

2^{ème} année BTS Bioanalyses
en Laboratoire de Contrôle

Notice Technique Spectromètre IRTF Tensor 27 de Bruker



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

l.godin@etsl.fr

TP n°4 : Dosage de la vitamine C dans une spécialité pharmaceutique par spectrophotométrie IRTF

1. PRISE EN MAIN DU SPECTROPHOTOMETRE BRUKER TENSOR27	2
1.1. Obtention de la position et de l'énergie, puis choix de la méthode d'acquisition	2
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
1.1.3. Acquisition des spectres étalons	6
2. ANALYSE QUANTITATIVE PAR REFLEXION	8
2.1. Obtention de droites d'étalonnage	8
2.2. Détermination de la concentration de l'étalon de contrôle et de l'inconnue	12
3. ANALYSE QUALITATIVE DE SPECTRES IR PAR REFLEXION	14
3.1. Acquisition du spectre IR de la vitamine C dans l'eau	14
3.2. Acquisition du spectre IR de l'eau	16
4. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS	17

1. PRISE EN MAIN DU SPECTROMETRE BRUKER TENSOR 27

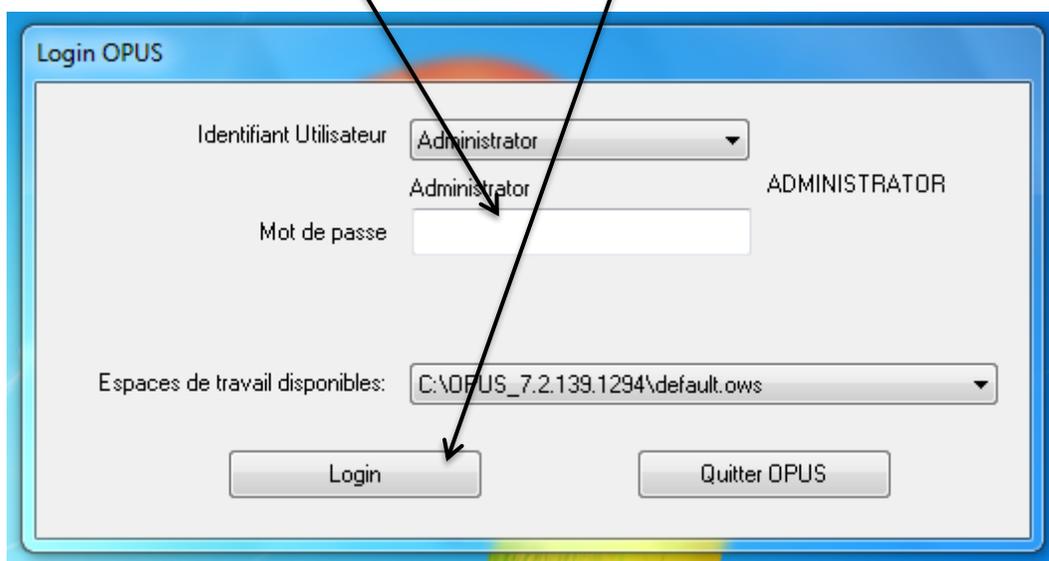
1.1. Obtention de la position et de l'énergie (les valeurs sont à consigner dans le CL), puis choix de la méthode d'acquisition

1.1.1. Obtention de l'énergie

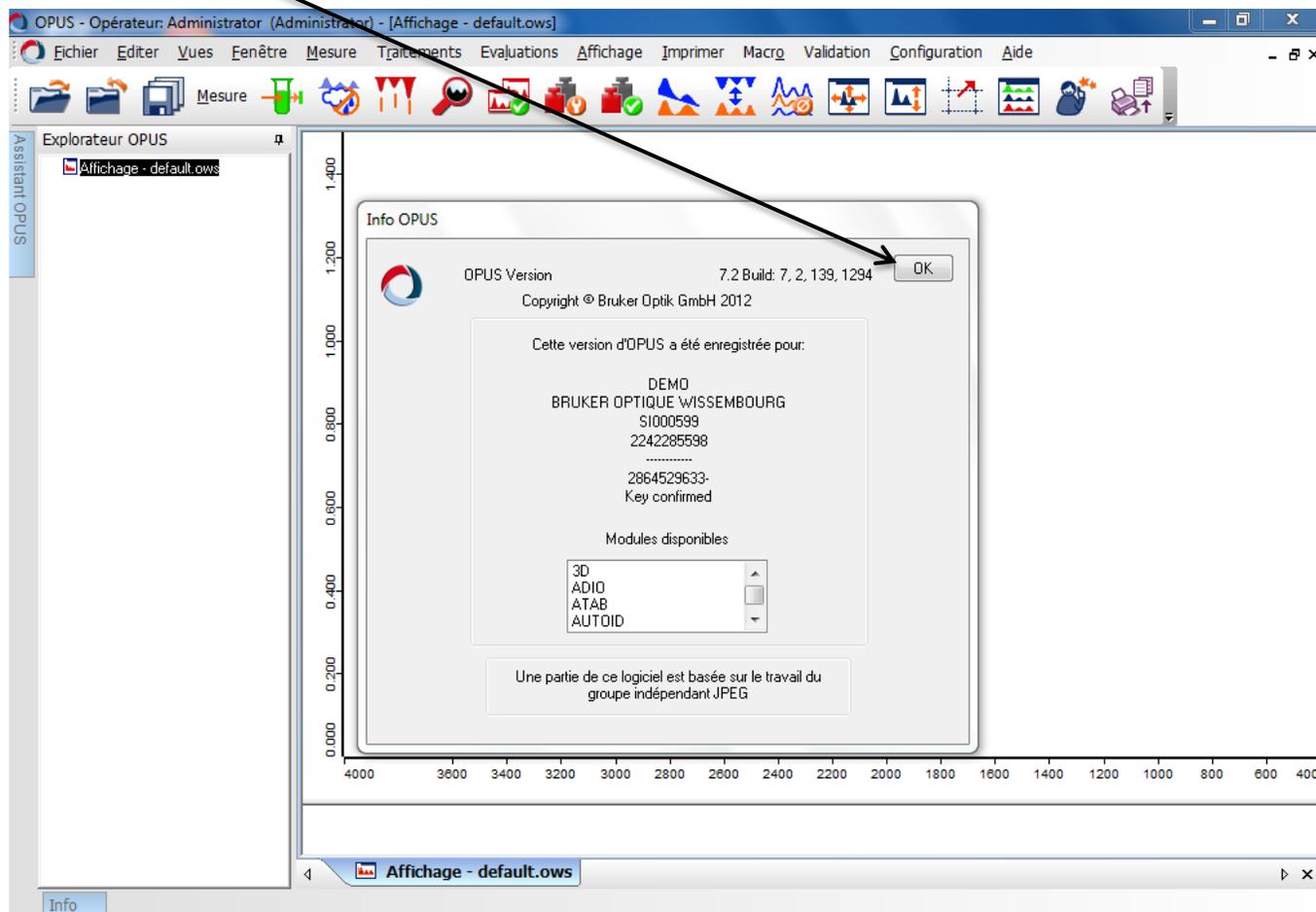
1. Ouverture du logiciel OPUS : double-cliquer sur l'icône du logiciel



