

ChemStation Agilent pour systèmes CPL 3D



**Comprendre votre module
d'analyse spectrale**



Agilent Technologies

Avvertissements

© Agilent Technologies, Inc. 2003

Conformément aux lois nationales 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.

Référence du manuel

G2180-93006

Edition

06/03

Imprimé en Germany

Agilent Technologies Deutschland GmbH
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn, Germany

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 concerne le module d'analyse spectrale de la ChemStation Agilent. Il complète les informations contenues dans le manuel *Comprendre votre ChemStation Agilent* décrivant les concepts d'analyse spectrale spécifiques applicables à la ChemStation Agilent pour systèmes CPL 3D et systèmes EC.

La procédure d'installation et de configuration détaillée de votre module d'analyse spectrale avec une ChemStation Agilent pour système CPL 2D est décrite dans le manuel *Installation de votre ChemStation Agilent pour systèmes CPL*.

1 Comprendre votre module d'analyse spectrale

Ce chapitre couvre les points suivants :

- Qu'est-ce qu'une analyse spectrale ?
- Détermination de 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 composants autres que ceux étalonnés apparaissent dans la fenêtre spécifiée des temps de rétention,
- plus d'un pic apparaît dans la fenêtre spécifiée des temps de rétention, ou
- le composé reste dans la colonne plus longtemps que prévu dans la fenêtre, en raison des variations de débit de solvant ou, plus fréquemment, de variations de caractéristiques de la colonne.

Pour éviter de telles erreurs, on utilise des qualificatifs de pic comme il est décrit dans le manuel *Comprendre votre ChemStation Agilent*.

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 sous des conditions chromatographiques bien définies et stockés dans une base de données (bibliothèque de spectres). Pour tout échantillon inconnu, le spectre d'un pic peut être comparé 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.

La ChemStation 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 une vérification de pureté du pic, en utilisant les paramètres dans 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 tels que :

- 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 d'une recherche 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 d'un pic

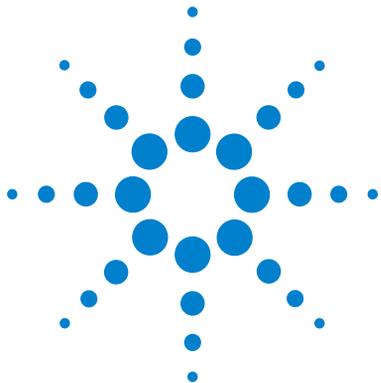
Ce chapitre décrit l'évaluation de la pureté d'un pic au moyen du logiciel révision A.04.0x et antérieure, ainsi que pour la révision A.05.0x du logiciel.

Sommaire

1	Comprende votre module d'analyse spectrale	9
	Que'est-ce qu'une analyse spectrale ?	10
	Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale	12
	Styles de rapports spectraux	14
2	Bibliothèques spectrales	15
	Les 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 d'un pic	21
	Evaluation de la pureté d'un pic (version A.04.0x et antérieure)	22
	Vérification de la pureté d'un pic	23
	Qu'est-ce que le test de pureté d'un pic ?	23
	Le facteur de correspondance	24
	Techniques de pureté des pics	26
	Première technique de vérification de la pureté d'un pic : Normalisation spectrale	27
	Correction d'absorption non spécifique par sélection d'un spectre de référence	28
	Deuxième technique de vérification de la pureté d'un pic :	
	Génération d'un ratiogramme	30

Utilisation du tracé de signal des rapports dans la détection de pureté des pics	30
Ratiogramme	31
Troisième technique de pureté des pics : Courbes de similarité spectrale	33
Courbe de similarité affichée en tant que similarité/seuil	34
Utilisation des spectres cibles spécifiques	35
Calculs de pureté	37
Pas de courbe de similarité sélectionnée	37
Courbe de similarité sélectionnée	38
Pour inclure la courbe de seuil	40
Classification d'un pic comme pur ou impur	41
Affichage de la fenêtre Peak Signals	42
Courbes de seuil	43
Utilisation de l'analyse de pureté des pics	46
Acquisition de spectres	46
Définition des options de pureté	47
Définition des options de pureté avancées	49
Caractérisation plus approfondie des pics impurs	52
Résultats erronés du test de pureté	53
Paramètres recommandés	56
Exemple 1 : All Spectra (spectres collectés en continu) ou All in Peak (tous les spectres d'un pic sont collectés) avec courbe de similarité — Mode automatique	56
Exemple 2 : All Spectra (spectres collectés en continu) ou All in Peak (tous les spectres d'un pic sont collectés) avec courbes de similarité — Interprétation manuelle	58
Exemple 3 : All Spectra (spectres collectés en continu) ou All in Peak (tous les spectres d'un pic sont collectés) ; sans courbes de similarité	60
Exemple 4 : Peak-Controlled Spectra (spectres contrôlés par les pics)	62
Evaluation de la pureté des pics (A.05.0x)	64
Vérification de la pureté d'un pic	65

En quoi consiste la vérification de la pureté d'un pic ?	65
Le facteur de correspondance	66
Correction d'absorption non spécifique par sélection d'un spectre de référence	68
Techniques de pureté des pics	69
Affichage de la pureté d'un pic	70
Fenêtre Spectra	70
Normalisation spectrale	70
Fenêtre Purity	72
Courbes de similarité spectrale	73
Courbe de seuil	74
Utilisation des spectres cibles spécifiques	76
Calcul de la pureté et affichage	77
Classification d'un pic comme pur ou impur	78
Informations sur la pureté des pics	79
Options évoluées de pureté des pics	81
Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic	83
Acquisition de spectres	83
Paramètres pour l'évaluation de la pureté d'un pic	84
Pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de masse	86
Calcul de pureté des pics à partir des spectres de masse	87
Affichage de l'écran pureté des spectres de masse	88
Indice	89



1

Comprendre votre module d'analyse spectrale

Que est-ce qu'une analyse spectrale ? 10
Pour déterminer la longueur d'onde de détection optimale 12
Styles de rapports spectraux 14



1 Comprendre votre module d'analyse spectrale

Que'est-ce qu'une analyse spectrale ?

Que'est-ce qu'une analyse spectrale ?

L'analyse spectrale des données ajoute une troisième dimension à vos données analytiques lorsque vous les utilisez avec des données chromatographiques.

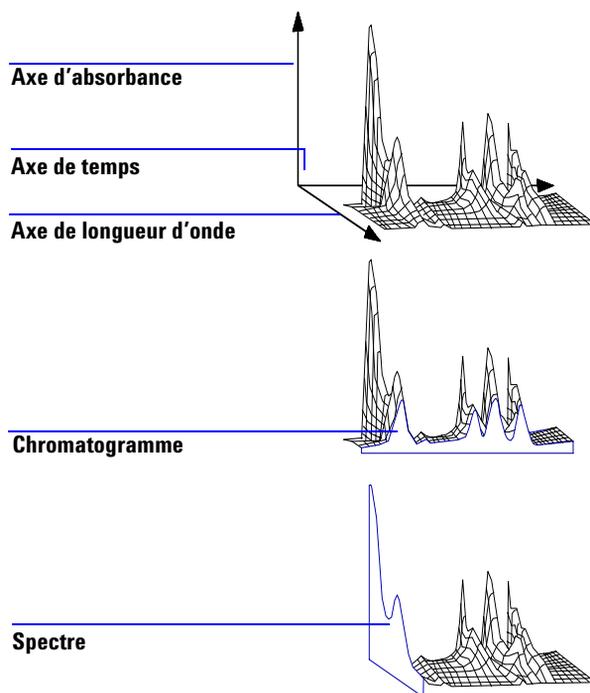


Figure 1 Information spectrale

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.

Traitement spectral

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 spectrale pour obtenir une identification qualitative,
- calculer les ratios des signaux chromatographiques pour déterminer la pureté des pics, et
- effectuer un contrôle de pureté des pics pour découvrir des impuretés (cachées.)

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'un 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 toute donnée spectrale. Reportez-vous à l'affichage central de la [Figure 2](#).

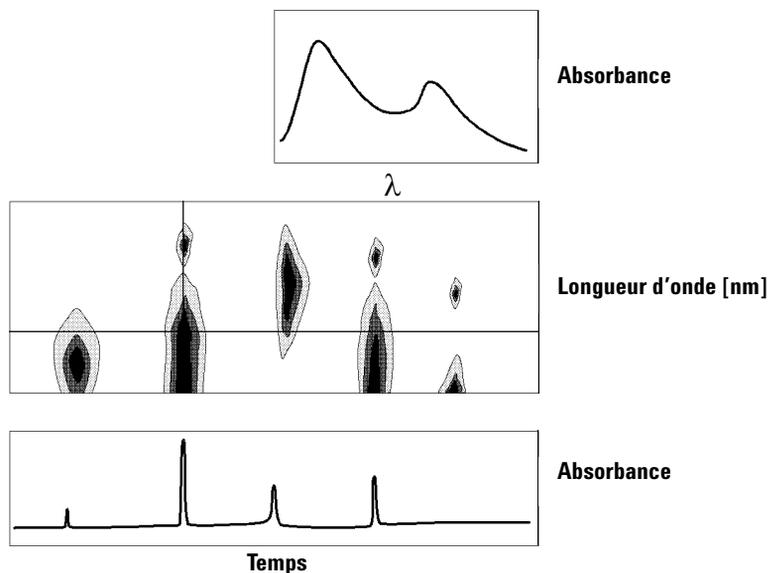


Figure 2 Tracé d'isoabsorbance

Cette technique est utile, en développement de méthode, pour trouver la longueur d'onde optimale pour la détection de chaque pic séparé. 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.

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

- Déplacez le curseur horizontal dans le mode Vue rapide de 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 le mode Vue de signal et optimisez la bande passante pour augmenter le ratio signal/bruit, afin d'obtenir la longueur d'onde optimale pour la détection. Le signal et la bande passante sélectionnés peuvent être transférés dans la fenêtre des signaux en mode analyse des données en cliquant sur le bouton Copy. 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 optimum à l'aide du tracé d'isoabsorbance.
- Préparez une table de chronoprogrammation pour déterminer la longueur d'onde d'émission optimum pour chaque pic lorsqu'il élue et collecter les spectres d'émission.

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 sont au-dessus du tracé iso (curseur vertical), les spectres d'émission sont en dessous du tracé iso (curseur horizontal).

Styles de rapports spectraux

Le module spectral permet d'obtenir les styles de rapports suivants :

- **Recherche en bibliothèque**

produit un rapport étalonné incluant les résultats de recherche en bibliothèque. Les numéros de pics, temps de rétention, facteurs de recherche en bibliothèque, quantités et noms de composés 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**

contient les éléments suivants : conditions d'instrument, chromatogramme, les résultats quantitatifs ainsi que les informations sur la pureté des pics.

- **Detail + Spectrum**

comprend l'en-tête, les conditions instrumentales, le chromatogramme, les résultats quantitatifs, les courbes d'étalonnage, ainsi que les informations de 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 spécifique à la méthode.

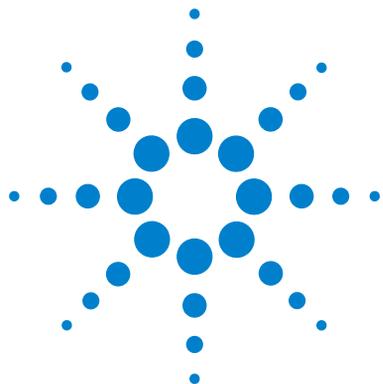
- **Performance + Lib. Search**

combine les styles de Performance et Recherche en bibliothèque (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.

Les calculs numériques incluent le facteur de pureté, une mesure de la similarité dans la forme du spectre. Pour plus d'informations sur la pureté des pics, consultez le [Chapitre 3](#), "Évaluation de la pureté d'un pic".



2 Bibliothèques spectrales

Les modes de recherche 16

Description du rapport 19



Les 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 de pic peut être ajouté en option.

1 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 Library Search Template, voir la [Figure 3](#).

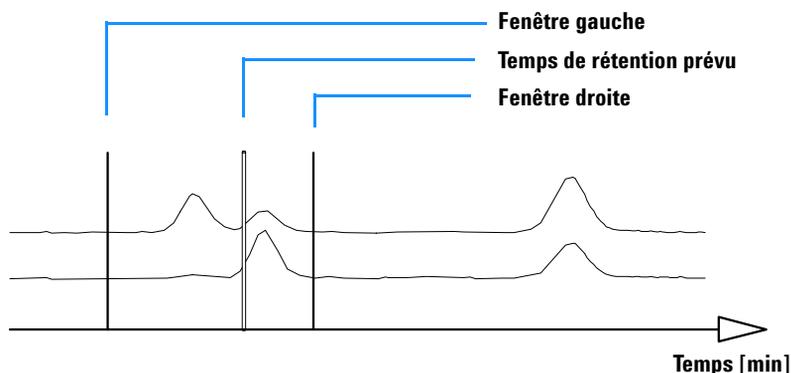


Figure 3 Fenêtre de Temps de rétention

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 reporté 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 n'est trouvé dans la table d'étalonnage, l'identité du pic est donnée, mais la méthode n'étant pas étalonnée pour le composé, une quantité n'est pas 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.

