

TP 6 - Spectroscopie Proche Infrarouge

La spectroscopie Proche InfraRouge (SPIR), ou NIR (Near InfraRed), est une technique récente, très utile en analyses de routine dans l'agriculture, l'agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, etc, pour le contrôle qualité des matières premières et des produits finis. Sans préparation particulière des échantillons, cette technique permet d'identifier des molécules et de les quantifier.

Cette technique utilise l'absorption (longueur d'onde et intensité) de la lumière proche infrarouge par un échantillon. Son principe repose sur les propriétés vibrationnelles des molécules et leurs interactions avec la lumière.

Tableau I. Avantages et inconvénients de la spectroscopie NIR

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">- Permet le dosage quantitatif et qualitatif de produits- Pas de préparation d'échantillons nécessaire- Ne nécessite pas l'utilisation de solvant ou de gaz- Non destructive (l'échantillon est inchangé)- Analyses en transmission sur des échantillons relativement épais- Analyse en réflexion sans contact- Utilisable en ligne- Possibilité d'analyse de produits toxiques ou dangereux à distance- Coût d'analyses réduit (consommables, temps...)- Rapide (de quelques secondes à 2 minutes)- Applicable en analyse de routine sans compétence spécifique- Méthode puissante pour l'étude de la liaison hydrogène.	<ul style="list-style-type: none">- Manque de bibliothèques de spectres diversifiées- Manque de corrélation structurale (difficultés pour l'interprétation des spectres)- Besoin de calibration pour les mélanges (analyse directe très difficile en général). Utilisation de méthode de chimométrie et phase d'étalonnage longue et délicate- En réflexion, la composition de la surface de l'échantillon doit être identique à celle du cœur (faible pénétration du faisceau dans l'échantillon)- La taille et l'orientation des particules modifient les spectres (même problème qu'en IR moyen)- Problème de transfert de calibration d'une méthode d'un appareil à l'autre- N'est généralement pas une technique d'analyse de traces, sauf cas particuliers.

I/ Rappels de cours

Les fréquences de vibration s'interprètent facilement à partir de la seule mécanique classique. La mécanique quantique est cependant nécessaire pour expliquer le passage de l'énergie de vibration à l'énergie des photons émis ou absorbés.

1/ L'oscillateur harmonique

Soit un atome de masse m lié à un point fixe par une force de rappel (figure 1),

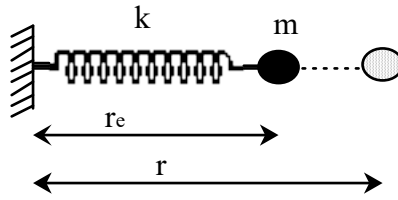


Figure 1. Oscillateur monoatomique

pour de petits déplacements $x = (r - r_e)$, l'allongement et la compression de la liaison représentée par un

ressort obéissent à la loi de Hooke : Force de rappel = $-\frac{dV(x)}{dx} = -kx$

où V est l'énergie potentielle, k la constante de force dont la valeur reflète la force de la liaison et $x = (r - r_e)$ le déplacement par rapport à la longueur de la liaison à l'équilibre r_e .

Au voisinage de la position d'équilibre le développement en série de Taylor de $V(x)$ s'écrit

$$V(x) = V(r_e) + \left(\frac{dV}{dx}\right)_{x=0} x + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_{x=0} x^2 + \dots$$

Si la position d'équilibre est prise comme origine des énergies, l'énergie potentielle $V(r_e)$ y sera nulle et

comme cette position correspond à un minimum, $\left(\frac{dV}{dx}\right)_{x=0} = 0$.

Enfin, comme $\left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_{x=0} = k$, l'énergie potentielle du système étudié s'écrit $V(x) = \frac{1}{2}kx^2$ (figure 2).

