

Éléments fondamentaux de la spectrophotométrie UV-Vis

Guide





Sommaire

1	Principes fondamentaux des mesures UV-Vis	3
1.1	Le spectre électromagnétique	3
1.2	Longueur d'onde et fréquence	3
1.3	Spectres UV-visible	3
1.4	Transmittance et absorbance	4
1.5	Résumé	4
2	Comment fonctionne un spectrophotomètre UV-Vis moderne ?	5
2.1	Conception de l'instrument	7
3	Sélection des paramètres optimaux pour les mesures UV-Vis	13
3.1	Sélection de la cellule optique	13
3.2	Régulation thermostatique des échantillons	16
3.3	Agitation des échantillons	16
3.4	Mesures à faible température	16
3.5	Transparence du solvant	17
3.6	Bande passante spectrale optimale	18
3.7	Lumière parasite	19
3.8	Plage linéaire d'un instrument UV-Vis	19
3.9	Autres informations utiles	20
3.10	Longueur d'onde ou cm^{-1}	20
4	Présentation des applications UV-Vis courantes	21
4.1	Identification : spectres et structure	21
4.2	Confirmation d'identité	22
4.3	Quantification d'une molécule	22
4.4	Cinétique	24
4.5	Mesure de la couleur	26
4.6	Modifications structurales des composés	28
4.7	Température de fusion des acides nucléiques et des protéines	28
4.8	Analyse multicomposants	30
4.9	Exigences relatives à la configuration logicielle	32
5	Glossaire	34

1. Principes fondamentaux des mesures UV-Vis

1.1 Le spectre électromagnétique

Le rayonnement visible et ultraviolet (UV) ne constitue qu'une petite partie du spectre électromagnétique, qui comprend d'autres formes de rayonnement telles que les ondes radio, le rayonnement infrarouge (IR), les rayons cosmiques et les rayons X.

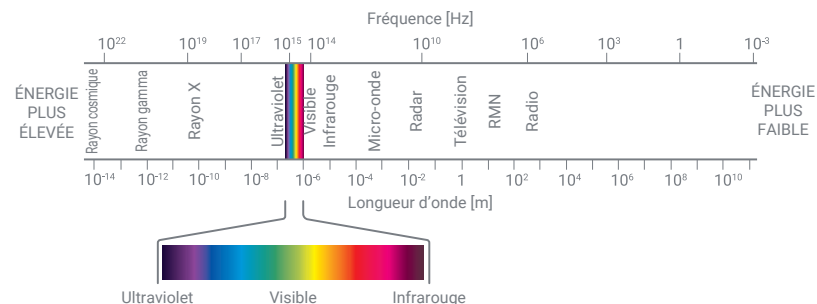


Figure 1. Le spectre électromagnétique, avec élargissement de la gamme de lumière visible.

L'énergie associée au rayonnement électromagnétique est définie de la façon suivante :

$$E = h\nu$$

où E est l'énergie (en joules), h est la constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ Js) et ν la fréquence (en secondes).

La spectroscopie permet d'étudier la façon dont la matière interagit avec le rayonnement électromagnétique ou émet un rayonnement électromagnétique. Il existe différents types de spectroscopie en fonction de la gamme de longueurs d'onde mesurée. La spectroscopie UV-Vis utilise le domaine visible et ultraviolet du spectre électromagnétique. La spectroscopie infrarouge utilise la zone infrarouge de plus faible énergie du spectre.

1.2 Longueur d'onde et fréquence

Un rayonnement électromagnétique peut être considéré comme l'association d'un champ magnétique et d'un champ électrique alternatifs qui se déplacent dans l'espace sous la forme d'une onde. Puisque le rayonnement se comporte comme une onde, on peut le classer en fonction de sa longueur d'onde ou de sa fréquence, deux grandeurs liées par l'équation suivante :

$$\nu = c/\lambda$$

où ν est la fréquence (en 1/seconde), c la vitesse de la lumière (3×10^8 ms⁻¹) et λ la longueur d'onde (en mètres).

En spectroscopie UV-Vis, la longueur d'onde est généralement exprimée en nanomètres (1 nm = 10^{-9} m). D'après l'équation, plus la longueur d'onde est courte, plus l'énergie du rayonnement est importante.

En spectroscopie UV-Vis, c'est la lumière UV de faible (courte) longueur d'onde qui possède la plus grande énergie. Parfois cette énergie peut suffire à produire des réactions photochimiques non désirées lors de la mesure d'échantillons photosensibles.

1.3 Spectres UV-visible

Lorsqu'un rayonnement interagit avec la matière, il peut se produire plusieurs processus : réflexion, diffusion, absorbance, fluorescence/phosphorescence (absorption et ré-émission) ou réactions photochimiques (absorbance et rupture de liaisons). En général, lorsqu'on analyse des échantillons afin de déterminer leur spectre UV-Vis, c'est l'absorbance qui est mesurée.

Comme la lumière est une forme d'énergie, l'absorption de lumière par la matière provoque l'augmentation de l'énergie contenue dans les molécules (ou atomes) de la matière. L'énergie potentielle totale d'une molécule correspond à la somme de son énergie vibrationnelle, de son énergie rotationnelle et de son énergie électronique :

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibrationnelle}} + E_{\text{rotationnelle}}$$

La quantité d'énergie de chaque type que possède une molécule n'est pas continue, mais se présente plutôt sous la forme d'une série de niveaux ou d'états discrets. La différence d'énergie entre les différents états est la suivante :

$$E_{\text{électronique}} > E_{\text{vibrationnelle}} > E_{\text{rotationnelle}}$$

Dans certaines molécules et certains atomes, les photons incidents de la lumière visible ou UV ont suffisamment d'énergie pour provoquer des transitions entre les différents niveaux d'énergie électronique. La longueur d'onde de la lumière absorbée possède l'énergie requise pour déplacer un électron d'un faible niveau d'énergie à un niveau d'énergie supérieur. La figure 2 montre les transitions électroniques possibles pour une molécule de formaldéhyde et les longueurs d'onde qui en sont responsables.

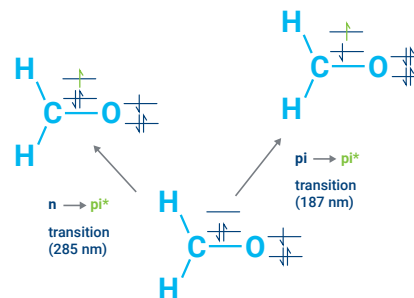


Figure 2. Transitions électroniques du formaldéhyde. Une lumière UV de 187 nm provoque l'excitation d'un électron de la liaison C-O et une lumière de 285 nm de longueur d'onde provoque l'excitation et le transfert d'un électron de l'atome d'oxygène vers la liaison C-O.

Ces transitions correspondent à des bandes d'absorbance très étroites à des longueurs d'onde qui caractérisent les différents niveaux d'énergie de l'espèce absorbante. Ceci se vérifie également pour les atomes, comme indiqué à la figure 3.

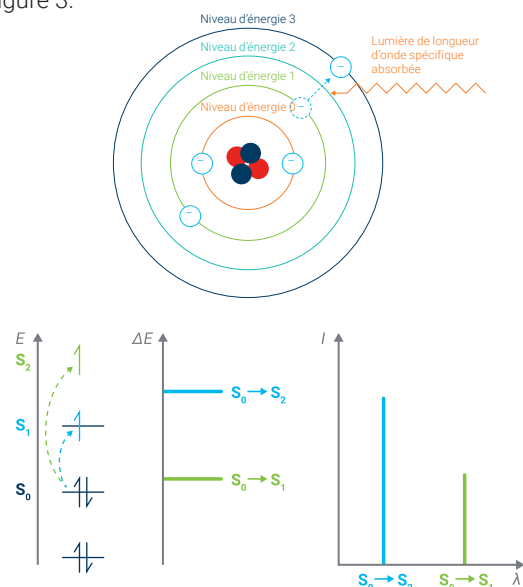


Figure 3. Une lumière incidente de longueur d'onde spécifique excite les électrons d'un atome. Le type d'atome ou d'ion (c'est-à-dire l'élément dont il s'agit) ainsi que les niveaux d'énergie entre lesquels l'électron se déplace déterminent la longueur d'onde de la lumière absorbée. Les transitions peuvent avoir lieu jusqu'à plusieurs niveaux d'énergie de distance, l'électron ayant besoin de davantage d'énergie (donc d'une longueur d'onde de lumière plus faible) pour s'éloigner davantage du noyau.

Cependant, pour les molécules, les niveaux d'énergie vibrationnelle et rotationnelle sont superposés aux niveaux d'énergie électronique. Les bandes sont plus larges du fait des nombreuses transitions d'énergie différentes qui peuvent se produire (voir figure 4). L'élargissement est encore plus important en solution en raison des interactions solvant-soluté.

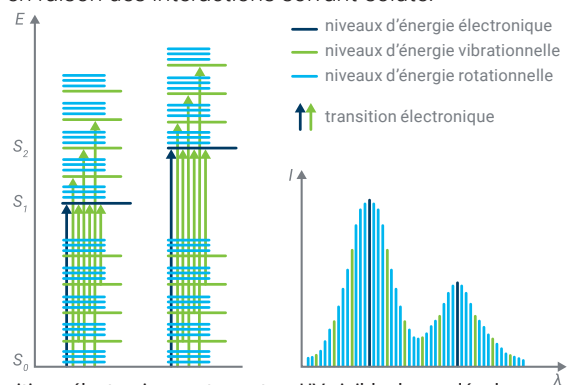


Figure 4. Transitions électroniques et spectres UV-visible des molécules (I étant l'intensité et λ la longueur d'onde).

1.4 Transmittance et absorbance

Lorsque la lumière passe à travers un échantillon ou est réfléchi par celui-ci, la quantité de lumière absorbée est égale à la différence entre l'énergie incidente (I_0) et l'énergie transmise (I). L'absorbance exprime la quantité de lumière absorbée. La transmittance, qui correspond au passage de la lumière à travers un échantillon, se présente généralement sous la forme d'un rapport de 1 ou d'un pourcentage, et est définie comme suit :

$$T = I / I_0 \text{ ou } \% T = I / I_0 \times 100$$

L'absorbance est définie comme suit :

$$A = -\log T$$

On utilise la valeur de l'absorbance dans la plupart des applications, car la relation entre l'absorbance et la concentration d'une part et le trajet optique d'autre part est normalement linéaire (d'après la loi de Beer-Lambert, décrite à la section 1.9).

1.5 Résumé

- La lumière visible et UV fait partie du spectre électromagnétique.
- En spectroscopie UV-Vis, la longueur d'onde est exprimée en nanomètres (nm).
- La lumière peut être réfléchi, diffusée, transmise ou absorbée par la matière et peut provoquer des réactions photochimiques.
- L'énergie de la lumière incidente entraîne la transition des électrons vers des niveaux d'énergie différents. Des transitions électroniques se produisent également entre les niveaux d'énergie vibrationnelle et rotationnelle des molécules.
- La plupart des applications de la spectroscopie UV-Vis utilise l'absorbance. Elle est définie par $A = -\log T$, où T est la transmittance.