2 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 les spectres de pics *uniquement pour des composés étalonnés* avec des spectres provenant de jusqu'à quatre bibliothèques spécifiées. Les pics sont seulement rapportés comme identifiés si confirmés par comparaison spectrale. Les noms de composés 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 comme une partie 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 rapportée comme identifiée seulement lorsqu'elle dépasse le seuil fixé.

Ce mode est recommandé pour chercher des composés spécifiques étalonnés 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.

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

Dans ce cas, la recherche est destinée à toutes les entrées de la bibliothèque, pas seulement celles qui sont 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 tombent 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 les temps de rétention entrent dans la fenêtre cible servent à l'identification. Quand une correspondance dépasse le seuil que vous avez fixé, le pic est rapporté comme identifié. La quantification continue, fondée sur le nom de ce composé dans la table

2 Bibliothèques spectrales

Les modes de recherche

d'étalonnage. Si le composé existe à la fois dans la bibliothèque et dans la table d'étalonnage, il est rapporté comme étalonné et identifié. S'il n'est pas dans la table d'étalonnage, il est reporté 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 un 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 pour l'identification des composés.

4 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 consistance du spectre dans différentes parties du pic. Elle calcule et rapporte un facteur de pureté. La pureté peut être définie par un seuil, au-dessous duquel les résultats douteux sont marqués avec un x dans le rapport. Pour des informations supplémentaires sur la pureté des pics, voir le [Chapitre 3](#), "Evaluation de la pureté d'un pic".

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 composés et leur facteur de pureté (s'il est sélectionné), avec :

le numéro d'élément de bibliothèque,
le facteur de concordance 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 suit :

Marqueur de pureté :

Pour les composés impurs, les spectres sur la montée et la descente 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 utilisés pour l'identification.
- d:** Composé impur et spectre sur la pente descendante utilisés 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 à celui du seuil donné.

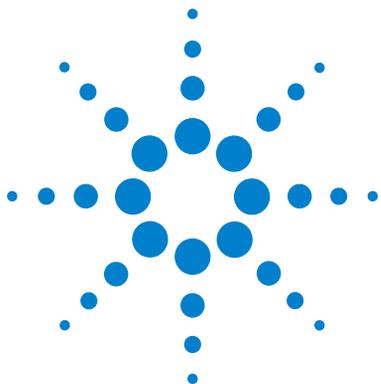
??: Composé identifié avec un nom déjà attribué à un autre composé avec une meilleure correspondance. Pour ce composé spécifique, une meilleure correspondance avec un nom unique n'a pu être trouvée.

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 un tableau séparé appelé Uncalibrated Compounds.



3 Evaluation de la pureté d'un pic

Evaluation de la pureté d'un pic (version A.04.0x et antérieure)	22
Vérification de la pureté d'un pic	23
Première technique de vérification de la pureté d'un pic : Normalisation spectrale	27
Deuxième technique de vérification de la pureté d'un pic : Génération d'un radiogramme	30
Troisième technique de pureté des pics : Courbes de similarité spectrale	33
Calculs de pureté	37
Courbes de seuil	43
Utilisation de l'analyse de pureté des pics	46
Définition des options de pureté	47
Evaluation de la pureté des pics (A.05.0x)	64
Vérification de la pureté d'un pic	65
Vérification de la pureté d'un pic	65
Affichage de la pureté d'un pic	70
Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic	83



3 Evaluation de la pureté d'un pic

Evaluation de la pureté d'un pic (version A.04.0x et antérieure)

Evaluation de la pureté d'un pic (version A.04.0x et antérieure)

Cette section décrit les différentes méthodes que vous pouvez utiliser pour évaluer la pureté d'un pic :

- “Vérification de la pureté d'un pic”.
- “Première technique de vérification de la pureté d'un pic : Normalisation spectrale”.
- “Deuxième technique de vérification de la pureté d'un pic : Génération d'un ratiogramme”.
- “Troisième technique de pureté des pics : Courbes de similarité spectrale”.
- “Calculs de pureté”.
- “Fenêtre des signaux de pic contenant les courbes de similarité et de seuil”.
- “Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic”.
- “Paramètres recommandés”.

Vérification de la pureté d'un pic

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.

Qu'est-ce que le test de pureté d'un pic ?

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. En principe, on utilise trois spectres par pic pour évaluer la pureté. Deux spectres aux points d'inflexion (le spectre de pente montante et celui de pente descendante) et un au sommet (spectre de sommet). Si nécessaire, vous pouvez aussi choisir 5, 7, 9, ou la totalité des spectres, pour le calcul de pureté.

Si ces pics ne sont pas identiques, théoriquement le pic contient une impureté spectrale. Cette impureté spectrale peut être due à un ou plusieurs composés, des pics non séparés à la ligne de base, ou à une absorption de fond.

ATTENTION

If the spectra are identical, the peak can still contain impurities. This can be the case if the spectral absorption is small compared to the main compound, or if the impurity and the main compound have the same or almost the same spectra, with similar elution times.

Le tracé de pureté d'un pic est constitué du spectre du pic dessiné en mode normalisé et superposé. 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 une 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 pics.

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

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

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 1000 indique des spectres identiques. En général, des valeurs supérieures à 990 indiquent que le spectre est similaire. 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 influencent le facteur de correspondance.

Ces paramètres sont déterminés par l'échantillon et la méthode de séparation. Ils incluent la spécificité des composés, l'absorption spectrale des composés de matrice, le niveau de bruit spectral et l'absorption de fond ainsi que 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 de la manière suivante :

- 1 Pour un nombre défini de points de données, par exemple 5, appelé aussi filtre, une régression cubique est utilisée 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 puis l'opération se répète.

L'algorithme de lissage permet de réduire le bruit statistique et donc d'augmenter la fiabilité de l'identification du spectre lissé.

REMARQUE

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 de lissage. 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 avec une faible résolution, vous pouvez utiliser le splining (fonction reconstruction) pour que votre spectre ressemble davantage à une courbe qu'à un polygone. Pour cela, il faut calculer les points de données supplémentaires entre les points de données d'origine de votre spectre en utilisant les fonctions trigonométriques. L'application de la reconstruction "splining" aux spectres préserve les points de données originaux.

Spectres dérivés

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

Techniques de pureté des pics

Les techniques de pureté des pics ne sont utilisables qu'avec des pics ayant une séparation de la ligne de base. Si cette séparation n'existe pas, la pureté des pics est plus compliquée et 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 style de rapport spectral, par exemple détail+spectre.

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

- nombre de spectres utilisés sur un pic,
- 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,
- normalisation des spectres, et
- composants de pureté calculés et affichés (ce sont : les spectres, les différences spectrales, les signaux, un ratiogramme à base de signaux, les courbes de similarité et de seuil).

Plusieurs techniques permettent de juger de la pureté d'un pic. Elles sont décrites dans les sections suivantes et comprennent :

- **la normalisation spectrale :**
comparaison d'un spectre normalisé à différentes sections du pic,
- **le ratiogramme :**
rapport d'absorbance à deux ou plusieurs longueurs d'onde tracé dans la gamme de temps, et
- **la courbe de similarité :**
comparaison d'un spectre défini ou d'un spectre moyen à tous les autres spectres pris au moment de l'élution du pic.

Première technique de vérification de la pureté d'un pic : Normalisation spectrale

Une technique classique consiste à normaliser et à comparer les spectres pris au travers du pic. La normalisation compense le changement de concentration du composant passant au travers de la cellule du détecteur durant l'élution du pic.

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 de spectres collectés sur la pente ascendante, le sommet et la pente descendante des pics et normalisés. La différence entre le pic pur et le pic impur apparaît clairement, tant par la comparaison visuelle que par le facteur de pureté calculé par le logiciel.

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Première technique de vérification de la pureté d'un pic : Normalisation spectrale

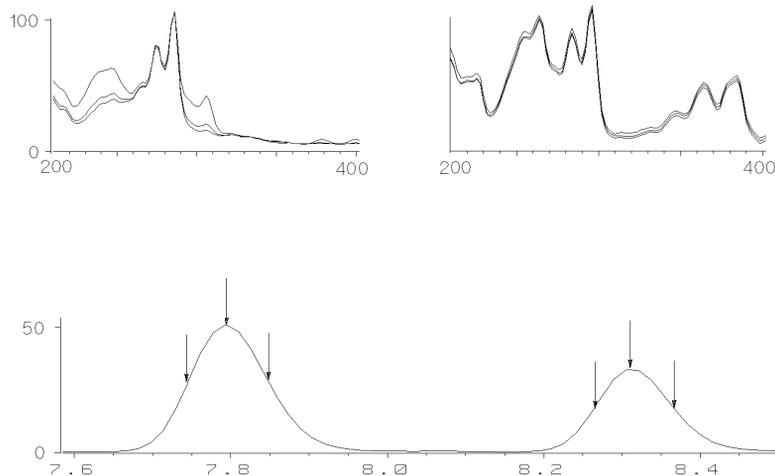


Figure 4 Vérification de la pureté d'un pic par superposition de spectres

Pour une précision accrue, la ChemStation Agilent peut calculer les facteurs de correspondance pour 3, 5, 7, 9 ou tous les spectres d'un pic.

Correction d'absorption non spécifique par sélection d'un spectre de référence

Divers types de correction permettent d'extraire des spectres de pic du fichiers de données, pour des corrections d'absorption :

Correction avec un seul spectre

Un spectre sélectionné prélevé à un moment précis dans le fichier de données, est soustrait du spectre du pic. Cette correction ne convient pas pour une absorption de fond changeante.

Correction avec la ligne de base

Un spectre de la ligne de base provenant du fichier de données, ou un spectre obtenu par interpolation entre deux spectres de la ligne de base, est soustrait des spectres du pic. Cette correction permet de compenser une absorption de fond à changement lent.

Correction au sommet du pic

Un spectre de référence pris au sommet d'un pic est soustrait de tous les autres spectres présents dans le pic. Cette correction peut être utilisée si les spectres de la ligne de base du pic ne sont pas disponibles.

Ligne de base du pic : Pour ce mode, les spectres de référence sélectionnés dépendent du mode de stockage du spectre dans le fichier de données.

All spectra stored (Tous les spectres stockés) : Les marques de début et de fin d'intégration du pic choisi indiquent la position des spectres de référence à la droite et à la gauche du pic.

Peak-controlled spectra (spectres contrôlés par les pics) : Les premiers spectres de type Baseline (ligne de base) à la droite et à la gauche du pic choisi sont utilisés comme spectres de référence. Si aucun spectre gauche ou droit de la ligne de base n'est trouvé, le premier ou le dernier spectre provenant du fichier de données est pris comme référence.

Utilisez ce mode lorsque tous les spectres sont stockés dans le fichier de données spectrales

Ligne de base la plus proche : Un spectre de référence est choisi au point de la ligne de base le plus proche du pic sélectionné et soustrait.

Deuxième technique de vérification de la pureté d'un pic : Génération d'un ratiogramme

Utilisation du tracé de signal des rapports dans la détection de pureté des pics

La technique utilisée pour calculer le rapport d'absorbance est basée sur le traçage du rapport d'absorbance à deux longueurs d'onde, ou plus, sur le profil d'élution.

Pour un composé pur, l'absorptivité molaire, A , à une longueur d'onde λ_1 est directement proportionnelle à celle de toute autre longueur d'onde λ_2 :

$$A(\lambda_1) = K \times A(\lambda_2)$$

où la constante K est caractéristique du composé aux longueurs d'onde sélectionnées. Le rapport d'absorbance entre deux longueurs d'onde pour un composé pur est constant. Un tracé du rapport d'absorbance par rapport au temps de rétention donnera une fonction d'onde carrée avec amplitude K . La présence d'un pic d'impureté co-éluant avec une valeur K différente causera un écart par rapport au tracé de rapport plat.

Les écarts par rapport à un tracé absolument plat peuvent également provenir d'un fond changeant (gradients rapides) ou d'un bruit de la ligne de base.

La montre des signaux et un tracé de rapport d'absorbance pour un pic pur et un pic impur. Il faut toujours établir un seuil pour éviter un bruit excessif dans le ratiogramme. Lorsque l'un des signaux tombe au-dessous du seuil, le rapport est mis à zéro.

