

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition

Comprendre votre module
d'analyse spectrale



Agilent Technologies

Avertissements

© Agilent Technologies, Inc. 1994-2012,
2013

Conformément aux lois nationales et internationales relatives à la propriété intellectuelle, toute reproduction totale ou partielle de ce manuel sous quelque forme que ce soit, par quelque moyen que ce soit, voie électronique ou traduction, est interdite sans le consentement écrit préalable de la société Agilent Technologies, Inc.

Microsoft® est une marque déposée de Microsoft Corporation aux Etats-Unis.

Référence du manuel

M8301-93170

Édition

01/13

Imprimé en Allemagne

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn, Allemagne

Révision du logiciel

Ce guide correspond aux révisions C.01.xx du logiciel Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, où xx désigne les révisions mineures du logiciel sans influence sur l'exactitude technique de ce guide.

Garantie

Les informations contenues dans ce document sont fournies « en l'état » et pourront faire l'objet de modifications sans préavis dans les éditions ultérieures. Dans les limites de la législation en vigueur, Agilent exclut en outre toute garantie, expresse ou implicite, quant à ce manuel et aux informations contenues dans ce dernier, notamment, mais sans s'y restreindre, toute garantie marchande et aptitude à un but particulier. En aucun cas, Agilent ne peut être tenu responsable des éventuelles erreurs contenues dans ce document, ni des dommages directs ou indirects pouvant découler des informations contenues dans ce document, de la fourniture, de l'usage ou de la qualité de ce document. Si Agilent et l'utilisateur ont souscrit un contrat écrit distinct dont les conditions de garantie relatives au produit couvert par ce document entrent en conflit avec les présentes conditions, les conditions de garantie du contrat distinct se substituent aux conditions stipulées dans le présent document.

Licences technologiques

Le matériel et le logiciel décrits dans ce document sont protégés par un accord de licence et leur utilisation ou reproduction sont soumises aux termes et conditions de ladite licence.

Limitation des droits

L'utilisation du logiciel dans le cadre d'un contrat principal ou de sous-traitance avec le Gouvernement américain est soumise à la réglementation fédérale des Etats-Unis régissant les logiciels informatiques commerciaux (DFAR 252.227-7014, juin 1995) ou les produits commerciaux (FAR 2.101(a)) ou les logiciels informatiques sous licences (FAR 52.227-19, juin 1987) ou toute réglementation ou clause de contrat

équivalente. L'utilisation, la duplication ou la publication de ce logiciel est soumise aux termes de la licence commerciale standard délivrée par Agilent Technologies. Conformément à la directive FAR 52.227-19(c)(1-2) (juin 1987), les droits d'utilisation accordés aux départements et agences rattachés au Gouvernement américain sont limités aux termes de la présente limitation des droits. Les droits d'utilisation accordés au Gouvernement américain dans le cadre des données techniques sont limités conformément aux directives FAR 52.227-14 (juin 1987) ou DFAR 252.227-7015 (b)(2) (novembre 1995).

Mentions de sécurité

ATTENTION

Une mention **ATTENTION** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, le produit risque d'être endommagé ou les données d'être perdues. En présence d'une mention **ATTENTION**, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

AVERTISSEMENT

Une mention **AVERTISSEMENT** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, les personnes risquent de s'exposer à des lésions graves. En présence d'une mention **AVERTISSEMENT**, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

Contenu de ce manuel

Ce manuel décrit les concepts sous-jacents au module d'analyse spectrale de la OpenLAB CDS ChemStation Edition. Il complète les informations du manuel Concepts et procédures par les notions de spectre spécifiques des systèmes ChemStation Agilent pour CPL 3D et EC, et la partie UV-visible de la ChemStation Agilent pour spectrométrie de masse.

1 Comprendre l'analyse spectrale

Ce chapitre couvre les points suivants :

- Qu'est-ce qu'une analyse spectrale ?
- Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale
- Styles de rapports spectraux

2 Bibliothèques spectrales

Les systèmes classiques quantifient les composés détectés à l'aide de corrélations basées sur les temps de rétention. Cela peut mener à une identification erronée, si :

- des composés autres que ceux étalonnés apparaissent dans la fenêtre de temps de rétention spécifiée,
- plus d'un pic apparaît dans la fenêtre de temps de rétention spécifiée ou
- le composé reste dans la colonne plus longtemps que la fenêtre spécifiée, en raison de variations de débit de solvant ou, plus fréquemment, de variations au niveau des caractéristiques de la colonne.

De telles erreurs peuvent être évitées grâce à un détecteur à barrette de diodes, puisque les spectres UV-visibles peuvent être utilisés pour confirmer l'identité d'un pic. Les spectres standard sont obtenus à partir d'un échantillon de référence dans des conditions chromatographiques bien définies et stockés dans une base de données (bibliothèque de spectres). Vous pouvez comparer les spectres de pic d'un échantillon inconnu à ceux stockés dans une ou plusieurs bibliothèques. Les spectres peuvent être superposés pour une comparaison visuelle, et l'ordinateur peut calculer la similarité entre les spectres standard et l'échantillon.

OpenLAB CDS ChemStation Edition peut automatiser cette procédure pour tous les pics d'un chromatogramme et pour tous les chromatogrammes

d'une séquence. En plus d'une telle analyse sur les pics, le logiciel peut effectuer un test de pureté des pics, en utilisant les paramètres de la boîte de dialogue Purity Preferences.

Ces résultats qualitatifs peuvent être associés aux résultats quantitatifs en un seul rapport. Ce rapport contient toutes les informations utiles au chimiste analyticien pour chaque pic d'une analyse :

- le nom du composé,
- la quantité,
- le temps de rétention,
- le facteur de correspondance d'identité et
- le facteur de correspondance de pureté.

Ce chapitre décrit les concepts des recherches en bibliothèque de spectres. Pour des informations sur ce type de recherche, reportez-vous à l'aide en ligne et au didacticiel intégré.

3 Evaluation de la pureté des pics

Ce chapitre décrit l'évaluation de pureté des pics.

Sommaire

1	Comprendre l'analyse spectrale	7
	Qu'est-ce qu'une analyse spectrale ?	8
	Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale	10
	Styles de rapports spectraux	13
2	Bibliothèques spectrales	15
	Modes de recherche	16
	Description du rapport	19
	Marqueur de pureté	19
	Marqueur de correspondance en bibliothèque	20
	Marqueur nom du composé	20
	Marqueur quantité	20
3	Evaluation de la pureté des pics	21
	Test de la pureté des pics	22
	En quoi consiste le test de pureté des pics ?	22
	Le facteur de correspondance	23
	Correction de fond par sélection d'un spectre de référence	25
	Techniques de pureté des pics	26
	Affichage de la pureté des pics	27
	Fenêtre Spectra	27
	Normalisation spectrale	28
	Fenêtre Purity	29
	Courbes de similarité spectrale	31
	Courbe de seuil	32
	Utilisation des spectres cibles spécifiques	35

Sommaire

Calcul de la pureté et affichage	36
Classification d'un pic comme pur ou impur	38
Informations sur la pureté des pics	39
Options évoluées de pureté des pics	41
Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic	43
Acquisition de spectres	43
Paramètres pour l'évaluation de la pureté d'un pic	44
Pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de masse	46
Calcul de pureté des pics à partir des spectres de masse	47
Affichage de la pureté des spectres de masse	48
Index	49

1

Comprendre l'analyse spectrale

Qu'est-ce qu'une analyse spectrale ? [8](#)

Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale [10](#)

Styles de rapports spectraux [13](#)



1 Comprendre l'analyse spectrale

Qu'est-ce qu'une analyse spectrale ?

Qu'est-ce qu'une analyse spectrale ?

L'analyse spectrale vous permet de traiter les données spectrales collectées par le détecteur UV-visible à barrette de diodes ou le détecteur fluorimétrique.

L'analyse spectrale des données ajoute une troisième dimension à vos données analytiques lorsque vous l'utilisez avec des données chromatographiques (voir [Figure 1](#)).

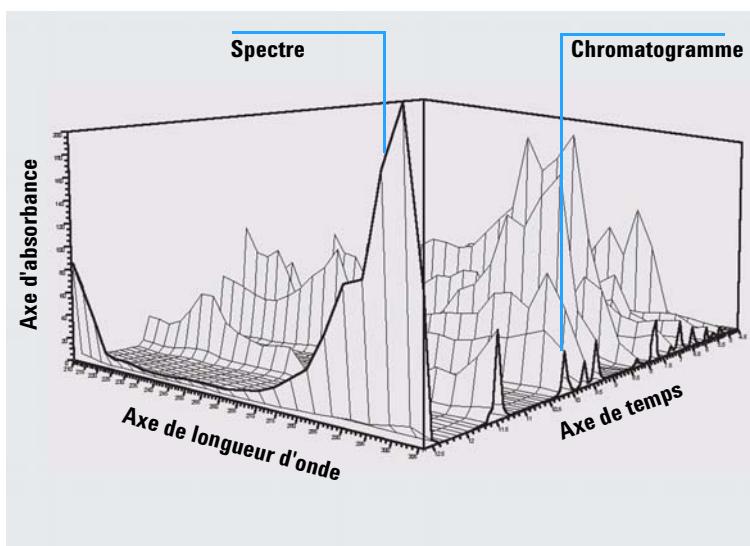


Figure 1 Informations spectrales

Détecteur UV-visible à barrette de diodes

Le détecteur UV-visible à barrette de diodes permet l'acquisition de spectres en continu dans la région spectrale UV-visible. Comme le détecteur à barrette de diodes prélève simultanément des spectres à toutes les longueurs d'onde, il n'y a pas de perte de sensibilité durant l'acquisition.