2. Comment fonctionne un spectrophotomètre UV-Vis moderne ?

Les spectrophotomètres fonctionnant dans le domaine ultraviolet-visible (UV-Vis) utilisent une source lumineuse dont la longueur d'onde se situe dans la gamme de l'UV ou du visible (généralement de 190 à 900 nm) pour éclairer un échantillon. Les instruments mesurent ensuite la lumière absorbée, transmise ou réfléchie par l'échantillon à chaque longueur d'onde. Certains spectrophotomètres ont une gamme de longueurs d'onde plus large, qui s'étend dans le proche infrarouge (NIR) (de 800 à 3200 nm).

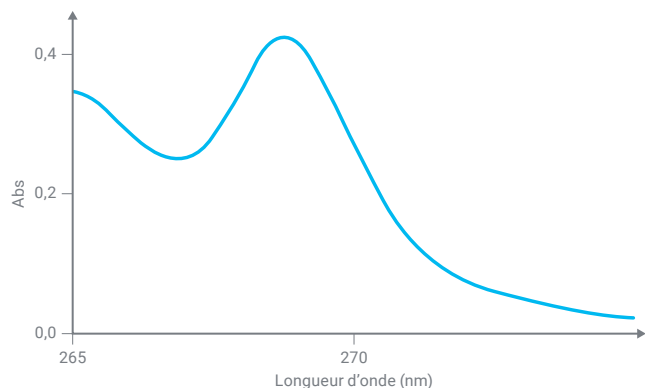


Figure 5. Spectre d'absorbance dans l'UV, indiquant un pic d'absorbance à environ 269 nm. À partir du spectre obtenu, par exemple celui de la figure 5, on peut déterminer les propriétés physiques ou chimiques de l'échantillon. En général, il est possible de :

- identifier les molécules présentes dans un échantillon solide ou liquide,
- déterminer la concentration d'une molécule particulière en solution,
- caractériser l'absorbance ou la transmittance dans un liquide ou un solide, sur une gamme de longueurs d'onde,
- caractériser les propriétés de réflectance d'une surface ou mesurer la couleur d'un matériau,
- étudier des réactions chimiques ou des processus biologiques.

Il est possible d'effectuer divers types de mesures avec un spectrophotomètre UV-Vis en lui associant des accessoires et des porte-échantillons. Il existe différents accessoires adaptés à divers types de mesures et d'échantillons, par exemple des solides versus des liquides, et à diverses conditions de mesures (figures 6 et 7).



Figure 6. Un accessoire du type sonde à fibre optique peut être installé sur un spectrophotomètre UV-Vis pour réaliser des mesures sur des échantillons liquides contenus dans diverses sortes de récipient.

La spectrophotométrie UV-Vis est une technique polyvalente utilisée depuis près d'un siècle dans un large éventail de domaines. Les spectrophotomètres UV-Vis sont couramment utilisés dans les laboratoires d'essais/de recherche, de chimie/pétrochimie et de biotechnologie/pharmaceutiques.

Figure 7. Un échantillon solide, tel que cette cellule photovoltaïque polycristalline, peut être mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis.



2.1 Conception de l'instrument

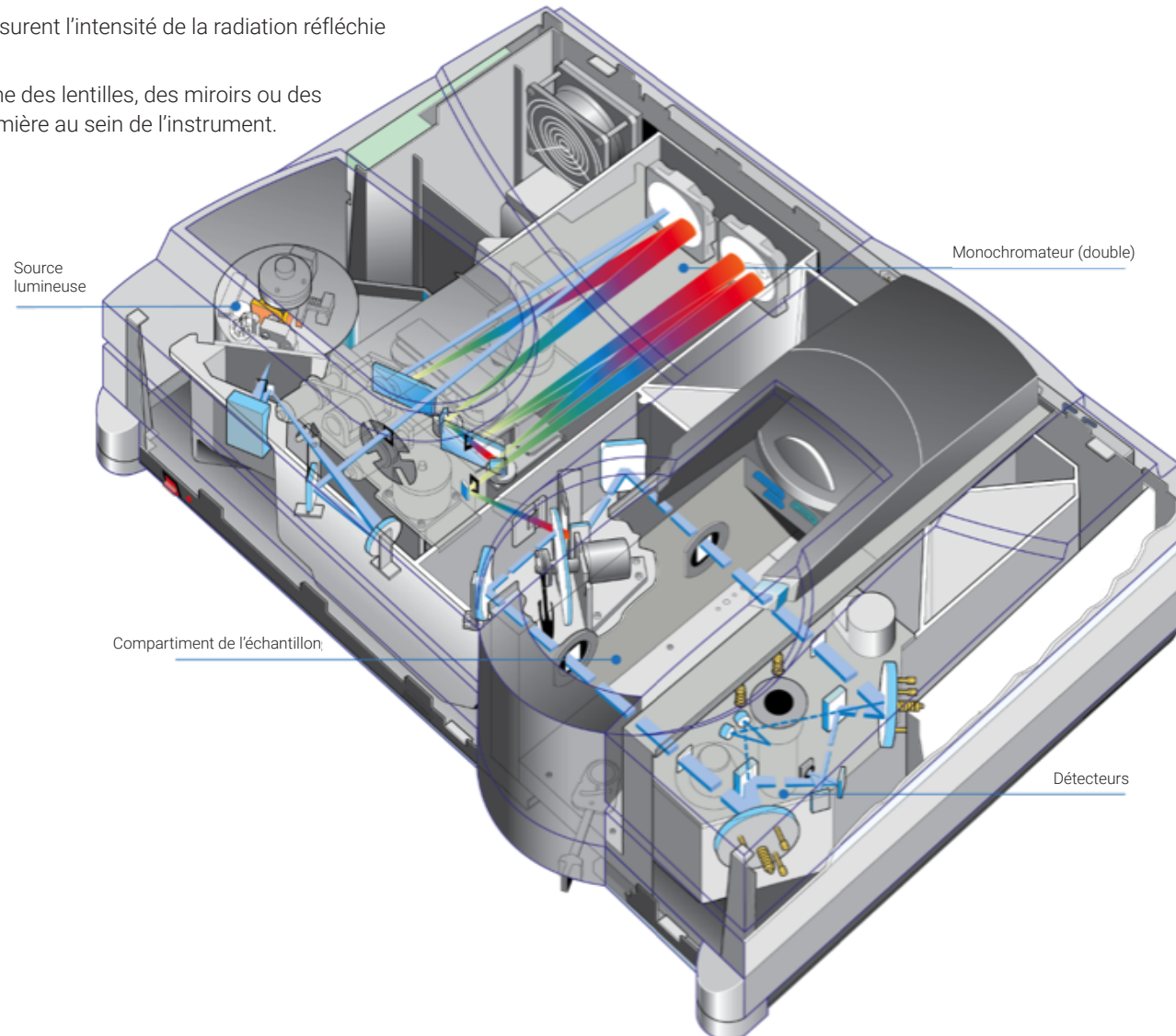
Composants

Les principaux composants d'un spectrophotomètre sont les suivants :

- Une source lumineuse qui génère une large bande de rayonnement électromagnétique du spectre UV-visible.
- Un appareil de dispersion qui sépare le rayonnement à large bande en longueurs d'onde.
- Une surface de l'échantillon, à travers laquelle passe la lumière ou sur laquelle se réfléchit la lumière.
- Un ou plusieurs détecteurs qui mesurent l'intensité de la radiation réfléchie ou transmise.

D'autres composants optiques, comme des lentilles, des miroirs ou des fibres optiques, qui transmettent la lumière au sein de l'instrument.

Figure 8. Schéma de la disposition interne d'un spectrophotomètre UV-Vis-NIR Agilent Cary 5000, illustrant les principaux composants. Il est à noter qu'il s'agit là d'un instrument de haute performance. La conception optique des spectrophotomètres UV-Vis servant aux mesures de routine est plus simple.



Sources lumineuses

Dans l'idéal, la source lumineuse devrait produire une intensité constante sur toutes les longueurs d'onde avec un faible bruit et une donnée de sortie stable sur le long terme. Malheureusement, ce type de source n'existe pas. Deux différentes sources de lumière ont été utilisées historiquement dans les spectrophotomètres UV-Vis :

- La lampe à arc au deutérium a été utilisée pour fournir un bon continuum d'intensité dans le domaine UV et une intensité utile dans le domaine visible.
- La lampe halogène au tungstène permettait d'obtenir une bonne intensité sur la totalité de la gamme visible et sur une partie du spectre UV.

Plus récemment, le recours à une lampe flash au xénon unique s'est répandu. Elle offre de réels avantages par rapport à l'utilisation de deux lampes conventionnelles.

Lampe à arc au deutérium (D_2)

La lampe à arc au deutérium, qui utilise une décharge en arc à partir de deutérium gazeux, assure un bon continuum d'intensité dans le domaine UV et une intensité utile dans le domaine visible, de 185 à 400 nm (voir figure 9). Même si les lampes à arc au deutérium modernes ont un faible rapport signal sur bruit, leur bruit constitue souvent le facteur limitant au niveau de la performance globale de l'instrument. L'intensité de la lumière produite par une lampe à arc au deutérium diminue progressivement avec le temps. La demi-vie d'une telle lampe, c'est-à-dire le temps au bout duquel l'intensité tombe à la moitié de sa valeur initiale, est généralement d'environ 1 000 heures. Du fait de cette courte durée de vie, la lampe au D_2 doit être remplacée relativement souvent.

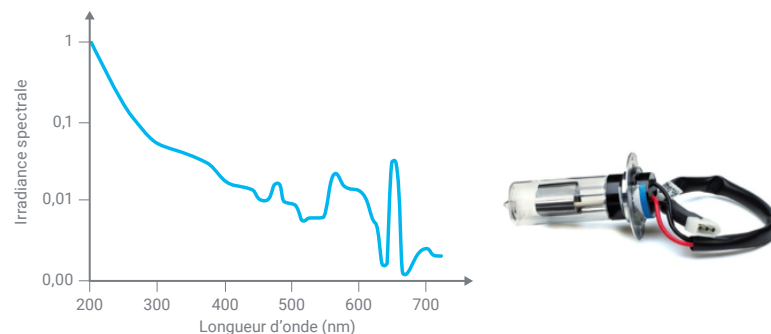


Figure 9. Spectre d'intensité de la lampe à arc au deutérium.

Lampe halogène au tungstène

La lampe halogène au tungstène comporte un filament. Lorsqu'un courant passe dans le filament, celui-ci chauffe et émet de la lumière (voir figure 10). La lampe a une bonne intensité sur une partie du spectre UV et sur l'ensemble du domaine visible et NIR (de 350 nm à 3000 nm). Ce type de lampe présente un bruit très bas, une dérive faible et une durée de fonctionnement type de 10 000 h.

