

269. Techniques nouvelles de microspectrophotométrie infra-rouge des solides

par P. Baudet, Cl. Otten et E. Cherbuliez

(27 VII 64)

L'application de la spectrophotométrie infrarouge aux micro-quantités se heurte à diverses difficultés techniques qui ne semblent pas encore avoir été toutes résolues, sauf dans le cas de substances liquides introduites dans des cuves capillaires [1]¹⁾.

Lorsqu'il s'agit de substances solides, les difficultés suivantes doivent être surmontées: 1) il faut répartir de façon homogène quelques microgrammes de la substance dans ou sur quelques milligrammes d'un support approprié, 2) le mélange doit pouvoir être rendu suffisamment transparent à la lumière infra-rouge, 3) le faisceau lumineux doit être concentré sur la préparation.

On a déjà essayé de résoudre ces 3 problèmes. En ce qui concerne les deux premiers SCHWARZ [2] propose une lyophilisation d'une solution benzénique de 10^{-4} à 10^{-7} g de produit, sur un dépôt de KBr obtenu d'abord par lyophilisation d'une solution aqueuse. MASSON [3], travaillant avec des quantités du même ordre de grandeur, procède un peu différemment; pour éviter des pertes de substance (adsorption sur les parois en verre), il congèle à la surface d'une éprouvette, successivement la solution aqueuse de bromure de potassium, puis la solution benzénique du corps à examiner, de telle manière que cette dernière ne touche pas la paroi du récipient; les deux solvants sont alors éliminés simultanément par sublimation dans le vide. SCHIEDT *et al.* [4] utilisent un procédé analogue. Quant au problème optique, ANDERSON & MILLER [5] ont décrit une lentille en chlorure d'argent pour concentrer la lumière infra-rouge. COATS, OFFNER & SIEGLER [6] utilisent pour le même but un système de plusieurs lentilles. PERKIN-ELMER CORP. a développé un système d'un type semblable qui réduit de 6 fois la largeur du faisceau convergent.

Cependant, si le problème optique est résolu, les techniques de répartition qui ont été déjà proposées [2] [3] [4] ne permettent pas de généraliser l'emploi de la microspectrophotométrie infra-rouge à l'examen des solides.

Reprenant l'étude de ces problèmes, nous avons élaboré des méthodes capables de fournir des spectrogrammes infra-rouges avec des quantités de substance allant de 0,01 à 0,1 micromole, soit par incorporation homogène de l'échantillon dans du bromure de potassium, soit par dispersion dans le «nujol» de la substance à examiner sur la surface d'une pastille transparente de bromure de potassium, soit encore par étalement sous pression du produit sur cette surface. La résolution des spectres obtenus à l'aide de ces micro-techniques est aussi bonne que celle que fournit la spectrophotométrie habituelle.

Pour la prise des spectres, nous avons utilisé les spectrophotomètres IR 21 ou 521 de PERKIN-ELMER²⁾, munis de l'appareillage optique «Beam Condensing Unit»²⁾ que cette maison a développé.

¹⁾ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 2443.

²⁾ PERKIN-ELMER CORP., Norwalk, Connecticut, U.S.A.

Pour illustrer nos procédés, nous comparons entre eux, les spectres obtenus à l'aide de différentes techniques, d'une série de produits possédant une grande variété de fonctions.

Il va sans dire que dans l'application de la spectrophotométrie infra-rouge aux micro-quantités, toutes sources de contamination doivent être évitées lors des manipulations. Parmi les contaminations possibles, celles provenant de l'atmosphère ne doivent pas être négligées. Toutes les pièces mobiles de l'appareillage sont conservées dans du benzène exempt de résidus non volatils, et manipulées avec des pinces. Les solvants organiques utilisés pour l'introduction des corps dans le bromure de potassium doivent être dépourvus de résidus non évaporables.

I. Incorporation de la substance dans le bromure de potassium

La poudre de bromure de potassium que nous utilisons a été préparée spécialement par la Maison MERK à Darmstadt³⁾ pour la confection des pastilles de bromure de potassium utilisées en spectrographie infra-rouge. Son homogénéité et sa pureté permettent d'obtenir des blancs pratiquement dépourvus de bandes d'absorption entre 4000 et 500 cm^{-1} . Cette préparation est très peu hygroscopique.

HAMPEL [7] a bien mis en évidence les qualités de ce produit.

1) *A partir d'une solution concentrée (0,01 à 0,1 micromole dans 10 à 40 microlitres) dans un solvant organique volatil, dans KBr solide.* L'homogénéisation de micro-quantités de produits avec 4 mg de KBr par broyage ou vibration n'est pas réalisable. Le mélange du sel avec une solution convenable du produit, suivie de l'élimination du solvant entraîne de grandes pertes sur les parois du récipient dans lequel se fait cette opération.

Voici comment nous parvenons à introduire la prise de l'échantillon quantitativement et d'une manière homogène dans le bromure de potassium:

4 mg de KBr sont transvasés à l'aide d'une microspatule en nickel dans un entonnoir en acier inoxydable (pièce A fig. 1) placé sur un disque mobile de même matière ce qui l'obture à sa partie inférieure. Le sel est tassé à l'aide d'un poussoir (pièce B fig. 1) dont l'extrémité est exactement calibrée aux dimensions de l'orifice de l'entonnoir. Le bromure de potassium forme alors une masse compacte cylindrique. Pour introduire la prise de substance dans le cylindre KBr ainsi préparé, l'entonnoir A est placé sur un support cylindrique de verre de diamètre approprié (pièce C, fig. 1), puis à l'aide d'une micro-pipette en polyéthylène, on fait pénétrer la solution (10 à 40 μl) du produit, dans le bromure de potassium. Des volumes plus importants ne peuvent pas être déposés en une seule fois dans le sel. La solution recouvre toute la surface du sel et s'y répartit par capillarité dans son épaisseur. Ainsi se trouve réalisée la répartition homogène de l'échantillon dans le bromure de potassium. Si pour un transfert quantitatif, il est nécessaire de laver le micro-récipient où se trouvait la solution du produit, il faut introduire alternativement 10 microlitres du solvant de lavage de chaque côté du cylindre du bromure, de façon à laisser la substance à examiner à l'intérieur et ne pas la repousser vers l'extérieur du cylindre. L'entonnoir A est alors porté dans un vide de $5 \cdot 10^{-2}$ Torr durant 40 min pour éliminer le solvant encore présent. (Nous avons appliqué ce procédé en utilisant de l'acétone *puriss. pro analysi* comme solvant des différents corps examinés.) L'homogénéat ainsi débarrassé du solvant est introduit quantitativement dans l'orifice circulaire central de 1,5 mm de diamètre d'une plaque en acier inoxydable trempé (pièce D fig. 1), à l'aide du procédé suivant: l'entonnoir A est placé dans l'alvéole de la chambre de compression du «Micro Die» de PERKIN-ELMER (pièce E, fig. 2) au-dessus du disque D, dont le trou central est exactement dans l'axe de l'entonnoir A et dans celui d'un piston en acier cadmié (pièce F fig. 2). Le «Micro Die» comprend un disque identique au disque D (voir fig. 1). L'extrémité supérieure du piston F s'engage dans le trou de ce disque et, avant d'introduire le disque D porteur du cylindre de KBr, il faut vérifier que la face supérieure du piston soit rigoureusement au ras de la face supérieure du disque en question.