Deuxième technique de vérification de la pureté d'un pic : Génération d'un ratiogramme

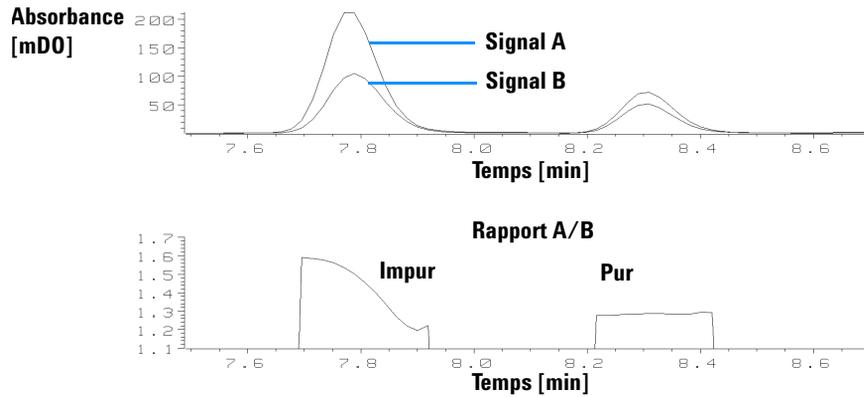


Figure 5 Rapports de signal pour des pics impurs et purs

Ratiogramme

Une autre technique de test de pureté des pics utilise des rapports d'absorbance multiples pour générer un ratiogramme. Au lieu de s'en tenir à un petit nombre de longueurs d'onde sélectionnées, les rapports sont tracés à toutes les longueurs d'onde relatives à la longueur d'onde d'absorbance maximale. Pour chaque spectre, le programme recherche la longueur d'onde d'absorbance maximale et trace le rapport d'absorbance aux autres longueurs d'onde pour chaque spectre tout le long du chromatogramme entier. Le ratiogramme est tracé dans une fenêtre où l'axe horizontal représente le temps, et l'axe vertical la longueur d'onde.

Les couleurs représentent les rapports. Des couleurs différentes représentent les valeurs de rapport basses et hautes. Cette procédure permet de voir rapidement la pureté de tous les pics dans un chromatogramme.

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Deuxième technique de vérification de la pureté d'un pic : Génération d'un ratiogramme

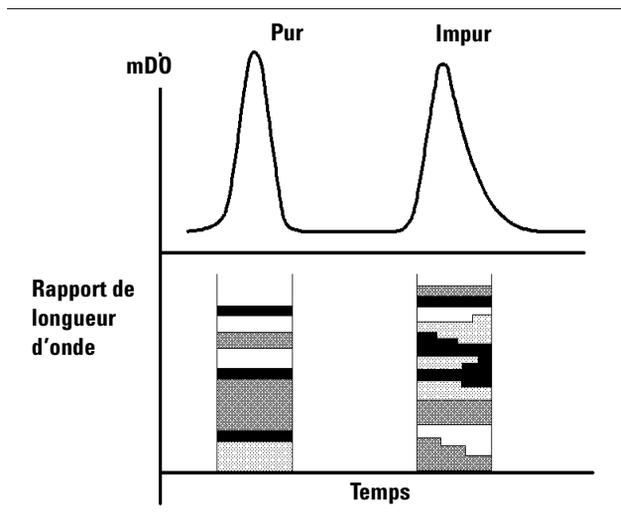


Figure 6 Ratiogramme

Si un pic est pur, il apparaît sous la forme d'une suite de bandes parallèles dont la couleur sera la même pendant tout le temps d'élution du pic. Un pic pur présente un rapport constant sur toute sa largeur.

Si un pic est impur, la couleur des bandes change pendant le temps d'élution. Le rapport n'est pas constant.

Troisième technique de pureté des pics : Courbes de similarité spectrale

Les courbes de similarité spectrale apparaissent dans la fenêtre Peak Signals de l'écran de pureté des pics.

Si certains détails ne s'affichent pas clairement, 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 provenant d'un pic sont comparés à un ou plusieurs spectres sélectionnés par l'opérateur ; par exemple, un spectre de sommet. Le degré de correspondance, ou *similarité spectrale*, est tracé dans le temps pendant l'élution. Le profil idéal pour un pic pur est une ligne plate à 1000, comme illustré dans la [Figure 7 \(a\)](#).

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 part du bruit dans la courbe de similarité est représentée dans la [Figure 7 \(b\)](#).

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Troisième technique de pureté des pics : Courbes de similarité spectrale

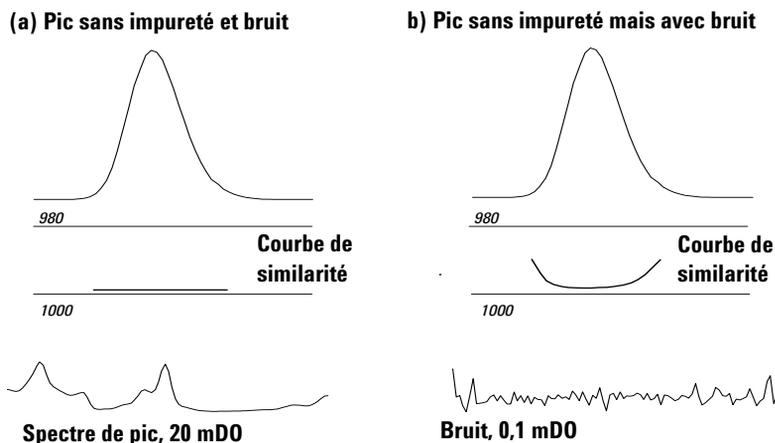


Figure 7 Courbes de similarité pour un pic pur avec et sans bruit pour un facteur de similarité idéal (1000) et un seuil défini par l'utilisateur (980)

La deuxième ligne horizontale de l'affichage correspond au seuil de pureté défini par l'utilisateur, celle-ci est fixée à 980 dans la [Figure 7](#) page 34. Lorsque la courbe de similarité se situe au-dessus de cette ligne, elle montre quelle partie du pic se trouve hors de votre définition de pureté acceptable.

Courbe de similarité affichée en tant que similarité/seuil

Dans la boîte de dialogue Advanced Purity Options, vous pouvez choisir d'afficher la courbe de similarité en tant que rapport des valeurs de similarité et de seuil. Voir aussi "[Evaluation de la pureté d'un pic \(version A.04.0x et antérieure\)](#)" page 22.

Pour les points impurs, le rapport est supérieur à 1 ; et il est inférieur à 1 pour les points purs.

Utilisation des spectres cibles spécifiques

La ChemStation Agilent permet d'effectuer des calculs de pureté de pic et de courbes de similarité en fonction de différents spectres cibles, comme le montre la Figure 8. En règle générale, l'option "Compare the Average Spectrum" fournit la meilleure information pour la plupart des impuretés inconnues. Il est très intéressant de pouvoir sélectionner un spectre cible spécifique dans deux cas : lorsque l'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 avec tous les autres spectres que l'on obtient l'information la plus significative dans ce cas.

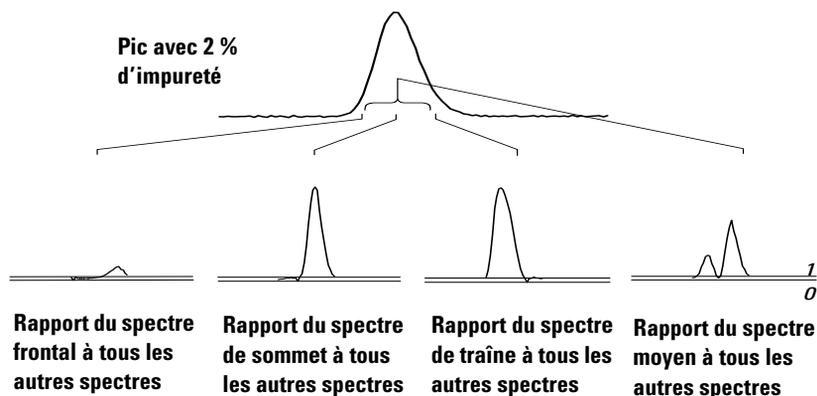


Figure 8 Les courbes de rapport pour différents spectres cibles à partir du même pic

La **Figure 8** donne la courbe de rapport pour le spectre frontal, de sommet, de traîne, ainsi que le spectre moyen d'un pic contenant une impureté après la réponse maximum (sommet).

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.

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Troisième technique de pureté des pics : Courbes de similarité spectrale

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

Le **spectre moyen** (moyenne des spectres de pic sélectionnés, dans ce cas les spectres de pente ascendante, de sommet et de pente descendante) indiquent l'impureté spectrale dans le pic total. 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'éluion ou de migration, et une impureté inférieure dans 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 de tirer une conclusion générale. Attendez-vous à un profil différent selon la situation.

Calculs de pureté

Le calcul du niveau de pureté dépend de votre choix parmi les préférences suivantes :

- Draw and Use Similarity Curve (tracer et utiliser une courbe de similarité)
- Include Threshold Curve (inclure une courbe de seuil)
- Purity Level Calculated With (niveau de pureté calculé avec)

REMARQUE

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 paramètres. Pour des pics impurs, une analyse du cas le plus mauvais est effectuée. Seuls les points de données se référant à une impureté, par exemple des spectres qui se situent au-dessous du seuil, sont considérés dans le calcul. Par conséquent, un changement dans la valeur de seuil peut grandement 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 de la ChemStation Agilent, voir "[Correction d'absorption non spécifique par sélection d'un spectre de référence](#)" page 68.

Pas de courbe de similarité sélectionnée

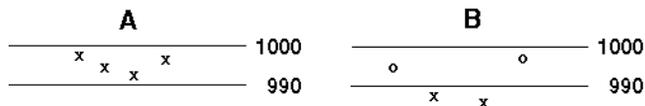
A utiliser pour les fichiers générés avec Peak Controlled Spectra

- 1 Les facteurs de correspondances sont calculés entre chaque spectre sélectionné affiché dans la fenêtre des spectres de pic de l'affichage de pureté, et le ou les spectre(s) spécifié(s) dans la rubrique de préférence Purity Calculated With. (par exemple, moyenne, sommet, front, etc.). Si deux spectres seulement sont disponibles, eux seuls sont comparés, sans tenir compte des valeurs pour le calcul du facteur de correspondance (spectres moyens, de sommet, ou de front & traîne).
- 2 Lorsqu'une valeur est inférieure au seuil donné (par exemple, 990), la valeur de pureté correspond à la valeur moyenne de tous les facteurs de correspondance calculés au-dessous du seuil. Dans ce cas, le pic a déjà été identifié comme impur et seuls les spectres au-dessous du seuil sont utilisés

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Calculs de pureté

pour évaluer le niveau d'impureté. Si aucune valeur ne se situe sous la valeur de seuil, le niveau de pureté correspond à la valeur moyenne de tous les facteurs de correspondance.



A - Niveau de pureté = 995,6 (100 % des spectres)

B - Niveau de pureté = 986,5 (50 % des spectres)

X = Facteurs de correspondance utilisés pour calculer le niveau de pureté

O = Facteurs de correspondance n'intervenant pas dans le calcul du niveau de pureté

Dans l'exemple B, deux des quatre facteurs de correspondance (50 %) sont au-dessous du seuil. C'est donc la moyenne de ces deux facteurs de correspondance qui donne la valeur de pureté.

Courbe de similarité sélectionnée

A utiliser pour les fichiers générés avec All Spectra.

Le facteur de correspondance de tous les spectres enregistrés dans le pic, et le ou les spectre(s) spécifié(s) dans la rubrique de préférence Purity Level Calculated With... (par exemple, moyenne, sommet, front, etc.) sont calculés et affichés en tant que courbe de similarité dans la fenêtre des signaux de pic de l'affichage de pureté des pics.

Si plus de deux facteurs de correspondance adjacents se situent au-dessous du seuil, la valeur de pureté résulte de la moyenne de toutes les sections dans les courbes de similarité, dont plus de deux facteurs de correspondance adjacents se situent au-dessous du seuil.

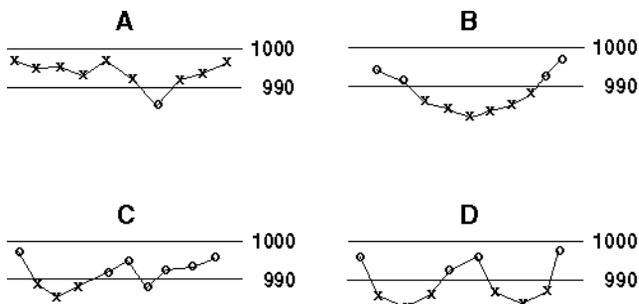
S'il y a deux facteurs de correspondance adjacents, ou moins, au-dessous du seuil, c'est la moyenne de tous les facteurs de correspondance *au-dessus* du seuil qui donne le niveau de pureté.

Tous les spectres de pic utilisés pour calculer la courbe de similarité sont marqués au bas de la fenêtre Peak Signals par des graduations spectrales ('). Les graduations obéissent aux codes de couleurs suivants :

Noir : Facteurs de correspondance au-dessus du seuil.

Rouge : Facteurs de correspondance au-dessous du seuil utilisés dans le calcul de pureté.

Bleu : Facteurs de correspondance au-dessous du seuil *non* utilisés dans le calcul de pureté.