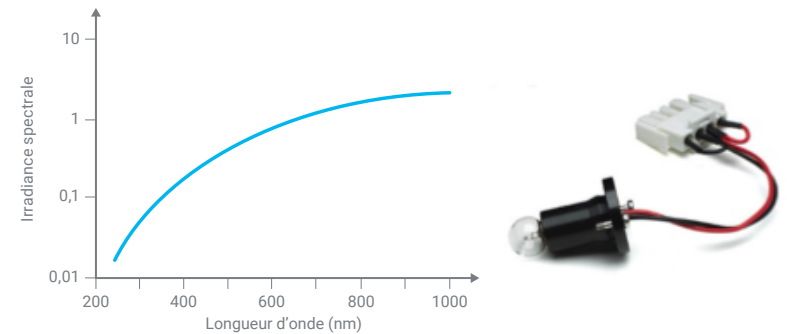


Figure 10. Spectre d'intensité de la lampe halogène au tungstène.

Les spectrophotomètres UV-visible comportant à la fois une lampe au D_2 et une lampe halogène au tungstène utilisent un sélecteur de source pour passer d'une lampe à l'autre en fonction du besoin, ou combinent la lumière des deux sources pour produire une source unique à large bande.

Lampe flash au xénon

Contrairement aux lampes au D_2 ou aux lampes halogènes au tungstène, qui procurent une source de lumière constante, une lampe flash au xénon émet de la lumière pendant une durée extrêmement courte, sous forme de flashes. Cette durée d'émission lumineuse très courte, juste le temps de mesurer l'échantillon, donne à la lampe une longue durée de vie. L'échantillon n'est exposé à la lumière que le temps de la mesure. Grâce à cette courte durée d'exposition, la lampe flash au xénon peut être utilisée pour mesurer les échantillons potentiellement sensibles au photoblanchiment. Un photoblanchiment peut être observé lorsqu'un échantillon sensible est exposé pendant une longue période à une source de lumière en continu. La lampe flash au xénon émet une lumière de grande intensité de 185 à 2500 nm ; de ce fait, aucune source lumineuse secondaire n'est requise (figure 11). La lampe flash au xénon peut durer de nombreuses années avant de devoir être remplacée, ce qui la rend populaire face aux systèmes à lampe au D_2 ou à lampe halogène au tungstène. Elle a également l'avantage de ne pas nécessiter de temps de préchauffage, contrairement aux deux autres types de lampe.

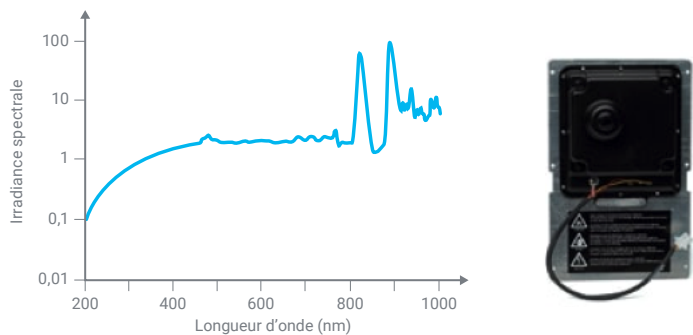


Figure 11. Spectre d'intensité de la lampe au xénon.

Monochromateur

Toutes les sources lumineuses produisent une lumière blanche à large spectre. Pour réduire cette émission à une bande de longueurs d'onde sélectionnée, la lumière doit passer à travers un monochromateur.

Le monochromateur est composé des éléments suivants :

- une fente d'entrée,
- un appareil de dispersion, qui disperse la lumière en différentes longueurs d'onde (comme un arc-en-ciel) et permet de sélectionner une bande particulière de longueurs d'onde, et
- une fente de sortie à travers laquelle passent les longueurs d'onde choisies avant de se diriger sur l'échantillon.

Pour faire simple, le monochromateur peut être considéré comme une pièce avec une fenêtre qui la baigne de lumière. La lumière du soleil arrive sur un prisme qui sépare la lumière blanche en un arc-en-ciel. Cet arc-en-ciel parvient jusqu'à une autre fenêtre située à l'autre bout de la pièce. En tournant le prisme, on peut faire passer par cette deuxième fenêtre une lumière de différentes couleurs, c'est-à-dire de différentes longueurs d'onde.

Dans l'idéal, la lumière sortant du monochromateur ne comporte qu'une seule longueur d'onde, mais, en pratique, on obtient toujours une bande de longueurs d'onde.

Les appareils de dispersion de la plupart des spectrophotomètres actuellement disponibles sur le marché sont des réseaux holographiques. Ces composants optiques, constitués de verre, possèdent à leur surface des rainures extrêmement étroites, gravées avec précision. Les dimensions des rainures sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de la lumière à disperser. Pour finir, un revêtement d'aluminium est appliqué pour créer une surface réfléchissante.

La lumière arrivant sur le réseau interfère, est diffractée et réfléchiée selon différents angles, en fonction de la longueur d'onde. Les réseaux holographiques assurent une dispersion angulaire linéaire avec la longueur d'onde et ne sont pas sensibles à la température. Toutefois, ils réfléchissent la lumière sous forme de plusieurs ordres, qui se chevauchent (voir figure 12). Des filtres doivent donc être ajoutés pour veiller à ce que seule la lumière de l'ordre de réflexion recherché arrive jusqu'au détecteur. Un réseau concave disperse et focalise simultanément la lumière.

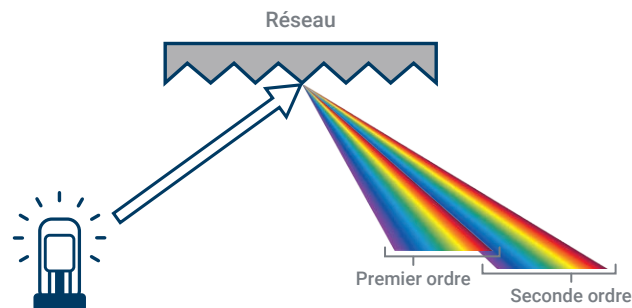


Figure 12. Représentation de la dispersion, par un réseau holographique, de la lumière blanche sous forme de lumière de différentes longueurs d'onde.

Spectrophotomètres à simple monochromateur

Le spectrophotomètre à simple monochromateur est utilisé dans la spectroscopie à usage général et peut être intégré à un système optique compact. La figure 13 présente un schéma de système optique à simple monochromateur. Un spectrophotomètre à simple monochromateur n'a pas la capacité de sélectionner les longueurs d'onde de manière aussi fine qu'un système à double monochromateur. Toutefois de nombreuses applications, comme avec les échantillons présentant de larges pics d'absorption, ne nécessitent pas une fonctionnalité aussi poussée.

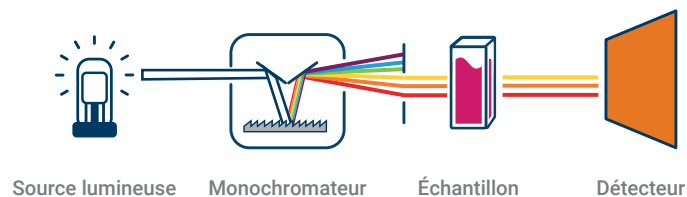


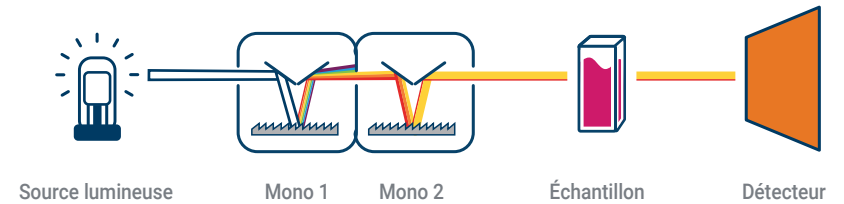
Figure 13. Spectrophotomètre à simple monochromateur.



Spectrophotomètres à double monochromateur

Les instruments de haute performance comportent généralement un double monochromateur. Les deux monochromateurs sont placés en série. La source lumineuse est divisée par le premier monochromateur, puis par le second. La lumière parasite, c'est-à-dire la lumière qui s'échappe dans le système, est ainsi réduite, ce qui accroît l'exactitude spectrale, autrement dit la capacité à sélectionner avec exactitude une longueur d'onde particulière. La figure 14 présente un schéma de système optique à double monochromateur.

Figure 14. Schéma d'un spectrophotomètre à double monochromateur.



Compartment de l'échantillon

Dans son compartiment, l'échantillon est positionné de façon à être traversé par le faisceau provenant du monochromateur. Lorsqu'il s'agit de mesurer l'absorbance, les échantillons liquides sont généralement placés dans une cuve de trajet optique fixe et connu. Une cuve est un support rectangulaire pour liquide, comme illustré à la figure 15. Les cuves sont en verre, en quartz, en plastique ou tout autre matériau transmettant la lumière UV ou visible. Les cuves standard ont un trajet optique de 10 mm et sont constituées de quartz, ce qui garantit un bon facteur de transmission des longueurs d'onde UV. Il est également possible d'utiliser des cuves en plastique, moins chères, mais qui ne transmettent pas la lumière UV et ne conviennent donc qu'aux mesures dans le domaine des longueurs d'onde du visible. Il existe une multitude de cuves dédiées à des applications spéciales, allant des cuves pour les volumes infimes de liquide à celles de trajets optiques bien plus longs pour les échantillons très dilués.



Figure 15. Cuves de mesure pour échantillons liquides. De gauche à droite : cuve standard de 3 mL et trajet optique de 10 mm, cellule ultra-micro pour mesurer les très faibles volumes et cuve à long trajet optique pour les solutions diluées.

Les échantillons solides peuvent être maintenus en position fixe pour des mesures simples de la transmission. Il est également possible de les mesurer à divers angles d'incidence. Pour les mesures plus complexes, comme la réflexion ou la transmission diffuse, d'autres accessoires peuvent être installés dans le compartiment de l'échantillon.

Spectrophotomètre à simple faisceau

Le modèle de spectrophotomètre UV-Vis le plus simple comporte un système optique doté d'un seul faisceau. Dans un système à simple faisceau, la lumière en provenance du monochromateur traverse l'échantillon, puis le détecteur. Cette conception simplifiée implique moins de composants optiques, ce qui permet de réduire la taille de l'instrument et donc son coût.

Toutefois, avant de pouvoir mesurer un échantillon, il est nécessaire de mesurer une ligne de base ou un échantillon blanc. Pour les échantillons liquides, la lecture de la ligne de base permet de tenir compte de l'absorbance de la cuve et du solvant utilisé. Avec un système à simple faisceau, la ligne de base et l'échantillon doivent être mesurés séparément. Cette lecture en deux temps implique une éventuelle baisse de l'exactitude de la mesure en cas de variation de l'intensité lumineuse ou des performances optiques du système entre la lecture de la ligne de base et celle de l'échantillon. Cette perte d'exactitude est problématique pour les mesures qui sont longues ou lorsque le blanc peut varier dans le temps. Cela signifie en pratique qu'avec un système à simple faisceau, il convient de mesurer fréquemment et régulièrement la ligne de base/le blanc au cours d'une session de mesure.

