde d'émission étant supérieures aux longueurs d'onde d'excitation, il convient de commencer le spectre d'émission à une longueur d'onde légèrement supérieure à la longueur d'onde d'excitation. Par exemple, si λ excitation est fixée à 260 nm, on commence le spectre de fluorescence à λ égale 265 nm.
- **Pour un spectre d'excitation**, il faut préciser la longueur d'onde d'émission et la plage de longueur d'onde d'excitation balayée (entre 220 et 800 nm). Les longueurs d'onde d'excitation étant inférieures aux longueurs d'onde d'émission, il convient d'arrêter le spectre d'excitation à une longueur d'onde légèrement inférieure à la longueur d'onde d'émission. Par exemple, si λ émission est fixée à 350 nm, on termine le spectre d'excitation à λ égale 345 nm.
- **La vitesse de balayage** « scan speed »: on dispose de quatre vitesses : Super (environ 3700 nm/min), Fast, Medium et Slow. Plus la vitesse de balayage est grande, plus les spectres sont rapidement réalisés mais moins on dispose de temps de mesure à chaque longueur d'onde différente. Pour nos manipulations, la vitesse de balayage Fast sera sélectionnée.
- **Le temps de réponse** « Response » (sec) : le signal en sortie du photomultiplicateur est continu. Les valeurs stockées sont des valeurs moyennes du signal mesuré pendant un intervalle de temps donné. Plus cet intervalle est court, plus le spectrofluorimètre est capable de mesurer des variations rapides du signal ce qui génère du bruit de fond. Plus ce temps est long, moins le bruit de fond est important mais les petites variations de signal ne sont plus mesurées. Plusieurs valeurs de temps de réponse sont possibles (de 0,02 s à 8 s). Un mode automatique assigne le temps de réponse en fonction de la vitesse de balayage. Toutes les mesures seront réalisées en mode Auto.
- **Echelle des ordonnées** : les intensités de fluorescence sont reportées graphiquement sur une échelle d'unité arbitraire modifiable de -100 à +1000. Par défaut, l'échelle de 0 à 1 000 sera choisie.
- **Sensibilité** « sensitivity » : modifie le voltage appliqué au photomultiplicateur. Deux valeurs sont possibles : basse (low) et haute (high). La dernière correspond à la première, multipliée par un facteur d'environ 50. Par défaut, nous prendrons la sensibilité basse.
- **Obturateur** « shutter » : un volet permet d'obturer le faisceau de la lumière d'excitation. En position fermée (shutter off) le manipulateur n'est pas exposé à ce faisceau (danger possible avec les rayonnements de l'ultraviolet). De plus, l'échantillon n'est pas exposé entre deux mesures ce qui permet d'éviter des problèmes de réactions photochimiques. Il ne faut pas oublier dès lors de passer en position ouverte (shutter ON) pour les mesures. Un mode automatique (Auto shutter ON) maintient le volet fermé et ne l'ouvre que pour les mesures. Travailler en mode automatique pour toutes les manipulations.

2.1. Acquisition des données

- Pour lancer **un spectre**, il suffit d'appuyer sur l'icône « start ». Le spectre est mesuré suivant les paramètres préalablement réglés.
- Pour lancer **une série de spectre** : c'est une option accessible dans le réglage des paramètres du spectrofluorimètre. On spécifie le nombre de répétitions à effectuer et l'intervalle de temps entre deux départs consécutifs. Un nom de fichier est donné pour la série de spectres. On active le mode série de spectre avec « Enable » et on le désactive avec « Disable ». En mode actif, une indication est visualisable à l'écran ; elle indique notamment le n° du spectre en cours.
- Pour faire **une mesure d'intensité** de fluorescence, il suffit de donner la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission. La mesure dépend également des autres paramètres. L'intensité est directement mesurée et visualisable à l'écran de l'ordinateur.
- Quel que soit le type de mesure réalisé, des indications sur le déroulement de la mesure sont affichés sur l'écran. Lorsque la mesure est terminée, un signal sonore est émis. On peut donc travailler à autre chose pendant la mesure sans perdre de temps.