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

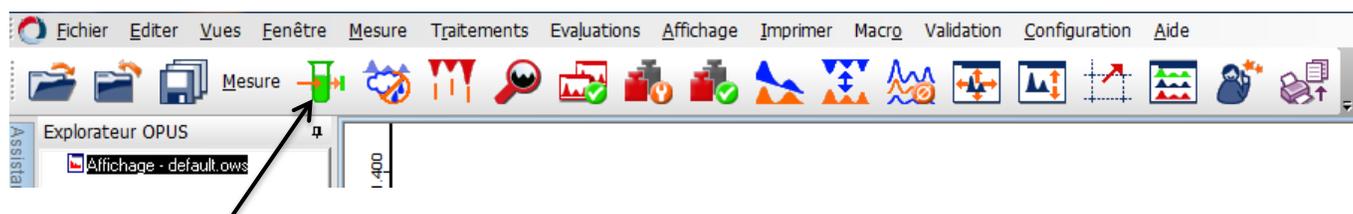


Cliquer sur OK



2. Contrôle du spectrophotomètre :

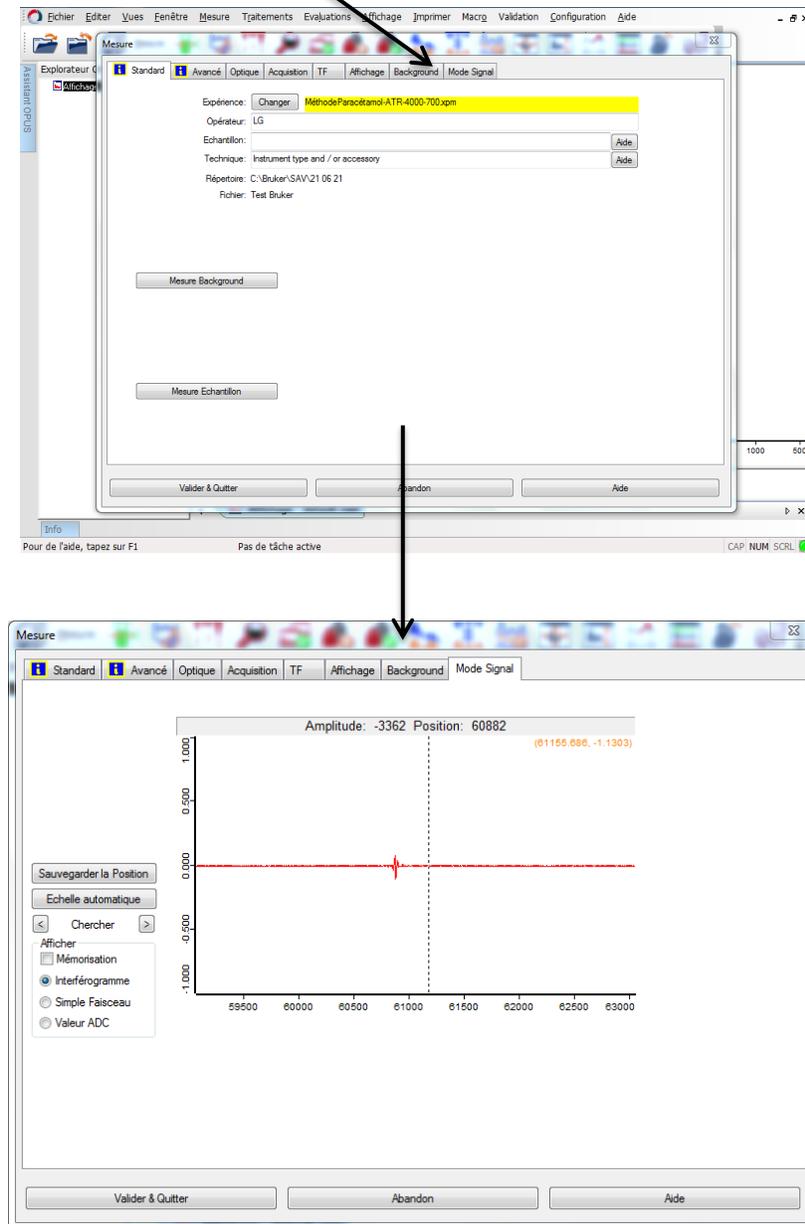
La fenêtre principale apparaît :



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

☞ Vérification de l'énergie :

Cliquer sur l'onglet : **mode d'ajustement**, l'amplitude de l'interférogramme doit être de **20000** (lorsque la source IR est neuve), en-dessous de la moitié de cette valeur, la source sera a changé !
Avec le module ATR, elle doit être de l'ordre de 4000 (lorsque la source IR est neuve).
La position doit être d'environ 61200.



Relever les valeurs obtenues dans le CL.