Spectrophotomètre à double faisceau

De nombreux systèmes UV-Vis sont dotés d'un système optique à double faisceau. Dans ce type d'appareil, la lumière émise par le monochromateur est divisée en deux faisceaux : un faisceau de référence et un faisceau destiné à l'échantillon. Cette division de la lumière est généralement assurée par un composant optique tel qu'une roue tournante, qui comporte un segment muni d'un miroir, ou un miroir à moitié recouvert d'argent appelé séparatrice. Chaque faisceau pénètre dans la chambre de l'échantillon via des trajets optiques distincts. La présence de deux faisceaux aux mêmes longueurs d'onde permet de mesurer en même temps l'échantillon et la référence/le blanc. La mesure de l'échantillon est donc corrigée en temps réel par la prise en compte des fluctuations de l'instrument. Cette correction en temps réel donne une mesure de grande exactitude.

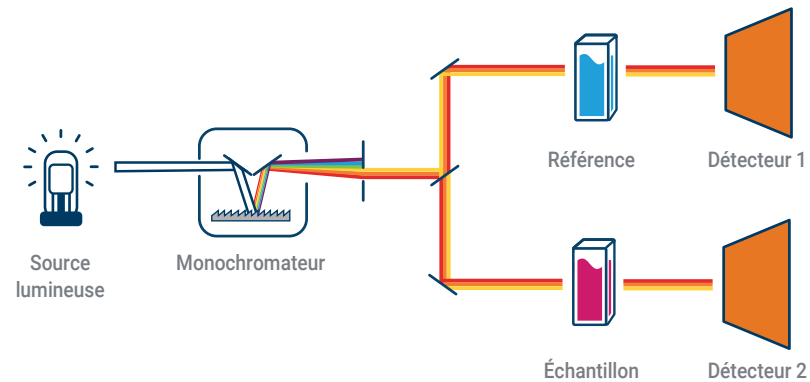


Figure 16. Schéma d'un système optique à double faisceau, équipé de deux détecteurs.

Spectrophotomètre à double faisceau avec correction en temps réel

Une autre conception de spectrophotomètre, plus récente, utilise une disposition optique à double faisceau avec un échantillon et un détecteur de référence. Le détecteur de référence permet de corriger les fluctuations de luminosité de la lampe pour chaque mesure, tandis que le solvant ou le blanc (en cas d'échantillon solide) est mesuré dans la position de l'échantillon, puis soustrait du spectre de l'échantillon après recueil. Grâce aux améliorations apportées à l'électronique et au logiciel, cette configuration permet d'effectuer des mesures en toute simplicité et réduit le risque d'erreur de la part de l'utilisateur dû à l'utilisation de cuves non assorties ou à un positionnement incorrect de l'échantillon. La conception à double faisceau avec correction en temps réel offre les mêmes performances qu'un instrument à double faisceau de routine, et la conception à double faisceau standard est désormais généralement réservée aux instruments de recherche.

Compartiment de l'échantillon

Le compartiment de l'échantillon d'un spectrophotomètre UV-Vis consiste en général en un caisson de couleur noir équipé d'un couvercle de fermeture. Le noir mat à l'intérieur du compartiment contribue à absorber la lumière parasite susceptible d'y pénétrer.

Dans son compartiment, l'échantillon est positionné de façon à être traversé par le faisceau provenant du monochromateur. Comme indiqué précédemment, il existe des cuves en verre, en plastique et en quartz (figure 15) pour les échantillons liquides. Les échantillons solides sont maintenus en position à l'aide d'un support fixé à la partie inférieure du compartiment de l'échantillon. La lumière peut également être évacuée hors du compartiment de l'échantillon à l'aide de fibres optiques. Ces fibres optiques sont utiles pour la mesure d'échantillons particulièrement grands, chauds, froids, radioactifs ou dangereux. Comme illustré à la figure 6, les fibres optiques peuvent amener la lumière du spectrophotomètre jusqu'à une sonde à fibre optique afin de mesurer les solutions en-dehors du compartiment de l'échantillon. Il est également possible d'utiliser un appareil à fibre optique permettant de mesurer la réflectance, la fluorescence ou la transmission de la lumière à travers un échantillon solide.

Détecteur

Un détecteur convertit la lumière provenant de l'échantillon en signal électrique. Tout comme la source lumineuse, le détecteur devrait donner une réponse linéaire sur une large gamme de longueurs d'onde, avec un faible bruit et une grande sensibilité. Les spectrophotomètres contiennent normalement soit un détecteur de type photomultiplicateur, soit un détecteur à photodiode. Les systèmes de haute performance peuvent comporter d'autres détecteurs spécialisés permettant d'améliorer la couverture en matière de longueurs d'onde et la sensibilité.

Chaque détecteur présente une sensibilité et une gamme de longueurs d'onde différentes. Lorsqu'il possède plusieurs détecteurs, le système bascule sur le détecteur correspondant à la gamme de longueurs d'onde requise pour la mesure.

Tube photomultiplicateur (PMT)

Le tube photomultiplicateur (figure 17) combine une conversion du signal et plusieurs étages d'amplification dans le corps du tube. La nature du matériau composant la cathode détermine la sensibilité spectrale. Un seul PMT donne une bonne sensibilité sur la totalité de la gamme UV-visible de 200 à 900 nm. Un détecteur PMT procure une grande sensibilité à de faibles niveaux de lumière. Pour les échantillons dilués, la majeure partie de la lumière frappant l'échantillon traverse le détecteur. Afin de détecter avec exactitude de légères différences entre les mesures du blanc et de l'échantillon, le détecteur doit présenter un faible rapport signal sur bruit à ces hauts niveaux d'intensité lumineuse.

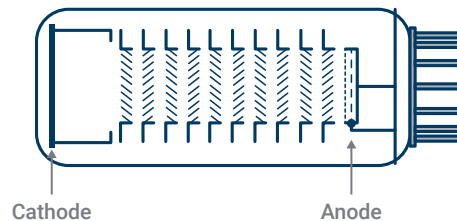
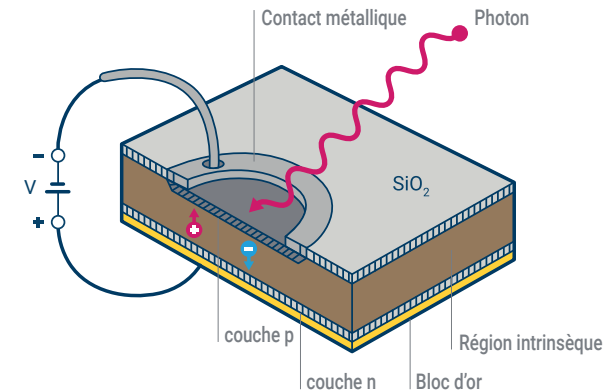


Figure 17. Détecteur de type photomultiplicateur.

Diode au silicium (Si)

Les détecteurs à photodiode au silicium (figure 18) sont couramment utilisés dans les spectrophotomètres modernes. Les détecteurs à photodiode ont une gamme dynamique plus large et sont plus robustes que les détecteurs PMT. Dans une photodiode, la lumière parvenant jusqu'au matériau semi-conducteur provoque le déplacement d'électrons en son sein, ce qui provoque une déplétion de charge dans un condensateur connecté au matériau. La quantité de charge nécessaire pour recharger le condensateur à intervalles réguliers est proportionnelle à l'intensité de la lumière. Les limites de détection des détecteurs à base de silicium sont environ de 170 à 1 100 nm.

Figure 18. Détecteur à photodiode au silicium.



Photodiode du type indium-gallium-arséniure (InGaAs)

Le détecteur InGaAs est un détecteur spécialisé qui offre d'excellentes performances sur la gamme de longueurs d'onde dans le visible et le NIR. Les détecteurs InGaAs sont disponibles en version à bande étroite (de 800 à 1700 nm) et à bande large (de 800 à 2500 nm). Ces détecteurs sont intéressants de par leur réponse linéaire et leur sensibilité dans le domaine de l'infrarouge proche.

Détecteur au sulfure de plomb (PbS)

Le détecteur PbS est le détecteur NIR le plus couramment utilisé dans les spectrophotomètres. Il est sensible de 1000 à 3500 nm. Dans les spectrophotomètres à large gamme de longueurs d'onde et de haute performance, le détecteur PbS est souvent associé à un détecteur PMT pour couvrir l'UV-visible. Lorsqu'il est nécessaire d'avoir une grande sensibilité dans les faibles fréquences NIR, un détecteur PbS peut être associé à un détecteur InGaAs à bande étroite.

3. Sélection des paramètres optimaux pour les mesures UV-Vis

Sélectionner le porte-échantillon, le solvant et les paramètres instrumentaux les plus adaptés est essentiel au succès de votre mesure.

3.1 Sélection de la cellule optique

Les échantillons liquides sont généralement contenus dans une cuve (aussi appelée cuve optique, cellule optique ou juste cellule). Les cuves peuvent être de différents types selon l'application. Il peut s'agir :

- D'une cellule optique « standard » de 10 mm de trajet optique (voir figure 15). D'une contenance d'environ 3,5 mL, cette cellule possède deux fenêtres optiques, parallèles l'une à l'autre. Les autres parois sont généralement dépolies ou rainurées pour indiquer qu'elles sont destinées à la manipulation de la cellule. Il convient de conserver les fenêtres optiques aussi propres que possible et de ne jamais les toucher. On évitera également d'érafler ou de frotter les surfaces optiques lorsque la cuve n'est pas utilisée. Il existe aussi des cellules jetables à usage limité. Celles-ci sont constituées de polystyrène ou de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) et ne conviennent pas aux mesures à haute température. Le polystyrène ne transmettant pas la lumière UV, il ne peut servir qu'aux mesures entre 340 et 800 nm. Les cellules en PMMA peuvent descendre jusqu'à 300 nm.
- Pour les faibles volumes, jusqu'à environ 0,5 mL, il est possible d'utiliser une cellule semi-micro. Ces cellules ont des dimensions extérieures similaires à celles des cellules standard, mais comportent à l'intérieur un canal étroit qui réduit le volume d'échantillon requis. Des cellules ultra-micro, d'une contenance à partir de 0,5 μ L, sont également disponibles. Le masquage noir autour de la fenêtre optique (comme indiqué à la figure 19 et à la figure 20) empêche la réflexion interne dans la cuve. Il est important de vérifier que les cellules sont alignées sur la hauteur optique du faisceau dans l'instrument UV-Vis. Cette distance est appelée « hauteur z ». La hauteur z correspond à la longueur entre la base de la cuve et le centre du trajet optique.

Les cellules semi-micro et ultra-micro sont utiles pour les échantillons de volume limité.