³⁾ Nous remercions la maison MERCK à Darmstadt, de nous avoir fourni cette préparation de KBr.

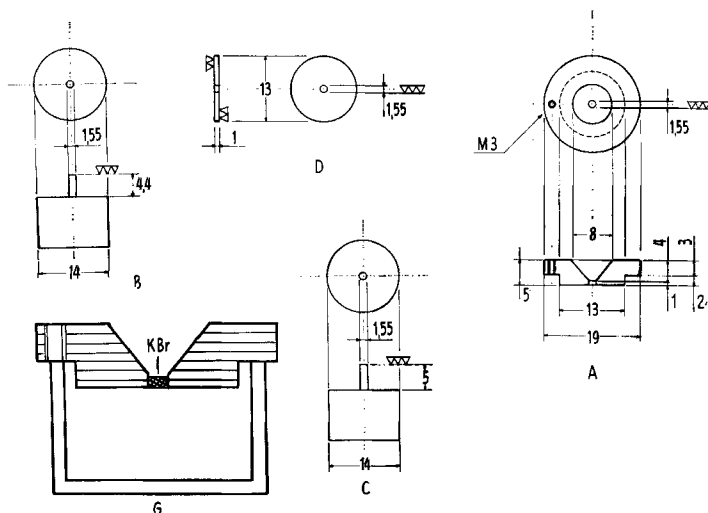


Fig. 1. Pièces en acier inoxydable, utilisées pour l'introduction de l'échantillon dans le KBr
 A entonnoir pour la préparation du cylindre de KBr (de face et de profil). – B piston pour confectionner le cylindre de KBr dans l'entonnoir A. – C piston pour transférer le cylindre de KBr chargé, dans le trou central du disque D. – D disque recevant le cylindre de KBr chargé, pour la transformation en pastille

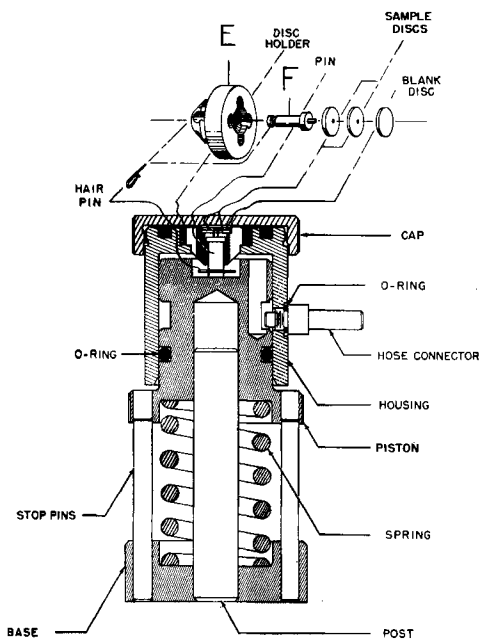


Fig. 2. «Micro Die» PERKIN-ELMER⁴⁾

⁴⁾ Nous remercions la Maison BODENSEWERKE PERKIN-ELMER & Co. à Überlingen (Allemagne) de nous avoir autorisé à reproduire le dessin constituant la figure 2.

On repousse le cylindre de sel par le poussoir (pièce C fig. 1) dont la surface est rigoureusement plane et qui est calibré de telle sorte que le cylindre de bromure de potassium soit transféré sans déformation dans l'orifice du disque D (fig. 1). Il est important, en effet, que les surfaces inférieure et supérieure du cylindre en question restent tout à fait parallèles pour que l'épaisseur de la matière à comprimer soit constante partout. L'introduction effectuée, on enlève le poussoir et l'entonnoir, recouvre le disque D par un disque plein en acier inoxydable et referme le couvercle du «Micro Die». Celui-ci repose sur un ressort (v. fig. 2); en tournant le «Micro Die» d'un demi-tour sur son axe on élève le piston qui vient alors en contact avec le cylindre de bromure de potassium. Par l'intermédiaire d'une embouchure latérale («hose connector», fig. 2), on établit un vide de $5 \text{ à } 7 \cdot 10^{-2}$ Torr dans la chambre de compression puis tout en conservant ce vide à l'intérieur de l'appareillage on comprime le «Micro Die» dans une presse appropriée, de telle sorte que le ressort se comprime de 7 mm. On maintient la pression et le vide pendant 15 min puis rétablit la pression normale à l'intérieur de la chambre. Le couvercle est enlevé; on sort le disque D qui contient en son centre la préparation de bromure de potassium devenu translucide, voire transparente, selon la nature de la substance répartie.

Cette façon de procéder permet l'introduction d'une quantité définie de produit dans le bromure de potassium ainsi que l'obtention d'une pastille à qualités optiques excellentes. Exemple des spectres obtenus v. fig. 5, a-c.

2) *A partir d'une solution diluée (0,01 à 0,1 micromole dans 100 à 500 microlitres) dans un solvant organique volatil, dans KBr solide.* Dans certains cas la solubilité des substances en cause ne permet pas de dissoudre la quantité nécessaire de substance dans le volume maximum de $40 \mu\text{l}$ qui est admissible. Pour ces cas, nous avons développé un procédé d'introduction de l'échan-

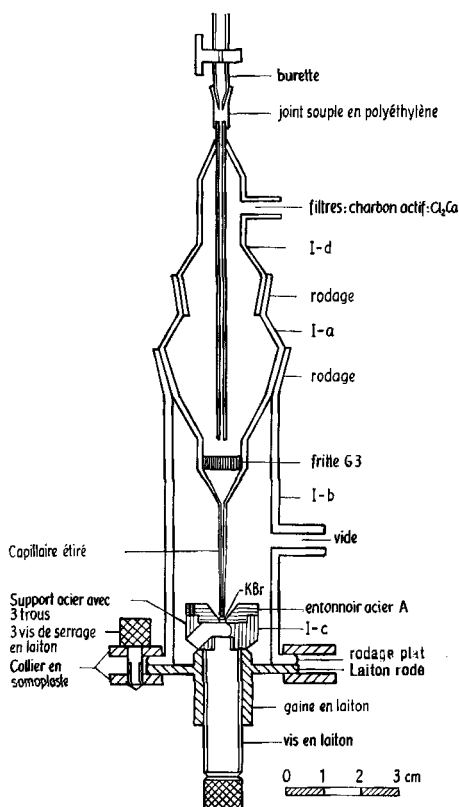


Fig. 3. Dispositif d'incorporation d'une prise en solution diluée dans le KBr

tillon dans 4 mg de KBr à partir de solutions diluées, basé sur l'arrivée lente de la solution sur le bromure de potassium accompagnée de l'évaporation simultanée du solvant.