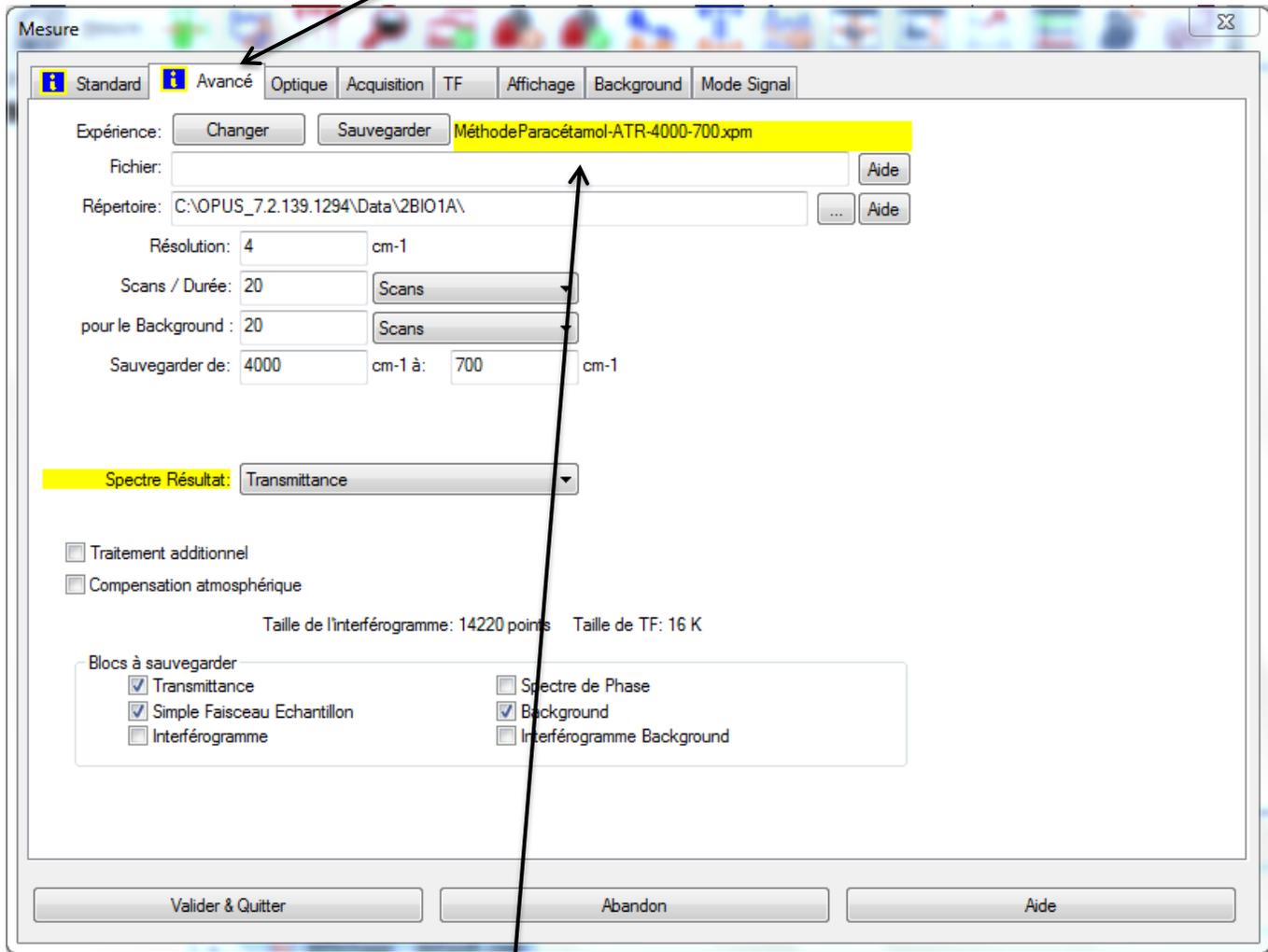
Rapport

- Quelle est la perte d'énergie, en pourcentage, réalisée suite à l'utilisation du dispositif ATR ?

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



Dans Expérience : Vérifier que la "*méthode VitamineC-ATR-4000-600*" soit utilisée, si ce n'est pas le cas, il faut aller la charger.

Dans Fichier : indiquer le nom de votre échantillon.

Dans Répertoire : vérifier que le chemin de fichier corresponde bien à votre classe et groupe.

- 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.

1.2. ACQUISITION DES SPECTRES

1.2.1. Choix de la méthode d'acquisition

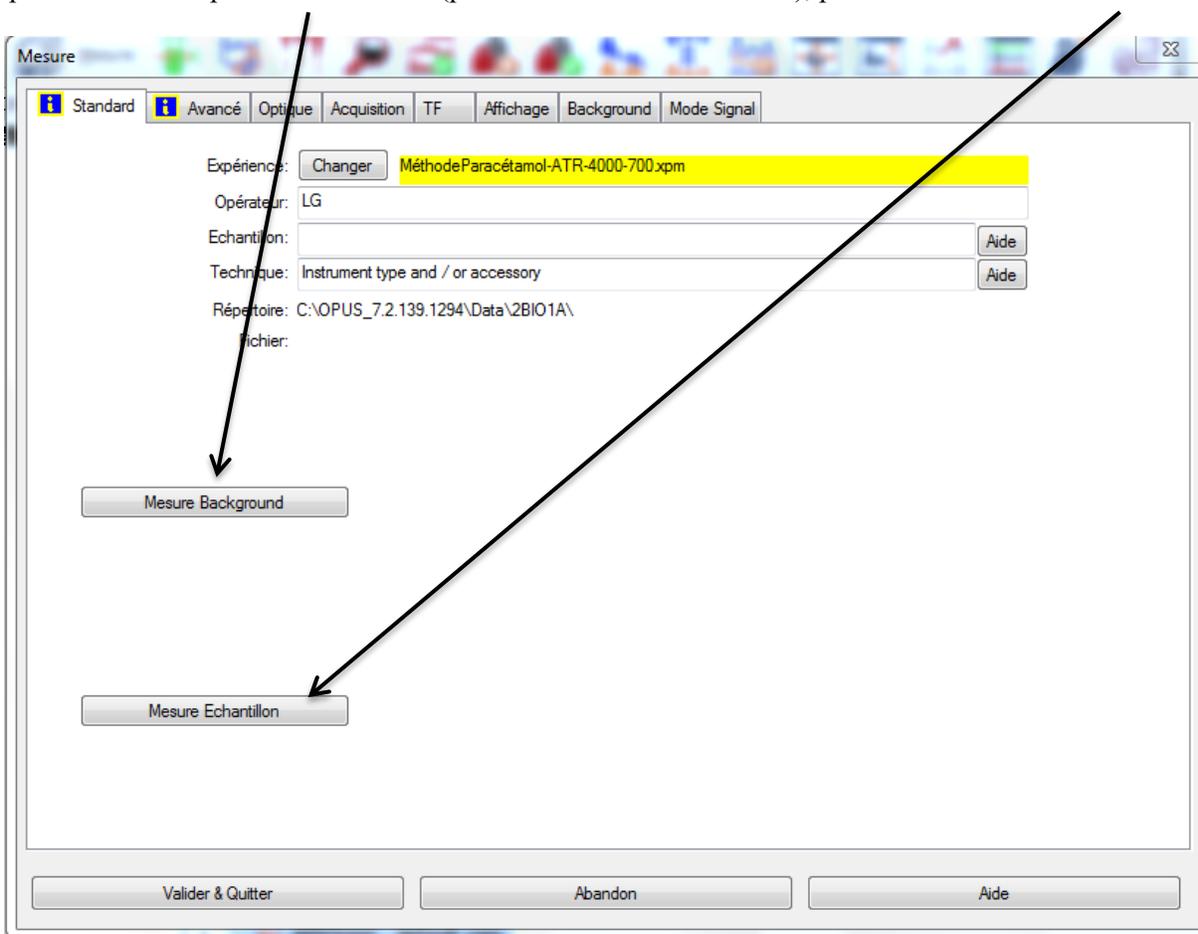
☛ Vous utiliserez la méthode intitulée : Méthode-VitamineC-ATR-4000-600.xpm, pour laquelle, Les paramètres de scan sont les suivants :

- **Nombre de Scans : 40**
- **Résolution : 2 cm^{-1}**
- **Apodisation : Norton-Bier weak**
- **Range : 4000 - 600 cm^{-1}**