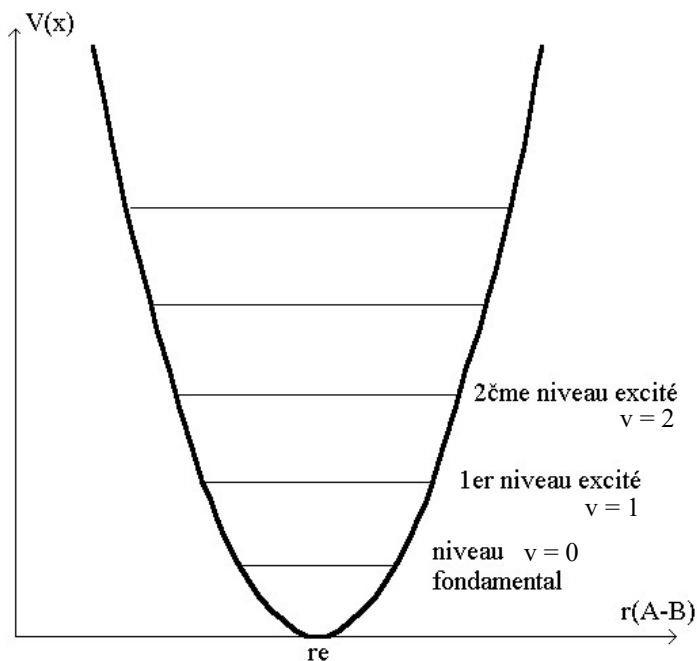


Figure 2. Courbe d'énergie potentielle d'un oscillateur harmonique

Au voisinage de la position d'équilibre, l'énergie potentielle est alors assimilable à une parabole (approximation harmonique).

Les termes d'ordre supérieur dans le développement en série de Taylor, sont appelés termes d'anharmonicité.

Par ailleurs, l'hamiltonien quantique de l'oscillateur harmonique à une dimension est donné par

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} + \frac{1}{2} kx^2. \text{ L'équation de Schrödinger } H\psi = E\psi \text{ devient}$$

$$\frac{d^2\psi_v}{dx^2} + \left(\frac{2mE_v}{\hbar^2} - \frac{mkx^2}{\hbar^2} \right) \psi_v = 0$$

équation à partir de laquelle il est possible de montrer que l'énergie d'un niveau vibrationnel est

$$E_v = hv \left(v + \frac{1}{2} \right)$$

où v est la fréquence de vibration classique et v le nombre quantique de vibration qui peut prendre les valeurs 0, 1, 2, ...

Cette relation montre que les niveaux vibrationnels sont régulièrement espacés de hv et que le niveau $v = 0$ a l'énergie $\frac{1}{2} hv$, appelée énergie de point zéro.

La seule transition permise par l'approximation de l'oscillateur harmonique est le passage de la molécule de son niveau fondamental ($v = 0$) à son premier niveau excité ($v = 1$). Le niveau fondamental $v = 0$ étant pratiquement le seul niveau occupé à température ambiante, la transition associée $v = 0$ vers $v = 1$ est généralement intense et peut être observée soit en spectroscopie infra-rouge (molécules diatomiques hétéronucléaires et vibrations antisymétriques), soit en spectroscopie Raman (molécules diatomiques homonucléaires et vibrations symétriques).

L'énergie cinétique du système est reliée au cours du temps à son énergie potentielle par la relation de Lagrange $\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial T}{\partial \dot{x}} \right) = -\frac{\partial V}{\partial x}$, qui, après calcul, conduit à la formule $\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{m}}$.

Le principe précédemment exposé peut facilement être transféré aux molécules diatomiques.

Une molécule diatomique est constituée de deux masses ponctuelles m_1 et m_2 , positionnées le long d'un axe x . Les déplacements sont déterminés par les coordonnées x_1 et x_2 (figure 3).