Détecteur fluorimétrique

Le détecteur fluorimétrique permet de collecter des données spectrales de trois façons différentes :

- vous pouvez fixer une longueur d'onde d'excitation et collecter les spectres d'émission,
- vous pouvez fixer une longueur d'onde d'émission et collecter les spectres d'excitation,
- vous pouvez effectuer un balayage fluorimétrique au cours duquel vous ferez varier les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour obtenir une caractérisation tridimensionnelle de l'échantillon.

Des spectres d'excitation et d'émission peuvent être collectés au cours d'une analyse chromatographique. Cependant, comme le détecteur fluorimétrique est un détecteur à balayage, plus les longueurs d'onde prélevées sont nombreuses (gamme de balayage large), plus la sensibilité de l'analyse est faible. Le balayage fluorimétrique tridimensionnel doit être effectué hors ligne ou en mode à flux stoppé car il est nécessaire que la concentration de l'échantillon dans la cellule soit constante tout au long de l'analyse.

Traitements spectraux

Vous pouvez traiter vos données spectrales de diverses façons. Par exemple, vous pouvez :

- extraire des signaux chromatographiques de données spectrales pour déterminer pour chaque pic la longueur d'onde optimale pour la détection,
- effectuer des recherches en bibliothèque de spectres pour obtenir une identification qualitative,
- calculer les ratios des signaux chromatographiques pour déterminer la pureté des pics et
- effectuer un test de pureté des pics pour découvrir des impuretés (cachées).

1 Comprendre l'analyse spectrale

Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale

Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale

Après avoir déterminé des conditions appropriées pour la séparation des pics, l'étape suivante du développement de méthode est la détermination de la longueur d'onde de détection optimale pour chaque pic.

Une technique consiste à présenter l'intensité du pic (absorbance ou luminescence), la longueur d'onde et le temps sous la forme d'une carte de lignes concentriques appelée tracé d'isoabsorbance. Cette technique permet de tracer les informations spectrales sous la forme d'une série de lignes d'isoabsorbance concentriques en fonction de la longueur d'onde et de la gamme de temps (3D). Cette technique vous permet d'afficher et de vérifier simultanément toutes les données spectrales. Voir l'affichage central de la [Figure 2](#).

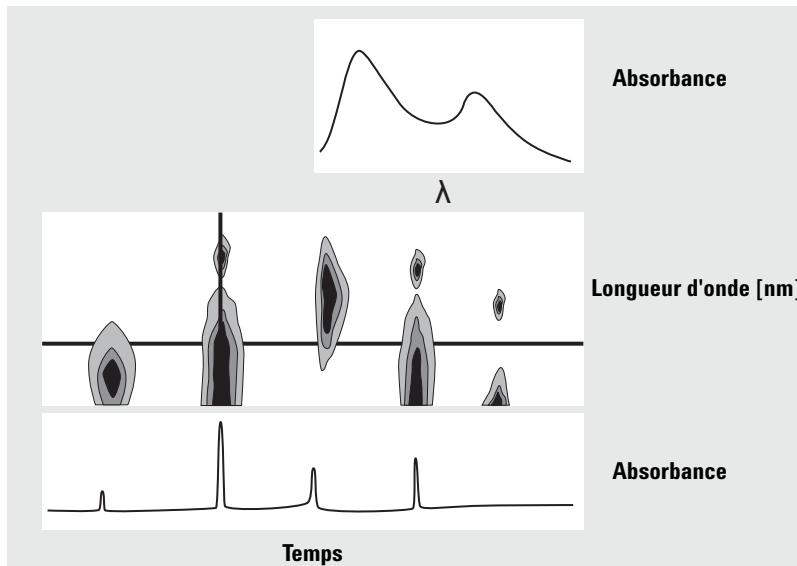


Figure 2 Tracé d'isoabsorbance

Cette technique est utile, en développement de méthode, pour trouver la longueur d'onde de détection optimale pour chaque pic. La longueur d'onde correspond à la position du curseur horizontal dans le tracé d'isoabsorbance. Lorsque le curseur est déplacé sur l'axe de longueur d'onde, le chromatogramme est reconstruit dans la fenêtre inférieure ; voir la [Figure 2](#) page 10.

Pour trouver la longueur d'onde de détection optimale pour un pic, procédez de la manière suivante :

- Sélectionnez Quick View (vue rapide) dans le champ Cursor (curseur) et déplacez le curseur horizontal dans l'affichage central, jusqu'à ce que l'absorbance du pic concerné soit la plus haute possible et qu'il y ait une bonne séparation chromatographique dans l'affichage inférieur.
- Sélectionnez Signal (vue de signal) dans le champ Cursor (curseur) et optimisez la bande passante pour augmenter le rapport signal/bruit, afin d'obtenir la longueur d'onde optimale pour la détection. Pour transférer le signal et la bande passante sélectionnés dans la fenêtre des signaux en mode analyse des données, cliquez sur le bouton Copy (copier). Le signal et la bande passante pourront ensuite servir pour tester les processus d'intégration, d'identification et de quantification.

Deux analyses sont généralement nécessaires à l'optimisation de la longueur d'onde pour le détecteur fluorimétrique :

- Programmez une longueur d'onde d'excitation dans le bas de la gamme UV (230 à 250 nm) et collectez des spectres d'émission. Pour chaque pic du chromatogramme, déterminez la longueur d'onde d'émission optimale à l'aide du tracé d'isoabsorbance.
- Préparez une table de chronoprogrammation pour déterminer la longueur d'onde d'émission optimale pour chaque pic lorsqu'il élue et collecter les spectres d'excitation.

1 Comprendre l'analyse spectrale

Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale

Spectre de fluorescence

Le tracé iso tridimensionnel est utilisé pour afficher des spectres obtenus par balayage fluorimétrique seulement. Dans ce cas, les informations spectrales sont tracées dans le plan longueur d'onde d'excitation/longueur d'onde d'émission. Il n'y a pas d'axe de temps car le balayage fluorimétrique est effectué soit en mode à flux stoppé, soit hors ligne. On peut déterminer, à partir du tracé iso, des spectres d'excitation ou d'émission à n'importe quelle longueur d'onde ; les spectres d'excitation figurent au-dessus du tracé iso (curseur vertical), les spectres d'émission en dessous du tracé iso (curseur horizontal).

Styles de rapports spectraux

Les styles de rapports suivants sont disponibles avec le module spectral :

- Library Search

Produit un rapport étalonné incluant les résultats de recherche en bibliothèque. Les numéros de pic, temps de rétention, facteurs de recherche en bibliothèque, quantités et noms de composé sont imprimés d'après les paramètres spécifiés dans la boîte de dialogue Automated Library Search. Pour un complément d'information, reportez-vous au paragraphe ["Description du rapport"](#) page 19.

- Short + Spectrum

Inclut les conditions instrumentales, un chromatogramme, des résultats quantitatifs, et des informations sur la pureté des pics.

- Detail + Spectrum

Inclut un titre, les conditions instrumentales, un chromatogramme, des résultats quantitatifs, des courbes d'étalonnage et des informations sur la pureté des pics. Le titre est stocké dans un fichier appelé RPTHEAD.TXT, dans le répertoire des méthodes. Vous pouvez modifier le titre à l'aide d'un éditeur de texte, pour inclure un texte propre à la méthode.

- Performance + Lib. Search

Combine les styles Performance et Library Search.

Informations sur la pureté des pics

Les informations sur la pureté des pics concernent l'évaluation des spectres au travers des pics, résultant en tracés de pureté pour chaque composé. Ces tracés comprennent les spectres superposés et normalisés, ainsi que les signaux normaux et superposés. Les tracés de pureté peuvent également inclure des courbes de seuil et de similarité, selon les valeurs des préférences de pureté (Purity Preferences) pour la méthode.

1 Comprendre l'analyse spectrale

Styles de rapports spectraux

Les calculs numériques incluent le facteur de pureté, mesure de la similarité dans la forme des spectres. Pour des informations supplémentaires sur la pureté des pics, voir le [Chapitre 3](#), "Evaluation de la pureté des pics".

2

Bibliothèques spectrales

Modes de recherche 16

Description du rapport 19

Marqueur de pureté 19

Marqueur de correspondance en bibliothèque 20

Marqueur nom du composé 20

Marqueur quantité 20



2 Bibliothèques spectrales

Modes de recherche

Modes de recherche

Trois modes de recherche peuvent être utilisés. Une bibliothèque de spectres *et* une table d'étalonnage sont nécessaires pour les trois modes. Un test de pureté des pics peut être ajouté en option.

- Identification par recherche dans une bibliothèque de spectres.

Ce mode de recherche est le plus général. La ChemStation utilise le chromatogramme comme base pour la recherche en bibliothèque. Elle compare le spectre de *tous les pics trouvés par l'intégrateur* et caractérisés par leurs temps de rétention, avec les spectres d'une à quatre bibliothèques spécifiées. Pour accélérer le processus ou accroître la fiabilité, vous pouvez réduire la recherche aux spectres qui entrent dans une certaine fenêtre de temps de rétention, en utilisant le modèle Library Search. Voir la [Figure 3](#).