1.2.1. Acquisition et traitement des spectres

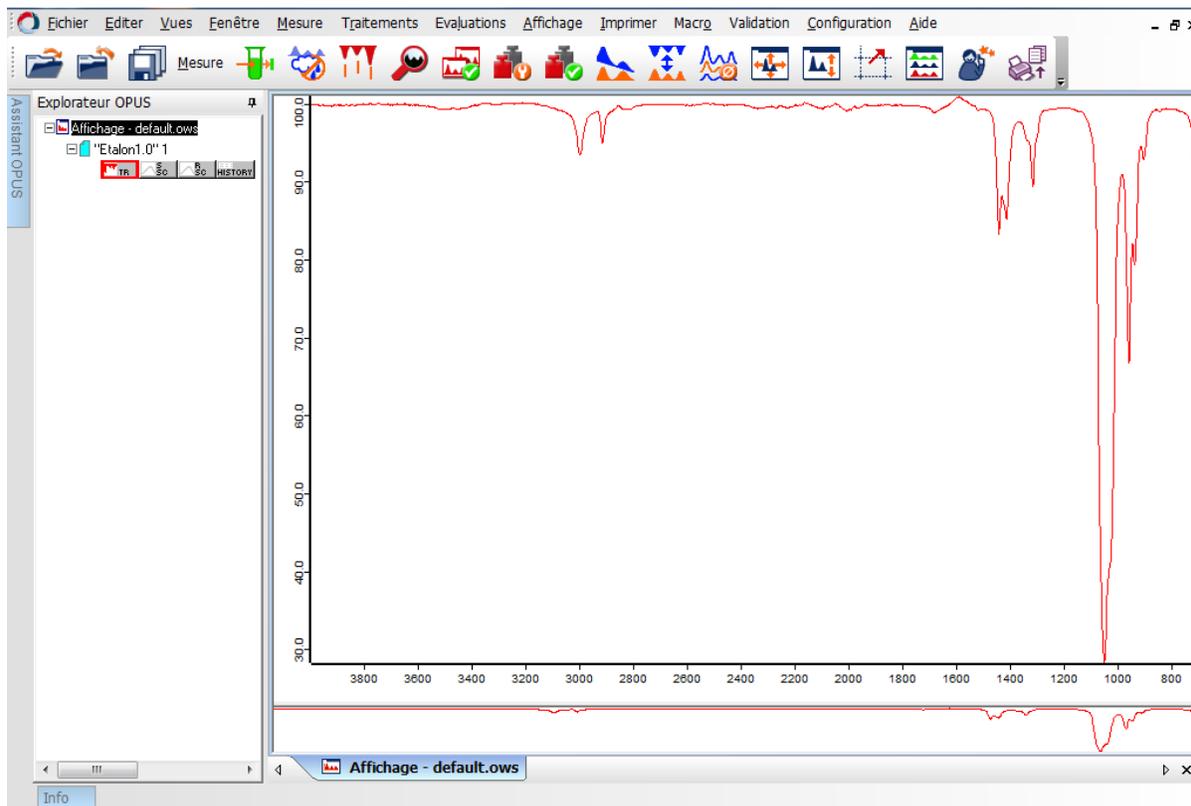
☛ Cliquer sur l'onglet "Standard" :

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 "*Lancer la mesure*" pour obtenir le spectre désiré :



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

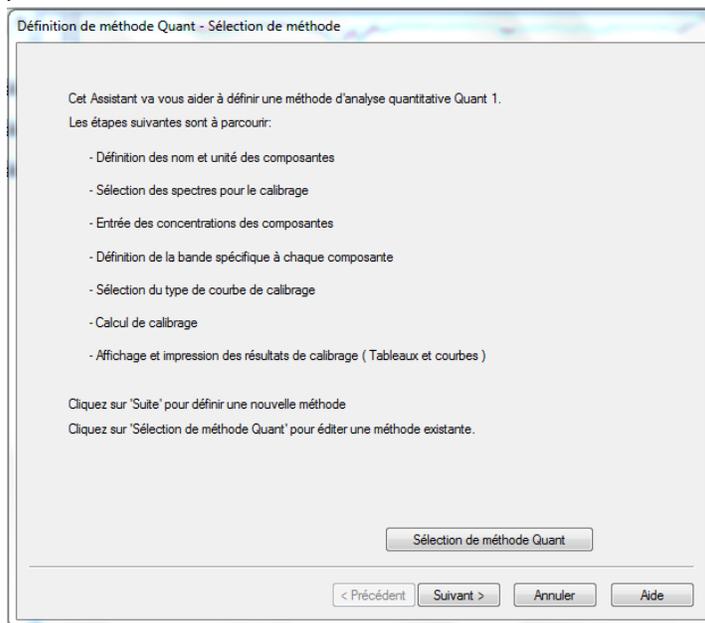
Remarque : 2 : En faisant un clic droit dans la fenêtre du spectre, et en cliquant sur Properties, on peut ajuster les valeurs max et min de l'absorbance.

2. ANALYSE QUANTITATIVE PAR RÉFLEXION

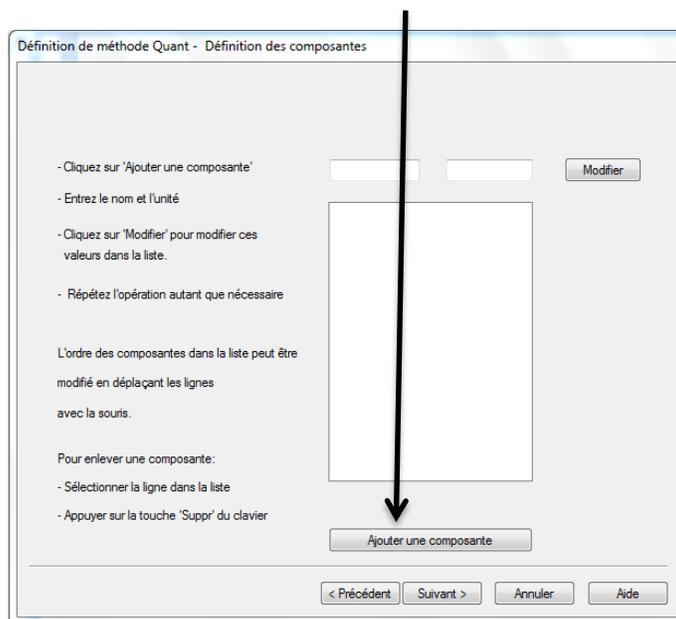
2.1. OBTENTION DE DROITES D'ÉTALONNAGE

Corriger la ligne de base du spectre moyen et le renommer en sélectionnant le nom de fichier Av, puis dans Fichier, Sauvegarder sous.