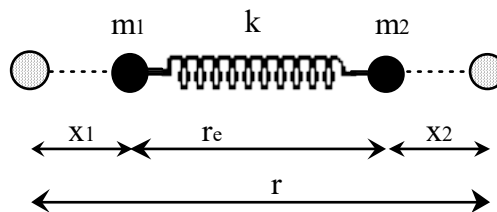


Figure 3. Oscillateur diatomique

Le centre de gravité de la molécule reste immobile pendant l'oscillation, sinon la molécule se déplace.

L'analyse mathématique d'un tel système, avec deux masses et deux allongements, est substituable par un

système de masse réduite $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$, avec un déplacement $x = x_1 - x_2$, lié à une paroi fixe.

La résolution des équations de Lagrange associées conduit à la formule bien connue : $\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$.

Par abus de langage, ce nombre d'onde est souvent désigné sous le terme de "fréquence, en cm^{-1} ", ce qui s'explique par la proportionnalité directe entre fréquence et nombre d'onde.

Les molécules complexes sont constituées de nombreux oscillateurs diatomiques (liaisons) ou polyatomiques (groupements, squelette, etc) qui conduisent à des spectres complexes présentant de nombreuses bandes de vibrations fondamentales (élongations de valences, déformations angulaires).

Les "bonnes" vibrations, celles exploitables facilement, se situent classiquement dans les hautes fréquences (tableau II), parfois les basses fréquences.

Tableau II. Zones de fréquences caractéristiques de quelques groupements

groupement (atomes = C, O, N)	zone de fréquences (cm^{-1})
XH _n	2600-3600
X≡Y et X=Y=Z	2050-2250
X=Y	1600-1800

Les moyennes fréquences qui correspondent souvent à des vibreurs très couplés ne sont pas transférables d'une molécule à l'autre. Toutefois cette zone moyenne ($800\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) constituant l'empreinte digitale de la molécule peut être analysée à l'aide de bases de données et de logiciels appropriés.

2/ L'oscillateur anharmonique

L'approximation de l'oscillateur harmonique ne permet pas d'expliquer l'intégralité de ce qui est observé sur les spectres, ni la possible rupture des liaisons, car une molécule réelle n'est pas exactement harmonique. L'approximation vue précédemment n'est applicable qu'au voisinage de la position d'équilibre, c'est à dire lorsque $x (= r - r_e)$ est petit.

Aux grandes valeurs de r , la molécule se dissocie. Deux atomes neutres sont formés et comme ils n'interagissent plus, la constante de force devient nulle et r peut alors augmenter jusqu'à l'infini. Par conséquent, la courbe de l'énergie potentielle devient plate à $V = D_e$, où D_e est l'énergie de dissociation spectroscopique (théorique) mesurée par rapport à l'énergie potentielle d'équilibre.

L'énergie de dissociation à partir du niveau fondamental est l'énergie de dissociation chimique (ou expérimentale) et vaut $D_0 = D_e - \frac{1}{2} h\nu$.

Pour une molécule diatomique, la courbe d'énergie potentielle devient (figure 4) :