A - Niveau de pureté = 995,6 (90 % des spectres)

B - Niveau de pureté = 986,5 (60 % des spectres)

C - Niveau de pureté = 988,6 (30 % des spectres)

D - Niveau de pureté = 986,5 (60 % des spectres)

X = Facteurs de correspondance utilisés pour calculer le niveau de pureté

O = Facteurs de correspondance n'intervenant pas dans le calcul du niveau de pureté

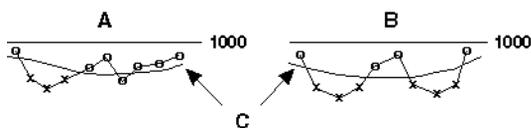
Les exemples ci-dessus illustrent les différentes méthodes de calcul du niveau de pureté :

- Dans l'exemple A, un point seulement dans la courbe de similarité se situe au-dessous du seuil de 990. Dans ce cas, le niveau de pureté est calculé à l'aide des neuf points de la courbe (90 %) au-dessus du seuil.
- Dans l'exemple B, six points adjacents se situent au-dessous du seuil. La moyenne de ces six facteurs de correspondance donne le niveau de pureté.
- Dans l'exemple C, quatre points se situent au-dessous du seuil, mais trois seulement sont des points adjacents. La moyenne des trois facteurs de correspondance adjacents donne le niveau de pureté.
- Dans l'exemple D, deux groupes de trois points adjacents sont au-dessous du seuil. La moyenne de ces six points donne le niveau de pureté.

Pour inclure la courbe de seuil

Une 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.

En outre, la valeur de seuil, affichée dans la boîte d'information de pureté, est calculée comme étant la moyenne des valeurs de seuil individuelles pour chacun des spectres échantillonnés utilisé dans le calcul du niveau de pureté.



A - Niveau de pureté = 988,6 (30 % des spectres)

B - Niveau de pureté = 986,5 (60 % des spectres)

C - Courbes de seuil

X = Facteurs de correspondance utilisés pour calculer le niveau de pureté

O = Facteurs de correspondance n'intervenant pas dans le calcul du niveau de pureté

Les exemples ci-dessus montrent les différentes méthodes de calcul du niveau de pureté :

- Dans l'exemple A, les trois facteurs de correspondance adjacents au-dessous du seuil calculé (X) sont utilisés pour calculer le niveau de pureté. Les valeurs de seuil de ces trois points servent également à calculer la valeur de seuil figurant dans la boîte "Purity Information".
- Dans l'exemple B, les deux jeux de trois facteurs de correspondance adjacents au-dessous de la courbe de seuil calculée (X) sont utilisés pour calculer le niveau de pureté. Ces six facteurs de correspondance servent aussi à calculer la valeur de seuil figurant dans la boîte "Purity Information".

Classification d'un pic comme pur ou impur

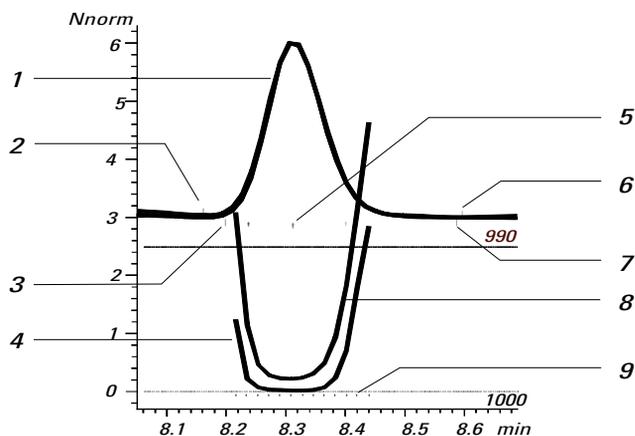
Le niveau de pureté calculé est utilisé pour générer la déclaration de pureté affichée au-dessous des spectres de pic. Si le facteur de pureté se situe dans la valeur de seuil, (définie manuellement, ou calculée à partir de la courbe de seuil), le pic est classé comme pur. Si le facteur de pureté dépasse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

REMARQUE

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 du solvant (gradients) ou se produisent dans des pics non séparés par la ligne de base.

Affichage de la fenêtre Peak Signals

La Figure 9 illustre un pic pur. Les graduations au-dessous de la ligne zéro montrent l'endroit où les spectres de référence sont pris pour calculer la pureté du pic. Les autres petites graduations au-dessous de la ligne de base montrent les spectres sélectionnés utilisés pour le calcul. Les grandes graduations montrent le début et la fin du pic défini par l'intégrateur. Dans la boîte de dialogue Advanced Purity Options, vous pouvez définir les options de traçage des courbes de similarité.



- 1 Tracés des signaux de pic
- 2 Début du pic
- 3 Spectre de référence de début
- 4 Courbe de similarité
- 5 Position des spectres sélectionnés
- 6 Fin de pic
- 7 Spectre de référence de fin
- 8 Courbe de seuil
- 9 Graduons spectrales

Figure 9 Fenêtre des signaux de pic contenant les courbes de similarité et de seuil

Courbes de seuil

On peut voir l'influence du bruit dans la [Figure 10](#). Le facteur de similarité diminue avec un rapport signal/bruit croissant ou un niveau de bruit constant avec une plage d'absorbance décroissante.

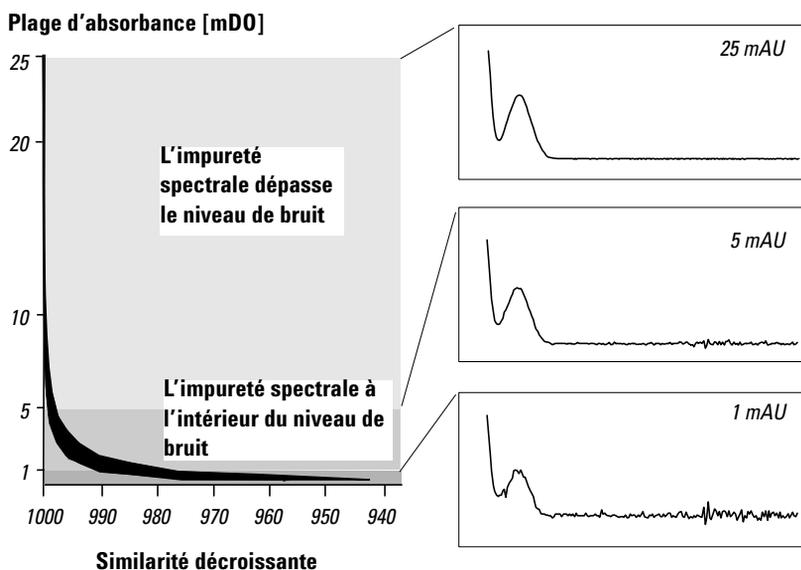


Figure 10 Facteur de similarité comme fonction du niveau de bruit

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. Une courbe de seuil peut être considérée comme une courbe de similarité pour un pic pur, avec la contribution d'un bruit de fond. La [Figure 11 \(a\)](#) illustre à la fois la courbe de similarité et la courbe de seuil pour un pic pur avec du bruit, la [Figure 11 \(b\)](#) pour un pic impur.

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Courbes de seuil

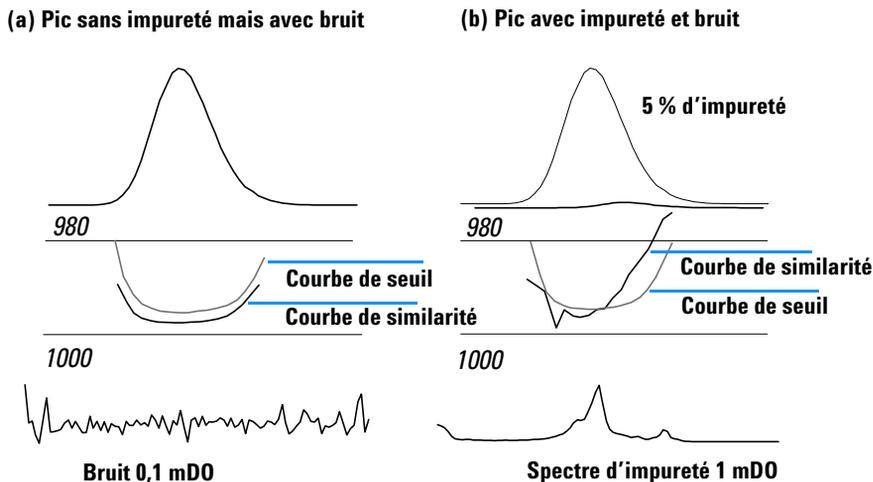


Figure 11 Effet de l'impureté du bruit sur les courbes de similarité et de seuil

Le seuil de bruit est déterminé automatiquement en fonction de l'écart type des spectres de bruit pur à un temps spécifié avec un nombre de spectres sélectionnés par l'utilisateur, les paramètres par défaut de la ChemStation étant 0 minute avec 14 spectres. Pour les analyses suivantes, vous pourrez définir le seuil de bruit en tant que valeur fixe fondée sur votre expérience ou des mesures antérieures.

La courbe de seuil, représentée par la ligne continue, 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).

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

- 1 Sans aucune transformation, voir la [Figure 12 \(a\)](#) ;
- 2 En tant que logarithme naturel, \ln , voir la [Figure 12 \(b\)](#), présente l'avantage d'être plus détaillé pour le sommet du pic dans la partie inférieure du graphique ;
- 3 En tant que rapport :
$$\text{ratio} = \frac{1000 - \text{similarité}}{1000 - \text{seuil}}$$
, voir [Figure 12 \(c\)](#).

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

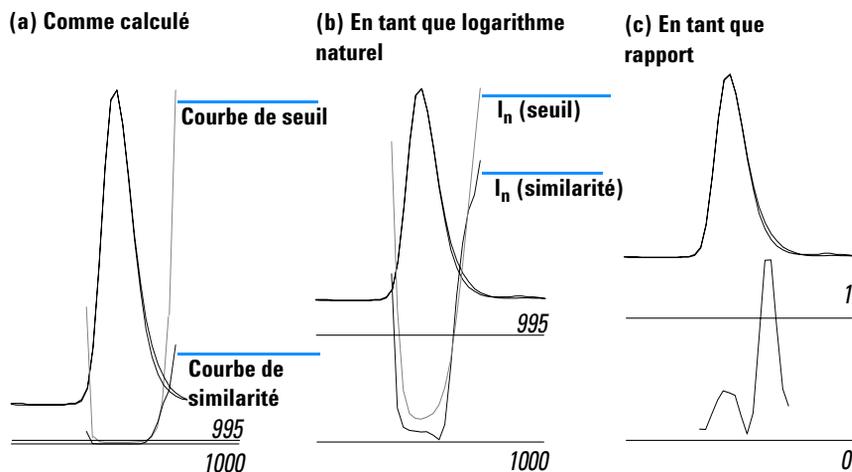


Figure 12 Courbes de similarité et de seuil,
 (a) as Calculated, (telle que calculée)
 (b) I_n (Threshold : seuil) et I_n (Similarity : similarité), et
 (c) as a Ratio (en tant que rapport)

Utilisation de l'analyse de pureté des pics

Cette section donne des conseils pratiques sur l'acquisition de données adaptée à l'analyse de pureté d'un pic et à 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. Pour la comparaison, il faut disposer de suffisamment de spectres de bonne qualité. Il faut aussi que le détecteur soit bien entretenu, que l'intensité de la lampe soit forte et que vous choisissiez la cuve à circulation et la fente appropriées. En général, il vaut mieux optimiser la sensibilité plutôt que la résolution, car même de petits décalages dans le spectre sont exprimés sur des gammes de longueurs d'onde plus larges et la résolution est généralement peu importante.

Utilisez le stockage All spectra pour collecter des spectres de manière continue. Les nouveaux détecteurs supportent 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 pour 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 votre concentration d'échantillon convient à la gamme de fonctionnement linéaire du détecteur. Si un composant est trop concentré, le détecteur opérera hors de sa gamme linéaire aux longueurs d'onde de plus grande absorbance, tout en restant linéaire aux autres longueurs d'onde. De ce fait, la forme des spectres changera avec la concentration et les composants pourront être signalés impurs. Si la concentration du composant est insuffisante, les rapports signal/bruit pour les spectres seront médiocres et la sensibilité de l'analyse de pureté 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.

Les paragraphes suivants décrivent les paramètres recommandés pour vérifier la pureté d'un pic. Si un risque d'impureté est détecté, vous pouvez jeter un regard plus critique aux résultats pour confirmer l'impureté et approfondir sa caractérisation.

Définition des options de pureté

Sélectionnez les paramètres suivants dans les panneaux appropriés de la boîte de dialogue Purity Options.