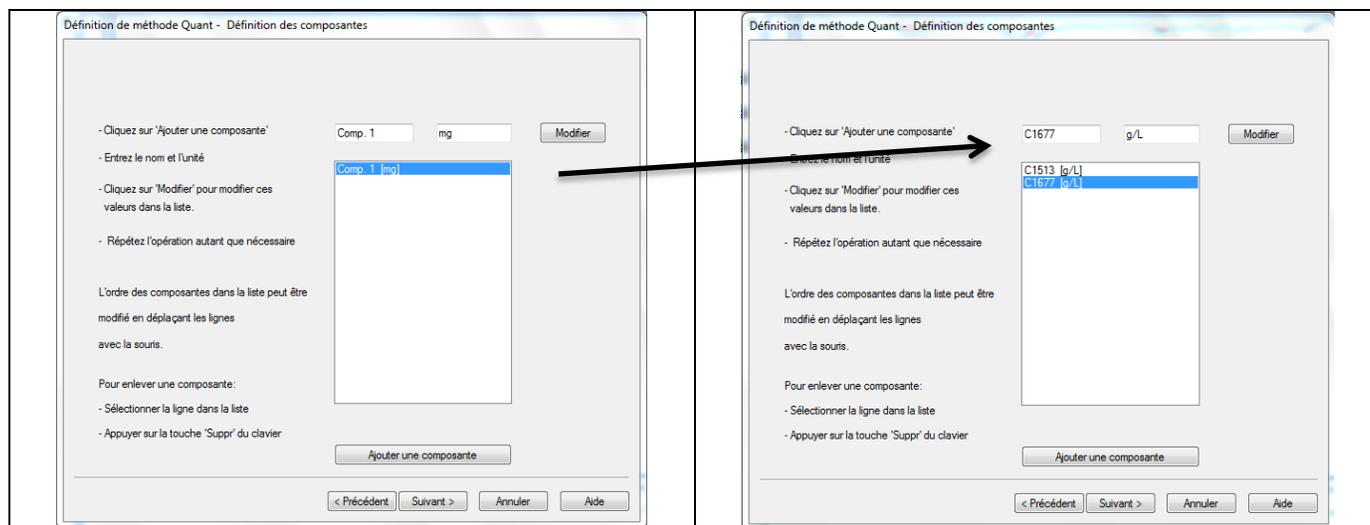
Dans la barre des menus : cliquer sur l'icône *Définition méthode Quant* , Une fenêtre apparaît : cliquer sur *Suivant* :



Une fenêtre apparaît : cliquer sur *Ajout d'une composante* :

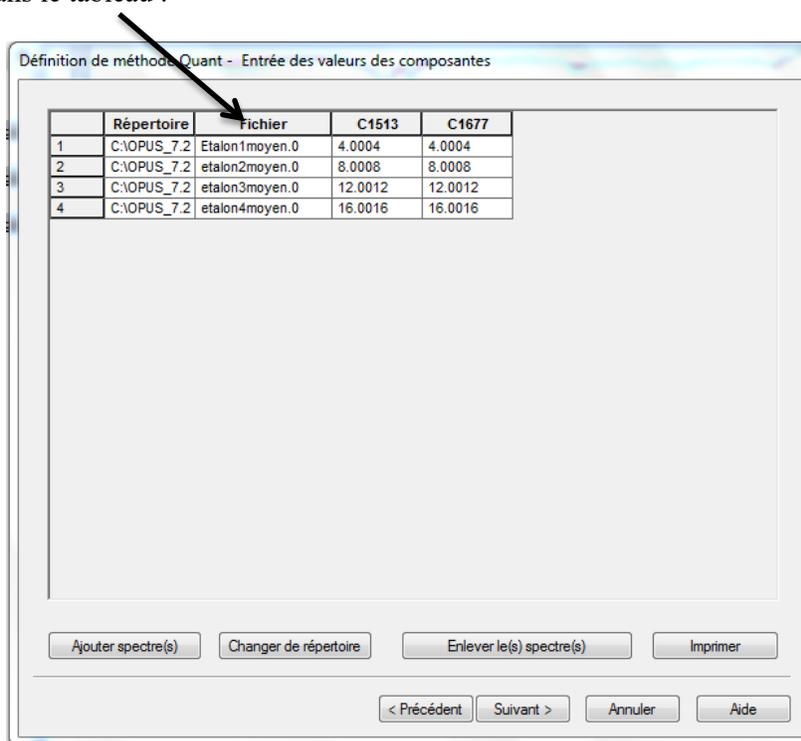


La fenêtre fait apparaître la composante 1 que l'on va renommer :



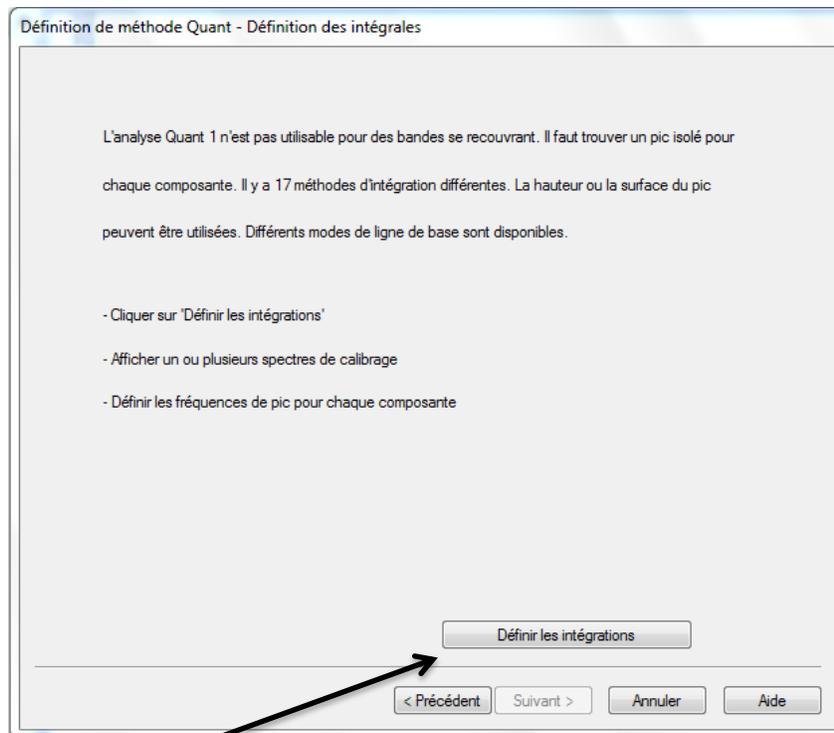
À la place de Comp. 1, rentrer la concentration C₁₁₄₈ et modifier l'unité, cliquer sur Modifier. Cliquer sur Suivant.