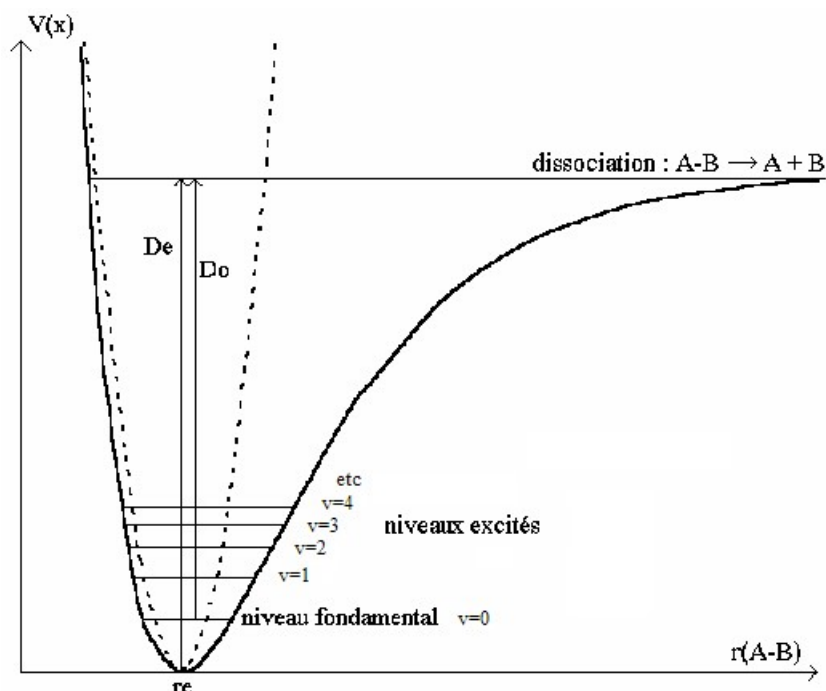


Figure 4. Courbe d'énergie potentielle d'un oscillateur anharmonique
(La courbe en pointillés correspond à l'oscillateur harmonique)

Les valeurs propres obtenues par la résolution de l'équation de Schrödinger ont cette fois-ci pour expression

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu_e - \alpha_e \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 h\nu_e$$

avec ν_e la fréquence théorique d'harmonique et α_e le coefficient d'anharmonicité (de l'ordre de 0,005 à 0,02 pour une molécule diatomique).

Il s'en suit qu'au lieu d'être équidistants, les niveaux de vibration se rapprochent lorsque leur énergie augmente et sont en nombre fini. En effet, les valeurs de E_v n'ont donc de sens que si E_v augmente avec v ,

c'est à dire si $\frac{dE_v}{d(v+1/2)} = 1 - \alpha_e(v+1/2) > 0$, ce qui conduit à $v < \frac{1}{2\alpha_e} - \frac{1}{2}$. En conséquence, la rupture

de la liaison chimique se produira à partir de cette valeur entière de v .

Par ailleurs, contrairement à l'approximation de l'oscillateur harmonique, de nombreuses transitions (non fondamentales) sont ici permises (figures 5 et 6) :

- des harmoniques sont observées à des multiples entiers de la fréquence d'absorption fondamentale et décroissent rapidement en intensité.
- des bandes de combinaison, correspondant à la somme ou à la différence de deux ou plusieurs fréquences fondamentales, et ayant des intensités en principe assez faibles.
- des transitions chaudes, quant à elles, ne partent pas du niveau fondamental mais d'un niveau déjà excité pour rejoindre un niveau d'excitation supérieure. Leur intensité, déjà faible, décroît rapidement lorsque le degré d'excitation du niveau de départ augmente, de même que l'écart entre les deux niveaux concernés.