Appareillage: Un récipient en verre pyrex rodé (pièce I-a, fig. 3) muni d'une fritte G3 est prolongé par un capillaire suffisamment fin pour présenter une forte résistance à l'écoulement. Ce récipient s'ajuste par un rodage approprié sur un cylindre en verre (pièce I-b, fig. 3) muni à sa partie inférieure d'un rodage plan sur lequel s'applique un rodage métallique également plan et qui est pourvu en son centre d'une vis micrométrique supportant une alvéole (I-c, fig. 3) destinée à recevoir l'entonnoir A (voir fig. 1). La vis micrométrique a pour office de permettre d'amener l'extrémité du capillaire assez près du cylindre de bromure de potassium dans l'entonnoir pour que la goutte de solution qui sort du capillaire vienne immédiatement en contact avec le sel lorsqu'elle s'allonge. Le rodage plan permet de centrer à la main l'entonnoir A par rapport au capillaire. Par l'intermédiaire d'un autre rodage, le récipient I-a est surmonté d'un prolongement (I-d, fig. 3) où s'adapte un micro-réservoir avec robinet, contenant la solution du produit à examiner (100 à 500 μ l). Le récipient I-c est muni d'une tubulure latérale d'amenée d'air, sur laquelle sont fixés en série un filtre à charbon actif et un filtre à chlorure de calcium. L'arrivée de l'air permet de conserver dans l'enceinte au-dessus de la fritte, pratiquement la pression atmosphérique. Les filtres mettent le KBr à l'abri d'impuretés atmosphériques qui rendraient l'interprétation des spectres illusoire.

Mode opératoire. Après avoir établi le vide (14 à 17 mm Torr) dans l'enceinte I-b, on règle à l'aide du robinet du réservoir l'admission de la solution de telle sorte que son écoulement à travers le capillaire se fasse à peu près à la vitesse de l'évaporation du solvant dans le KBr, dans le vide appliqué. Ce réglage, que nous effectuons en observant l'écoulement à l'aide d'une loupe, prend en général quelques min. Lorsqu'il est obtenu, on voit la solution issue du capillaire toucher la surface du sel dans l'entonnoir A sans former de gouttes isolées (qui éclateraient dans le vide) et s'y répandre régulièrement par capillarité. Le solvant est alors aussitôt évaporé sur les 2 surfaces libres du cylindre de bromure de potassium. Au fur et à mesure que la solution s'introduit dans le bromure, la majeure partie du solvant introduit précédemment doit déjà être évaporée. On réalise ainsi, en 20 à 40 min, l'introduction quantitative du produit, à partir d'une solution diluée, dans 4 mg de KBr.

Il va sans dire que la pureté du solvant doit être contrôlée. A cet effet, on prépare un blanc en introduisant dans le KBr un volume identique du solvant, blanc dont on examinera les propriétés optiques.

La présence de la fritte G3 a deux buts: retenir des particules éventuellement présentes dans la solution et permettre l'emploi de cet appareillage pour l'extraction d'un produit fixé sur un support solide (p. ex. un support de chromatographie), en vue de l'obtention d'un spectrogramme infra-rouge. Soulignons à ce propos que, d'après nos observations, la filtration sur une fritte G4 entraîne une perte de produit, probablement par rétention capillaire.

Les résultats spectrométriques obtenus sont illustrés dans la fig. 5, d et e.

3) *A partir d'une solution aqueuse de bromure de potassium, pour les produits solubles dans l'eau (0,01 à 0,1 μ mole), ou par dispersion d'une solution dans un solvant organique hydrosoluble (10 à 20 μ l), dans une solution aqueuse de bromure de potassium pour les produits insolubles dans l'eau. Elimination du solvant par lyophilisation.* — a) *Pour produits solubles dans l'eau.* Après lyophilisation d'une solution aqueuse de bromure de potassium, contenant ou non la substance à examiner, on obtient un résidu qui retient toujours assez d'eau pour produire des bandes d'absorption gênantes. Par sublimation simultanée de l'eau avec du benzène, on réalise un entraînement suffisamment complet de cette eau pour que les bandes d'absorption dues à l'eau ne gênent plus l'interprétation du spectrogramme.

On dissout 0,01 à 0,1 micromole de la substance à examiner dans 0,2 ml d'eau bidistillée contenant déjà 4 mg de KBr. On congèle cette solution sur la surface solidifiée de 0,35 ml de benzène (exempt de résidus non volatils). Les solvants sont sublimés sous un vide de $5 \text{ à } 7 \cdot 10^{-2}$ Torr. Pour juger de la quantité d'eau résiduelle présente et de la qualité du benzène employé, un blanc est constitué à partir des mêmes quantités resp. de benzène et de solution aqueuse de bromure, et sublimé dans les mêmes conditions. Les poudres légères obtenues sont introduites dans l'orifice central du disque D (voir fig. 1) à l'aide de l'entonnoir A et du poussoir B (fig. 1). Chacune de ces poudres est alors transformée en une pastille translucide ou transparente, d'après le procédé indiqué plus haut.

b) *Pour produits insolubles dans l'eau.* A une solution de 4 mg de KBr dans 0,2 ml d'eau bidistillée, on ajoute 10 ou 20 microlitres d'une solution du produit (0,01 à 0,1 micromole) dans l'acétone et homogénéise la solution qui demeure limpide ou devient tout au plus légèrement trouble. L'élimination des solvants est réalisée comme en (a), après congélation de la solution aqueuse au-dessus d'une couche gelée de 0,35 ml de benzène. En terminant comme décrit plus haut, on obtient une pastille transparente ou translucide. Les figures 5f, g et h illustrent les résultats spectrométriques obtenus par ces 2 procédés.