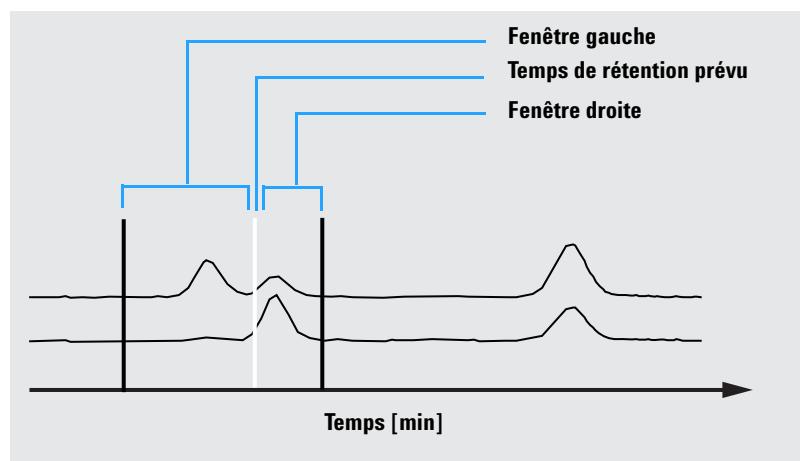


Figure 3 Fenêtre du temps de rétention

Le nom du composé qui correspond le mieux est assigné au pic. Vous pouvez spécifier la précision de la correspondance grâce à votre propre valeur de seuil. Si un facteur de correspondance meilleur que le seuil est trouvé, le pic est signalé comme *identifié*. La ChemStation se

rapporte à la table d'étalonnage pour trouver une entrée de même nom. S'il en existe une, les données sont utilisées pour calculer et rapporter la quantité.

Si aucun nom correspondant n'est trouvé dans la table d'étalonnage, l'identité du pic est donnée, mais, la méthode n'étant pas étalonnée pour le composé, aucune quantité n'est calculée.

Cette méthode est recommandée pour rechercher des composés inconnus dans une analyse. Elle est plus efficace quand le nombre de composés dans le chromatogramme est faible par rapport au nombre d'entrées dans la bibliothèque.

- Analyse d'un composé cible en utilisant une table d'étalonnage.

Ce mode de recherche n'est destiné qu'aux composés pour lesquels la méthode est étalonnée. La ChemStation compare, *uniquement pour des composés étalonnés*, les spectres des pics avec les spectres d'une à quatre bibliothèques spécifiées. Les pics sont seulement signalés comme identifiés si confirmés par comparaison spectrale. Les noms de composé définis dans la table d'étalonnage doivent être identiques à ceux définis dans la bibliothèque.

Une fenêtre cible pour les temps de rétention peut être spécifiée dans le cadre de la méthode de recherche. Seuls les pics pour lesquels le temps de rétention entre dans la fenêtre cible sont utilisés dans l'identification. La meilleure correspondance est signalée comme identifiée seulement lorsqu'elle dépasse le seuil fixé.

Ce mode est recommandé pour rechercher des composés étalonnés spécifiques dans le chromatogramme. Il est préférable au premier mode de recherche quand le chromatogramme contient un grand nombre de composés, mais que seul un petit nombre, ceux qui sont intéressants, sont étalonnés.

- Analyse d'un composé cible en utilisant une bibliothèque de spectres.

Dans ce cas, la recherche concerne toutes les entrées de la bibliothèque, pas seulement celles qui figurent aussi dans la table d'étalonnage. La ChemStation utilise la bibliothèque de spectres comme base. Elle compare *tous les spectres de la bibliothèque* avec ceux des pics du chromatogramme, et essaie d'identifier tous les pics trouvés par l'intégrateur qui entrent dans la fenêtre de temps de rétention spécifiée pour les entrées de la bibliothèque et dans le modèle de recherche en bibliothèque. Seuls les pics pour lesquels le temps de rétention entre

2 Bibliothèques spectrales

Modes de recherche

dans la fenêtre cible sont utilisés dans l'identification. Quand une correspondance dépasse le seuil que vous avez fixé, le pic est signalé comme identifié. La quantification continue, fondée sur le nom de ce composé dans la table d'étalonnage. Si le composé existe à la fois dans la bibliothèque et dans la table d'étalonnage, il est signalé comme étalonné et identifié. S'il n'est pas dans la table d'étalonnage, il est signalé comme non étalonné.

Ce mode est recommandé si vous avez installé des bibliothèques contenant des groupes spécifiques de composés. Par exemple, vous pouvez avoir une bibliothèque contenant les vitamines hydrosolubles, et une autre contenant les vitamines liposolubles. Vous pouvez alors rechercher de tels composés dans le chromatogramme. Si le chromatogramme contient un grand nombre de composés alors que la bibliothèque n'en contient qu'un petit nombre, ce mode est préférable au premier.

- Test de pureté des pics

Le test de pureté des pics est facultatif. Il est recommandé avant une recherche en bibliothèque, la fiabilité de la correspondance dépendant de la qualité de séparation. La ChemStation compare la cohérence des spectres dans différentes parties de chaque pic. Elle calcule et rapporte un facteur de pureté. La pureté peut être définie par un seuil, au-dessous duquel les résultats sont considérés comme douteux et marqués avec un *x* dans le rapport. Pour des informations supplémentaires sur la pureté des pics, voir le [Chapitre 3, "Evaluation de la pureté des pics"](#).

Description du rapport

Un rapport type fourni par une recherche en bibliothèque de spectres inclut les informations suivantes :

- un chromatogramme/électrophérogramme annoté avec les temps de rétention/migration,
- un titre avec des informations sur les noms des fichiers et les paramètres de recherche,
- une description du signal du détecteur et deux tables d'analyse,
- les temps de rétention des pics trouvés dans l'analyse,
- les temps de rétention des candidats à une correspondance en bibliothèque,
- les temps de rétention contenus dans la table d'étalonnage et
- les quantités de composé et leur facteur de pureté (s'il est sélectionné), avec :
 - le numéro d'entrée de bibliothèque,
 - le facteur de correspondance en bibliothèque,
 - le nom du composé.

Dans d'autres colonnes du rapport de recherche en bibliothèque, certains marqueurs sont utilisés pour la pureté du composé, sa correspondance et son nom.

Ces marqueurs peuvent être interprétés comme l'indiquent les étapes ci-dessous.

Marqueur de pureté

Pour les composés impurs, les spectres sur les pentes montante et descendante du pic sont normalement différents et, par conséquent, tous deux sont utilisés pour la recherche en bibliothèque.

- u :** Composé impur et spectre sur la pente montante utilisé pour l'identification.

2 Bibliothèques spectrales

Description du rapport

- d** : Composé impur et spectre sur la pente descendante utilisé pour l'identification.

Marqueur de correspondance en bibliothèque

- x** : Facteur de correspondance inférieur au seuil donné.

Marqueur nom du composé

- ?** : Composé identifié avec un facteur de correspondance inférieur au seuil donné.
- ??** : Composé identifié avec un nom déjà attribué à un autre composé avec une meilleure correspondance. Pour ce composé spécifique, une meilleure correspondance avec un nom unique n'a pu être trouvée.

Marqueur quantité

- +** : Quantité individuelle haute : la limite fixée dans Compound Details est dépassée.
- : Quantité individuelle basse : la limite fixée dans Compound Details est dépassée.

Les pics qui ne correspondent à aucune entrée dans la table d'étalonnage sont énumérés dans une table séparée appelée Uncalibrated Compounds.

3

Evaluation de la pureté des pics

Test de la pureté des pics	22
En quoi consiste le test de pureté des pics ?	22
Le facteur de correspondance	23
Correction de fond par sélection d'un spectre de référence	25
Techniques de pureté des pics	26
Affichage de la pureté des pics	27
Fenêtre Spectra	27
Normalisation spectrale	28
Fenêtre Purity	29
Courbes de similarité spectrale	31
Courbe de seuil	32
Utilisation des spectres cibles spécifiques	35
Calcul de la pureté et affichage	36
Classification d'un pic comme pur ou impur	38
Informations sur la pureté des pics	39
Options évoluées de pureté des pics	41
Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic	43
Acquisition de spectres	43
Paramètres pour l'évaluation de la pureté d'un pic	44
Pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de masse	46
Calcul de pureté des pics à partir des spectres de masse	47
Affichage de la pureté des spectres de masse	48

Cette section décrit les diverses méthodes que vous pouvez utiliser pour évaluer la pureté des pics.



3 Evaluation de la pureté des pics

Test de la pureté des pics

Test de la pureté des pics

Dans toute analyse chromatographique se pose la question importante de savoir si le pic comprend un ou plusieurs composants. En contrôle de qualité, les impuretés cachées derrière le pic concerné peuvent fausser les résultats. En analyse de recherche, un composant caché et non détecté risque d'entraîner la perte d'informations essentielles et utiles pour les travaux de recherche.

En quoi consiste le test de pureté des pics ?

Un test de pureté montre si un pic est pur ou s'il contient des impuretés. Ce résultat se fonde sur la comparaison des spectres enregistrés pendant l'élution du pic. On utilise cinq spectres par pic pour évaluer la pureté : deux spectres sur chaque pente (montante et descendante) et un au sommet (ou spectre au sommet). On fait la moyenne des cinq spectres et on les compare à tous les autres spectres enregistrés dans le pic.

Si les spectres du pic ne sont pas identiques au spectre moyen, le pic contient théoriquement une impureté spectrale. Cette impureté spectrale peut être due à un ou plusieurs composants, des pics non séparés à la ligne de base ou une absorption de fond.

NOTE

Le pic peut contenir des impuretés même si les spectres sont identiques. Cela peut se produire si l'absorption spectrale est faible par rapport au composé principal, ou si l'impureté et le composé principal ont un spectre identique ou très voisin, avec des temps d'élution similaires.

La fenêtre Spectra contient les spectres de pic comportant les spectres de comparaison (moyens) tracés dans un mode normalisé et superposé. La fenêtre Purity contient les signaux avec des informations de pureté en superposition. Le facteur de pureté est une mesure de similarité dans la forme des spectres.

Il est possible de détecter l'impureté d'un pic même en présence d'une absorption de fond, qui peut être corrigée. Généralement, l'absorption de fond ne perturbe pas la quantification du pic, puisqu'elle influence également la hauteur du début et de la fin du pic qui est retirée par la correction de la ligne de base. Les absorptions de fond peuvent changer si l'on utilise différents solvants ou une composition de solvants différente dans une analyse.