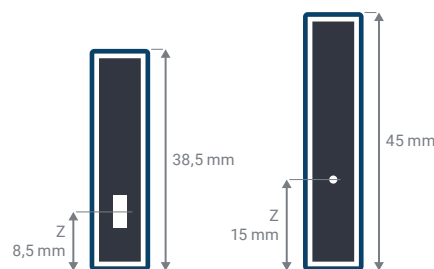


Figure 19. Le « masquage » permet de s'assurer que le faisceau optique traverse l'échantillon. Il est crucial de s'assurer que la hauteur z de la cuve est compatible avec la disposition de votre spectrophotomètre UV-Vis.



Figure 20. Cellule semi-micro de 1,4 mL et 10 mm de trajet optique.

Il est possible d'utiliser une cellule à circulation pour mesurer plusieurs échantillons liquides. Ce type de cellule est disponible avec divers volumes internes et trajets optiques. Les cellules sont généralement reliées à une pompe péristaltique et peuvent être raccordées à un passeur automatique d'échantillons. La pompe pousse l'échantillon à travers le tube connecté à la cellule, ce qui remplit la cellule en vue de la mesure. Une solution de rinçage est ensuite poussée afin de nettoyer la cellule avant le pompage de l'échantillon suivant dans la cellule.



Figure 21. Cellule à circulation dotée d'ouvertures optiques rectangulaires de 4 x 11 mm et d'un trajet optique de 10 mm, avec connecteurs et tube.

La plupart des cellules optiques possèdent un bouchon ou un couvercle. Le bouchon est conçu pour réduire les risques d'éclaboussure ou de déversement de l'échantillon, de même que son évaporation. Il est fortement recommandé d'utiliser un bouchon lors de la mesure d'échantillons volatils ou dangereux.

Trajet optique des cellules

Le trajet optique correspond à la distance que parcourt la lumière incidente à l'intérieur de l'échantillon. Il existe des cuves de différents trajets optiques. Le trajet optique qu'il convient d'utiliser dépend de l'absorbance de votre échantillon :

- Les échantillons concentrés de forte absorbance (> 3 Abs) nécessitent une cuve à faible trajet optique (inférieur ou égal à 5 mm) ou doivent être dilués. Les cuves de faible trajet optique peuvent également servir à compenser les solvants de forte absorbance.
- Les échantillons dilués de faible absorbance ($< 0,2$ Abs) ont besoin d'une cuve à long trajet optique (jusqu'à 100 mm) pour augmenter la lecture de l'absorbance. Ce type de cellule permet aussi de réduire le niveau d'erreur.

La plupart des spectrophotomètres UV-Vis comportent un support de cuve adapté aux cuves standard de 10 mm de trajet optique. Les cuves à trajet optique plus long nécessitent un support de cellule Agilent adapté aux longs trajets optiques.

Les cellules de plus faible trajet optique sont disponibles dans les mêmes dimensions que la cuve standard de 10 mm de trajet optique. Elles s'adaptent dans le support de cellule Agilent standard fourni avec l'instrument. Des entretoises sont également disponibles pour placer en toute sécurité une cuve de faible trajet optique dans un support de cuve standard.

Matériau

Les propriétés optiques du matériau constituant les fenêtres de la cuve doivent être prises en compte. Il est préférable d'utiliser du verre de quartz pour accéder à une plus large gamme de longueurs d'onde. Le verre de quartz étant plus onéreux, il est possible d'utiliser du verre optique ou du plastique (polystyrène) lorsque les mesures se font au-dessus de 340 nm (polystyrène) et 350 nm (verre optique). Les cellules en polystyrène ne conviennent pas aux utilisations à haute température. Il est également important de vérifier que les échantillons/solvants ne détériorent pas les cellules lorsqu'elles sont en polystyrène. L'expression « cellules jetables » ou « cellules en plastique » est souvent utilisée pour désigner les cellules en polystyrène. Celles-ci se rayent facilement et sont conçues pour un usage unique. Le tableau 1 montre la transmission de matériaux courants sur la gamme de longueurs d'onde UV et NIR.

Tableau 1. Fenêtres de transparence des matériaux couramment employés pour les cuves.

Matériau	Longueur d'onde acceptable (nm)
Quartz	170-2700
Quartz Infrasil (NIR)	220-3800
Verre optique	334-2500
Polystyrène (jetable)	340-800

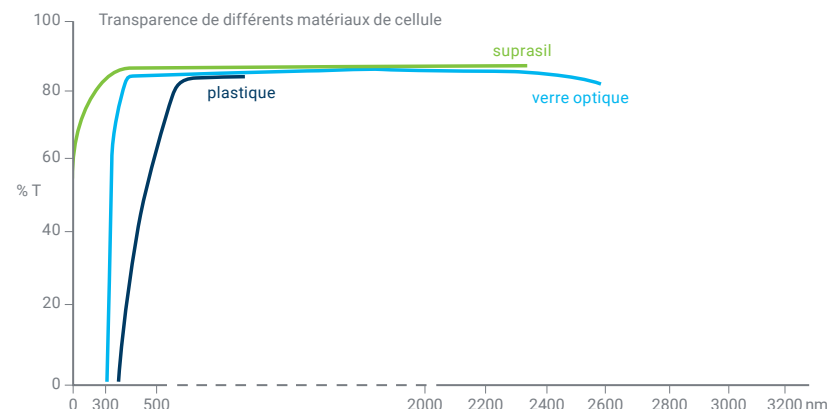


Figure 22. Transparence des matériaux couramment employés pour les cellules optiques.

Cuves assorties

Certaines cuves sont vendues sous forme de paires assorties et sont utilisées dans la plupart des analyses UV-Vis et UV-Vis-NIR de routine. Les paires assorties garantissent que les deux cuves ont une absorbance ou une transmission similaire quand elles sont vides ou remplies d'eau. Le code d'assortiment peut être assimilé à un numéro de lot. Il reflète les caractéristiques en transmission du lot (matière fondue) de la matière première dont sont constituées les cuves.

Pour que deux cuves soient assorties, elles doivent se situer dans la tolérance de transmission acceptable à une longueur d'onde donnée. Par exemple, la transmission des deux cuves d'une paire doit se situer à moins de 1,5 % l'une de l'autre à 200 nm. Les fabricants de cuve spécifient les tolérances d'assortiment en transmission aux longueurs d'onde mesurées pour les matériaux qu'ils fournissent.

Les codes d'assortiment n'ont de réelle valeur que pour comparer de nouvelles cellules. Les caractéristiques de transmission évoluent au cours de l'utilisation du fait de la contamination de surface ou de l'usure causée par les processus de nettoyage ou les erreurs de manipulation. C'est pourquoi une cellule toute neuve ne sera pas forcément assortie à une ancienne cellule du même code d'assortiment.

Les techniques modernes de production et d'assemblage par fusion ont abouti à l'amélioration des tolérances en matière de platitude, de parallélisme et de construction. Ceci, associé à une plus grande attention portée à l'assurance qualité des matières premières, a quasiment permis de s'affranchir de l'assortiment en transmission pour les cellules standard en quartz de grande qualité.

Propreté

Les matières grasses présentes dans les empreintes digitales absorbent fortement dans le domaine UV. Les empreintes déposées sur les surfaces optiques peuvent donc fausser les résultats. Il est donc nécessaire, avant d'utiliser une cellule, d'essuyer toutes les empreintes et tous les contaminants à l'aide d'un chiffon doux et propre. Le chiffon ne doit contenir aucun détergent ou lubrifiant. Les tissus utilisés pour nettoyer les verres de lunettes ou tout autre essuie-verre contiennent souvent des détergents ou des lubrifiants qui peuvent avoir une incidence sur vos mesures.

Les cuves en verre ou en quartz ne doivent pas être nettoyées dans un système de nettoyage à ultrasons. Chaque bain à ultrasons génère des ondes ultrasonores à une fréquence différente, et si votre bain fonctionne à la fréquence de résonance de votre cellule, celle-ci se brisera.

Il convient d'éviter les acides fluorés tels que l'acide fluorhydrique (HF), quelle qu'en soit la concentration, car ils attaquent le quartz et le verre. Les solutions fortement basiques (de pH supérieur ou égal à 9,0) dégradent également la surface des fenêtres et raccourcissent la durée de vie de la cuve.

Une fois le blanc mesuré, évitez de nettoyer les fenêtres optiques de votre cellule. Si un nettoyage s'avère nécessaire, refaites une mesure du blanc avant de poursuivre vos mesures.

Autres conseils concernant la manipulation des cuves

Des précautions simples peuvent être prises pour garantir la longévité des cuves :

- Essayez de retirer les échantillons des cuves immédiatement après usage. Ceci évitera à votre échantillon de sécher et de coller à la cuve. Faites particulièrement attention aux protéines et aux colorants puissants, car ils sont connus pour adhérer aux surfaces internes de la cuve. Retirez ces échantillons de la cellule immédiatement après analyse et rincez-les soigneusement avec votre solvant avant de passer à l'échantillon suivant.
- Si vous devez mesurer un échantillon sur une longue période, placez le bouchon sur la cuve de l'échantillon et maintenez le tout à une température adaptée afin de réduire autant que possible l'évaporation. Certains échantillons peuvent nécessiter une agitation en continu.
- Nettoyez avec soin toutes les cuves à la fin de la journée, et :
 - stockez-les dans un récipient adapté après séchage, ou
 - stockez les cuves humides dans une solution légèrement acide (1 % d'acide nitrique ou d'acide chlorhydrique), dans un bécher résistant aux acides. Ne placez qu'une seule cuve par bécher pour éviter de l'ébrécher. Rincez toujours la cuve avec de grandes quantités d'eau immédiatement avant l'utilisation suivante.



Mesure des affichages de téléphone portable

Les concepteurs d'écrans de téléphone portable, tablette, ordinateur portable et télévision s'efforcent de les rendre aussi fins que possible. Amincir un écran de seulement quelques dixièmes de microns peut avoir un impact notable sur la taille globale de l'appareil. Ces écrans utilisent des diodes électroluminescentes (DEL) et des affichages à cristaux liquides (LCD) pour contrôler les couleurs de l'affichage, ainsi qu'un réflecteur de rétro-éclairage pour fournir l'éclairage. Les réflecteurs de rétro-éclairage sont généralement constitués d'un matériau polymère transparent dont une surface est recouverte d'un film réflecteur. Ils ressemblent à une feuille de miroir en plastique. Mesurer la réflectance et la transmission du réflecteur de rétro-éclairage est une phase critique du développement d'un nouveau modèle. Il s'agit également d'une mesure importante de contrôle-qualité lors de leur fabrication. La réflectance et la transmission d'un réflecteur de rétro-éclairage sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. Le réflecteur de rétro-éclairage est monté à la verticale dans le compartiment de l'échantillon et mis en rotation autour de son axe central, ce qui permet de mesurer sa réflectance et sa transmission à différents angles d'incidence.