II. Répartition du produit sur la surface d'une micropastille de bromure de potassium

1) *En dispersion dans du nujol.* – a) *A partir d'une solution.* Pour l'application de la technique de répartition dans le nujol des produits à examiner, à la micro-spectrophotométrie IR., nous avons adopté la méthode suivante:

Deux disques en acier inoxydable ou en laiton, de 13 mm de diamètre, sont pourvus d'un trou circulaire central de 1,55 mm et de 3 trous excentriques de 1,60 mm de diamètre, placés symétriquement (voir pièce H, fig. 4). Par l'intermédiaire de l'entonnoir A (voir fig. 1) on introduit 2 mg de bromure de potassium dans le trou central de chacun des disques au moyen du poussoir G (fig. 1). On transforme le KBr en pastille transparente dans le «Micro Die» en exerçant une

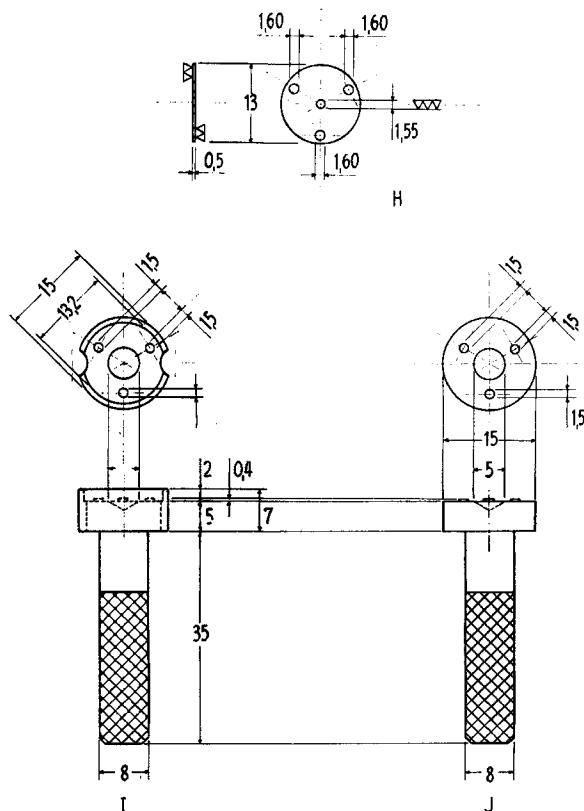
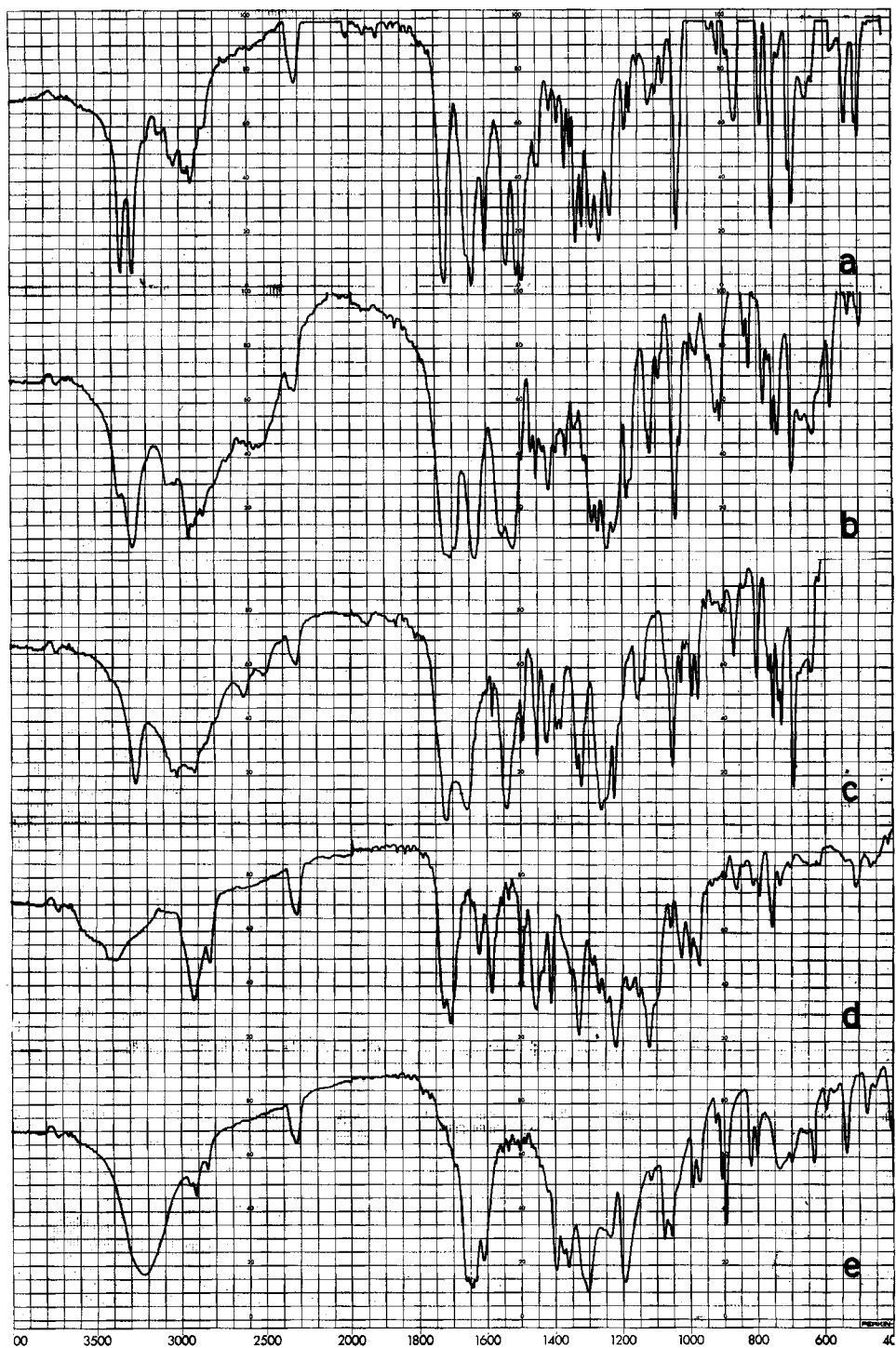
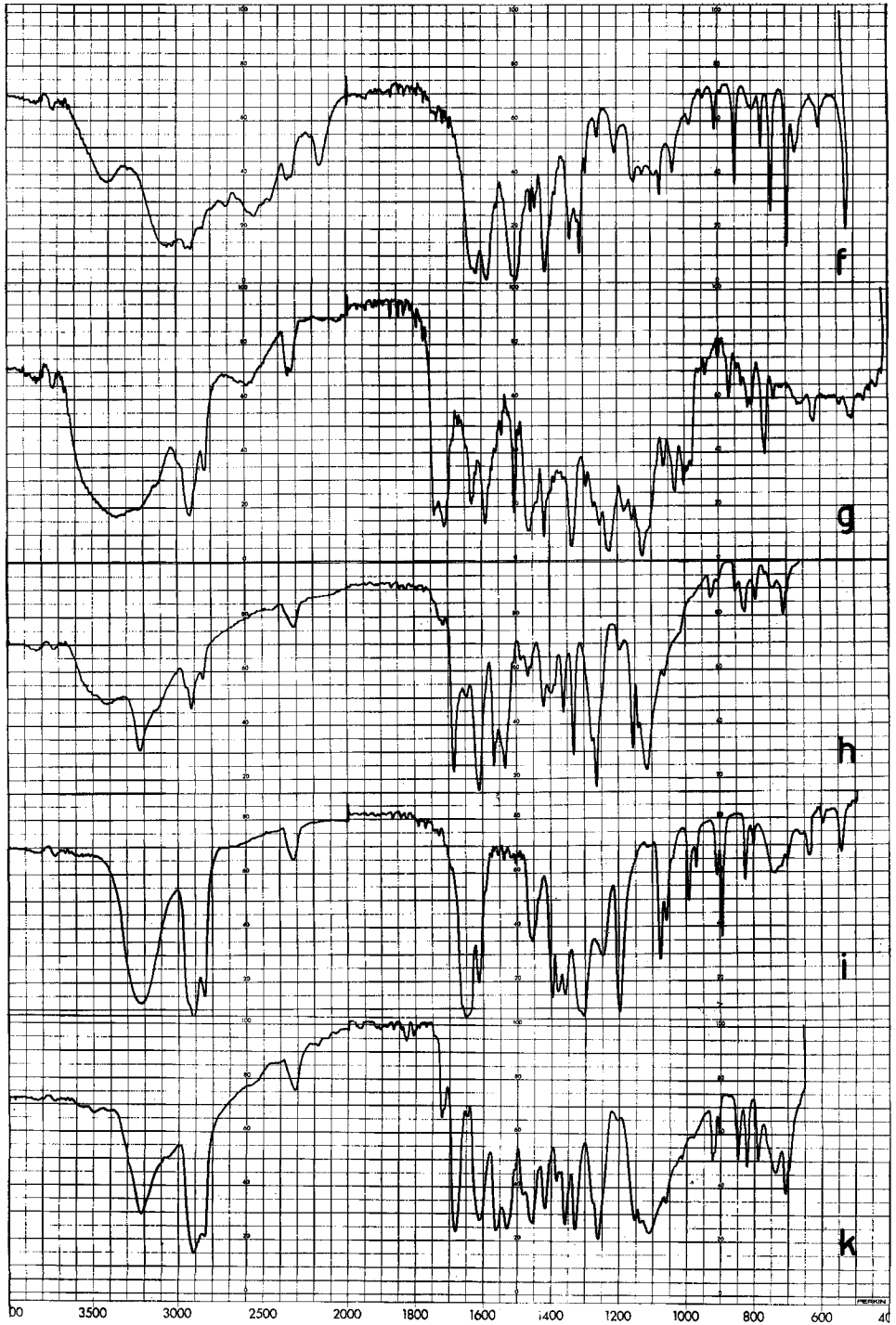