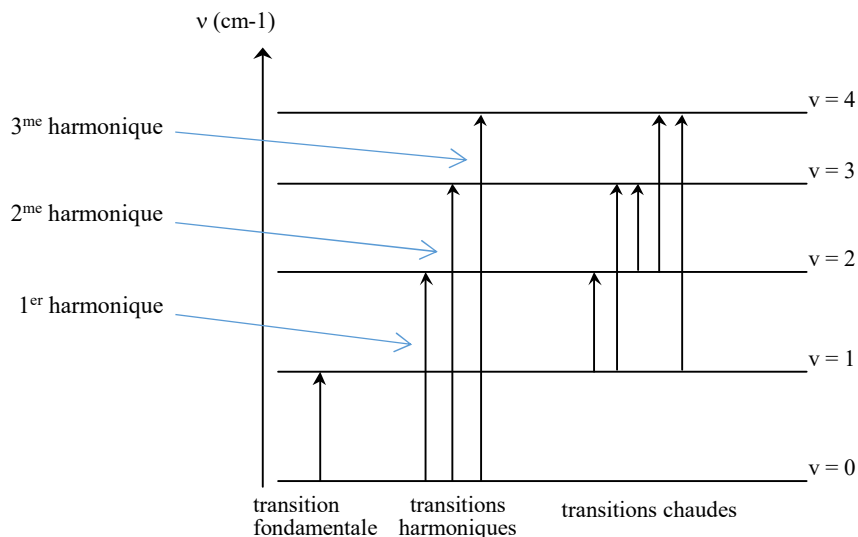


Figure 5. Représentation des différents types de transitions

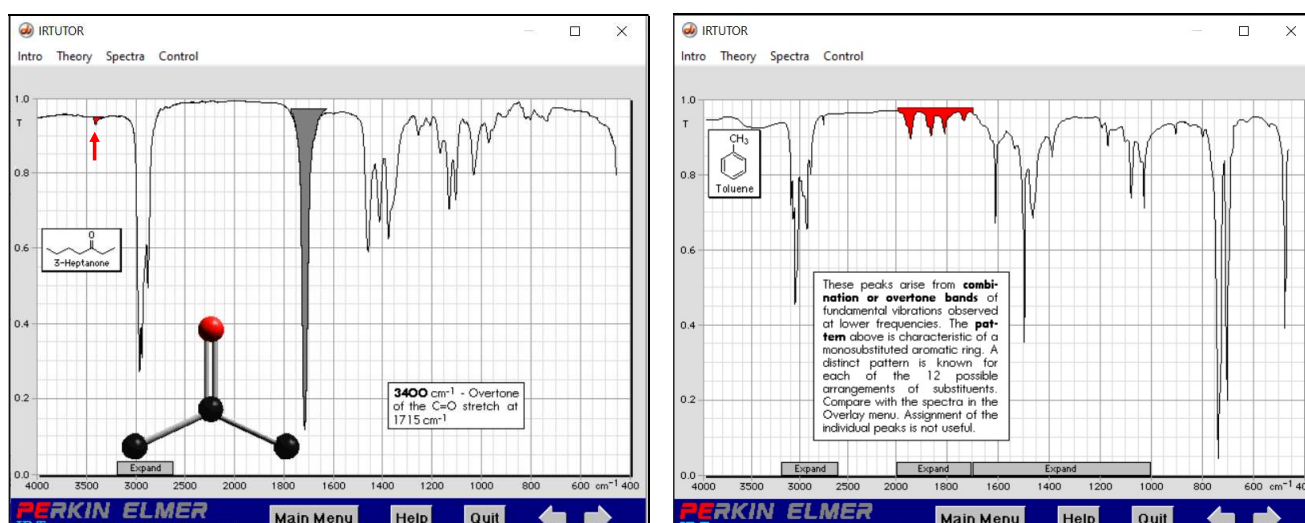


Figure 6. Exemple de spectres moyen infrarouge présentant des bandes harmoniques et/ou de combinaison
 A gauche : à 3400 cm^{-1} , le 1^{er} harmonique de la bande fondamentale de l'élongation de valence de la liaison C=O située à 1715 cm^{-1} ; à droite, en rouge, une zone caractéristique des noyaux aromatiques (bandes de combinaison et bandes harmoniques).

3/ Exploitation des spectres Proche InfraRouge et traitement des données

Les zones couramment exploitées en spectroscopie PIR sont présentées figure 7 ci-après. Elles concernent les vibrations harmoniques et de combinaisons de groupements contenant des hydrogènes, comme les liaisons CH, OH et NH essentiellement.

L'établissement d'un modèle mathématique (régression linéaire multiple ou PLS -Partial Least Squares- le plus souvent) nécessite l'enregistrement préalable d'un grand nombre de spectres de produits purs et de mélanges aux proportions connues, sur lesquels des données sont relevées puis traitées mathématiquement.

La régression par la méthode des moindres carrés partiels (PLS) est une méthode rapide, efficace et optimale pour un critère de minimisation des covariances bien maîtrisé. Son utilisation est recommandée

dans le cas où un grand nombre de variables explicatives est utilisé ou lorsqu'il y a de fortes colinéarités entre les variables (analyse multivariée).