Le facteur de correspondance

La détection d'impureté des pics par comparaison spectrale visuelle demande beaucoup de temps et ne convient pas aux opérations automatisées. La comparaison automatisée des spectres peut s'effectuer par plusieurs techniques statistiques. L'une de ces techniques est la comparaison mathématique de deux spectres. Celle-ci calcule un facteur de correspondance représentant le degré de similarité des spectres.

La comparaison des deux spectres donne le facteur de correspondance, défini comme suit :

$$\text{Match Factor} = \frac{10^3 \times \left\{ \sum x \times y - \left(\frac{\sum x \times \sum y}{n} \right) \right\}^2}{\left\{ \sum x^2 - \left(\frac{\sum x \times \sum x}{n} \right) \right\} \times \left\{ \sum y^2 - \left(\frac{\sum y \times \sum y}{n} \right) \right\}}$$

Les valeurs x et y sont des absorbances mesurées, respectivement, dans le premier et le second spectres à la même longueur d'onde ; n est le nombre de points de données et Σ la somme des données. Aux extrêmes, un facteur de correspondance de 0 indique qu'il n'y a pas de correspondance et 1 000 indique des spectres identiques. En général, des valeurs supérieures à 990 indiquent que les spectres sont similaires. Entre 900 et 990, elles indiquent un certain degré de similarité, mais le résultat doit toutefois être interprété avec prudence. Au-dessous de 900, les spectres sont différents.

Un certain nombre de paramètres sont pris en compte pour déterminer le facteur de correspondance. Ils dépendent de l'échantillon et de la méthode de séparation utilisée. Ils incluent la spécificité des composés, l'absorption

3 Evaluation de la pureté des pics

Test de la pureté des pics

spectrale des composés de matrice, le niveau de bruit spectral, ainsi que l'absorption de fond et les décalages spectraux causés par le solvant ou des instruments différents (étalonnages avec des longueurs d'onde différentes).

Lissage des spectres

La fiabilité d'un test de pureté est limitée lorsque le bruit spectral est du même ordre que le spectre. Le lissage des spectres fonctionne ainsi :

- 1 Pour un nombre déterminé de points de données, par exemple 5, également désigné comme le filtre, on utilise une régression cubique pour déterminer un nouveau point de données.
- 2 Le filtre avance alors d'un point, prenant les 4 derniers points de données déjà utilisés et un point supplémentaire, et ainsi de suite.

Le fait d'utiliser l'algorithme de lissage permet de réduire le bruit statistique, l'identification du spectre lissé est de ce fait plus fiable.

NOTE

L'algorithme de lissage peut également changer le profil d'un spectre selon la longueur du filtre, c'est-à-dire le nombre de points de données utilisés à la fois dans l'algorithme. Il est conseillé de lisser tous les spectres avec le même filtre, avant toute comparaison.

Application du "splining" (reconstruction) à des spectres

Si vous avez acquis des spectres en basse résolution, il vous est possible d'utiliser la fonction de reconstruction pour que votre spectre ressemble plus à une ligne incurvée qu'à un polygone. Pour cela, il faut calculer des points de données supplémentaires entre les points de données d'origine de votre spectre en utilisant des fonctions trigonométriques. Lors de l'utilisation de la fonction de reconstruction, les points de données d'origine sont conservés.

Spectres logarithmiques

Les spectres logarithmiques compriment l'échelle des absorbances. Ils peuvent être utiles si les absorbances couvrent une très grande gamme.

Spectres dérivés

Les spectres dérivés révèlent des détails plus spécifiques que les spectres d'origine lors de la comparaison de différents composés. Les petites différences dans les spectres sont bien plus évidentes et plus faciles à identifier visuellement. Toutefois, le bruit augmente, ce qui limite l'utilisation des spectres dérivés.

Correction de fond par sélection d'un spectre de référence

Il existe plusieurs types de correction pour extraire les spectres de pic du fichier de données afin de procéder aux corrections de fond :

Sélection manuelle d'une référence

Lorsque vous choisissez un spectre de référence, le spectre retenu au moment spécifié est pris du fichier de données et soustrait de chaque spectre de pic. Cette correction ne convient pas pour une absorption de fond changeante.

Quand deux spectres de ligne de base sont choisis, une interpolation linéaire est effectuée entre les deux spectres. Un spectre de référence reconstruit sur la base de l'interpolation linéaire est soustrait de chaque spectre de pic. Cette correction permet de compenser une absorption de fond à changement lent.

Sélection automatique d'une référence

Dans ce mode, les spectres de référence choisis sont fonction du mode de stockage des spectres dans le fichier de données.

All Spectra (tous les spectres) : Les spectres de début et de fin de pic intégré du pic sélectionné sont choisis comme référence et interpolés linéairement comme dans le cas d'une sélection de référence manuelle avec deux spectres de référence.

Peak-Controlled Spectra (spectres contrôlés par les pics) : Le spectre de ligne de base le plus proche du pic est choisi comme référence et soustrait comme dans le cas d'une sélection de référence manuelle avec un spectre de référence.

3 Evaluation de la pureté des pics

Test de la pureté des pics

Techniques de pureté des pics

Les techniques de pureté des pics ne sont utilisables qu'avec des pics qui ont une séparation de ligne de base. Si cette séparation n'existe pas, la pureté des pics est plus compliquée car les pics voisins constituent une impureté pour chaque pic.

La pureté des pics peut être déterminée de manière interactive pic par pic pour tous les pics provenant d'un certain fichier de données ou automatiquement à la fin de chaque analyse dans le cadre de la méthode, lorsqu'on utilise un rapport spectral, par exemple Detail + Spectrum.

Vous pouvez optimiser l'exactitude ou les performances de la pureté des pics, en définissant des préférences dans les domaines suivants :

- gamme de longueurs d'onde utilisée pour déterminer la pureté,
- spectres de référence,
- seuil de pureté,
- traitement spectral, y compris les facteurs logarithmiques, de lissage et de reconstruction ("splining"), et l'ordre de la dérivée,
- facteurs de pureté calculés et affichés (notamment les spectres, les différences spectrales, les signaux, et les courbes de similarité et de seuil).

Les techniques que vous pouvez utiliser pour juger de la pureté des pics, qui sont décrites dans les sections suivantes, comprennent :

- la normalisation spectrale :
comparaison de spectres normalisés à différentes parties de pic,
- la courbe de similarité :
comparaison d'un spectre moyen ou défini à tous les autres spectres pris au moment de l'élution du pic.

Affichage de la pureté des pics

Fenêtre Spectra

La fenêtre des spectres affiche les cinq spectres utilisés pour calculer le spectre moyen utilisé dans le calcul de pureté. Vous pouvez utiliser les outils de manipulation graphique de la ChemStation Agilent pour observer les spectres de pic en détail.

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

Normalisation spectrale

Une technique d'évaluation de pureté des pics commune associe normalisation et comparaison de spectres collectés au travers du pic. La normalisation compense le changement de concentration du composant passant au travers de la cellule du détecteur durant l'élation du pic. C'est une des fonctions d'affichage spectrales de la ChemStation Agilent.

Les spectres sont acquis, par exemple, sur la pente montante, au sommet, et sur la pente descendante du pic. Les spectres sont normalisés et superposés pour une présentation graphique. Cette technique est excellente pour l'évaluation interactive des données et elle est adaptable aux analyses de routine automatisées.

Si un facteur numérique semble préférable, les spectres des pentes montante et descendante peuvent être comparés mathématiquement et les facteurs de pureté peuvent être imprimés pour chaque pic avec le temps de rétention.

La [Figure 4](#) montre un exemple dans lequel les spectres ont été acquis sur la pente montante, au sommet, et sur la pente descendante des pics, puis normalisés. La différence entre les pics purs et impurs apparaît clairement, tant par la comparaison visuelle que par le facteur de pureté calculé par le logiciel.

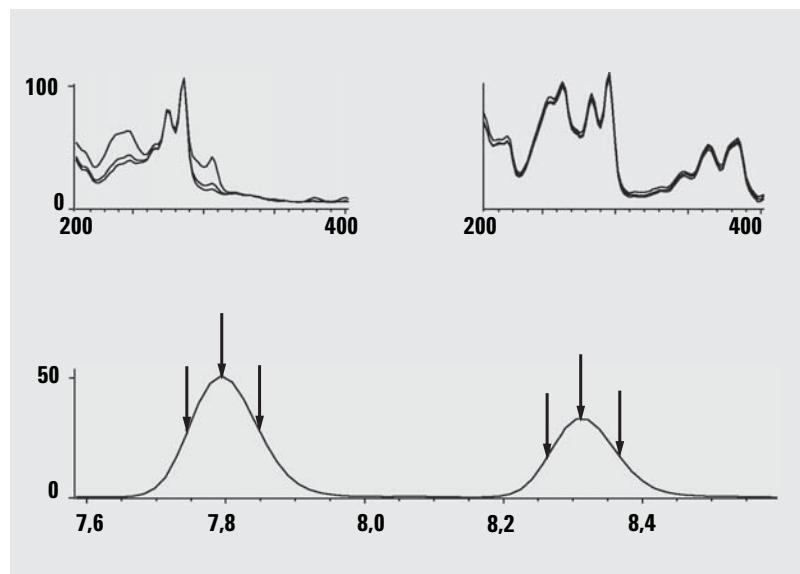


Abbildung 4 Test de la pureté des pics par superposition de spectres

Fenêtre Purity

Le contenu de la fenêtre Purity est fonction des paramètres de pureté retenus. L'affichage Purity Ratio (rapport de pureté) est utilisé par défaut. Il montre les signaux avec les courbes de similarité et de seuil en superposition (voir la [Figure 5](#)). Les bandes vertes et rouges sous l'affichage correspondent au seuil de pureté défini par l'utilisateur. La valeur de pureté calculée pour chaque spectre du pic est indiquée par un point noir ; s'il est à l'intérieur de la bande verte, la pureté du spectre se situe dans les limites acceptables de pureté que vous avez fixées.