Spectre de référence

Les spectres de référence sont des spectres de ligne de base utilisés pour corriger l'absorbance de fond. Nous vous conseillons de toujours utiliser un spectre de référence. Le paramètre recommandé est Automatic Peak Baseline. Avec ce mode, un spectre est pris 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 en utilisant des gradients. Les autres modes de référence sont disponibles pour permettre la compatibilité rétroactive avec des logiciels précédents, de manière à pouvoir obtenir quelques informations de pureté même à partir d'un petit nombre de spectres.

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

Wavelength Range (gamme de longueur d'onde)

Utilisez ce paramètre pour contrôler la partie de la gamme de longueurs d'ondes 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'ondes plus hautes où le composé intéressant n'absorbe pas.

Purity Display (affichage de la pureté)

Vous pouvez spécifier le mode de calcul de la pureté et les informations incluses dans l'affichage de pureté. Nous vous conseillons de sélectionner toutes les options sauf Signal Ratios. Les deux options les plus importantes sont "Draw & Use Similarity Curve" et "Include Threshold Curve". Quand la courbe de similarité est sélectionnée, le test compare toujours le spectre en cours à tous les spectres sur le pic et utilise tous les résultats pour déterminer la pureté.

Il faut sélectionner un seuil pour décider si la correspondance de pureté pour un spectre donné, est bonne ou non. Auparavant, il fallait déterminer ce seuil de manière empirique à partir de matériaux de référence. Mais, comme le seuil approprié change avec le rapport signal/bruit, cette approche pose un problème. En effet, si la taille du pic changeait, le seuil approprié changeait également. Avec l'option Include Threshold Curve sélectionnée, le logiciel calcule un seuil approprié pour chaque spectre du pic, en se basant sur son rapport signal/bruit individuel.

Spectra per Peak (spectres par pic)

Utilisez spectra per peak pour sélectionner combien de spectres seront superposés et comment ils sont sélectionnés. Si chaque spectre est comparé à un spectre moyen, il contrôle la sélection des spectres pour la moyenne. Set By User commence avec le premier spectre de chaque côté du pic qui dépasse le seuil d'absorbance et distribue le reste à égalité sur le pic. Si vous utilisez la sélection de spectres automatique, un nombre impair de spectres commençant au spectre de sommet est sélectionné. Les spectres restants sont ensuite sélectionnés sur le pics d'après la largeur et la symétrie du pic. En sélectionnant Set By User, nous avons la certitude d'utiliser tous les spectres d'un bout à l'autre du pic. Quinze spectres donnent normalement une bonne représentation sur le pic.

Le seuil définit le spectre minimum utilisable pour l'analyse. Normalement, ce paramètre est de 1 - 2 mDO pour être certain que les bords du pic sont testés.

Purity (pureté)

Si "Include Threshold Curve" n'est pas sélectionné, il faut utiliser le seuil de pureté pour définir manuellement la coupure pour le test de pureté. Une fois la courbe de seuil sélectionnée, cette valeur n'intervient pas dans le test de pureté.

Définition des options de pureté avancées

Signal Processing (Traitement des signaux)

Ces paramètres contrôlent simplement l'affichage du pic et des signaux sur l'écran des résultats de pureté. Nous vous conseillons d'utiliser les paramètres par défaut.

Spectra Processing (Traitement des spectres)

Vous permet d'effectuer des calculs mathématiques pour lisser ou reconstruire «spline» des spectres. Dans la pratique, tout ce qui améliore les petites différences dans les spectres (dérivés) améliore le bruit, tandis que tout ce qui réduit le bruit (lissage) diminue la sensibilité pour de petits changements de spectre.

Spectra Normalization (normalisation des spectres)

Sélectionnez Match quand les spectres sont très similaires et que les concentrations varient largement. Sélectionnez la même gamme pour la normalisation que la Wavelength Range spécifiée dans la boîte de dialogue Purity Options.

Purity (Pureté)

"Purity Level Calculated With" définit quel(s) spectre(s) seront utilisés pour la comparaison avec chaque spectre individuel sur le pic. Pour de petits pics, il vaut mieux utiliser un spectre moyen. Le spectre de sommet est le spectre le plus grand dans le pic et l'utilisation du spectre de sommet simplifie l'interprétation des résultats.

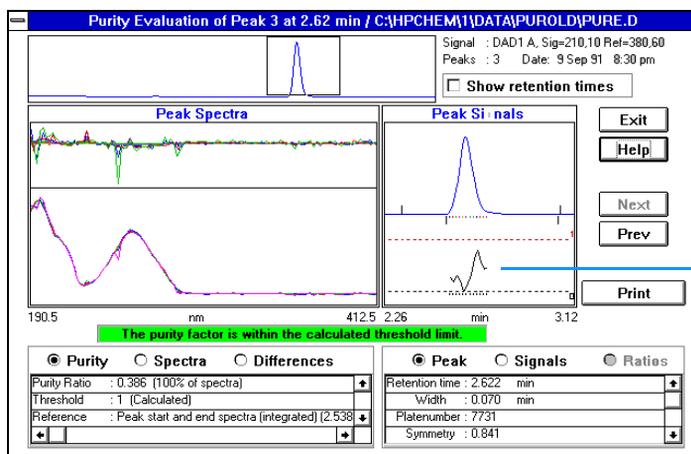
3 Evaluation de la pureté d'un pic

Utilisation de l'analyse de pureté des pics

En sélectionnant l'affichage sous la forme Similarity/Threshold, on obtient une comparaison entre les résultats pour chaque spectre et le résultat prévu basé sur le calcul du seuil. Si le ratio est inférieur à 1, le test pour ce spectre réussit ; s'il est supérieur à 1, il échoue. Cette technique élimine les problèmes d'échelle qui se posent lorsque vous passez de grands spectres à de plus petits.

Threshold Curve (Courbe de seuil)

Pour calculer une courbe de seuil, le logiciel utilise des spectres de la ligne de base pour calculer le bruit. Par défaut, les 14 premiers spectres dans l'analyse sont utilisés. Comme la ligne de base précède le «void» volume mort de la colonne, il ne doit jamais y avoir de pic dans cette région. Si le pic est éloigné du début de l'analyse ou si vous utilisez un gradient, il vaut mieux utiliser les spectres de la ligne de base les plus proches du pic. Vous pouvez faire cela en donnant au temps de départ une valeur différente où vous êtes sûr qu'il n'y a pas de pics dans la zone sélectionnée. La Figure 13 page 50 montre les résultats pour un pic pur.



Rapport de similarité

Figure 13 Résultats pour un pic pur

Pour un pic pur, chaque point dans le rapport de similarité se situe au-dessous de 1, les spectres se superposent harmonieusement et les différences entre les spectres n'ont pas de caractère systématique. La boîte est verte et contient le texte suivant : *The purity factor is within the calculated threshold limit (Le facteur de pureté se situe dans la limite de seuil calculée).*

La donne les résultats obtenus pour un pic comportant 0.5 % d'impureté.

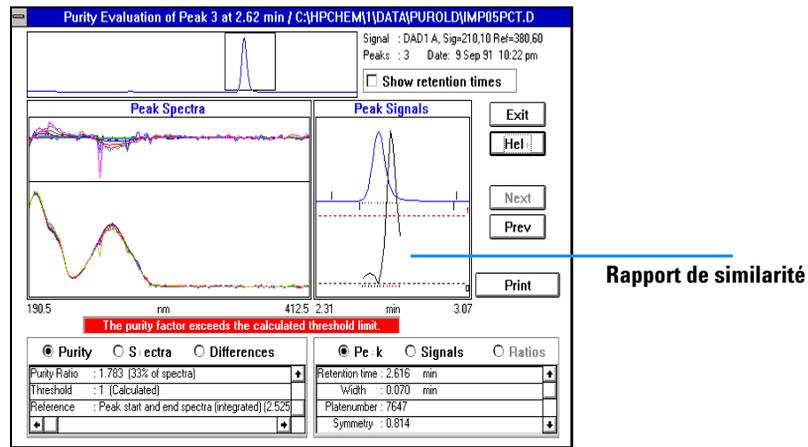


Figure 14 Résultats pour un pic avec 0,5 % d'impureté

Avec 0,5 % d'impureté, le rapport de similarité dans l'affichage des signaux du pic s'élève au-dessus de 1. Si le rapport est au-dessus de 1 pour trois points consécutifs ou plus, le test de pureté échoue, la boîte devient rouge et indique *The purity factor exceeds the calculated threshold limit (Le facteur de pureté dépasse la limite de seuil calculée).* Les changements dans le spectre et les spectres de différence présentent un profil défini.

Caractérisation plus approfondie des pics impurs

Pour pousser la caractérisation de pics impurs, nous pouvons retester le pic après avoir apporté deux changements simples aux paramètres de pureté. A l'écran Purity Options, changer spectra per peak en automatic 3. Dans Advanced Purity Options, définir Front et Tail pour le Niveau de pureté calculé avec. Ainsi, le logiciel compare un spectre provenant du front du pic et un spectre provenant de la traîne du pic, à chaque spectre individuel, générant deux rapports de similarité. La Figure 15 montre les résultats obtenus après les changements de paramètres.

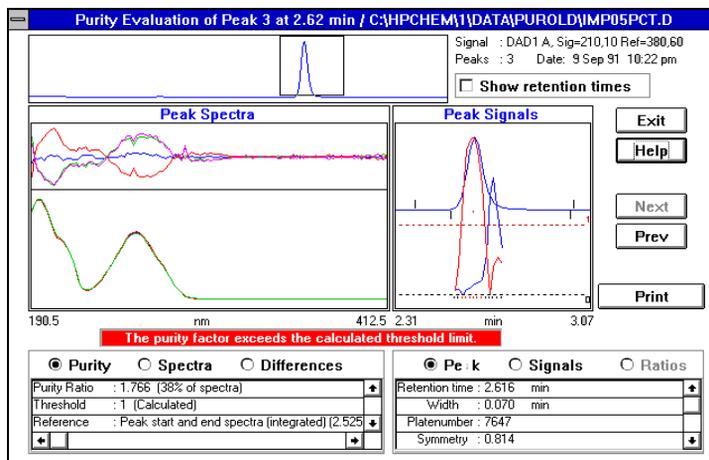


Figure 15 Pic avec 0,5 % d'impureté et des paramètres de pureté différents

Nous voyons les positions approximatives du composant majeur et l'impureté. Notez que les tailles relatives des rapports de similarité ne reflètent pas les tailles relatives du composant majeur et de l'impureté.

Résultats erronés du test de pureté

Deux problèmes de données courants influencent le test de pureté. Le premier se produit avec des données non linéaires causées par une trop forte concentration d'échantillon. Ce problème est facilement décelable puisque le spectre au sommet du pic ne concorde avec aucun autre spectre du pic. On obtient, pour le rapport de similarité, une courbe en "M" caractéristique comme le montre la Figure 16.

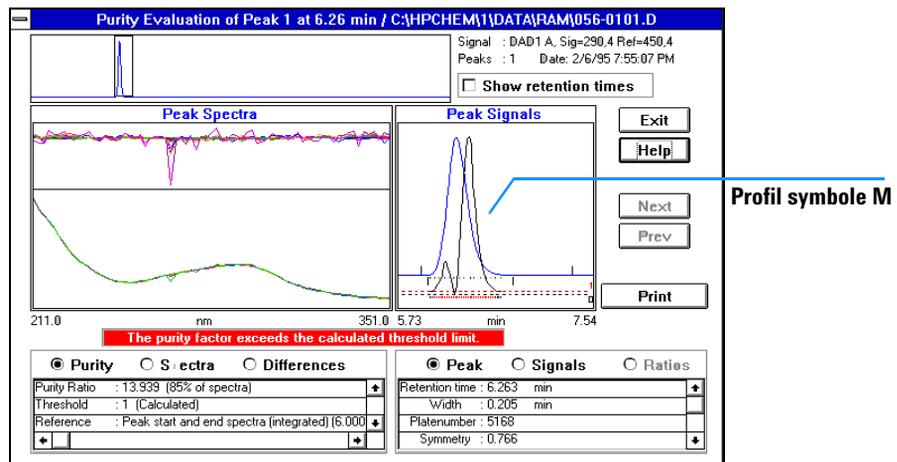


Figure 16 Evaluation de pureté à l'aide de données non linéaires

Le second problème se produit quand des régions du spectre avec une absorbance de fond élevée sont incluses dans l'évaluation de pureté. Le rapport de similarité devient alors très bruyant et la superposition spectrale est médiocre comme illustré dans la Figure 17 page 54.