Fig. 4. Dispositif pour confectionner un montage en sandwich

H disque à trou central pour confectionner une pastille de 2 mg de KBr. – I support à 3 chevilles excentriques recevant un disque H avec pastille. – J clé à 3 chevilles excentriques, permettant de terminer le sandwich.





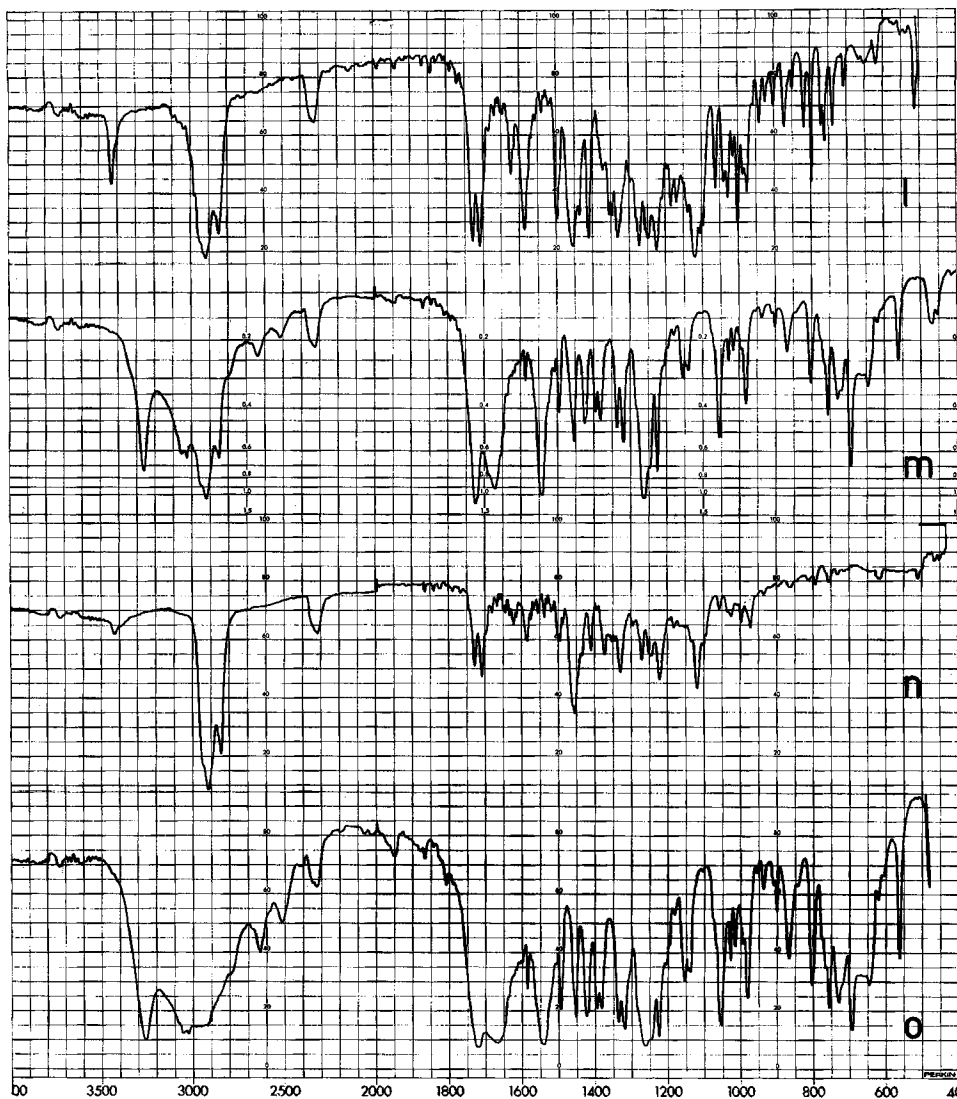


Fig. 5. Spectres

Technique I-1: incorporation dans le KBr, à partir d'une solution concentrée dans l'acétone, de 0,1 μ mole de: a) N,N-diphénylhydrazidocarbonyl-glycinate d'éthyle; b) N-benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-cystine; c) N-benzoyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéine.