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

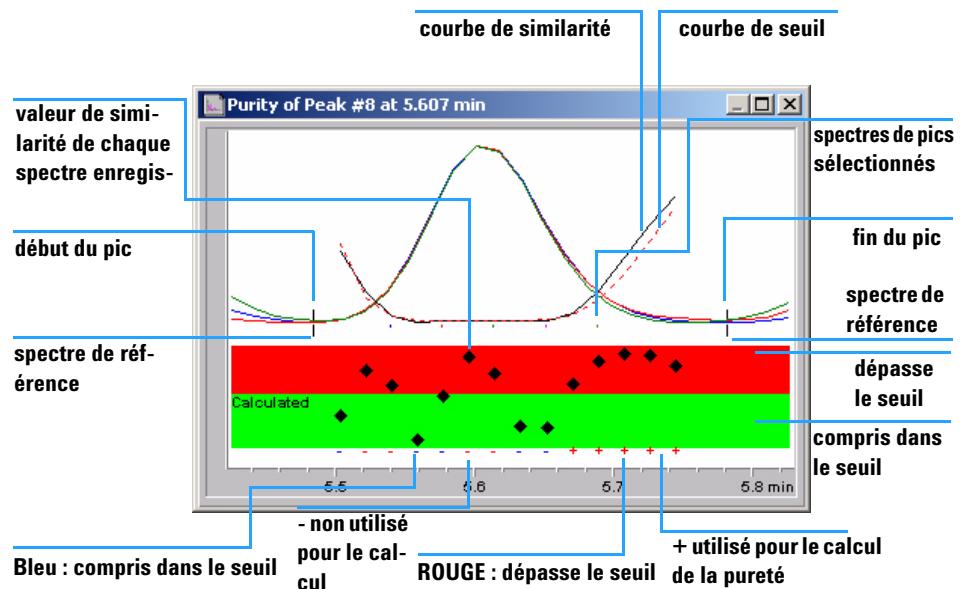


Abbildung 5 Fenêtre Purity

Courbes de similarité spectrale

Les courbes de similarité spectrale sont affichées dans la fenêtre Purity de l'affichage Spectra (voir la [Figure 5](#) de la page 30).

Si certains détails ne sont pas clairs, vous pouvez faire un zoom en déplaçant la souris tout en maintenant son bouton gauche enfoncé. Parallèlement à ce déplacement, une zone est dessinée à l'écran. Pour retrouver l'affichage original non agrandi, cliquez deux fois sur le bouton gauche de la souris.

Les courbes de similarité spectrale donnent le plus de détails sur la pureté ou l'impureté d'un pic. Tous les spectres d'un pic sont comparés à un spectre ou plus, par défaut un spectre moyen. Le degré de correspondance, ou *similarité spectrale*, est tracé dans le temps pendant l'élution. Le profil idéal d'un pic pur est une ligne plate à 1 000, comme illustré à la [Figure 6 \(a\)](#).

Au début et à la fin de chaque pic, là où le rapport signal/bruit diminue, la contribution du bruit de fond spectral aux spectres du pic devient significative. La contribution du bruit à la courbe de similarité est illustrée à la [Figure 6 \(b\)](#).

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

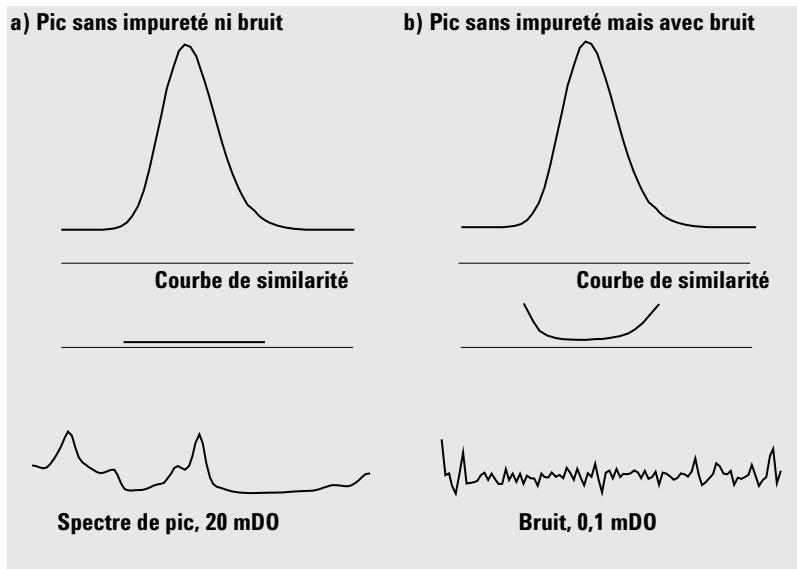


Abbildung 6 Courbes de similarité pour un pic pur avec et sans bruit tracé en relation avec le facteur de similarité idéal (1 000) et la valeur de seuil définie par l'utilisateur (980)

Courbe de seuil

La courbe de seuil montre l'effet du bruit sur une courbe de similarité donnée. L'effet augmente rapidement vers le début et la fin d'un pic. Autrement dit, une courbe de seuil est une courbe de similarité d'un pic pur, avec un composant de bruit de fond.

L'influence du bruit est illustrée dans la [Figure 7](#). Le facteur de similarité diminue avec un rapport signal/bruit décroissant ou un niveau de bruit constant avec une plage d'absorbance décroissante.

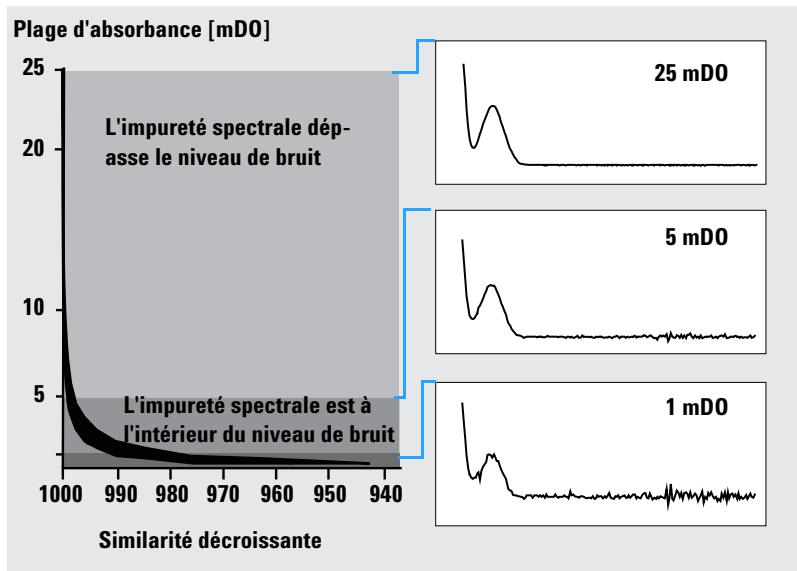


Abbildung 7 Facteur de similarité comme fonction du niveau de bruit

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

La [Figure 8](#) (a) montre les courbes de similarité et de seuil d'un pic pur avec du bruit, la [Figure 8](#) (b) celles d'un pic impur.

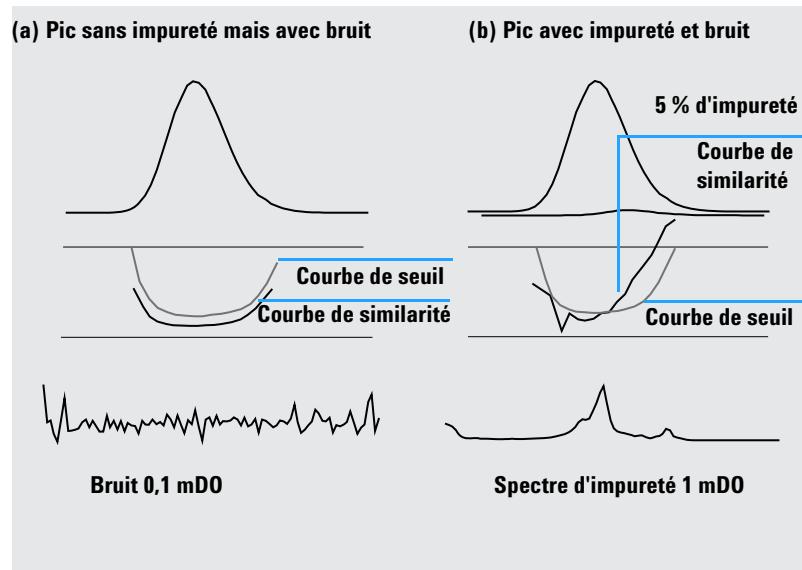


Abbildung 8 Influence de l'impureté et du bruit sur les courbes de similarité et de seuil

Le seuil de bruit est déterminé automatiquement, d'après l'écart type entre des spectres de bruit purs à un moment spécifique. Par défaut, il s'agit des 14 premiers spectres de l'analyse (c'est-à-dire à 0 minute).

La courbe de seuil donne la plage pour laquelle l'impureté spectrale se situe dans les limites du bruit. Au-dessus de ce seuil, l'impureté spectrale dépasse le bruit de fond spectral et la courbe de similarité coupe la courbe de seuil, indiquant une impureté (à la condition que les paramètres de référence et de bruit aient été choisis judicieusement).