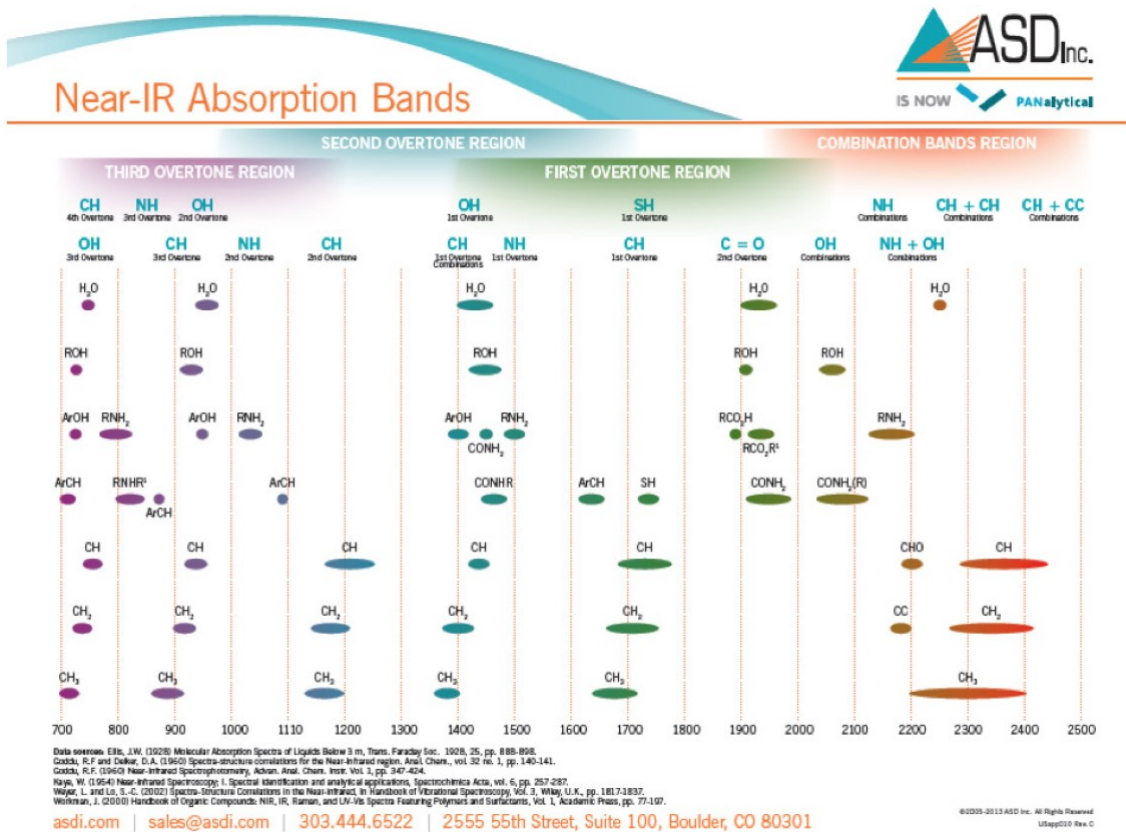


Figure 7. Les différentes régions d'absorption des liaisons chimiques en fonction des longueurs d'ondes (nm) dans le PIR

L'idée de la régression PLS est de créer à partir d'un tableau de n observations (échantillons) décrites par p variables (données spectrales et grandeurs associées), un ensemble de h composantes avec $h < p$ (Figure 8). La méthode de construction des composantes diffère de celle de l'ACP et présente l'avantage de bien s'accommoder de la présence de données manquantes. La détermination du nombre de composantes à retenir est en général fondée sur un critère mettant en jeu une validation croisée.