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Utilisation de l'analyse de pureté des pics

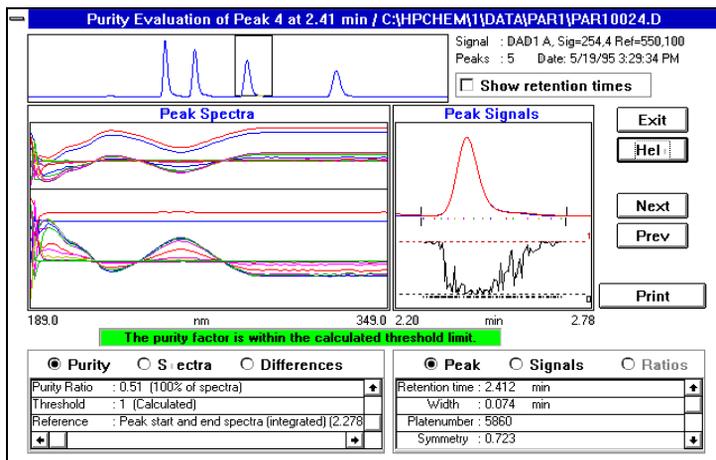


Figure 17 Evaluation de pureté avec un absorbance de fond élevée

Il est facile de confirmer ce point en réduisant la gamme de longueurs d'onde afin d'éliminer la région suspecte (dans ce cas, en définissant la limite inférieure à 220 nm) et en réexécutant le test. Les résultats sont présentés dans la [Figure 18](#).

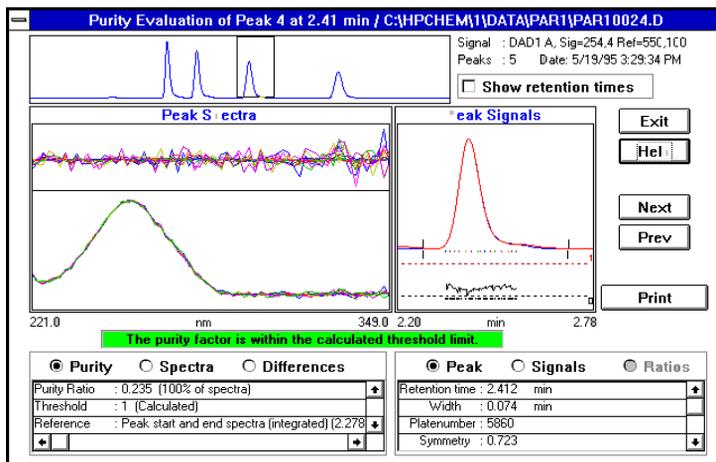


Figure 18 Evaluation de pureté avec une gamme de longueurs d'onde réduite

Paramètres recommandés

Les sections suivantes donnent des exemples de paramètres pour les boîtes de dialogue Purity Options et Advanced Purity Options, basés sur le mode de collecte de spectres utilisé.

Exemple 1 : All Spectra (spectres collectés en continu) ou All in Peak (tous les spectres d'un pic sont collectés) avec courbe de similarité — Mode automatique

Ces paramètres donnent les résultats les plus exacts, mais au prix de beaucoup d'espace disque et de temps de calcul.

Paramètres recommandés pour Purity Options

Reference Spectrum (spectre de référence)	Automatic ; Peak Baseline
Wavelength Range (gamme de longueurs d'onde)	Selon les besoins
Purity Display (affichage de la pureté)	Draw Spectra ; activé Draw Spectral Difference ; activé Draw & Use Similarity Curve ; activé Include Threshold Curve ; activé Draw Signals ; activé ; à partir des spectres Draw Signal Ratios ; désactivé
Spectra per Peak (spectres par pic)	Automatic ; 7

Informations supplémentaires

Purity Display (affichage de la pureté) La courbe de similarité est utilisée pour calculer la pureté des pics. La courbe de seuil est utilisée pour calculer la contribution du bruit.

Spectra per Peak (spectres par pic) Ces spectres sont utilisés pour construire les courbes de similarité en tant que fonction, avec tous les spectres enregistrés sur le pic. Voir “[Calculs de pureté](#)” page 37 pour des informations sur les seuils de spectres à utiliser pour le calcul de la pureté des pics. Réglez sur 7 ou 9 spectres par pic.

Seuil [mDO] ; dépend de votre système (de 0 à 5 mDO)
Seuil des spectres à utiliser dans les calculs de pureté des pics.

Ne sont pas utilisés dans les calculs, les spectres dont la plage d'absorbance est inférieure à cette valeur.

Purity Threshold (seuil de pureté) Non utilisé avec les courbes de seuil.

Paramètres recommandés pour Advanced Purity Options

Signal Processing (traitement du signal)	Seuil d'absorbance pour les signaux [mDO] ; 2 Normalize ; Maximum
Spectra Processing (traitement des spectres)	Tous désactivés
Spectra Normalization (normalisation des spectres)	Normalize ; Match
Purity (pureté)	Niveau de pureté calculé avec ; Courbe Average Spectrum Similarity affichée comme ; Ln(similarité & seuil)
Threshold Curve (courbe de seuil)	Calculer l'écart type de bruit à TR(min) avec 14 spectres

Informations supplémentaires

Purity (pureté) : Utiliser Average Spectrum pour la pureté de pic non-interactive. La courbe de similarité est calculée en utilisant le spectre moyen à partir du paramètre Spectra per peak, avec tous les spectres enregistrés sur le pic

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Paramètres recommandés

Threshold Curve (courbe de seuil) : Calculer le bruit avec les spectres à l'intersection d'une ligne de base plate (de 12 à 25 spectres environ).

Exemple 2 : All Spectra (spectres collectés en continu) ou All in Peak (tous les spectres d'un pic sont collectés) avec courbes de similarité — Interprétation manuelle

Ces paramètres donnent les résultats les plus exacts, mais au prix de beaucoup d'espace disque et de temps de calcul. L'interprétation manuelle est surtout utilisée dans le développement de méthodes.

Paramètres recommandés pour Purity Options

Reference Spectrum (spectre de référence)	Automatic ; Peak Baseline
Wavelength Range (gamme de longueurs d'onde)	Selon les besoins
Purity Display (affichage de la pureté)	Draw Spectra ; activé Draw Spectral Difference ; activé Draw & Use Similarity Curve ; activé Include Threshold Curve ; activé Draw Signals ; On ; à partir des spectres Draw Signal Ratios ; désactivé
Spectra per Peak (spectres par pic)	Automatic ; 7

Informations supplémentaires

Reference Spectra (spectres de référence) Les spectres de référence manuels peuvent aussi être utilisés avec la pureté de pics interactive.

Purity Display (affichage de la pureté) La courbe de similarité est utilisée pour calculer la pureté des pics. La courbe de seuil est utilisée pour calculer la contribution du bruit.

Spectra per Peak (spectres par pic) Ces spectres sont utilisés pour construire les courbes de similarité, avec tous les spectres enregistrés sur le pic. Le nombre de spectres dépend du paramètre Advanced: Purity. Pour un spectre Average, utiliser 7 ou 9 ; pour un spectre Front/Tail, utiliser 3 ou 5 ; pour un All Peak Spectra, utiliser 3 ou 5.

Seuil [mDO] ; dépend de votre système (de 0 à 5 mDO). Seuil des spectres à utiliser dans les calculs de pureté des pics.

Ne sont pas utilisés dans les calculs, les spectres dont la plage d'absorbance est inférieure à cette valeur.

Purity (pureté) Non utilisé avec les courbes de seuil.

Paramètres recommandés pour Advanced Purity Options

Signal Processing (traitement du signal)	Plage du temps de signal à afficher (*largeur du pic) ; 4 Seuil d'absorbance pour les signaux [mDO] ; 2 Normalize ; Maximum
Spectra Processing (traitement des spectres)	Tous désactivés
Spectra Normalization (normalisation des spectres)	Normalize ; Match
Purity (pureté)	Niveau de pureté calculé avec ; All Peak Spectra Courbe de similarité affichée comme ; Ln(similarité & seuil)
Threshold Curve (courbe de seuil)	Calculer l'écart type de bruit à TR(min) avec 14 spectres

Informations supplémentaires

Purity (pureté) Tout mode peut être utilisé pour la pureté de pics interactifs. La courbe de similarité est calculée avec le spectre sélectionné en tant que fonction avec tous les spectres enregistrés sur le pic.

Threshold Curve (courbe de seuil) Pour le *même* fichier, et pour réduire le temps de calcul, vous pouvez utiliser une valeur calculée antérieurement.

Calculer le bruit avec les spectres à l'intersection d'une ligne de base plate (de 12 à 25 spectres environ).

Exemple 3 : All Spectra (spectres collectés en continu) ou All in Peak (tous les spectres d'un pic sont collectés) ; sans courbes de similarité

Ces paramètres donnent des résultats plus rapides mais moins exacts.

Paramètres recommandés pour Purity Options

Reference Spectrum (spectre de référence)	Automatic ; Peak Baseline
Wavelength Range (gamme de longueurs d'onde)	Selon les besoins
Purity Display (affichage de la pureté)	Draw Spectra ; activé Draw Spectral Difference ; désactivé Draw & Use Similarity Curve ; désactivé Include Threshold Curve ; désactivé Draw Signals ; activé ; à partir des spectres Draw Signal Ratios ; désactivé
Spectra per Peak (spectres par pic)	Automatic ; 5
Purity (pureté)	Purity Threshold ; 990

Informations supplémentaires

Reference Spectra (spectres de référence) Les spectres de référence manuels peuvent aussi être utilisés avec la pureté de pics interactive.

Spectra per Peak (spectres par pic) Ces spectres sont utilisés pour les calculs de pureté des pics. Vous pouvez choisir 5 ou 7 spectres par pic.

Seuil des spectres à utiliser dans les calculs de pureté des pics.

Seuil [mDO] ; dépend de votre système (de 0 à 5 mDO)

Seuil des spectres à utiliser dans les calculs de pureté des pics.

Les spectres dont la plage d'absorbance est inférieure à cette valeur ne sont pas utilisés dans les calculs de pureté de pics.

Purity (pureté) Utilisé pour déterminer les pics purs/impurs.

Paramètres recommandés pour Advanced Purity

Signal Processing (traitement du signal)	Plage du temps de signal à afficher (*largeur du pic) ; 4 Seuil d'absorbance pour les signaux [mDO] ; 2 Normalize ; Maximum
Spectra Processing (traitement des spectres)	Tous désactivés
Spectra Normalization (normalisation des spectres)	Normalize ; Match
Purity (pureté)	Niveau de pureté calculé avec ; Apex spectrum
Threshold Curve (courbe de seuil)	Non utilisé

Informations supplémentaires

Purity (pureté) Vous pouvez aussi utiliser le paramètre Average ou All.

Exemple 4 : Peak-Controlled Spectra (spectres contrôlés par les pics)

Ces paramètres sont ceux qui demandent le moins d'espace disque.

Paramètres recommandés pour Purity Options

Reference Spectrum (spectre de référence)	Automatic ; Apex
Wavelength Range (gamme de longueur d'onde)	Selon les besoins
Purity Display (affichage de la pureté)	Draw Spectra ; activé Draw Spectral Difference ; activé Draw & Use Similarity Curve ; désactivé Include Treshold Curve ; désactivé Draw Signals ; activé ; Stored in Data File Draw Signal Ratios ; désactivé
Spectra per Peak (spectres par pic)	Automatic ; All
Purity (pureté)	Purity Threshold ; 990

Informations supplémentaires

Reference Spectra (spectres de référence) Les spectres de référence manuels peuvent aussi être utilisés avec la pureté de pics interactive.

Vous pouvez aussi utiliser la ligne de base la plus proche si le fichier de données contient suffisamment de spectres de ligne de base.

Spectra per Peak (spectres par pic) Ces spectres sont utilisés pour les calculs de pureté des pics.

Seuil des spectres à utiliser dans les calculs de pureté des pics.

Seuil [mDO] ; dépend de votre système (de 0 à 5 mDO). Seuil des spectres à utiliser dans les calculs de pureté des pics.

Les spectres dont la plage d'absorbance est inférieure à cette valeur ne sont pas utilisés dans les calculs de pureté de pics.

Purity (pureté) Utilisé pour déterminer les pics purs/impurs.

Paramètres recommandés pour Advanced Purity

Signal Processing (traitement du signal)	Plage du temps de signal à afficher (*largeur du pic) ; 4 Seuil d'absorbance pour les signaux [mDO] ; 2 Normalize ; Maximum
Spectra Processing (traitement des spectres)	Tous désactivés
Spectra Normalization (normalisation des spectres)	Normalize ; Match
Purity (pureté)	Niveau de pureté calculé avec ; All peak spectra
Threshold Curve (courbe de seuil)	Non utilisé

Informations supplémentaires

Purity (pureté) Vous pouvez aussi utiliser le paramètre Average.

Evaluation de la pureté des pics (A.05.0x)

Cette section décrit les diverses méthodes que vous pouvez utiliser pour évaluer la pureté d'un pic :

- “Vérification de la pureté d'un pic” page 65
- “Affichage de la pureté d'un pic” page 70
- “Utilisation de l'analyse de pureté d'un pic” page 83
- “Calcul de pureté des pics à partir des spectres de masse” page 87

Vérification de la pureté d'un pic

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 la vérification de la pureté d'un pic ?