Utilisation des spectres cibles spécifiques

La ChemStation Agilent permet le calcul du facteur de pureté et des courbes de similarité relatifs à différents spectres cibles, comme le montre la Figure 9. En règle générale, la comparaison par défaut avec le spectre moyen fournit les meilleures informations pour la plupart des impuretés inconnues. Il est très intéressant de pouvoir sélectionner un spectre cible spécifique dans deux cas : lorsque le chimiste analyticien doit supposer où se trouve l'impureté ou lorsqu'il doit améliorer la sensibilité de l'évaluation de la pureté. Un exemple peut expliquer ce principe : s'il est supposé que l'impureté se trouve dans la traîne du pic, c'est en sélectionnant le spectre de traîne ou de sommet à comparer à tous les autres spectres que l'on obtient les informations les plus significatives.

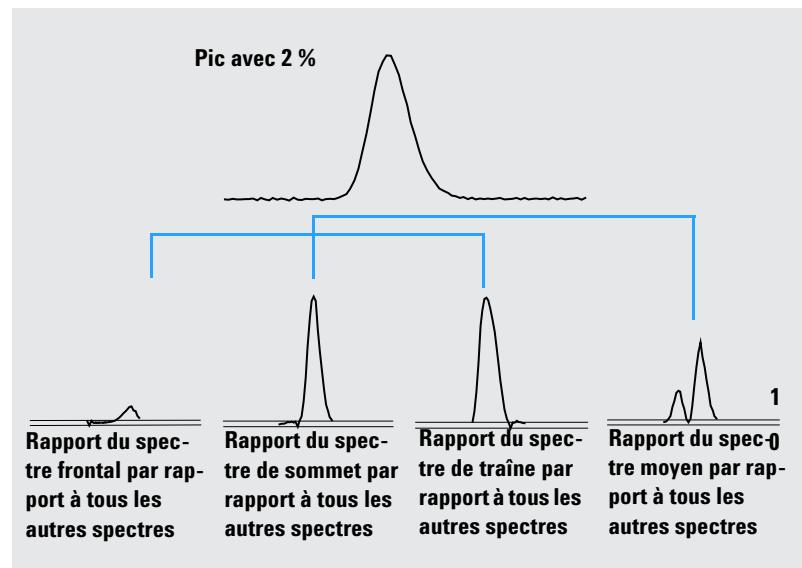


Abbildung 9 Courbes de rapport pour différents spectres cibles à partir du même pic

La Figure 9 donne la courbe de rapport pour le spectre frontal, de sommet, de traîne et moyen d'un pic contenant une impureté après la réponse maximale (sommet).

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

Le **spectre frontal** donne une petite impureté spectrale à la fin du pic. L'écart dans cette première courbe de rapport est petit car le spectre frontal a peu absorbé (donnant une courbe de seuil plutôt haute).

Le **spectre de sommet** donne une impureté basse à l'avant du pic (le spectre de sommet ne contient qu'une très petite quantité de l'impureté) et une impureté haute dans la traîne.

Le **spectre de traîne** (avec un haut niveau d'impureté) donne une impureté spectrale à l'avant du pic.

Le **spectre moyen** (moyenne des cinq spectres de pic sélectionnés) indique l'impureté spectrale dans l'ensemble du pic. Le spectre moyen contient la contribution spectrale de l'impureté. Dans ce cas, la moyenne contient une plus grande contribution de l'impureté que le spectre de sommet, présentant une impureté spectrale supérieure au front d'élution ou de migration, et une impureté inférieure sur la traîne, par rapport à la courbe de rapport du spectre de sommet.

Le profil des courbes de similarité, de seuil et de rapport dépend de la position, du niveau et des différences spectrales de l'impureté et, de ce fait, la forme ne permet pas d'aboutir à une conclusion générale. Attendez-vous à un profil différent selon la situation.

Calcul de la pureté et affichage

Le facteur de pureté n'est pas une mesure absolue de la pureté d'un pic. Il est fonction des paramètres utilisés dans les calculs, particulièrement le seuil de pureté. Par conséquent, il faut interpréter les résultats en tenant compte du seuil défini. Pour des pics purs, des résultats comparables sont obtenus pour différentes valeurs de paramètre. Pour des pics impurs, une analyse du cas le plus défavorable est effectuée. Seuls les points de données se référant à une impureté, par exemple, des spectres qui se situent au-dessous du seuil, sont pris en compte dans le calcul. Par conséquent, un changement dans la valeur de seuil peut fortement influencer le facteur de pureté pour un pic impur. Pour plus de détails sur ces calculs, voir les paragraphes ci-après. Pour une description détaillée des courbes de similarité, voir „[Courbes de similarité spectrale](#)“ auf Seite 31.

All Spectra (tous les spectres)

- 1 Tous les spectres de référence corrigés enregistrés pour le pic et qui se situent au-dessus du seuil défini par l'utilisateur sont utilisés pour le calcul des courbes de pureté et de seuil ; cinq de ces spectres sont affichés dans la fenêtre Spectra.
- 2 Les facteurs de correspondance sont calculés entre chaque spectre sélectionné et la moyenne des cinq spectres affichés dans la fenêtre Spectra ; ils sont tracés sous la forme de points uniques dans l'affichage Purity. Pour le seuil défini par l'utilisateur, la courbe de similarité est superposée sur le tracé de pureté.

Pour le seuil calculé, la valeur de seuil est calculée pour chaque spectre ; les valeurs de pureté des spectres sont définies comme un rapport entre la valeur de seuil et la valeur de similarité, ce qui donne une ligne droite. On obtient ainsi une meilleure indication sur les points de données purs et impurs. Les courbes de similarité et de seuil sont superposées dans le tracé de pureté.

Peak-Controlled Spectra (spectres contrôlés par les pics)

- 1 Tous les spectres de référence corrigés enregistrés pour le pic et qui se situent au-dessus du seuil défini par l'utilisateur sont utilisés pour le calcul et affichés dans la fenêtre Spectra.
- 2 Les facteurs de correspondance sont calculés entre chaque spectre affiché dans la fenêtre Spectra et la moyenne de ces spectres ; ils sont tracés sous la forme de points uniques dans l'affichage Purity.
- 3 La valeur de pureté représente la valeur moyenne de tous les facteurs de correspondance calculés.

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

Classification d'un pic comme pur ou impur

Le niveau de pureté calculé est utilisé pour générer la déclaration de pureté affichée à l'écran. Si le facteur de pureté se situe dans la valeur de seuil (définie manuellement ou calculée à partir de la courbe de seuil), le pic est classé comme pur. Si le facteur de pureté dépasse la valeur de seuil, le pic est classé comme impur.

NOTE

L'impureté détectée est une impureté *spectrale* qui ne signifie pas forcément une impureté de composé. Les impuretés spectrales peuvent être dues à des changements de composition de solvant (gradients) ou se produisent dans des pics non séparés à la ligne de base.

Informations sur la pureté des pics

Facteur de pureté

Le facteur de pureté donne une valeur numérique pour la pureté du pic.

- Si le pic a été déclaré pur, le facteur de pureté correspond à la valeur moyenne de tous les spectres qui se situent *dans la limite* du seuil.
- Si le pic a été déclaré impur, le facteur de pureté correspond à la valeur moyenne de tous les spectres qui *dépassent* le seuil.

Dans un cas comme dans l'autre, le nombre de spectres utilisés pour le calcul du facteur de pureté, ainsi que la base du calcul, sont spécifiés.

Seuil

Pour un seuil calculé, il s'agit de la valeur moyenne de tous les spectres utilisés pour le calcul du facteur de pureté. Pour un seuil défini par l'utilisateur, il s'agit de la valeur que vous entrez au niveau des options de pureté (Purity Options).

Spectres de pic

Les spectres de pic affichent le détail des cinq spectres retenus pour les calculs de pureté. Vous pouvez également afficher :

- Les spectres de différence :

Ce sont les spectres calculés représentant la différence entre le spectre moyen et les spectres individuels retenus. Les pics purs ne montrent du bruit qu'au niveau des spectres de différence.

- Le spectre de comparaison :

Il s'agit du spectre moyen utilisé pour les calculs de pureté.

- Tous les spectres retenus :

Tous les spectres enregistrés au travers du pic.

- Les spectres de référence :

Le spectre ou les spectres utilisés pour une correction de fond.

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

Calcul de la pureté et du bruit

Les informations concernant le calcul de la pureté indiquent le nombre total de pics enregistrés, et le nombre de ceux qui se situent dans la limite du seuil ou qui le dépassent, et qui ont été utilisés pour calculer le facteur de pureté.

Les informations concernant le calcul du bruit indiquent les spectres utilisés pour calculer le seuil de bruit, ainsi que les résultats du calcul effectué. Vous pouvez visualiser les spectres du bruit et un graphique des statistiques sur le bruit. Il vous est également possible de changer les paramètres de calcul du bruit.

NOTE

Le fait de changer les paramètres pour le calcul du bruit de fond peut avoir un impact important sur les résultats du calcul de pureté. Assurez-vous que vous avez bien compris les informations données dans la rubrique „[Options évoluées de pureté des pics](#)“ auf Seite 41 avant de procéder à tout changement.

Purity Curve (courbe de pureté)

Les informations Purity Curve montrent les résultats de la comparaison de chaque spectre du pic avec le spectre moyen. Les valeurs dans la colonne Difference représentent la différence arithmétique entre les valeurs de la colonne Purity et celles de la colonne Threshold. La valeur Difference est utilisée pour déterminer quels spectres seront utilisés pour le calcul du facteur de pureté et de la valeur de seuil du pic.