Une fenêtre apparaît : cliquer sur *Ajouter un spectre* : ouvrir le répertoire dans lequel se trouve vos spectres. Sélectionner les fichiers correspondant aux spectres des étalons, puis cliquer sur Ouvrir : ceux-ci apparaissent dans le tableau :



Dans la colonne C₁₁₄₈ du tableau, rentrer les valeurs des concentrations réelles. **ATTENTION** : utiliser le point et pas la virgule !

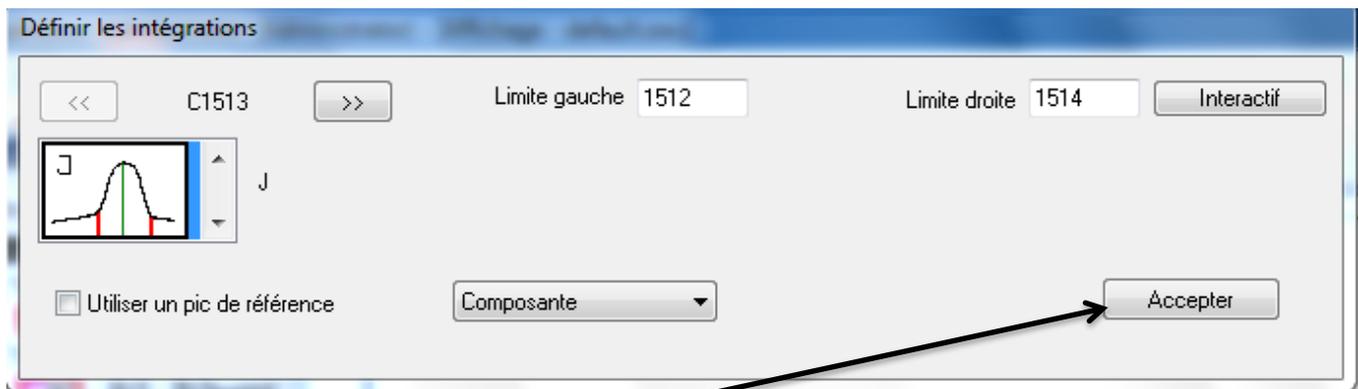
puis cliquer sur Suivant. Une fenêtre apparaît :



cliquer sur *Définition des intégrations* :

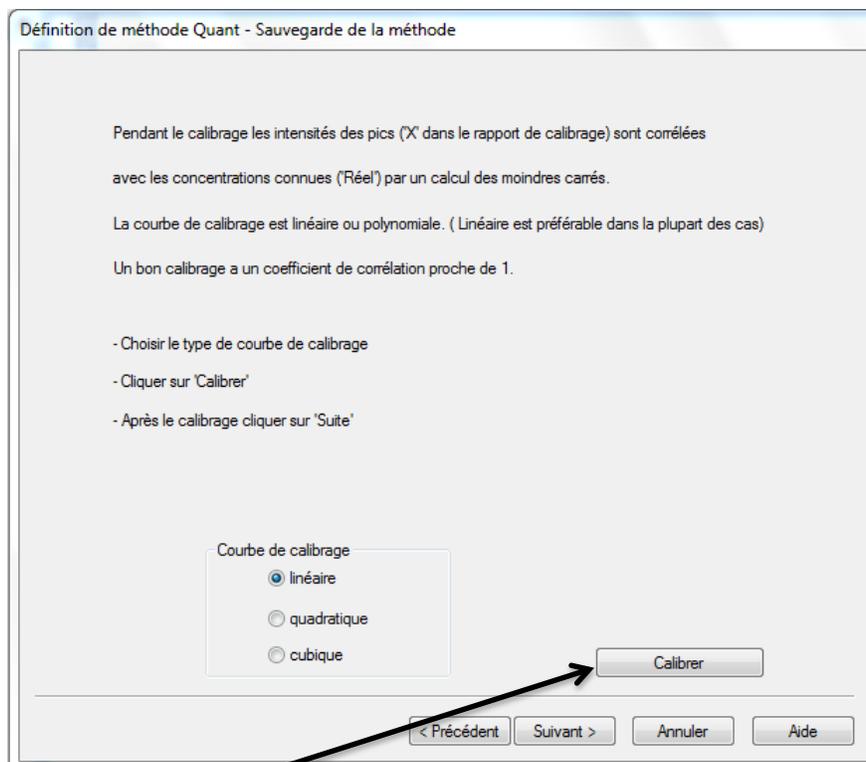
Pour C₁₁₄₈ Rentrer les valeurs limites des nombres d'ondes :
1146 et 1150.

Choisir la méthode d'intégration J, puis cliquer sur J afin qu'il soit pris en compte.



Cliquer sur Accepter,

Une nouvelle fenêtre apparaît :

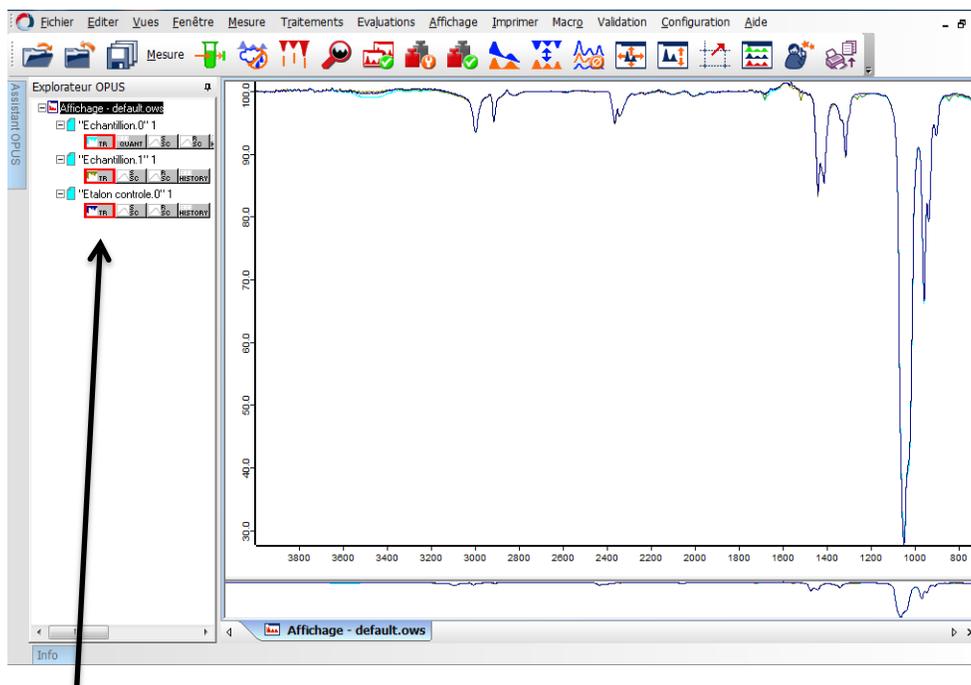


Cliquer sur Calibrer : on vous demande de sauvegarder la méthode, lui donner un nom, comme par exemple : **Calibrage-vitamineC-vos initiales**, puis cliquer sur Suivant.