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

ATTENTION

Le pic peut contenir des impuretés même si les spectres sont identiques. 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 des spectres contient les spectres de pic comportant les spectres de comparaison (moyens) tracés dans un mode normalisé et superposé. La fenêtre Purity contient les signaux comportant les 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 une 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 pics.

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

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

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 1000 indique des spectres identiques. En général, des valeurs supérieures à 990 indiquent que le spectre est similaire. 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, qui tient compte de l'échantillon et de la méthode de séparation utilisée. Ils incluent la spécificité des composés, l'absorption

spectrale des composés de matrice, et le niveau de bruit spectral, de même 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 puis l'opération se répète.

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.

REMARQUE

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 de lissage. 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 pic ressemble plus à une ligne incurvée qu'à un polygone. Pour cela, il faut calculer les points de données supplémentaires entre les points de données d'origine de votre spectre en utilisant les fonctions trigonométriques. Lors de l'utilisation de la fonction de reconstruction, les points de données originaux sont préservés.

Spectres logarithmiques

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

Spectres dérivés

Les spectres dérivés révèlent des détails plus spécifiques que les spectres d'origine lors d'une comparaison de composés différents. 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 de spectres dérivés.

Correction d'absorption non spécifique par sélection d'un spectre de référence

Il existe plusieurs types de correction pour extraire les spectres des pics 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 temps 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 marques de début et de fin d'intégration des pics choisis indiquent la position des spectres de référence et sont 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 de la même façon que lorsqu'on choisit une référence manuelle.

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 et 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 d'un spectre normalisé à différentes sections du 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 d'un pic

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 en détail.

Normalisation spectrale

Une technique d'évaluation de pureté de pic commune associe normalisation et comparaison de spectres collectés tout le long du pic. La normalisation compense le changement de concentration du composant passant au travers de la cellule du détecteur durant l'élution 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 19](#) page 71 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 le pic pur et le pic impur apparaît clairement, tant par la comparaison visuelle que par le facteur de pureté calculé par le logiciel.

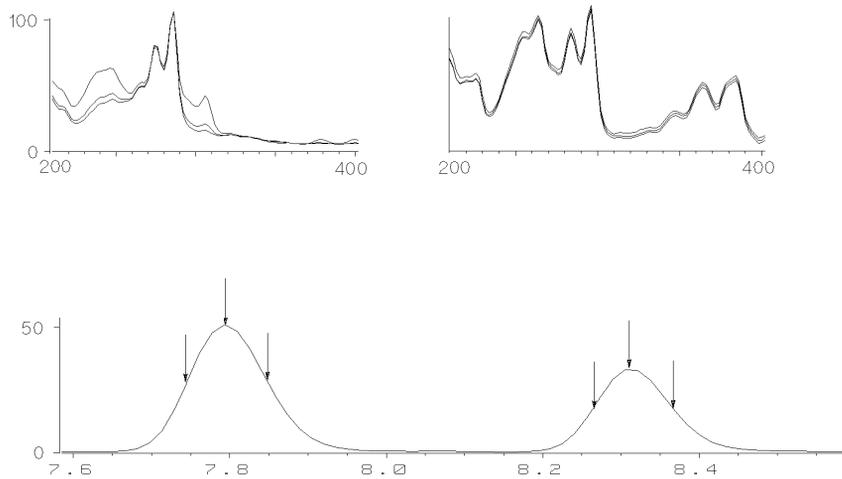


Figure 19 Vérification de la pureté d'un pic par superposition de spectres

Fenêtre Purity

Le contenu de la fenêtre Purity est fonction des paramètres de pureté retenus. L'affichage par défaut est le Purity Ratio (rapport de pureté), qui montre les signaux avec les courbes de similarité et de seuil en superposition (voir la [Figure 20](#)). 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 votre limites acceptables de pureté que vous avez fixées.

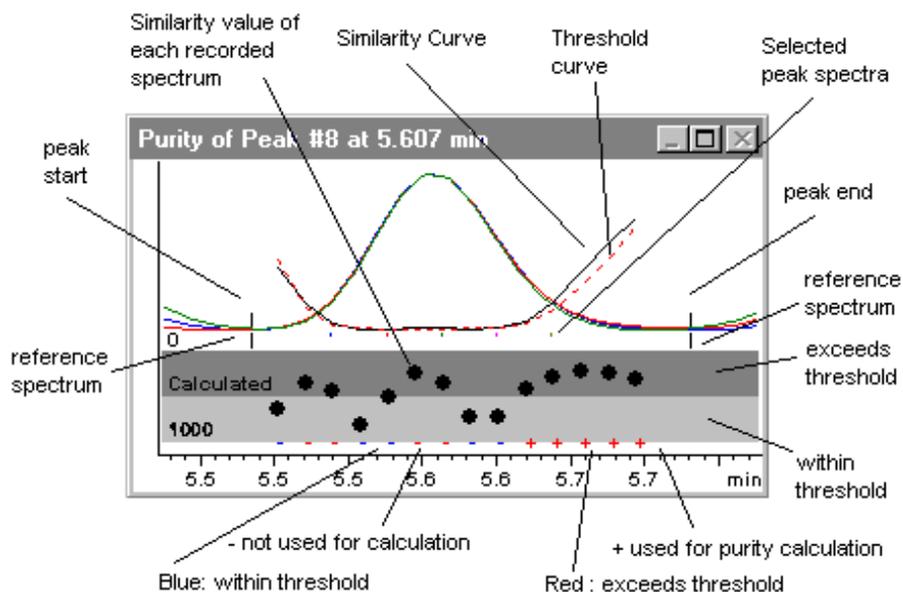


Figure 20 Fenêtre Purity

Courbes de similarité spectrale

Les courbes de similarité spectrales sont affichées dans la fenêtre Purity de Spectra display (voir la Figure 20).

Si certains détails ne s'affichent pas clairement, 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 1000, comme illustré à la Figure 21 (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 21 (b).

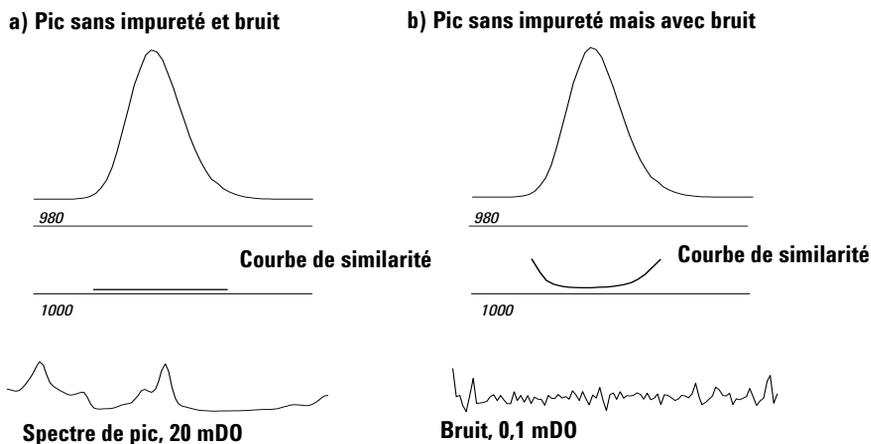


Figure 21 Courbes de similarité pour un pic pur avec ou sans bruit pour un facteur de similarité idéal (1000) et un seuil défini par l'utilisateur (980)

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 22](#). Le facteur de similarité diminue avec un rapport signal/bruit croissant ou un niveau de bruit constant avec une plage d'absorbance décroissante.

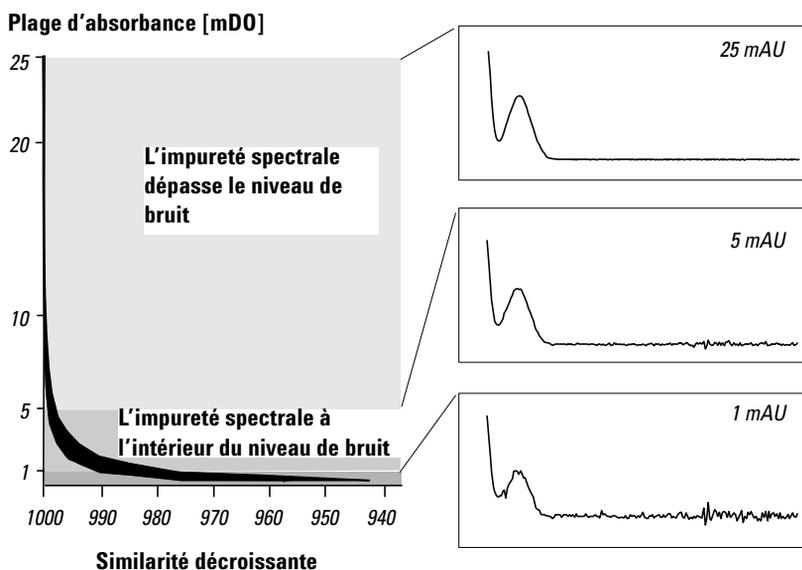


Figure 22 Facteur de similarité comme fonction du niveau de bruit

La [Figure 23](#) (a) montre à la fois la courbe de similarité et la courbe de seuil d'un pic pur avec du bruit, La [Figure 23](#) (b) pour un pic impur.

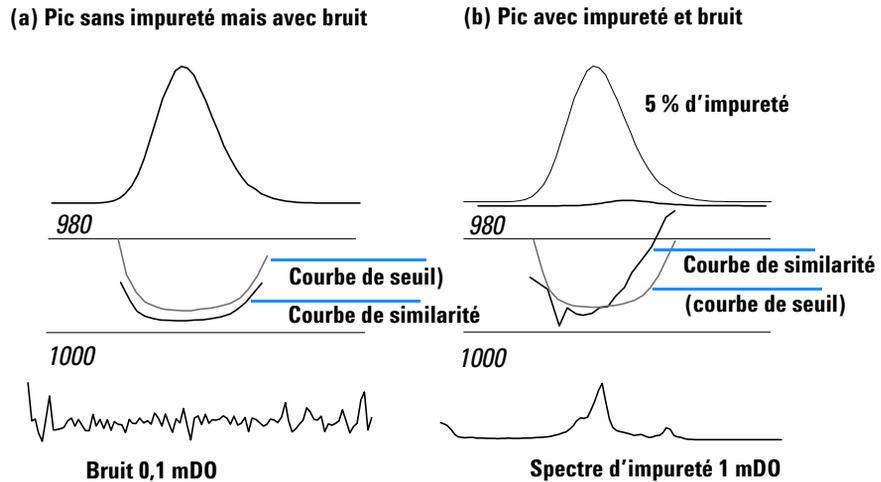


Figure 23 Influence de l'impureté du bruit sur les courbes de similarité et de seuil

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

La courbe de seuil, représentée par la ligne continue, 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 24](#).

En règle générale, la comparaison par défaut avec le spectre moyen fournit la meilleure information pour la plupart des impuretés inconnues. Il est très intéressant de pouvoir sélectionner un spectre cible spécifique dans deux cas: lorsque le chimiste analytique 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 l'information la plus significative dans ce cas.

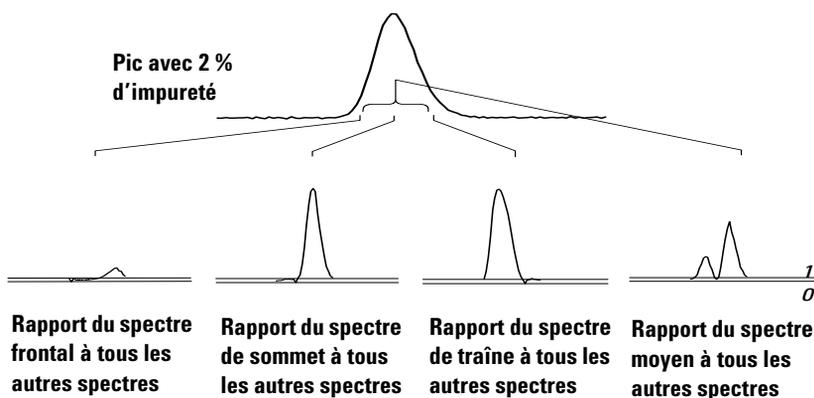


Figure 24 Les courbes de rapport pour différents spectres cibles à partir du même pic

La [Figure 24](#) donne la courbe de rapport pour le spectre frontal, de sommet, de traîne, et moyen, d'un pic contenant une impureté après la réponse maximum (sommet).

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 spectres de pic sélectionnés, dans ce cas les spectres de la pente montante, de sommet et de la pente descendante). 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 paramètres. Pour des pics impurs, une analyse du cas le plus mauvais est effectuée. Seuls les points de données se référant à une impureté, par exemple, des spectres qui se situent au-dessous du seuil, sont considérés 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](#)" page 73.

All Spectra (tous les spectres)

- 1 Tous les spectres de référence corrigés pris pour un pic et qui se situent au-dessus du seuil défini par l'utilisateur sont utilisés pour le calcul des courbes de pureté et de similarité ; 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.