More Purity Curves (courbes de pureté supplémentaires)

Les informations More Purity Curves affichent les résultats des calculs de pureté avec les spectres frontal, de sommet et de traîne en plus du spectre moyen (voir „[Utilisation des spectres cibles spécifiques](#)“ auf Seite 35). Vous pouvez choisir de visualiser les courbes de similarité pour un ou plusieurs de ces calculs. Il vous est également possible de changer les paramètres de calcul de pureté, ainsi que l'affichage des résultats.

NOTE

Le fait de changer les paramètres pour le calcul de la pureté peut avoir un impact important sur les résultats de pureté. Assurez-vous que vous avez bien compris les informations données dans la rubrique „[Options évoluées de pureté des pics](#)“ auf Seite 41 avant de procéder à tout changement.

Options évoluées de pureté des pics

Si vous faites des changements au niveau des options avancées de pureté des pics (Advanced Peak Purity Options), ceux-ci peuvent avoir un effet significatif sur les résultats de pureté. Nous vous recommandons de ne faire aucun changement à moins que vous ne soyez pleinement conscient des effets qui pourraient en découler au niveau des résultats.

Calcul de la pureté

Le calcul de pureté par défaut utilise la moyenne de cinq spectres au travers du pic (voir la rubrique „[En quoi consiste le test de pureté des pics ?](#)“ auf Seite 22), mais vous pouvez aussi utiliser d'autres spectres comme base de calcul :

L'option **All peak spectra (tous les spectres du pic)** utilise chacun des cinq spectres choisis pour produire cinq jeux de résultats qui sont tous affichés dans la même fenêtre.

Les options **Apex spectrum (spectre de sommet)**, **Front spectrum (spectre frontal)** et **Tail spectrum (spectre de traîne)** utilisent des spectres spécifiques pouvant permettre d'améliorer la sensibilité de l'analyse de pureté (voir „[Utilisation des spectres cibles spécifiques](#)“ auf Seite 35).

L'option **Front & Tail spectrum (spectre frontal & spectre de traîne)** montre deux jeux de résultats obtenus en utilisant le spectre frontal et le spectre de traîne comme point de départ du calcul de pureté.

L'affichage par défaut de la pureté d'un pic est Purity Ratio, comme montré dans la [Figure 5](#) de la page 30, mais il vous est également possible d'afficher les résultats de pureté sous forme de courbes de similarité et de seuil.

La ChemStation Agilent propose trois modes d'affichage des courbes de similarité et de seuil :

- 1 Sans aucune transformation, voir la [Figure 10](#) de la page 42 (a) ;
- 2 En tant que logarithme naturel, *ln*, voir la [Figure 10](#) de la page 42 (b), avec l'avantage de plus de détails pour le sommet du pic dans la partie inférieure du graphique ;
- 3 En tant que rapport : ratio = $\frac{1000 - \text{similarity}}{1000 - \text{threshold}}$, voir la [Figure 10](#) de la page 42 (c).

3 Evaluation de la pureté des pics

Affichage de la pureté des pics

Pour un pic spectralement pur, les valeurs de rapport sont inférieures à 1 ; elles sont supérieures à 1 pour des pics spectralement impurs. L'avantage du mode rapport est de n'afficher qu'une seule ligne, ce qui facilite l'interprétation.

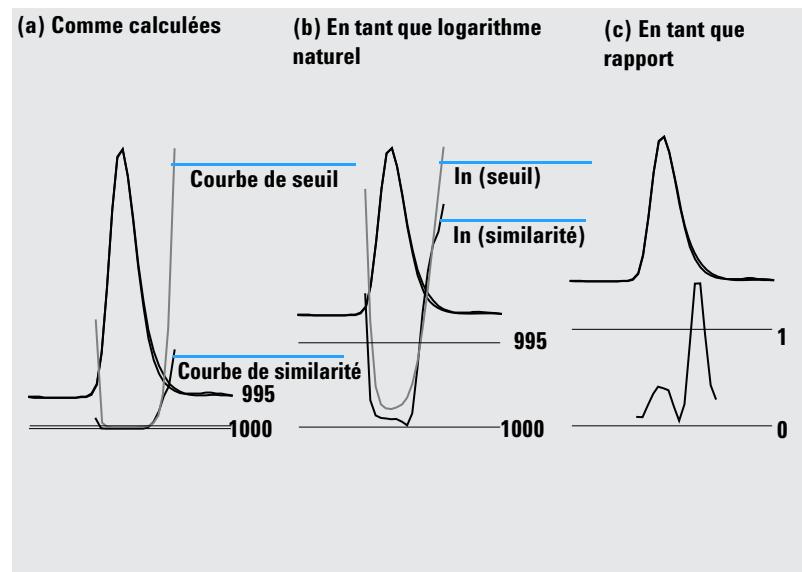


Abbildung 10 Courbes de similarité et de seuil,

- (a) Comme calculées,
- (b) I_n (seuil) et I_n (similarité), et
- (c) En tant que rapport

Seuil du bruit

Par défaut, le seuil de bruit est déterminé automatiquement, en utilisant l'écart type de 14 spectres de bruit purs en début d'analyse (0 minute). Vous pouvez modifier le moment et le nombre des spectres à partir desquels l'écart type du bruit est calculé ou vous pouvez entrer une valeur fixe pour l'écart type (valeur par défaut = 0,1). La plus grande exactitude est obtenue quand l'écart type est calculé à partir d'un nombre spécifié de balayages.

Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic

Cette section donne des conseils pratiques sur l'acquisition de données adaptée à l'analyse de pureté d'un pic et sur la définition des options de pureté.

Acquisition de spectres

Le test de pureté d'un pic s'appuie sur la comparaison de spectres au travers d'un pic. Assurez-vous que vous disposez d'un nombre suffisant de spectres pour permettre une comparaison et que leur qualité est élevée. Assurez-vous que le détecteur est bien entretenu, l'intensité de la lampe forte, et que vous avez choisi la cellule et la fente appropriées. En règle générale, il est préférable d'optimiser la sensibilité plutôt que la résolution, car même les petits décalages des spectres apparaissent dans les vastes gammes de longueurs d'onde, et la résolution n'est généralement pas si importante.

Utilisez le stockage All Spectra pour collecter des spectres de manière continue. Les nouveaux détecteurs prennent en charge le mode All in Peak qui collecte les spectres de manière continue quand un pic est détecté et, en outre, stocke environ 20 spectres au début de l'analyse pour les utiliser dans la détermination du bruit de la ligne de base en vue de l'analyse de pureté.

Réglez la largeur du pic de l'écran du détecteur à barrette de diodes d'après la largeur du pic intéressant le plus étroit dans l'analyse.

Assurez-vous que la concentration de l'échantillon convient à la gamme de fonctionnement linéaire du détecteur. Si un composant est trop concentré, le détecteur fonctionnera en dehors de sa gamme linéaire aux longueurs d'onde de plus grande absorbance tout en restant linéaire aux autres longueurs d'onde. Ceci engendrera une modification de la forme des spectres en fonction de la concentration, et le composant sera déclaré comme probablement impur. Si la concentration du composant est trop basse, le rapport signal/bruit des spectres sera médiocre et la sensibilité de l'analyse de pureté en sera réduite. L'analyse de pureté la plus précise et la plus sensible s'applique à des pics compris entre 250 et 800 mDO de hauteur.

3 Evaluation de la pureté des pics

Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic

Utilisez les paramètres par défaut pour vérifier la pureté des pics. Si une impureté probable est détectée, vous pouvez vérifier de plus près les résultats de façon à confirmer la présence d'une impureté et rechercher plus avant son origine.

Paramètres pour l'évaluation de la pureté d'un pic

Choisissez les paramètres suivants dans les onglets appropriés de la boîte de dialogue Spectral Options (options spectrales).

Wavelength Range (gamme de longueurs d'onde)

Utilisez ce paramètre pour contrôler la partie de la gamme de longueurs d'onde utilisée pour l'analyse de pureté. Vous pouvez, par exemple, définir une limite basse pour exclure les longueurs d'onde où l'absorbance de la phase mobile cause un bruit excessif. Vous pouvez définir une limite haute pour exclure les longueurs d'onde plus hautes où le composé intéressant n'absorbe pas.

Spectra Processing (traitement des spectres)

Utilisez ce paramètre pour effectuer des calculs mathématiques pour transformer, lisser ou reconstruire ("spliner") des spectres. Dans la pratique, tout ce qui améliore les petites différences dans les spectres (dérivés) améliore également le bruit, tandis que tout ce qui réduit le bruit (lissage) diminue la sensibilité pour de petits changements de spectre.

Absorbance Threshold (seuil d'absorbance)

Le seuil d'absorbance fixe la limite basse de l'intensité des spectres qui peuvent être pris en compte pour l'analyse. Normalement, la valeur de seuil définie est comprise entre 1 et 2 mDO pour garantir que les spectres pris aux extrémités du pic seront bien inclus dans le test de pureté.

Reference Spectrum (spectre de référence)

Les spectres de référence sont des spectres de ligne de base utilisés pour corriger l'absorbance de fond. Nous vous recommandons de toujours utiliser un spectre de référence. Le paramètre recommandé est Automatic. Dans ce

mode, un spectre est pris à partir de la ligne de base, près du début et de la fin de l'intégration. Une extrapolation linéaire de ces deux spectres est utilisée pour corriger chaque spectre au travers du pic. S'agissant d'une référence à deux points, elle peut compenser la dérive du détecteur et les changements survenus dans la composition de la phase mobile à l'aide de gradients. Les autres modes de référence sont disponibles pour permettre la compatibilité rétroactive avec les logiciels précédents, de manière à ce que vous puissiez obtenir quelques informations de pureté même si seulement quelques spectres ont été pris.