[Voici les détails de la mesure.](#)

3.2 Régulation thermostatique des échantillons

De nombreux échantillons peuvent être mesurés à température ambiante. Toutefois, certaines circonstances requièrent le chauffage ou le refroidissement des échantillons. Il peut s'agir des situations suivantes :

- Refroidissement d'échantillons volatils afin de réduire l'évaporation
- Chauffage d'échantillons visqueux pour faciliter la manipulation ou améliorer l'homogénéité des échantillons
- Échantillons sensibles aux variations chimiques lorsqu'ils sont chauffés
- Observation de modifications des échantillons lors du chauffage ou du refroidissement

Les spectrophotomètres UV-Vis peuvent être équipés d'accessoires visant à réguler la température des échantillons. Les systèmes de régulation de la température les plus simples permettent d'effectuer des mesures à température fixe. Ils utilisent généralement un dispositif de circulation d'eau thermostaté qui fait passer de l'eau chauffée dans un collecteur supportant la cuve à échantillon. Pour réguler de manière plus précise la température, un appareil de chauffage/refroidisseur à effet Peltier est intégré au collecteur d'échantillons. Les appareils à effet Peltier permettent de mieux réguler la température et de réaliser des mesures avec une montée en température. Un système à effet Peltier refroidi à l'air requiert moins de maintenance qu'un système à effet Peltier refroidi à l'eau ou qu'un système à circulation d'eau. Les systèmes à circulation d'eau nécessitent une maintenance périodique, notamment la recherche de fuites au niveau des tuyaux d'eau et le remplissage de la solution refroidissante. Un système à effet Peltier présente également l'avantage de fonctionner sans bruit, car il ne nécessite aucun pompage de solution refroidissante.

Quelle que soit l'option de régulation choisie, il convient que votre système surveille la température. Il devrait, au minimum, indiquer la température du collecteur d'échantillons. Ceci est particulièrement important pour un système chauffé à l'aide d'une circulation d'eau externe. Des baisses de température par rapport à la température de consigne du bain-marie peuvent se produire entre le dispositif de circulation d'eau et le collecteur d'échantillons. Dans le cas des systèmes régulés par effet Peltier, la température du collecteur d'échantillons est surveillée et cette rétroaction permet de maintenir une température stable.

Lorsque la régulation de la température est critique, mesurer directement la température de l'échantillon procure une lecture plus exacte. De petites sondes de température sont insérées dans l'échantillon, à l'intérieur de la cuve. Ces sondes sont soigneusement positionnées en-dehors du trajet optique. Si la température est surveillée directement dans les échantillons, le logiciel de commande UV-Vis doit vous permettre d'enregistrer la température de chaque cuve pour chacune des mesures.

3.3 Agitation des échantillons

Il est important d'agiter un échantillon thermostaté, car cela maintient l'homogénéité de la solution et de la température. L'agitation est particulièrement importante pour les échantillons visqueux ou pour s'assurer que les solutions sont mélangées de façon homogène lors de l'étude d'une réaction chimique dans la cuve.

L'efficacité de l'agitation, et donc l'obtention d'une homogénéité thermique (et chimique), dépend fortement de l'échantillon, du solvant et de la viscosité de la solution. Il est important de noter que la viscosité évolue avec la température, ce qui peut influencer l'efficacité de l'agitation, ainsi que les mesures, lorsqu'on utilise une montée en température dans le temps.

Les solutions sont agitées à l'aide d'un barreau magnétique, en forme d'étoile ou de barre, placé au fond de la cuve de l'échantillon. Il existe des cuves spécifiquement conçues avec un renforcement au niveau de la base. Ce renforcement circulaire contient le barreau d'agitation et améliore l'efficacité de l'agitation.

Durant le développement de la méthode analytique, il convient de faire attention à ce que la vitesse d'agitation soit adaptée aux solutions. Si la vitesse d'agitation est trop faible, l'échantillon risque de ne pas être mélangé correctement. Si elle est trop forte, des bulles d'air peuvent être piégées dans l'échantillon et fausser les résultats.

Il est recommandé de procéder à des essais sur tous les échantillons afin de trouver la vitesse d'agitation optimale pour votre expérience. Pour la mesure de liquides dont la viscosité est proche de celle de l'eau, une vitesse d'agitation de 800 à 900 tr/min donne généralement la meilleure uniformité de température dans les cuves standard. Réduisez la vitesse d'agitation pour les échantillons plus visqueux et augmentez-la pour les échantillons moins visqueux.

3.4 Mesures à faible température

Une condensation peut se former à l'extérieur de la cuve lors de la mesure d'échantillons dont la température est inférieure à la température ambiante, ce qui peut interférer avec la mesure. Cette condensation peut être évitée en purgeant le compartiment de l'échantillon du spectrophotomètre UV-Vis à l'aide d'un gaz propre et sec. Certains systèmes comportent des ports de purge permettant d'introduire le gaz dans le compartiment de l'échantillon sans faire entrer la lumière. Une autre solution pour la mesure des échantillons froids consiste à utiliser une sonde d'immersion à fibre optique. Un coupleur de fibre optique, introduit dans le compartiment de l'échantillon, dirige la lumière du système dans un câble de fibre optique jusqu'à une sonde d'immersion insérée directement dans l'échantillon (comme illustré à la figure 6). La lumière est ensuite renvoyée jusqu'au détecteur par un câble à fibre optique de retour. En cas d'échantillonnage à haut débit, cette technique peut être préférable lorsque plusieurs échantillons sont mesurés à une température donnée.

3.5 Transparence du solvant

Il est nécessaire de tenir compte de la transparence du solvant lors de la mesure d'échantillons liquides ou de la dissolution d'échantillons solides en vue d'une analyse UV. Les solvants sont choisis en fonction de la solubilité de l'échantillon, de sa stabilité, de ces exigences en matière de pH et de la longueur d'onde seuil en UV-visible. Pour les composés aqueux, l'eau est un excellent choix car elle permet d'effectuer la mesure sur toutes les longueurs d'onde UV. Recourir à des solvants organiques limite la gamme de longueurs d'onde effectivement utilisable dans l'UV. Lorsque vous choisissez un solvant, tenez compte de la solubilité de votre échantillon dans le solvant et de la transparence de ce dernier dans la gamme de longueurs d'onde ciblée (comme indiqué à la figure 23).

Gammes de transparence utiles des solvants courants dans le domaine UV

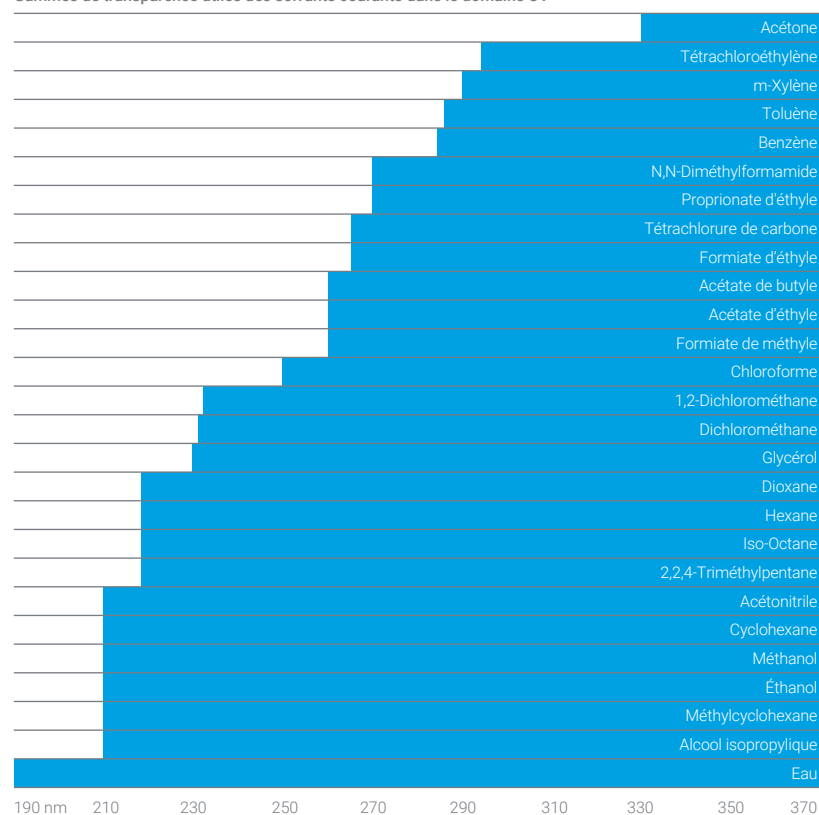


Figure 23. Gammes de transparence des solvants courants dans le domaine UV. Bien qu'il soit préférable d'utiliser l'eau pour l'analyse dans le domaine UV, un autre solvant peut être nécessaire si votre échantillon n'est pas soluble dans l'eau.



Une molécule au rôle prépondérant

La molécule de protoporphyrine constitue la base de la vie d'une multitude d'animaux et de plantes. Le corps stabilise cette molécule par l'insertion d'atomes de zinc dans sa structure annulaire dans les globules rouges immatures (réticulocytes). Lorsque les réticulocytes deviennent matures, le zinc est remplacé par du fer. Les globules rouges matures s'associent ensuite à l'hémoglobine formant les globines, la molécule de transport de l'oxygène du sang de nombreux animaux et des êtres humains.

Chez les plantes, du magnésium est inséré dans le cycle de la protoporphyrine pour former la chlorophylle, l'un des principaux composés nécessaires à la photosynthèse.

La protoporphyrine absorbe la lumière UV. Cette molécule est également fluorescente. Ces caractéristiques font de la protoporphyrine un candidat idéal pour l'analyse spectroscopique. D'ailleurs, elle est à la base du principal test de dépistage du saturnisme chez l'enfant (1).

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Erythrocyte Protoporphyrin Testing; Approved Guideline, Volume 16, No. 8, 1996

3.6 Bande passante spectrale optimale

Il est nécessaire de tenir compte de la résolution de la mesure lorsque vous mesurez un échantillon. La plupart des échantillons solides ou liquides analysés par spectroscopie UV-Vis présentent naturellement de larges pics, de l'ordre de 20 nm ou plus d'un côté à l'autre. Une bonne pratique consiste à utiliser un instrument dont la bande passante spectrale (SBW) est égale à environ un dixième de la bande passante naturelle de l'analyte. La SBW de l'instrument est définie comme la largeur de la bande de lumière à mi-hauteur du maximum du pic (comme illustré à la figure 24). Elle est parfois appelée « largeur complète à mi-hauteur » (FWHM). La SBW du spectrophotomètre UV-Vis est liée à la largeur de fente physique de la structure du monochromateur.

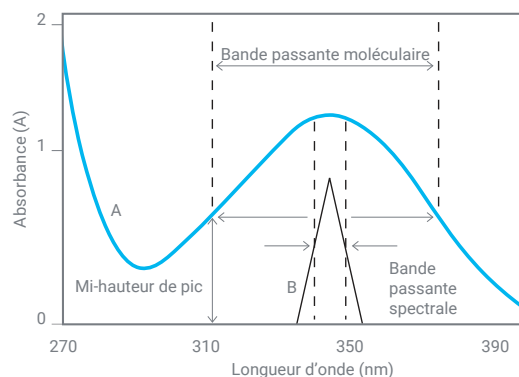


Figure 24. Le spectre A présente un maximum du pic proche de 345 nm. La bande passante spectrale est indiquée. La largeur de fente spectrale du spectrophotomètre UV-Vis est toujours plus étroite que la bande passante spectrale requise.