Le **rapport de calibration** apparaît : cliquer sur Suivant, puis sur *Impression*, puis OK afin d'imprimer la **courbe de calibration**, puis cliquer sur *Terminer*.

2.2. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE L'ÉTALON DE CONTRÔLE ET DE L'INCONNUE

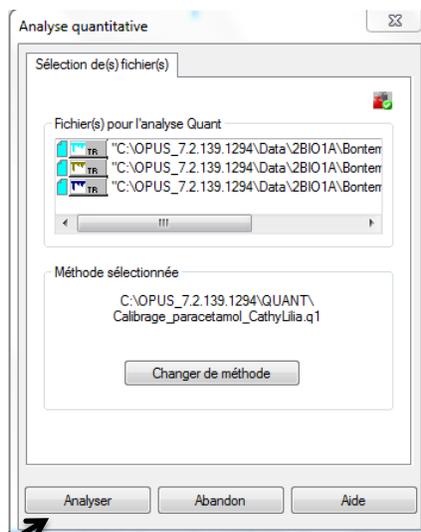
Les fichiers doivent être ouvert, si ce n'est pas le cas, charger les !



Sélectionner les spectres associés aux fichiers.

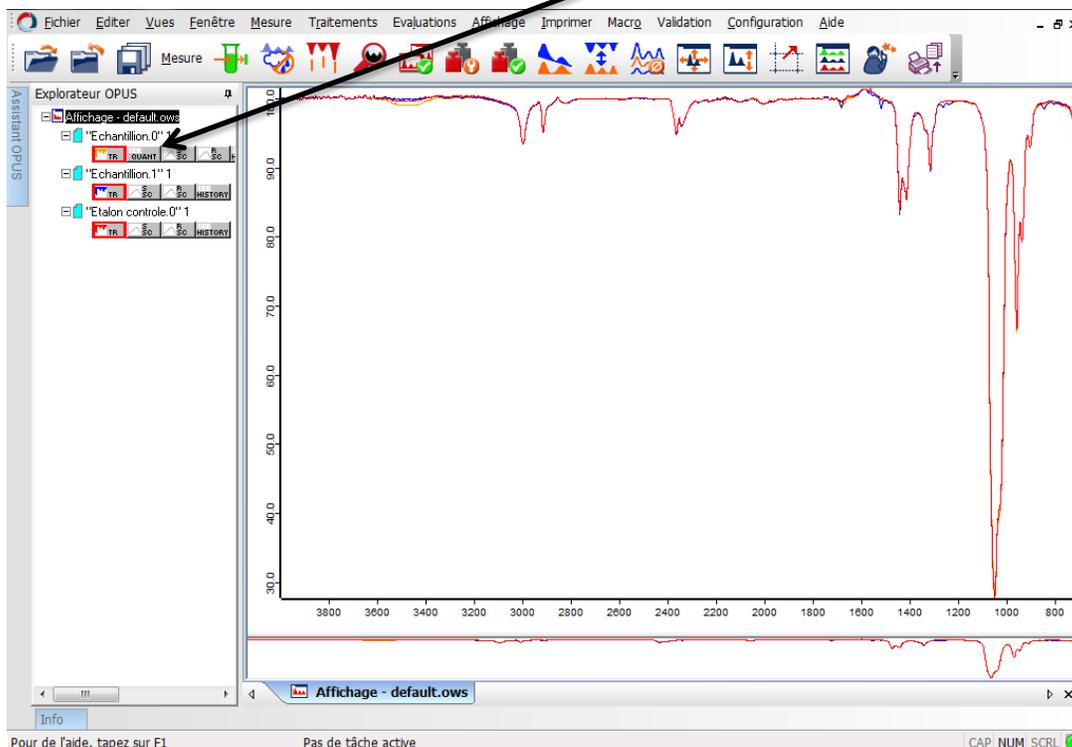
Dans la barre des menus : cliquer sur l'icône *Analyse Quantitative* ,

Vérifier que la Méthode sélectionnée soit la bonne !



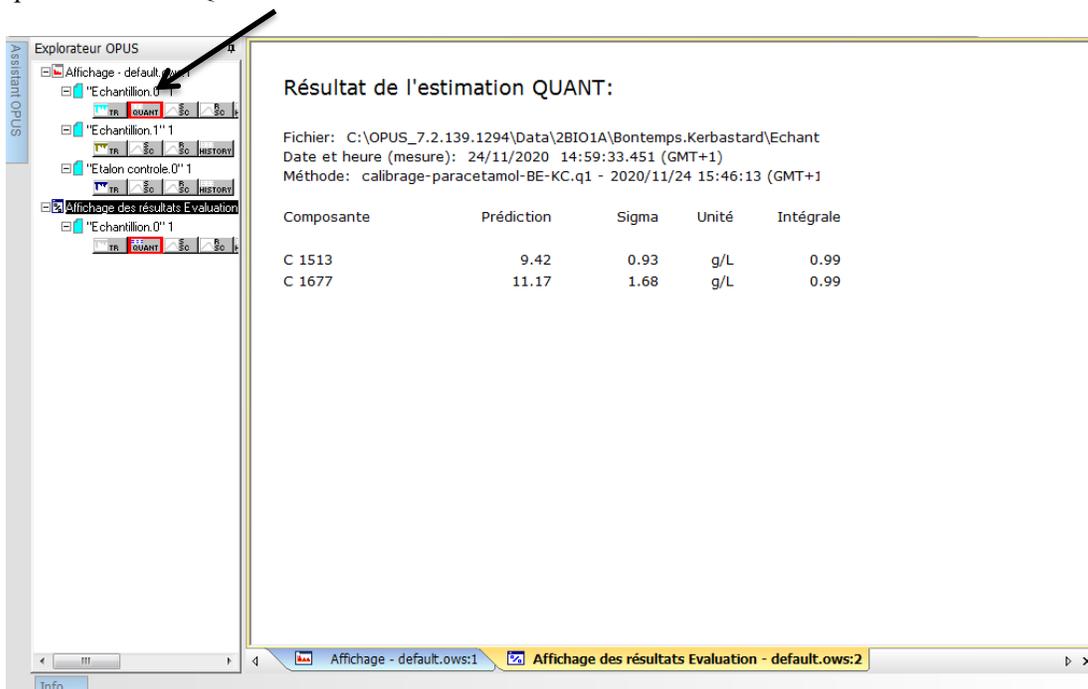
puis cliquer sur Analyser.

La fenêtre du logiciel fait apparaître une case supplémentaire (Quant) associée à chaque spectre :



Pour observer les résultats :

Cliquer sur la case Quant associée au 1^{er} fichier :



Sur la partie droite de l'écran apparaissent les résultats de dosage ou « Résultat de l'estimation QUANT ». Relever la valeur de concentration (Prédiction) correspondante avec son écart-type (Sigma).