Technique I-2: incorporation dans le KBr, à partir d'une solution diluée dans l'acétone, de 0,1 μ mole de: d) réserpine; e) phoenicine.

Technique I-3a: lyophilisation: substance soluble dans l'eau: f) DL-phénylalanine.

Technique I-3b: lyophilisation: substance non soluble dans l'eau: g) réserpine; h) nitro-3-hydroxy-4-benzaldéhyde.

Technique II-1a: dispersion dans le nujol de 0,1 μ mole, déposé sur la pastille à partir d'une solution acétonique, de: i) phoenicine; k) nitro-3-hydroxy-4-benzaldéhyde.

Technique II-1b: dispersion dans le nujol du produit déposé sur la pastille à l'état solide: l) réserpine; m) N-benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéine. – Quantité minimum de réserpine pouvant encore permettre une détermination: n) 0,005 μmole (3 μg) de réserpine.

Technique II-2: étalement à la surface d'une pastille de KBr de 0,1 μmole de: o) N-benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéine.

pression sur l'appareil, à l'aide des deux mains, de manière à comprimer le ressort de 2 à 3 mm; on obtient ainsi des pastilles cylindriques, transparentes de KBr, de 1,55 mm de diamètre et de 0,4 mm d'épaisseur, insérées dans les deux disques.

Sur le centre de l'une de ces pastilles on dépose le produit (0,01 à 0,1 μmole) à partir d'une solution dans un solvant tel que l'acétone, c'est-à-dire volatil, n'attaquant pas le sel et propre à l'application spectrophotométrique. Le dépôt s'effectue par une pipette en polyéthylène de 5 μl , par applications successives de volumes assez petits pour ne recouvrir que le centre de la pastille. L'évaporation du solvant déposé chaque fois est assez rapide pour que le produit présent dans les 5 μl soit transféré totalement en 5 à 7 minutes sur la partie centrale de la surface de la pastille de bromure de potassium. On porte alors le disque sous un vide de 5 à $7 \cdot 10^{-2}$ Torr durant 15 min. Ensuite on place le disque dans le support I (fig. 4) où il est immobilisé par 3 chevilles qui s'introduisent dans ses 3 trous excentriques. Au centre de la face supérieure de la pastille de bromure de potassium, on dépose sur le produit une microgoutte de nujol (100 à 130 μg). L'autre disque est posé sur le premier, de telle sorte que les deux pastilles de KBr prennent l'échantillon et le nujol en sandwich. A l'aide de la clef J (fig. 4), qui tient le second disque par trois chevilles également, on fait tourner d'un demi-tour, aller et retour, un disque sur l'autre, plusieurs fois de suite. De cette façon on obtient une suspension homogène du corps à examiner dans le nujol, étalée sur toute la surface entre les deux pastilles de KBr. Les deux disques (chacun avec une pastille de 2 mg de KBr) qui constituent maintenant un tout sont enlevés en bloc du support I (fig. 4) et placés dans le porte-disque du «Beam Condensing Unit»²⁾ en vue de la prise du spectre. Exemples: fig. 5, i et k.

b) *A partir d'un solide*. On peut aussi – ce qui est plus simple – déposer le produit à l'état solide. A cet effet, on le prélève au moyen d'un microtube en verre (pareil aux tubes utilisés pour introduire des prises dans les capillaires en vue de la détermination du poids moléculaire selon RAST [8]). A l'aide d'une micro-baguette coulissant dans le tube, on repousse l'échantillon en le déposant au centre de la surface d'une pastille de 2 mg de KBr. Exemples: fig. 5, l et m.

Recherchant les *quantités minimums* de produit qui, dispersées dans le nujol, permettent la prise d'un spectre de bonne qualité sans qu'on ait recours à l'expansion de l'échelle de sensibilité du spectrophotomètre 521, nous constatons que pour la réserpine, cette quantité se situe vers 3 μg (v. fig. 5n). Les bandes parasites dues à l'eau atmosphérique commencent à perturber l'interprétation du spectre entre 1750 et 1450 cm^{-1} vers des quantités de substance de cet ordre de grandeur. Lorsque nous disposons un condenseur à miroir également sur le trajet du faisceau de référence du spectrophotomètre – ce qui revient à utiliser à l'échelle micro la technique du double faisceau – ces bandes parasites sont supprimées, ce qui permet d'abaisser encore les quantités mises en œuvre, parce qu'alors on peut utiliser efficacement l'expansion de l'échelle de sensibilité dans cette région spectrale.

D'ailleurs PERKIN-ELMER CORP.²⁾ a développé un système de concentration de la lumière incidente, avec système de lentilles (Beam Condenser) qui peut se placer sur les deux faisceaux du spectrophotomètre. Essayée dans cet appareillage⁵⁾, dans le spectrophotomètre PERKIN-ELMER 125, avec env. 15 μg de réserpine dispersée dans le nujol (v. II-1), cette méthode a donné un spectre d'excellente qualité, dépourvu des bandes parasites signalées plus haut.

2) *Sans diluant*. Lorsque l'on prépare une pastille transparente à partir de 4 mg de KBr dans le disque E (fig. 1), on obtient une plaquette transparente de sel, qui affleure à la surface du disque par un côté et qui, de l'autre, constitue dans le disque une petite cavité où l'on peut introduire le produit solide. Lorsque, ensuite, on pose ce disque E chargé dans l'alvéole appropriée du «Micro Die» (v. fig. 2) et que l'on comprime le tout de telle sorte que ce soit le KBr et non le produit qui soit en contact avec la surface du piston F (fig. 2), on repousse la pastille de KBr de

⁵⁾ Nous remercions le Dr E. PALLUY du Laboratoire de recherche, département de Chimie-physique, de la Maison FIRMENICH à Genève, d'avoir bien voulu effectuer cette détermination.

l'autre côté du trou central de E. L'échantillon se trouve alors comprimé entre le bromure de potassium et le disque plein, placé sur E avant qu'on ait vissé le couvercle du «Micro Die». Le produit à examiner forme alors sur la pastille de KBr une couche mince qui permet la prise de spectre de bonne qualité (v. fig. 5, o).