Selon la conception du spectrophotomètre, la fente physique peut avoir une largeur fixe ou variable. La plupart des spectrophotomètres UV-Vis de milieu de gamme ont une bande passante spectrale fixe de 1,5 nm, ce qui suffit à séparer les pics de la majeure partie des échantillons liquides et solides. Une SBW plus large permet de faire passer davantage de lumière dans l'échantillon et d'obtenir des données de meilleure qualité et moins de bruit, mais elle ne permet pas de séparer des pics étroits ou proches les uns des autres. Une SBW plus faible permet d'accroître le pouvoir de résolution, mais peut rallonger le temps de collecte des données à qualité de données équivalente, du fait de la réduction de la quantité de lumière parvenant jusqu'à l'échantillon.

Les systèmes de spectrophotométrie de haute performance ou destinés à la recherche sont souvent conçus pour permettre à l'utilisateur de choisir la largeur de fente, et ainsi ajuster la résolution du système. Ceci s'avère utile pour la mesure d'échantillons plus complexes. Il est possible de maximiser la largeur de fente pour laisser passer plus de lumière dans les échantillons fortement absorbants, dans lesquels il n'est pas nécessaire d'avoir une haute résolution de pic. Envoyer une plus grande quantité de lumière sur le détecteur améliore la reproductibilité, l'exactitude et la précision des résultats. Lorsqu'une haute résolution est nécessaire, la largeur de fente peut être réduite (comme indiqué aux figures 25 et 26).

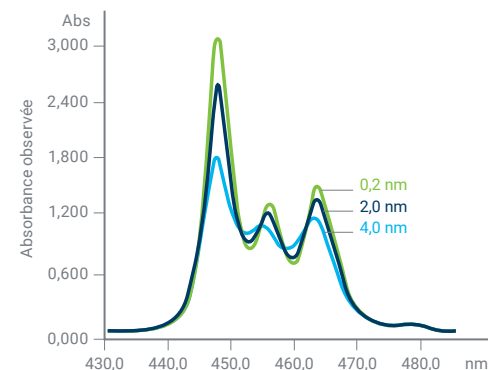


Figure 25. Superposition de différents balayages mesurés avec des fentes d'instrument différentes. Plus la fente s'élargit, plus le rapport signal sur bruit s'améliore, mais plus la résolution diminue.

À titre indicatif, il convient de fixer la SBW de façon à ce qu'elle soit égale à un dixième de la bande passante moléculaire de l'échantillon (voir les exemples du tableau 2).

Tableau 2. Paramètres de bande passante spectrale recommandés pour les types de mesure UV-Vis les plus courants.

Composé représentatif	Pic, nm	Bande passante, nm	Optimum (SBW), nm
Acides aminés			
tryptophane	279	45	4,5
tyrosine	275 ; 195	40 ; 10	4,0 ; 1,0
phénylalanine	258	2,2	0,2
Nucléotides			
adénosine	260	28	2,8
thymine	265	30	3
Protéines			
cytochrome c, oxydé	410	25	2,5
rhodopsine	500 ; 278	~ 90 ; 25	9 ; 2,5
ribonucléase	278	20	2
Pigments et colorants			
β-carotène	480	35	3,5
chlorophylle a	660	20	2
Coenzymes			
Nicotinamide adénine dinucléotide	260	35	3,5
NADH	340 ; 260	50 ; 25	5 ; 2,5
Composés organiques simples			
benzène, en phase vapeur	253	<< 0,1	<< 0,01
benzène, en solution	253	2	0,2
anthracène	375	3	0,3

Il est également nécessaire de tenir compte de l'intervalle d'échantillonnage (intervalle entre les données) durant la collecte lors de l'optimisation de la résolution spectrale. Au moins trois points de données par pic devraient être recueillis. Même si un intervalle d'échantillonnage plus faible peut améliorer la résolution, un compromis doit être fait entre cet intervalle et la durée de collecte des données.

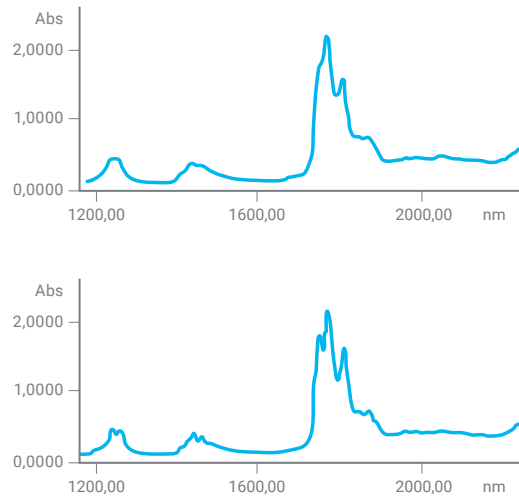


Figure 26. Ces deux spectres montrent l'influence de la variation de la SBW sur la résolution. Une SBW de 15 nm (graphique du haut) ne permet d'observer que peu de détails sur la structure du spectre. Une SBW de 3 nm (graphique du bas) améliore grandement la définition des pics.

3.7 Lumière parasite

La lumière parasite, ou énergie rayonnante parasite (SRE), est définie comme le pourcentage de rayonnement parvenant jusqu'au détecteur dont la longueur d'onde se trouve en-dehors de la bande spectrale sélectionnée. Elle est due à une mauvaise conception (fuite de lumière à l'intérieur de l'instrument, provenant de l'éclairage du laboratoire ou de la lumière du soleil qui traverse les fenêtres, ou de la lumière mal séparée par le monochromateur) ou une détérioration de l'instrument. La plupart des systèmes comportent des contrôles de performance instrumentale qui détectent les problèmes de lumière parasite. Ces contrôles sont effectués sur une solution de test. Les solutions servant à contrôler les niveaux de lumière parasite ne transmettent pas les longueurs d'onde indiquées (elles transmettent d'autres longueurs d'onde). La transmittance observée est donc uniquement due à la lumière parasite.

La lumière parasite provoque une baisse des lectures d'absorbance et modifie la forme des pics observés (comme illustré à la figure 27). Du fait de cette lumière parasite, la loi de Beer-Lambert n'est plus suivie (comme le montre la figure 28) et les mesures de concentration ne sont plus fiables. Les performances d'un instrument UV-Vis en matière de lumière parasite déterminent également l'absorbance maximale qu'un instrument peut mesurer.

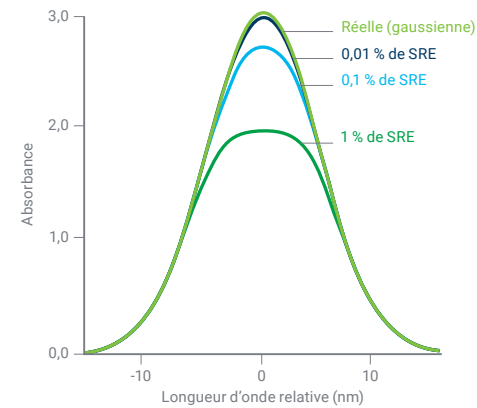


Figure 27. Plus la lumière parasite augmente, plus l'absorbance maximale des pics diminue et plus la courbe s'aplatit.

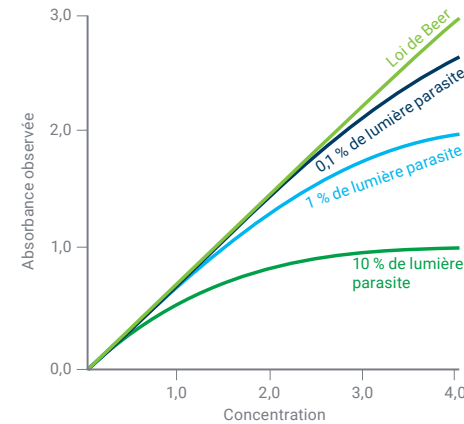


Figure 28. Un système UV-Vis présentant de piètres performances en matière de lumière parasite s'écarter de la loi de Beer. Les calculs de concentration ne sont donc pas fiables.

3.8 Plage linéaire d'un instrument UV-Vis

L'absorbance maximale qu'un instrument est capable de mesurer à une longueur d'onde spécifique dépend à la fois de la conception de l'instrument et des paramètres de mesure. Lorsque l'absorbance est forte, très peu de lumière parvient jusqu'au détecteur, ce qui diminue le rapport signal sur bruit (se reporter à la caractéristique « frange » du spectre de la figure 29). Comprendre les limites de votre système vous permet d'éviter de mesurer des échantillons ou d'effectuer des étalonnages en-dehors des plages de fonctionnement de votre instrument. Pour les échantillons liquides, une solution consiste à diluer l'échantillon pour ramener la mesure dans la plage linéaire de l'instrument. Vous avez aussi la possibilité d'utiliser une cuve à court trajet optique.

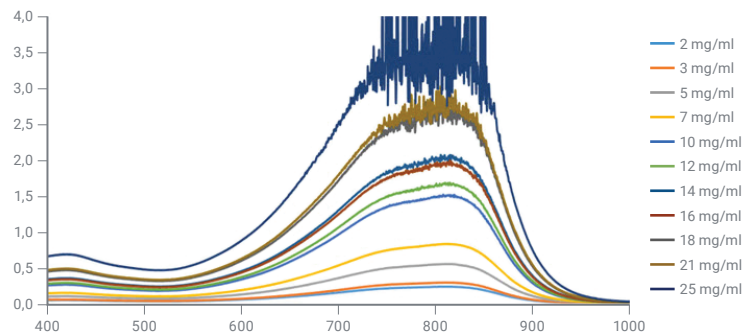


Figure 29. Plus l'absorbance de l'échantillon augmente, moins il y a de lumière parvenant jusqu'au détecteur. Ceci augmente le bruit dans les résultats et provoque l'apparition d'un signal en dents de scie typique en mode balayage.

3.9 Autres informations utiles

L'absorbance (A ou Abs) est fréquemment mesurée en spectroscopie UV-Vis du fait de la relation linéaire entre la concentration et l'absorbance, décrite par la loi de Beer-Lambert. Pour d'autres applications, le pourcentage de lumière transmise ou absorbée peut être plus parlant. Lorsque l'on souhaite comparer les propriétés optiques d'un matériau par exemple, il peut s'avérer plus utile de comparer la différence de pourcentage de transmission ou d'absorbance.

La plupart des systèmes de spectrophotométrie UV-Vis vous permettent de convertir les données que vous avez collectées entre les différents paramètres couramment utilisés. La relation entre ces paramètres est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3. La relation entre le pourcentage de transmission et d'absorbance peut être difficile à visualiser. Le tableau montre qu'un échantillon ayant une absorbance de 7 transmet seulement 0,00001 % de la lumière qui le traverse.