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Affichage de la pureté d'un pic

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 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.

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.

REMARQUE

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 Purity Options.

Spectres de pics

Les spectres de pics affichent le détail des cinq spectres retenus pour les calculs de la 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 pris au travers du pic.
- **Les spectres de référence :**
le spectre ou les spectres utilisés pour une correction de fond.

Calculs de la pureté et du bruit

Les informations concernant le calcul de la pureté indiquent le nombre total de pics pris 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 des calculs effectués. Vous pouvez visualiser à la fois 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.

REMARQUE

Le fait de changer les paramètres pour le calcul du bruit de fond peut avoir un effet majeur sur les résultats du calcul de pureté. Assurez-vous d'avoir bien compris les informations données dans la rubrique "[Options évoluées de pureté des pics](#)" page 81 avant de procéder à tout changement.

Courbe de pureté

Les informations de la courbe de pureté 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 pour le pic.

More Purity Curves

Les informations de "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](#)" page 76). 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.

REMARQUE

Le fait de changer les paramètres de calcul de la pureté peut avoir un effet 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](#)" page 81 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), celles-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 la vérification de la pureté d'un pic ?](#)” page 65), mais vous pouvez aussi utiliser d'autres spectres comme base de calcul :

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.

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 des pics (voir “[Utilisation des spectres cibles spécifiques](#)” page 76).

Front & Tail spectrum (spectre frontal & spectre de traîne) montrent 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 20, 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 25 \(a\)](#);
- 2 En tant que logarithme naturel, \ln , voir la [Figure 25 \(b\)](#), avec l'avantage de plus de détails pour le sommet du pic dans la partie inférieure du graphique;
- 3 En tant que rapport :
$$\text{ratio} = \frac{1000 - \text{similarité}}{1000 - \text{seuil}}$$
, voir la [Figure 25 \(c\)](#).

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Affichage de la pureté d'un pic

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

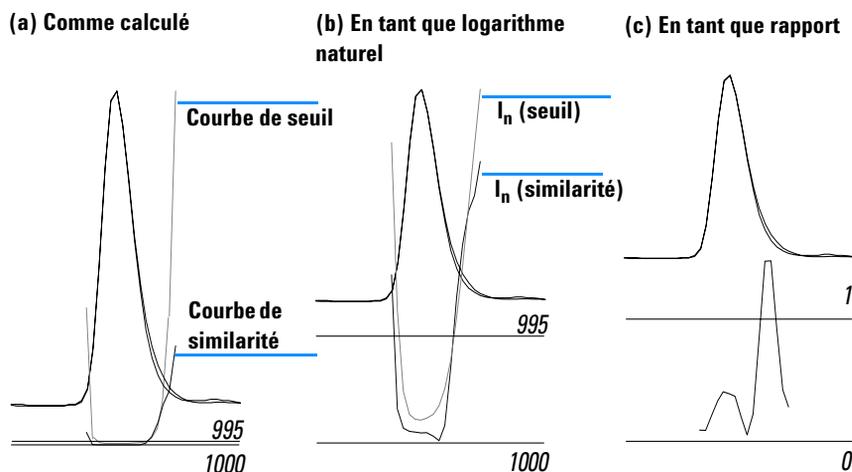


Figure 25 Courbes de similarité et de seuil,
(a) as Calculated, (telle que calculée)
(b) I_n (Threshold : seuil) et I_n (Similarity : similarité), et
(c) as a Ratio (en tant que rapport)

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 temps et le nombre de 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 à 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 acceptable. Assurez-vous que le détecteur est bien entretenu, l'intensité de la lampe forte, et que vous avez choisi la bonne cellule et la fente appropriée. 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 pas généralement pas si importante.

Utilisez le stockage All spectra pour collecter des spectres de manière continue. Les nouveaux détecteurs supportent 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 pour 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 votre concentration d'échantillon convient à la gamme de fonctionnement linéaire du détecteur. Si un composé 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. Ce qui engendrera une modification du profil des spectres en fonction de la concentration, et le composé sera déclaré comme probablement impur. Si la concentration du composé est trop basse, le rapport signal-sur-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 d'un pic

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 parmi les choix proposés dans les Options spectrales de la boîte de dialogue.

Wavelength Range (gamme de longueurs d'onde)

Utilisez ce paramètre pour contrôler la partie de la gamme de longueurs d'ondes 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'ondes plus hautes où le composé intéressant n'absorbe pas.

Spectra Processing (traitement des spectres)

Vous permet d'effectuer des calculs mathématiques pour 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, le seuil est réglé à 1 – ou 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 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 en utilisant des gradients.

Les autres modes de référence sont disponibles pour permettre la compatibilité rétroactive avec les logiciels précédents, de manière à pouvoir obtenir quelques informations de pureté même si seulement quelques spectres sont pris.

Si deux pics ne sont pas complètement séparés à la ligne de base, la sélection automatique des spectres de référence en utilisant Automatic reference selection pourrait conduire à un spectre de référence sélectionné à partir de la vallée entre les deux pics. Un pic non résolu ne peut être pur. Dans ce cas, il est possible d'utiliser le test de pureté pour rechercher d'autres composants cachés. Utilisez la 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 avec la fonction "peak-controlled spectra", vous devez entrer une valeur pour le seuil de pureté. Généralement, 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 spectres sous le pic, mais ce n'est pas recommandé. Si vous voulez utiliser un seuil fixe, choisissez-le plus élevé que pour le mode "spectres contrôlés par les pics" (peak-controlled spectra), par exemple entre 995 et 998.

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 deux composés peuvent être très proches 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 est 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, il est réputé impur et les différents groupes d'ions peuvent être déterminés.

Dans cette analyse, plusieurs postulats sont posés :

- Les constituants d'un mélange peuvent être séparés d'après leur spectre de masse ou leur temps de rétention. Dans ce cas, chaque composé doit présenter un spectre 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.
- Le temps de rétention des ions utilisés pour le calcul des temps de rétention des composés sont précis et représentatifs.

Une rare exception, 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 la série de spectres (même) en cas de co-élution, il est possible d'identifier et de quantifier ces ions. Une attention particulière doit être portée aux adduits de cations ou d'anions donnant des masses proches des ions 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 qu'en "électrospray".

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

L'algorithme du test de pureté identifie un pic impur uniquement en cas de différence entre les spectres et 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 est définie à différentes valeurs de m/z , et l'abondance maximale pour chacune de ces valeurs m/z est déterminée. Pour chaque maximum trouvé, un temps de rétention est déterminé par interpolation entre les numéros de spectres 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 de chaque (numéro de spectre) et les principales valeurs de m/z de l'amas sont alors affichés.

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 m/z d'abondance est supérieure à 1%. Pour chaque valeur m/z choisie, les valeurs des abondances du premier et du dernier spectre de la zone sont utilisées pour calculer la correction de bruit de fond de l'amas.

Chaque valeur de m/z du groupe est examinée sur chaque spectre dans la zone de temps et l'abondance maximale est enregistrée avec l'abondance mesurée de chaque côté du maximum. Un seul maximum par m/z est enregistré. Pour chaque maximum enregistré, on vérifie que sa valeur m/z n'existe pas sur le premier et le dernier spectre avec une abondance non nulle sur les deux côtés du pic.

Après calcul et correction de bruit de fond pour chaque valeur m/z , un tableau est construit avec le temps de rétention (interpolation), l'abondance et la valeur m/z , classés par temps de rétention croissants.

3 Evaluation de la pureté d'un pic

Pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de masse

Les amas sont définis à partir des plus fortes abondances de la liste 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 supérieur au précédent de plus d'un demi intervalle entre les spectres, un nouvel amas est défini.

Le nombre d'amas trouvé correspond au nombre de composés ; le temps de rétention moyen correspond au spectre d'abondance maximale et les deux valeurs de m/z ayant des abondances maximales sont données comme ions spécifiques.

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

Affichage de l'écran pureté des spectres de masse

Ions pour la fenêtre de pic

Le logiciel affiche les deux ions (valeurs m/z) par amas. Les pics mono-composant présentent deux ions ayant leur maximum au même temps de rétention ; les pics multi-composants présentent des paires d'ions ayant leur maximum à des temps de rétention différents. Chaque paire d'ions représente un composé sous le pic impur. Vous pouvez utiliser les outils de manipulation graphique de la ChemStation Agilent pour étudier les ions plus en détail.

Affichage des résultats du test de pureté (MS Peak Purity Results Window)

La fenêtre des résultats du test de pureté contient ces résultats sous forme tabulaire. Chaque ligne de la table représente un composé : avec numéro de spectre maximum (temps de rétention) et les deux ions les plus abondants.

Indice

A

absorbance
rapport, 30
absorbance de fond, 53
acquisition de spectres, 46, 83
affichage de pureté
spectre de masse, 88
astuces, 46

C

calcul du niveau de pureté, 37
courbe de similarité en tant que
similarité/seuil, 34
courbe de similarité sélectionnée, 38
pas de courbe de similarité
sélectionnée, 37
calculs de pureté
courbe de seuil, 73, 78
spectres de masse, 87
calculs du niveau de pureté
inclure la courbe de seuil, 40
compare
spectra, 70
COMPARE, commande, 24, 66
comparer
spectres, 27
conseils, 83
Correction d'absorption, 28, 68
Courbe de seuil, 74
courbe de seuil, 40, 43, 50, 73, 78, 81
modes d'affichage, 44, 75
courbe de similarité, 48
courbes de similarité spectrale, 33
courbes de similarité spectrales, 73

D

détermination
longueur d'onde optimale, 12
données non linéaires, 53

F

facteur de correspondance, 24, 66
fond
absorptions, 23, 65

G

gamme de fonctionnement linéaire, 46, 83

I

impureté, 23, 65

L

l'analyse spectrale
de quoi s'agit-il ?, 10
ligne de base
correction, 29, 68
lignes concentriques, 12
lissage de spectres, 25, 67
longueur d'onde
optimisation, 12
longueur d'onde optimale, 12

M

marqueur de correspondance en
bibliothèque, 20
marqueur de pureté, 19
marqueur nom du composé, 20
multiple
rapport d'absorbance, 31

N

niveau de pureté, 49
normaliser
spectres, 27
normalize
spectra, 70

P

peak signals window, 73
Peak Signals, fenêtre, 33
pic
impureté, 23, 65
pureté, 23, 65
pics impurs, 52
pureté
pic, 23, 65
pureté d'un pic
courbe de seuil, 81
de quoi s'agit-t-il ?, 23
qu'est ce ?, 65
spectrométrie de masse, 86
pureté d'un pic obtenu par spectrométrie de
masse, 86
pureté de pic
courbe de seuil, 74
courbes de similarité spectrales, 73
spectrométrie de masse, 86
utilisation des spectres cibles
spécifiques, 35, 76
pureté des pics
bruit, 43
courbe de seuil, 40, 43
courbe de similarité, 43
courbes de similarité spectrale, 33

Indice

R

rapport

- pureté de pic, 14
- recherche en bibliothèque, 14
- spectral, 14
- tracé de signal, 30

radiogramme, 31

- calcul du rapport d'absorbance, 31

recherche automatique en bibliothèque

- analyse de composé cible, 17

Recherche automatique en bibliothèque

spectrale

- généralités, 3

recherche en bibliothèque de spectres

automatisée

- aperçu, 3
- modèles de recherche, 16
- pureté des pics, 18
- recherche standard, 16

S

signal

- tracé des rapports, 30

Spectra, 49

spectra

- normalize, 70

spectral operations

- compare, 70
- normalize, 70

spectre

- correction, 28, 68
- lissage, 25, 67
- référence, 84
- référence, 47

spectre de fluorescence, 13

spectre de référence, 47, 84

- correction d'absorption, 28, 68

spectre de sommet, 35, 76

spectre de traîne, 36, 77

spectre frontal, 35, 76

spectre moyen, 36, 77

spectre, fluorescence, 13

spectres

- logarithmiques, 67
- normaliser, 27
- spectres cibles, 35, 76
- spectres dérivés, 25, 68
- spectres logarithmiques, 67

T

third dimension, 10

tracé d'absorbance, 12

traitement des signaux, 49

traitement des spectres

- comparer, 27
- normaliser, 27

www.agilent.com

A propos de ce manuel

Ce manuel concerne le module d'analyse spectrale de la ChemStation Agilent. Il complète les informations contenues dans le manuel *Comprendre votre ChemStation Agilent* décrivant les concepts d'analyse spectrale spécifiques applicables à la ChemStation Agilent pour systèmes CPL 3D et systèmes EC .

La procédure d'installation et de configuration détaillée de votre module d'analyse spectrale avec une ChemStation Agilent pour système CPL 2D est décrite dans le manuel *Installation de votre ChemStation Agilent pour systèmes CPL*.

© Agilent Technologies Deutschland GmbH 2003

Printed in Germany
06/03



G2180-93006



Agilent Technologies