Les disques porteurs des micro-pastilles (dépôt dans le KBr selon les diverses méthodes décrites, ou dispersion, sur le KBr, avec ou sans nujol) peuvent être conservés en vue de prises de spectres ultérieures. Ces disques portent un numéro pour aider à les classer.

III. Réglages des spectrophomètres IR. et du «Beam Condensing Unit» PERKIN-ELMER pour leur utilisation en microspectrophotométrie IR.

1) Programme pour le spectrophotomètre Perkin-Elmer 521

slit program (fente)	1000 × 2
gain (sensibilité)	4
attenuator speed	10-16
suppression	5-6
scale	1
intensité du courant	0,35 A
balance	au maximum

2) Programme pour le spectrophotomètre Perkin-Elmer 21

resolution	1000
réponse	1
gain	5 ¹ / ₂
speed	6
suppression	6
scale	automatique
balance	au maximum

3) Réglage du «Beam Condensing Unit». Après avoir placé la micro-préparation dans le porte-disque et avoir introduit celui-ci dans l'appareillage qui est disposé dans le passage du faisceau incident du spectrophotomètre, on dispose sur la fenêtre d'où émerge le faisceau de référence, un atténuateur (grille réglable). Les miroirs du «Beam Condensing Unit» concentrent la lumière sur la pastille de bromure de potasse présente au centre du disque D (fig. 1). Pour augmenter au maximum l'énergie lumineuse qui parvient à cette pastille, on règle l'absorption lumineuse à 4000 cm⁻¹ à 70% de transmission, par l'intermédiaire de l'atténuateur. A l'aide d'une vis de réglage placée sur le porte-disque, on élève ou descend verticalement le disque D de façon à centrer exactement la préparation dans l'axe du faisceau lumineux; on y est parvenu lorsque la transmission (T %) est devenue maximum. On termine le centrage du disque latéralement, en jouant alternativement sur deux couples de vis de réglage placées symétriquement sur un châssis horizontal où se pose le porte-disque. Là aussi le réglage est obtenu lorsque le maximum d'énergie lumineuse traverse la préparation (transmission maximum T %).

Discussion

Les méthodes décrites permettent une application générale de la spectrométrie IR. aux micro-quantités (0,01 à 0,1 μmole) avec des résolutions identiques à celles que l'on obtient à l'échelle macroscopique.

Selon les cas, tel ou tel procédé aura la préférence; par ex., pour les analyses de solides à l'état cristallisé, le procédé au nujol sera préférable, pour autant que les bandes d'absorption à 2920, 2840, 1460 et 1375 cm⁻¹ de l'huile de paraffine ne gênent pas. La méthode de répartition de l'échantillon dans le KBr par lyophilisation, est surtout utile pour les produits solubles seulement dans l'eau; dans ces cas cependant, de faibles bandes d'absorption dues à l'eau seront toujours présentes dans le spectre. L'introduction de l'échantillon dans le KBr à partir d'une solution concentrée ou

diluée dans un solvant organique sera appliquée dans les cas où l'emploi du nujol ou la répartition par lyophilisation ne sont pas recommandables.

Si l'on place une micro-goutte d'un liquide entre deux micro-pastilles de 2 mg de KBr (v. II-1), on pourra prendre sans difficulté des spectres de liquides. Cette application à la méthyl-2-hydroxyl-2-propanone-4 provenant de l'aldolisation de l'acétone sous l'influence d'une alumine basique, activée, nous a donné un spectre de très bonne qualité.

Insistons sur le fait que pour réaliser des spectres IR. sur des micro-quantités, toutes les sources de souillures atmosphériques et toute contamination durant les manipulations doivent être évitées.

La principale difficulté concernant l'introduction dans le KBr, de produits en solution diluée est liée au problème d'obtenir un solvant organique d'une pureté suffisante. Lorsque nous nous adressons à de l'acétone *puriss. pro analysi*, nous ne rencontrons aucune absorption étrangère après élimination (sous un vide de $5 \text{ à } 7 \times 10^{-2}$ Torr) du solvant introduit dans le KBr à raison de 10 à 40 μl ; cependant pour des volumes excédant 300 μl , introduits dans le cylindre du bromure de potassium à l'aide de l'appareillage décrit p. 2434 (fig. 3), des bandes d'absorption apparaissent dans le spectre du blanc, dans les régions d'absorptions d'hydrocarbures saturés. – Ces bandes parasites dues à des résidus peu volatils de cette acétone ne deviennent gênantes qu'à partir de ces volumes. Les solvants utilisés en microspectrophotométrie IR. devront subir des purifications spéciales [9], surtout lorsqu'il s'agira d'extraire des produits d'un support de chromatographie (silice, alumine, papier), cas où les volumes de solvant utilisés peuvent dépasser 0,5 ml.

C'est parmi une cinquantaine de spectres obtenus avec le spectrophotomètre PERKIN-ELMER 521, tous d'excellente qualité, que nous avons choisi les quelques exemples qui illustrent ici nos différentes techniques (voir fig. 5, a–o). Les spectres obtenus avec l'appareil PERKIN-ELMER 21 sont aussi de très bonne qualité. Dans nos essais, notre choix s'est porté sur des molécules contenant des fonctions rencontrées fréquemment en chimie organique. Pour les microtechniques d'incorporation dans le KBr ou de répartition dans le nujol, ou par étalement, nous avons étudiés les corps suivants (les spectres reproduits dans la fig. 5 sont signalés par des lettres entre parenthèses): nitro-3-hydroxy-4-benzaldéhyde [10] (h, k); N-tosyl-oxazolidinyl-5- γ -L-glutamyl-S-benzyl-L-cystéinyl-glycinate de méthyle [11] (fonctions: tosyle, γ -lactone, α - et γ -peptidiques, thioéther, ester aliphatique); acide hydroxy-4-phénylpyruvique [12]; phoenicine⁶) (quinone, éther) (e, i); (N, N-diphénylhydrazidocarbonyl)-glycinate d'éthyle [13] (carbonyle-carbazide, N-phényle, HN-phényle) (a); N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanyl- α, γ -L-glutamate de benzyle [14] (carbonyle carbamylique, polypeptides, esters α - et γ -benzylique); N-benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéine [14] (carbonyle carboxylique, thiol) (c, m, o); N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-cystine [14] (disulfure) (b); réserpine⁷) (NH-hétérocyclique, –C=C-hétérocyclique, éthers aromatique et alicycliques) (d, g, l, n); acides α -aminés dinitrophénylés (nitro, NH-aromatique); pour la technique d'incorporation des

⁶) Fournie par le professeur TH. POSTERNAK, Directeur du Laboratoire de Chimie Biologique et de Chimie Organique spéciale de l'Université de Genève, que nous remercions vivement.