3. ANALYSE QUALITATIVE DE SPECTRE IR PAR RÉFLEXION

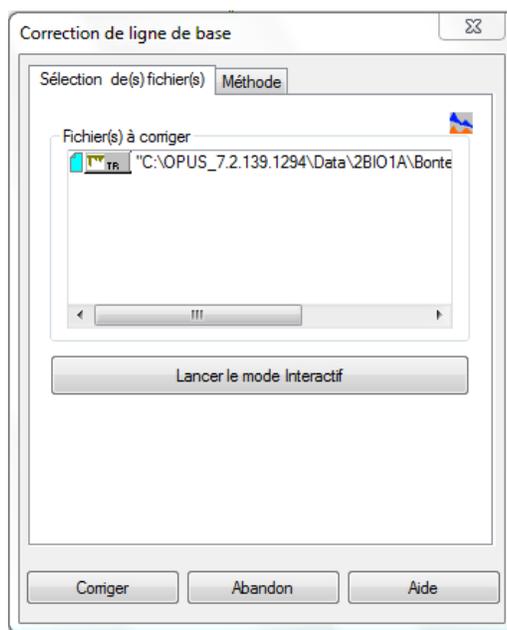
3.1. Acquisition du spectre IR de la vitamine C dans l'eau

☛ 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⁻¹**
- **Apodisation : Norton-Beer weak**
- **Range : 4000 - 600 cm⁻¹**

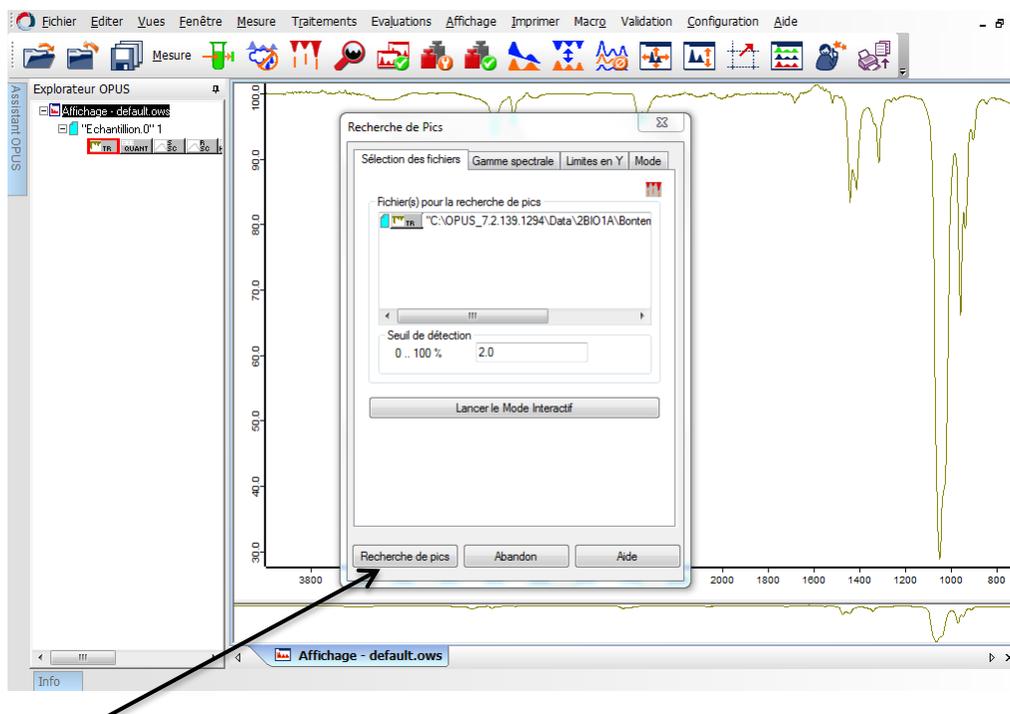
☛ Faire l'acquisition du spectre IR de la solution de vitamine C, réalisée pour le dosage, et sélectionner la case spectrale.

☛ 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.

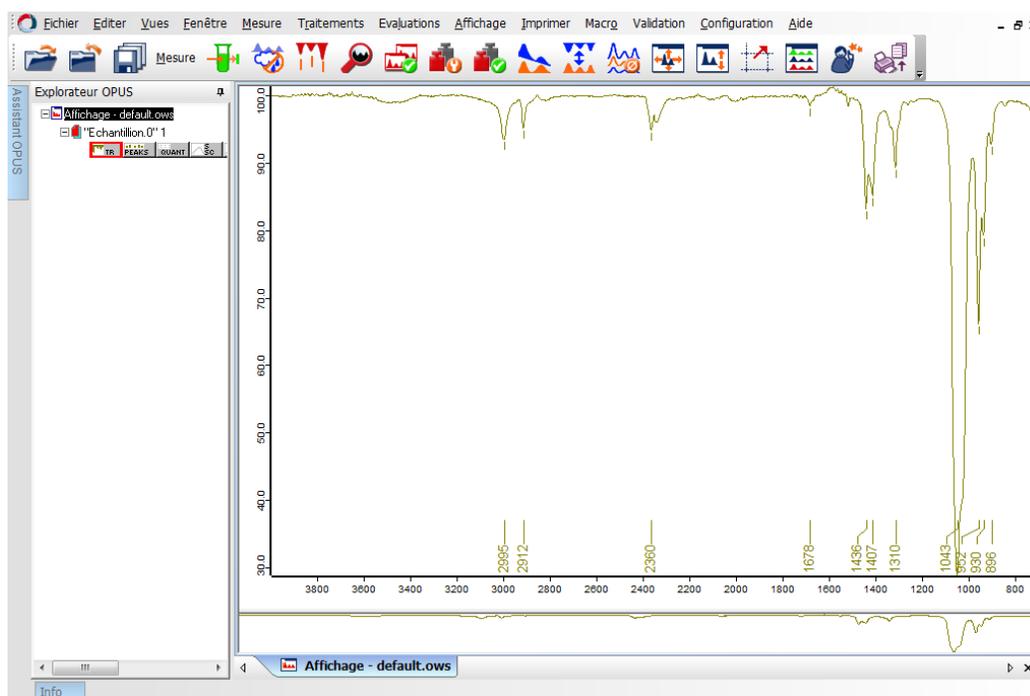
☞ Pour **obtenir la position des bandes** : cliquer sur l'icône :  , une fenêtre s'ouvre :



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 cm^{-1} signifie que deux bandes dont les centres sont séparés d'au moins 2 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 m^{-1} . Les spectroscopistes IR ont plutôt l'habitude d'utiliser le cm^{-1} (tous les spectrophotomètres IR ont leur abscisse en nombres d'onde exprimés en 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.