Si deux pics ne sont pas complètement séparés à la ligne de base, la sélection automatique des spectres de référence à l'aide de la sélection de référence automatique pourrait conduire à un spectre de référence sélectionné à partir de la vallée entre les deux pics. Un pic non résolu ne peut pas être pur. Dans ce cas, il est possible d'utiliser le test de pureté pour rechercher d'autres composants cachés. Utilisez la sélection de référence manuelle pour sélectionner des spectres de référence avant et après le groupe de pics.

Purity Threshold (seuil de pureté)

Si vos données ont été enregistrées en mode Peak-Controlled Spectra, vous devez entrer une valeur pour le seuil de pureté. Généralement, la valeur par défaut (990) donne des résultats acceptables.

Si vos données ont été collectées en mode All Spectra ou All in Peak, les meilleurs résultats seront obtenus en permettant à la ChemStation Agilent d'effectuer un calcul de seuil pour chaque spectre, basé sur le rapport signal/bruit qui lui est propre. Vous pouvez aussi fixer un seuil pour tous les balayages du pic, mais ce n'est pas recommandé. Si vous voulez utiliser un seuil fixe, choisissez-le plus élevé que pour le mode Peak-Controlled Spectra (compris entre 995 et 998 par exemple).

3 Evaluation de la pureté des pics

Pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de masse

Pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de masse

En CPL/SM, l'abondance des ions caractérisant un composé présente un maximum à un temps de rétention particulier correspondant à la concentration maximale de ce composé dans le MSD. Suivant les conditions chromatographiques et le cycle de balayage, les temps de rétention de pics à élution proche peuvent être très similaires et plusieurs composés peuvent apparaître sur le chromatogramme d'ionisation totale (TIC) sous la forme d'un pic unique ou d'un pic déformé (épaulement). En examinant les temps de rétention auxquels chaque ion passe par un maximum, il est possible de définir les groupes d'ions dont le maximum survient au même temps de rétention. Ces ions sont supposés appartenir au même composé. Si plusieurs groupes d'ions présentent un maximum à différents temps de rétention sous le même pic chromatographique, le pic peut être déclaré impur et les différents groupes d'ions déterminés.

Dans cette analyse, plusieurs postulats sont posés :

- Les composants d'un mélange peuvent être séparés d'après leur spectre de masse ou leur temps de rétention. Dans ce cas, chaque composant doit présenter un spectre de masse avec des valeurs de m/z spécifiques ou être bien séparé des co-analytes pour permettre la détermination des maxima.
- Le rapport signal/bruit est suffisamment élevé pour permettre la détermination sans ambiguïté des maxima.
- Les temps de rétention des ions, utilisés pour le calcul des temps de rétention des composés, sont précis et représentatifs.

A quelques exceptions près, l'ionisation "electrospray" (ESI), en l'absence de dissociations induites par collision (CID), produit seulement des ions moléculaires. Cela signifie que si deux ions à charge unique distincts sont trouvés dans une série de spectres (même en cas de co-élution), il est possible d'identifier et de quantifier ces ions. Cette opération nécessite une attention particulière car les adduits de cations ou d'anions peuvent donner des ions autres que ceux attendus ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$). La source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) produit aussi des ions moléculaires, mais les fragments thermiques sont plus fréquents dans l'ACPI qu'en "electrospray".

En outre, un spectre de masse contient des informations sur les ions isotopiques pouvant aider à l'identification et à l'évaluation de la pureté.

L'algorithme du test de pureté identifie un pic impur uniquement en cas de différence entre les spectres et entre les temps de rétention. L'interprétation manuelle peut aller au-delà de cette limite. A la différence des mesures en UV, les mesures en spectrométrie de masse permettent de quantifier les pics impurs pour autant que les composés ont des ions différents. Les tests de pureté des pics s'effectuent sur l'acquisition totale et non pas en mode spécifique (SIM).

Calcul de pureté des pics à partir des spectres de masse

Une gamme de chromatogrammes extraits (TIC) couvrant la zone intégrée du pic est définie à l'aide de différentes valeurs de m/z , et l'abondance maximale pour chacune de ces valeurs de m/z est déterminée. Pour chaque maximum trouvé, un temps de rétention est déterminé par interpolation entre les numéros de spectre en utilisant un ajustement parabolique. Les temps de rétention des principaux maxima sont regroupés en amas qui sont identifiés comme appartenant aux composés présents dans la zone. Les informations concernant le nombre de composés, les temps de rétention (numéros de spectre) de chacun et les principales valeurs de m/z de l'amas sont alors affichées.

Le choix du groupe de valeurs de m/z est obtenu par examen des spectres à 25 %, 50 % et 75 % de la zone d'intégration du pic en utilisant tous les ions dont la valeur de m/z d'abondance est supérieure à 1 % de l'abondance maximale du spectre (pic de base). Pour chaque valeur de m/z choisie, l'abondance moyenne du premier et du dernier spectre de la zone est utilisée pour la correction du fond, avant la détermination des amas.

Chaque valeur de m/z du groupe est examinée sur chaque spectre de la zone de temps et l'abondance maximale est enregistrée avec les abondances mesurées de chaque côté du maximum. Un seul maximum par valeur de m/z est enregistré. On vérifie que chaque maximum enregistré n'existe pas sur le premier ou le dernier spectre, et qu'il ne correspond pas à une abondance nulle sur les deux côtés du pic.

3 Evaluation de la pureté des pics

Pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de masse

Après calcul du temps de rétention (interpolation) pour la valeur de m/z et correction du fond, une table est construite avec les valeurs de m/z , l'abondance et les temps de rétention (interpolation), classés dans l'ordre croissant.

Les amas sont définis à partir des plus fortes abondances de la liste, dans l'ordre des temps de rétention croissants. Une fois l'amas enregistré, le temps de rétention moyen des différentes valeurs de m/z est calculé ; si le point suivant à prendre en considération se trouve à un temps dépassant la moyenne de plus d'un demi-intervalle entre les spectres, un nouvel amas est défini.

Le nombre d'amas trouvé est indiqué comme nombre de composés ; le temps de rétention moyen correspond au temps de rétention déclaré et les deux valeurs de m/z ayant les abondances les plus élevées sont données comme ions spécifiques.

Un pic intégré qui contient plus d'un amas est considéré comme impur.

Affichage de la pureté des spectres de masse

Fenêtre Ions for Peak

La fenêtre Ions for Peak affiche les deux valeurs de m/z de chaque amas dotées des abondances les plus élevées. Les pics mono-composants présentent deux ions ayant leur maximum au même temps de rétention ; les pics multi-composants présentent des paires d'ions ayant leur maximum au même temps de rétention. Chaque paire d'ions représente un composant dans le pic impur. Vous pouvez utiliser les outils de manipulation graphique de la ChemStation Agilent pour observer les ions en détail.

Fenêtre MS Peak Purity Results

La fenêtre MS Peak Purity Results contient une table présentant les résultats de l'analyse de pureté. Chaque ligne de la table fournit des informations sur un composant : indication du temps de rétention moyen et des deux ions les plus abondants.

Index

A

acquisition de spectres, 43
affichage de pureté
 spectre de masse, 48
analyse spectrale
 définition, 8

C

calculs de pureté
 courbe de seuil, 32, 37
 spectre de masse, 47
comparaison
 spectres, 28
COMPARE, commande, 23
conseils, 43
correction de fond, 25
courbe de seuil, 32, 37, 41
 mode d'affichage, 34
courbes de similarité spectrale, 31

D

dérivés, spectres, 25
détermination
 longueur d'onde optimale, 10

F

facteur de correspondance, 23
fenêtre des signaux de pic, 31
fluorescence, spectre, 12
fond
 absorptions, 22

G

gamme linéaire, 43

I

impureté, 22

L

ligne de base
 correction, 25
lignes
 concentriques, 10
lignes concentriques
 carte, 10
lissage de spectres, 24
logarithmiques, spectres, 24
longueur d'onde
 optimisation, 10
longueur d'onde optimale, 10

M

marqueur de correspondance en
 bibliothèque, 19, 20
marqueur nom du composé, 20

N

normalisation
 spectres, 28

O

opérations spectrales
 comparaison, 28
 normalisation, 28

P

pic
 impureté, 22
 pureté, 22

pureté

 pic, 22
pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de
 masse, 46

pureté des pics

 courbe de seuil, 32, 41
 courbes de similarité spectrale, 31
 définition, 22
 spectre de masse, 46
 utilisation des spectres cibles
 spécifiques, 35

R

rapport

 pureté des pics, 13
 recherche en bibliothèque, 13
 spectral, 13
recherche en bibliothèque de spectres
 automatisée
 analyse de composé cible, 17
 aperçu, 3
 modes de recherche, 16
 pureté des pics, 18
 recherche standard, 16
référence, spectre, 44

S

spectre

 correction, 25
 référence, 44
spectre de fluorescence, 12
spectre de référence
 correction de fond, 25
spectre de sommet, 36
spectre de traîne, 36
spectre frontal, 36

Index

spectre moyen, [36](#)

spectres

dérivés, [25](#)

lissage, [24](#)

logarithmiques, [24](#)

normalisation, [28](#)

spectres cibles, [35](#)

T

tracé d'isoabsorbance, [10](#)

troisième dimension, [8](#)

A propos de ce manuel

Ce manuel décrit les concepts sous-jacents au module d'analyse spectrale de la ChemStation Agilent révision B.03.0x. Il complète les informations des manuel *OpenLab CDS ChemStation Edition* par les notions de spectre spécifiques des systèmes ChemStation Agilent pour CPL 3D et EC, et la partie UV-visible de la ChemStation Agilent pour spectrométrie de masse.

© Agilent Technologies 1994-2012, 2013

Imprimé en Allemagne
01/13



Agilent Technologies