⁷) Produit *purum*, FLUKA A.G., Buchs.

substances dans le KBr par lyophilisation, nous avons examiné: les L-leucine, DL-phénylalanine (f); glycine (carbonyle du carboxylate) et chlorhydrate du glycinate d'éthyle (chlorhydrate d'amine primaire).

Sans vouloir aborder ici l'interprétation des spectres, nous tenons à préciser que les spectres obtenus pour une seule et même substance, au moyen des différentes techniques que nous proposons, peuvent présenter des différences parfois très nettes⁸⁾. On a du reste fait des observations analogues avec les techniques habituelles de la spectrophotométrie infra-rouge (par exemple modifications notées dans le spectre d'une substance examinée dans du nujol, par rapport au spectre de cette même substance examinée dans du KBr). A titre d'exemples, nous indiquons dans un tableau des changements des spectres de trois corps, obtenus à l'aide de diverses techniques et opposés aux spectres obtenus selon notre technique I 1 (introduction de la substance dans le KBr par imbibition d'une solution).

Modifications de bandes observées dans les spectres de diverses substances; pris à l'aide de techniques autres que l'introduction directe d'une solution de la substance dans le KBr, par rapport aux spectres obtenus avec cette dernière technique (bandes en cm^{-1})

Substance	Technique*)	Modifications des bandes en cm^{-1} **)
Résérpine (spectre de référence, fig. 5 d)	I 3 b	3300 (confondu avec bandes de l'eau); 1400 (a); 1355 (d); triplet 1005, 990, 978 (a); triplet 830, 812, 800 (a);
	II 1 b	3420 (singlet au lieu de doublet); 1355, 1350 (doublet à la place d'un singlet); 1272 (e); 1250 (e); doublet 1170, 1150 (a); 1115 (a); 1040 (a); 925 (a); 768 (a). 1055 (f); 990 <963 (i); 820 > 800 (i)
Phoénicine (spectre de référence, fig. 5 e)	II 1 b	3270 (abaissé de 10); 1015 (e); 982 singlet au lieu de doublet); 900 (e); 730 <720 (i)
N-benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéine (spectre de référence, fig. 5 c)	II 1 b	3270 (abaissé de 10); 1015 (e); 982 singlet au lieu de doublet); 900 (e); 730 <720 (i)
(spectre de référence, fig. 5 c)	II 2	3260 (abaissé de 20); 1018 (e); 982 (singlet au lieu de doublet); 900 (e); 730 <720 (i)
N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-cystine (spectre de référence, fig. 5 b)	I 3 b	1600 (a); 1395 (a).

*) I 3 b: Répartition par lyophilisation. II 1 b: dispersion dans le nujol. II 2: étalement (sans solvant).

**) (a) = apparition; (d) = disparition; (f) = affaiblissement; (e) = exaltation; (i) = interversion d'intensité.

Dans le cas de la N-benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéine nous remarquons une grande similitude des spectres obtenus respectivement par dispersion dans le nujol et par étalement. Mais nous pensons que c'est là une exception, si l'on se réfère aux observations faites dans les techniques habituelles où les spectres obtenus après étalement de la substance (technique comparable à notre procédé II 2) diffèrent des spectres obtenus dans le nujol.

⁸⁾ MASSON [3] a déjà fait une observation semblable dans le cas de l'O-acétyl-hydrocortisone, examinée respectivement après incorporation, par broyage, dans le KBr, et après lyophilisation d'une solution benzénique sur une solution aqueuse congelée de KBr.

Pour cette recherche, nous n'avons disposé que d'un seul «Beam Condensing Unit» placé sur un des faisceaux incidents; de ce fait, il n'y a pas de compensation pour les effets de l'atmosphère: le doublet du CO_2 (2320 et 2340 cm^{-1}) est donc toujours présent. Par conséquent, nous ne pouvions pas dépasser une expansion à plus du triple, sinon ces bandes devenaient trop gênantes. Toutefois, avec une expansion égale à trois, nous avons obtenu un très bon spectre avec 1 μg de réserpine.

Nous exprimons notre reconnaissance à la Maison F. HOFFMANN-LA ROCHE S.A., à Bâle dont l'appui a permis la réalisation de ce travail.

Nous sommes redevables de l'utilisation des spectrophotomètres PERKIN-ELMER 21 et 521 au professeur B. SUSZ, directeur du Laboratoire de Chimie physique de l'Université de Genève, que nous remercions vivement de cette coopération.

M. CH. BULLINGER, mécanicien au Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique de l'Université, a fabriqué avec beaucoup d'habileté toutes les pièces métalliques qui sont représentées dans les fig. 1, 3 et 4. Nous l'en remercions vivement.

SUMMARY

Procedures are described for micro spectrophotometry in the infrared: (1) for the quantitative incorporation of micro quantities (0,01–0,1 μmole) of substance in KBr pellets; (2) for confection of a thin layer nujol suspension of the same quantities of substance on the surface of KBr pellets.

Spectra obtained for a variety of substances are presented which show the possibility of using in the micro range the classical infrared spectrophotometry.

Laboratoires de Chimie organique et
pharmaceutique de l'Université de Genève

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. U. WHITE, SEYMOUR WEINER & N. L. ALPERT, *Analyt. Chemistry* **30**, 1695 (1953).
- [2] H. P. SCHWARTZ, L. DREISBACH, R. CHILDS & S. V. MASTRANGELO, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **69**, 116 (1957).
- [3] W. B. MASON, *The Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy*, March 1958.
- [4] U. SCHIEDT & H. REINWEIN, *Naturforsch.* **7b**, 270 (1952).
- [5] D. H. ANDERSON & O. E. MILLER, *J. opt. Soc. Amer.* **43**, 777 (1953).
- [6] V. J. COATES, A. OFFNER & E. H. SIEGLER, *J. opt. Soc. America* **43**, 984 (1953).
- [7] B. HAMPEL, *Spectrochimica Acta* **19**, 1276 (1963).
- [8] PREGL-ROTH, *Quantitative Organische Mikroanalyse*, 5^e édition, p. 288, Springer-Verlag, Wien 1947.
- [9] *Organic Solvents, Technique of Organic Chemistry*, vol. VII (second edition), A. WEISS BERGER, Editor, Interscience.
- [10] T. SHIBA & H. J. CAHNMAN, *J. org. Chemistry* **27**, 1773 (1962).
- [11] P. BAUDET & I. BORECKA, *Ann. Chimica* **53**, 53 (1963).
- [12] O. NEUBAUER, *Chem. Zbl.* **1909**, II, 51.
- [13] P. BAUDET, M. CALIN & E. CHERBULIEZ, à paraître.
- [14] P. BAUDET, I. BORECKA & E. CHERBULIEZ, à paraître.