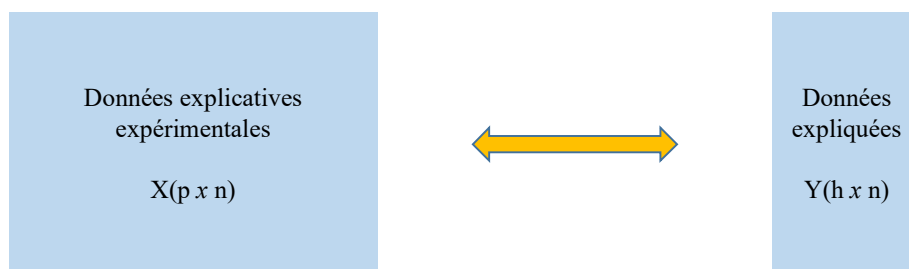


Figure 8. Eléments de construction en vue d'une régression PLS. (analyse univariée si $h = 1$, analyse multivariée si $h > 1$)

La mise en place d'un modèle mathématique (Figure 9) passe par une phase d'étalonnage puis de validation croisée ou d'un test de validation. Une fois les spectres enregistrés, les valeurs à traiter en sont extraites puis traitées informatiquement (logiciel OPUS en TP) après attribution des données expérimentales des mélanges.

La majorité des calculs statistiques est effectuée dans la phase d'optimisation. Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont la normalisation vectorielle, la dérivée première ou le couplage des deux.

Suite à l'optimisation, la validation croisée sera préférée ici car votre nombre d'échantillons est assez faible. Cette dernière va permettre de choisir le nombre de composantes à retenir pour le modèle mathématique final. Le principe consiste à extraire, à tour de rôle, k échantillons parmi les n échantillons

totaux ($k \approx \frac{n}{30}$, $k = 1$ si $n \leq 50$) après étalonnage pour venir ensuite valider celui-ci. Cette procédure est continue jusqu'à ce que tous les échantillons aient été exclus une fois, testés et remis dans le set d'étalonnage. Cela permet d'obtenir un graphique donnant la grandeur prédite par le modèle mathématique en fonction de la grandeur de référence enregistrée dans la saisie des données (Figure 10).

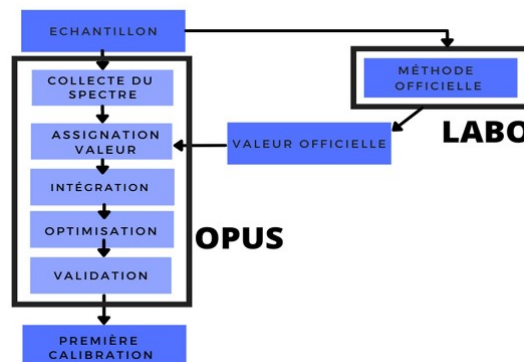


Figure 9. Schéma du développement et de la mise en place d'une calibration

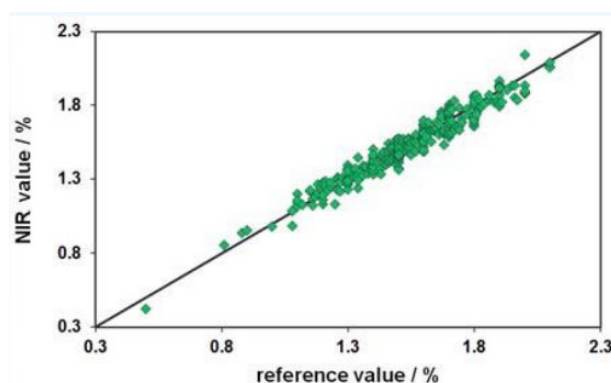


Figure 10. Résultats d'une calibration du taux d'azote dans des feuilles d'olivier

Lorsque le modèle mathématique a été validé et est utilisé en routine, il faudra penser à le revalider régulièrement avec des échantillons indépendants de sorte qu'il puisse perdurer dans le temps.

L'analyse graphique des différentes composantes entre elles peuvent également apporter certaines informations, comme par exemple sur le graphique ci-dessous (Figure 11).