2.2. Gestion des données

Gérer les spectres : un spectre est stocké dans un canal de la mémoire temporaire. Dix canaux sont simultanément accessibles. La sauvegarde d'un canal sur le disque dur est possible mais ne sera pas utilisée pendant le TP. On peut effacer un canal (menu « File » commande « Erase Channel ») ce qui libère une place pour un autre spectre. Les canaux peuvent être affichés ou masqués à l'écran (menu « Presentation » commande « Channel Status »).

Retrancher un spectre : des opérations mathématiques peuvent être réalisées entre les canaux. On peut retrancher un canal (un spectre de la cuve de référence) à un autre (le spectre du fluorophore). Menu « Manipulate » commande « File/Chnl Calc ». La forme générale du calcul est $A \text{ op } B = C$ où A et B sont les numéros des canaux sources, C le numéro de canal du résultat et op l'opération vectorielle (+, -, *, /).

Recherche de pic : les pics d'un spectre peuvent être déterminés automatiquement (menu « Manipulate » commande « Peak Pick »). Il est important de savoir ce que fait le programme lors d'une recherche de pic ou de vallée afin de savoir s'il faut changer ou non les seuils de détection. Ici, un pic est défini comme quatre augmentations successives suivies d'au moins quatre diminutions successives des valeurs. Le sommet du pic est défini comme le point situé avant le début de la décroissance. Le résultat de la recherche est affiché dans une fenêtre. Les valeurs peuvent alors être sauvegardées pour être imprimées.

Echelle du graphe : les valeurs limites du graphe à l'écran peuvent être fixées manuellement (menu « Presentation » commande « Set Limits »). Une mise à l'échelle automatique est également possible (menu « Presentation » commande « Radar »).

Couleurs : la couleur et l'aspect du tracé de chaque canal est modifiable. Attention toutefois, certaines couleurs passent mal à l'impression en noir et blanc.

2.3. Impression des résultats

Le logiciel découpe la page à imprimer en quatre parties. Chaque cellule peut contenir des informations différentes, on peut également associer les cellules entre-elles pour former des zones d'impression plus grandes. Dans une cellule ou un ensemble de cellules on peut faire apparaître un graphe ou les paramètres ou le contenu d'un fichier texte (comme le résultat de la recherche automatique des pics).



Remarque

Le graphe imprimé doit être compatible avec les bonnes pratiques de laboratoire. Les informations nécessaires qui n'auront pas pu être imprimées seront donc ajoutées à la main.

3. Utilisation en MODE SPECTRE

☞ Avant de lancer une quelconque mesure, placer la cuve 4 faces optiques dans le compartiment échantillon.

Pour **lancer la mesure** : cliquer simplement sur **Start**.

Lorsque la mesure est terminée, l'appareil vous demande de faire une sauvegarde du logiciel, indiquer le nom du spectre correspondant (8 caractères au maximum).

ATTENTION : la sauvegarde logiciel n'est pas une sauvegarde physique du spectre sur le disque dur, si vous voulez sauvegarde les spectres sur le disque dur, il faut le faire classiquement via FILE / SAVE FILE.

☞ Pour **Zoomer sur le spectre**, il faut faire un RADAR (**Presentation Graph** puis **Radar**), c'est un zoom automatique de l'appareil, ou dans certains cas, c'est plus approprié, il faut manuellement indiquer les limites en ordonnées et en abscisses, via **Presentation Graph** puis **Limits**.

☞ Pour **Imprimer un ou plusieurs spectres**, il suffit, d'aller dans **Channel Status** pour faire apparaître le ou les spectres que l'on veut imprimer, en cliquant sur Y (Display On) ou N (Display Off).

Ensuite, Dans **Plot**, cocher Graph, puis les 4 cadrans, si vous voulez un spectre plein écran, ou les cadrans 1 et 3 si vous voulez un spectre en format vertical, ou les cadrans 1 et 2 si vous voulez un spectre en format horizontal. Faire un « Preview » pour vérifier que ce sont bien les spectres que vous voulez imprimer, puis imprimer.

Si vous avez besoin d'imprimer les paramètres de mesures, il faut cocher, en second, parameters, puis choisir les 2 cadrans correspondants, enfin avant d'imprimer toujours faire un « Preview ».

☞ Pour **obtenir les maximums d'intensité**, il suffit, d'aller dans **Manipulate Peak Pick** pour faire apparaître les valeurs des pics dans une petite fenêtre.

Remarque importante : Si vous voulez avoir les valeurs de pics en impression, il faut imprimer à partir de cette fenêtre, en sélectionnant **Graphics Plot** dans **Output**.

Pour **obtenir des intensités à d'autres longueurs d'onde**, il suffit d'aller dans **Manipulate Point Pick**, indiquer les longueurs d'onde pour lesquelles on veut les absorbances (jusqu'à 10 valeurs max par spectres).

4. Utilisation en MODE QUANTITATIF

☞ Dans la barre des menus, sélectionner **Acquire mode : Quantitative**, une fenêtre s'ouvre :

Method : sélectionner "*Multipoint working Curve*", et indiquer :

Order of Curve : 1st ; *Zero Interception* : Yes ;

Indiquer les valeurs de λ_{ex} , λ_{em} ; *Concentration Units* et *Range* ;

Recording Range.

Sensitivity : low ; *Repeat* : 3.

Cliquer sur OK.

☞ Cliquer sur l'icône **Standard** (en bas à droite de la fenêtre quantitative) :

Placer une cuve correspondant au point de gamme 0 (le solvant), dans le compartiment échantillon, puis cliquer sur l'icône **Read** :

Une fenêtre apparaît avec la valeur de l'intensité, rentrer la concentration correspondante, puis OK. Répéter le processus deux fois.

Continuer avec les points de gamme suivants.

Remarque : la courbe de calibration se trace au fur et à mesure de l'avancé des mesures !

☞ Pour doser une inconnue, cliquer sur l'icône **Unknown** (en bas à droite de la fenêtre quantitative) :

Placer une cuve correspondant à l'inconnue, dans le compartiment échantillon, puis cliquer sur l'icône **Read** : les valeurs de l'intensité et de la concentration correspondante apparaissent.

☞ Pour **Imprimer la courbe d'étalonnage et les résultats du dosage**, dans la barre des menus, sélectionner **Presentation : Plot** : la fenêtre suivante s'ouvre :

The screenshot shows a window titled "Plot Layout" with the following content:

	Std.	Unk.	Params.	File	Format	Quadrant(s)
A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Graph	<input checked="" type="checkbox"/> 1 <input checked="" type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Std. Params.	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
C	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Table	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input checked="" type="checkbox"/> 4
D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4

At the bottom, there are four buttons: **Print**, **Cancel**, **Preview**, and **Setup**. To the right of the buttons is a 2x2 grid of small boxes containing the numbers 1, 2, 3, and 4.

Côcher **Std**, et sélectionner **Graph**, puis sélectionner les cadrans 1 et 2 si vous voulez une droite en format horizontal.

Côcher **Params**, et sélectionner **Std. Params.**, puis sélectionner le cadran 3, pour obtenir les paramètres sous la courbe, à gauche.

Côcher **Unk**, et sélectionner **Table**, puis sélectionner le cadran 4, pour obtenir les valeurs des concentrations inconnues sous la courbe, à droite.

Faire un « Preview » pour vérifier que ce sont bien les spectres que vous voulez imprimer, puis imprimer.