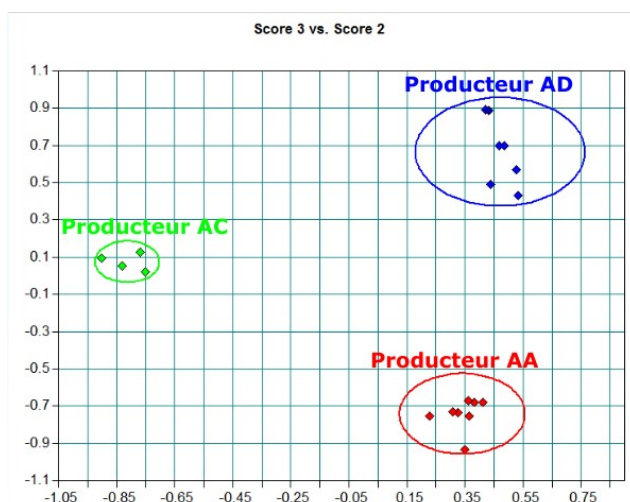


Figure 11. Identification d'huiles d'olives de différents producteurs

II/ Manipulation

PARTIE I :

Détermination de la quantité d'eau dans de l'éthanol commercial

1) a- Réaliser par ATR le spectre moyen infrarouge ($400-5500\text{ cm}^{-1}$) de l'eau et de l'éthanol à doser (référence air, résolution 2 cm^{-1}). Mesurer le nombre d'onde des bandes d'absorption fondamentales identifiables et les attribuer.

b- Réaliser le spectre proche infrarouge ($4000-13000\text{ cm}^{-1}$) de l'eau (cuve de 1 mm, référence air, résolution 2 cm^{-1}). Mesurer le nombre d'onde du 1^{er} harmonique des bandes d'élongation de la liaison O-H. Déduire de a- et b- la position du 2^{ème} harmonique des bandes d'élongation de la liaison O-H. Le rechercher et comparer la valeur calculée à sa valeur expérimentale ; justifier l'évolution des intensités.

2) Réaliser le spectre proche infrarouge de l'éthanol à doser entre 4000 et 13000 cm^{-1} dans des cuves de 1, 2, 5 et 10 mm (référence air, résolution 2 cm^{-1}). Choisir une bande de vibration pertinente et vérifier la linéarité de la loi de Beer-Lambert. Déterminer le coefficient d'extinction molaire au nombre d'onde choisi.

3) Déduire du 2) l'épaisseur de cuve la plus appropriée pour une analyse quantitative de l'eau dans l'éthanol fourni, puis effectuer le dosage en question par la méthode des ajouts dosés selon le protocole suivant sur la bande de vibration la plus appropriée. Notez que le phénomène de dilution est négligeable.

FiOLE N°	0	1	2	3	4	5
V _{H₂O} (μL)	0	40	80	120	160	200
EtOH à doser	QSP 10 mL					

L'eau étant l'impureté majeure de l'éthanol fourni, identifier le type d'alcool (95%, 99%, absolu) qui vous a été fourni.

PARTIE II :

Dosage d'un mélange de sucres par ACP en réflexion diffuse

Mise au point sous encadrement par Bernard Humbert

Soient les mélanges :

	Mélanges	Fructose	Glucose	Silice
1	Fructose / silice	500 mg	-	500 mg
2	Glucose / Silice	-	500 mg	
3	Sucres / silice	100 mg	400 mg	
4		250 mg	250 mg	
5		400 mg	100 mg	

Les mélanges 3 à 5 vous sont fournis, faites les deux premiers.

- 1/ Enregistrer, entre 4000 et 12000 cm^{-1} , le spectre de la silice en réflexion diffuse (référence air).
Interprétez ce que vous voyez.
- 2/ Enregistrer, entre 4000 et 12000 cm^{-1} , le spectre des mélanges 1 à 5 en réflexion diffuse (référence silice). Interprétez ce que vous voyez puis effectuer une ACP pour doser les sucres dans le mélange inconnu qui vous est fourni.