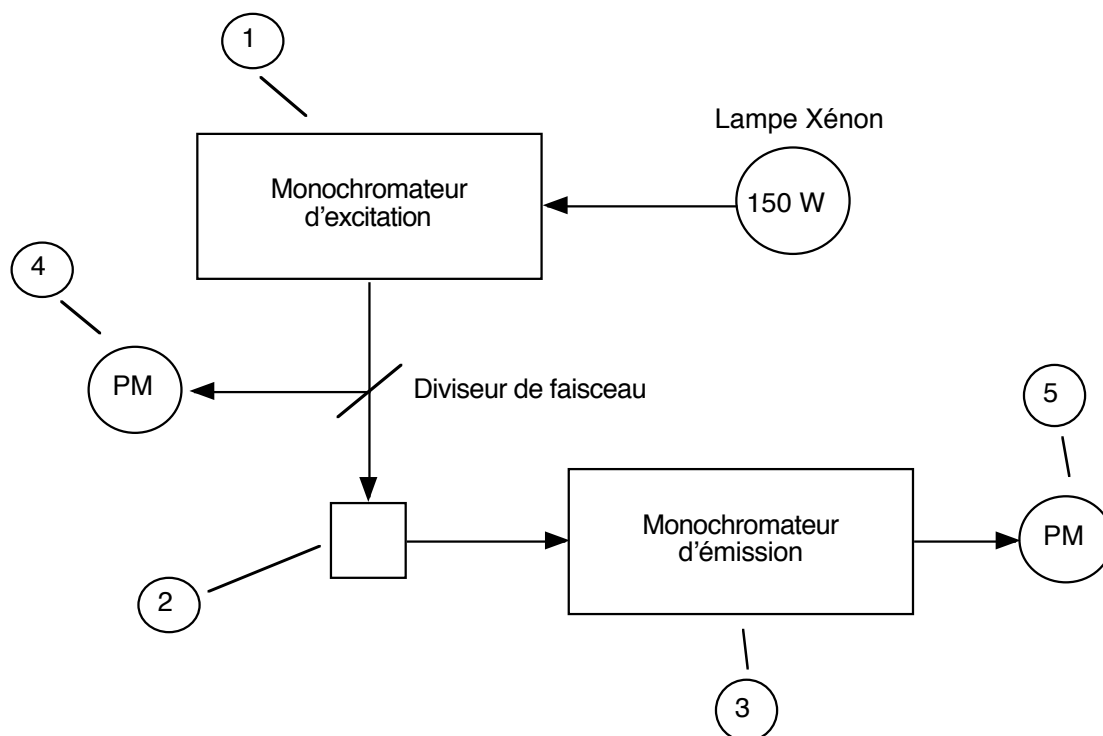
Annexe 1 : Schéma du spectrofluorimètre RF-1501 Shimadzu

Le monochromateur d'excitation (1) disperse la lumière émise par la lampe au xénon pour isoler la lumière d'excitation. Il présente un réseau dispersif de grande taille (55 x 55 mm) afin de collecter le plus de lumière possible. Plus la lumière d'excitation est intense, plus la sensibilité de l'appareil sera grande. La rotation du réseau est assurée par un moteur et permet de régler la lumière d'excitation à la longueur d'onde désirée.

En (2) se trouve le porte-cuve dans lequel on place la cuve à quatre faces optiques contenant l'échantillon.

Le monochromateur d'émission (3) disperse la fluorescence émise par l'échantillon avant la mesure par un photomultiplicateur (5). Il comporte également un réseau dispersif de même taille que celui du monochromateur d'excitation afin de collecter autant de lumière émise que possible.

La lampe au xénon généralement utilisée dans les spectrofluorimètres permet d'obtenir une lumière d'intensité très élevée et un spectre d'émission continu. En revanche, il est nécessaire de compenser les fluctuations de sa lumière qui augmenterait le bruit de fond. De plus, le spectre tend à être dégradé par divers facteurs instrumentaux (comme le spectre d'émission de la lampe, la sensibilité spectrale du photomultiplicateur,...). Ces problèmes sont minimisés en mesurant une partie de la lumière d'excitation à l'aide du photomultiplicateur (4) et en injectant le signal dans le photomultiplicateur de fluorescence (5). Cette technique de mesure est appelée compensation de la lumière source.



Annexe 2 : Système optique du spectrofluorimètre RF-1501 Shimadzu

La lumière émise par la lampe au xénon est concentrée par le miroir ellipsoïdal (M1) à l'entrée de la fente (S1) du monochromateur d'excitation.

La lumière qui passe par la fente (S1) est réfléchiée par le miroir plan (M2) et est dirigée vers le réseau dispersif (G1).

La lumière émise par la fente de sortie (S2) est la lumière d'excitation. Elle est focalisée par les lentilles (L1 et L2) sur l'échantillon (C).

Une partie de la lumière d'excitation est dispersée par le séparateur de faisceau (BS) et entre dans le photomultiplicateur (PM1) pour la compensation de la lumière source.

La fluorescence émise par l'échantillon est focalisée par les lentilles (L3 et L4) sur la fente (S3). Elle est ensuite dispersée par le réseau du monochromateur d'émission puis sort par la fente (S4) pour atteindre le photomultiplicateur de fluorescence (PM2).