% T	T	Abs	% A	LogA
100	10	0	0	–
50	0,5	0,3	50	-0,52
10	0,1	1	90	0
1	0,01	2	99	0,3
0,1	0,001	3	99,9	0,48
0,01	0,0001	4	99,99	0,60
0,001	0,00001	5	99,999	0,70
0,0001	0,000001	6	99,9999	0,78
0,00001	0,0000001	7	99,99999	0,85

3.10 Longueur d'onde ou cm^{-1}

La majeure partie des mesures UV-Vis est donnée pour des longueurs d'onde mesurées en nanomètres (1×10^{-9} m). La littérature ancienne utilise parfois l'inverse de la longueur ou le nombre d'ondes (cm^{-1}). Le nombre d'ondes est souvent employé pour les mesures de spectroscopie infrarouge (IR). L'utilisation d'une échelle de nombre d'ondes est utile, car elle indique la variation des niveaux d'énergie de la radiation incidente. Une longueur d'onde inférieure donne un nombre d'ondes supérieur et une plus grande énergie (comme indiqué dans le tableau 4).

L'emploi du nombre d'ondes en spectroscopie infrarouge permet également de visualiser plus facilement les différences spectrales lorsque la longueur d'onde se réduit progressivement.

En spectroscopie UV-Vis, la longueur d'onde est généralement préférée car elle constitue un moyen pratique de visualiser le spectre affiché sur un domaine spectral.

La plupart des systèmes de spectrophotométrie UV-Vis vous permettent de collecter un spectre soit en longueur d'onde, soit en nombre d'ondes.

Tableau 4. Conversion entre la longueur d'onde (nm) et le nombre d'ondes (cm^{-1}).

λ , nm	cm^{-1}
3300	3030
3000	3300
2500	4000
2000	5000
1500	6666
1000	10000
800	12500
600	16667
400	25000
200	50000
175	57143

4. Présentation des applications UV-Vis courantes

4.1 Identification – spectres et structure

Les spectres UV-Visible ne comportent généralement que quelques larges pics d'absorbance. Comparée à des techniques telles que la spectroscopie infrarouge, qui produit de nombreux pics étroits, la spectroscopie UV-visible fournit une quantité limitée d'informations qualitatives. Avec seulement quelques larges pics, il est difficile d'identifier un composé en se basant sur un spectre caractéristique.

La majeure partie de l'absorption due aux composés organiques provient de la présence de liaisons π . Un chromophore est un groupe moléculaire qui contient généralement une liaison π . Lorsqu'il est inséré dans un hydrocarbure saturé (qui ne présente aucun spectre d'absorbance UV-visible), il produit un composé présentant une absorption entre 185 et 1000 nm. Le tableau 5 énumère certains chromophores ainsi que la longueur d'onde de leurs maximums d'absorbance.

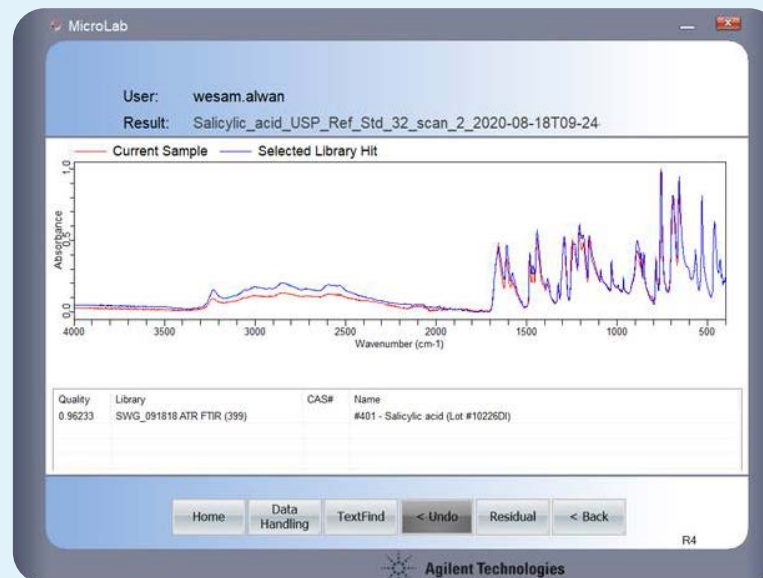
Tableau 5. Quelques chromophores donnés avec la longueur d'onde de leurs maximums d'absorbance.

Chromophore	Formule	Exemple	λ_{max} (nm)
Carbonyle (cétone)	$\text{RR}'\text{C}=\text{O}$	Acétone	271
Carbonyle (aldéhyde)	$\text{RHC}=\text{O}$	Acétaldéhyde	293
Carboxyle	RCOOH	Acide acétique	204
Amide	RCONH_2	Acétamide	208
Éthylène	$\text{RCH}=\text{CHR}$	Éthylène	193
Acétylène	$\text{RC}=\text{CR}$	Acétylène	173
Nitrile	$\text{RC}=\text{N}$	Acétonitrile	< 160
Nitro	RNO_2	Nitrométhane	271

La présence d'une bande d'absorbance à une longueur d'onde particulière est souvent un bon indicateur de la présence d'un chromophore. Toutefois, la longueur d'onde correspondant à la position du maximum d'absorbance n'est pas fixe ; elle dépend en partie de l'environnement moléculaire du chromophore et du solvant dans lequel est dissout l'échantillon. D'autres paramètres, tels que le pH et la température, peuvent également provoquer des variations de l'intensité et de la longueur d'onde des maximums d'absorbance.

Les spectre FTIR peuvent servir à identifier des composés

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) contiennent beaucoup plus de détails que les spectres UV-Vis. Un spectre comme celui présenté ici (en rouge) peut être comparé à une banque de spectres FTIR afin d'identifier le composé. Dans ce cas, il s'agit d'un composé pharmaceutique, l'acide salicylique (dont le spectre tiré de la banque est indiqué en bleu).



Conjuguer la double liaison avec des doubles liaisons supplémentaires accroît l'intensité et la longueur d'onde de la bande d'absorption. Pour certains systèmes moléculaires, tels que les caroténoïdes ou les hydrocarbures conjugués, la relation entre intensité et longueur d'onde a été étudiée de manière systématique. Les ions des métaux de transition possèdent également des niveaux d'énergie électronique qui provoquent une absorption à 400-700 nm dans le domaine visible.

4.2 Confirmation d'identité

Même si les spectres UV-Vis ne permettent pas l'identification absolue d'un composé inconnu, ils sont utilisés pour confirmer l'identité d'une substance en comparant le spectre mesuré à un spectre de référence. Lorsque des spectres sont extrêmement similaires, il est possible d'utiliser leurs dérivées. Comme indiqué à la figure 30, le nombre de bandes augmente lorsque l'ordre de la dérivée augmente. Ces dérivées de spectres complexes peuvent s'avérer utiles en analyse qualitative pour caractériser des matériaux ou à des fins d'identification. Par exemple, le spectre d'absorbance de la testostérone stéroïdienne montre une large bande unique sans élément distinctif centrée sur environ 330 nm, alors que sa dérivée seconde comporte six pics distinctifs. Cette amélioration de la résolution peut également servir dans l'identification d'un composé inconnu. La figure 30 présente une simulation informatique. Lorsque deux bandes gaussiennes avec une bande passante spectrale naturelle (NBW) de 40 nm, séparées de 30 nm, sont ajoutées en mode absorbance, on obtient une bande unique dont le maximum se situe à mi-chemin entre les bandes des deux composants. Les deux composants ne sont pas séparés. Avec la dérivée quatrième du spectre, ces deux bandes sont clairement visibles, avec des maximums centrés à proximité de la valeur $\lambda_{\max}$ des bandes des composants.

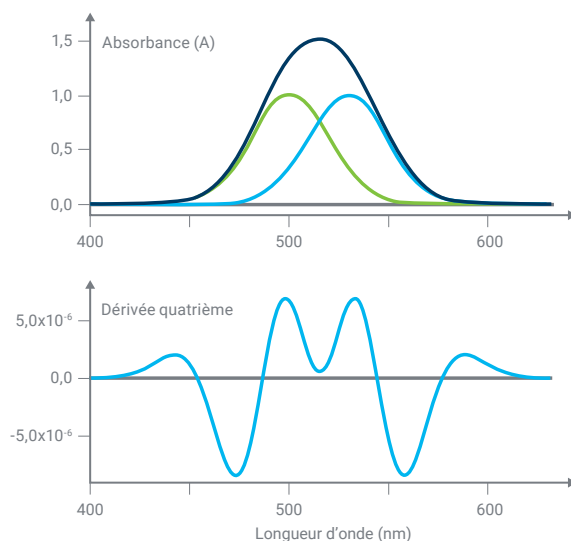


Figure 30. Amélioration de la résolution par l'analyse des dérivées. Les pics d'origine se chevauchaient en donnant un large pic unique. La dérivée quatrième du spectre produit une bien meilleure résolution des pics.

4.3 Quantification d'une molécule

Loi de Beer

Si 100 photons de lumière pénètrent dans la cuve et si 50 seulement en ressortent de l'autre côté, la transmittance est de 0,5 ou 50 %. Si ces 50 photons passent ensuite dans une cuve identique, seuls 25 en ressortent, et ainsi de suite. La figure 31 donne la transmittance en fonction du trajet optique de la cuve.

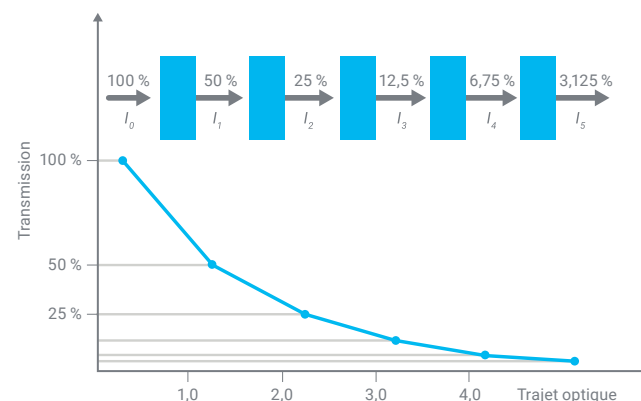


Figure 31. Transmittance et trajet optique – loi de Bouguer-Lambert.

Lambert (1760) reçoit généralement le crédit de la première expression mathématique de cet effet, mais il apparaît désormais que Bouguer a été le premier à l'établir en 1729. L'équation est :

$$T = I/I_0 = e^{-kb}$$

où :

- I_0 est l'intensité incidente,
- I est l'intensité transmise,
- e est la base du logarithme népérien,
- k est une constante,
- b est le trajet optique (habituellement en centimètres).

La loi de Beer est identique à la loi de Bouguer, sauf qu'elle est définie en termes de concentration. La quantité de lumière absorbée est proportionnelle au nombre de molécules absorbantes au travers desquelles passe la lumière. La figure 32 donne la transmittance en fonction de la concentration.

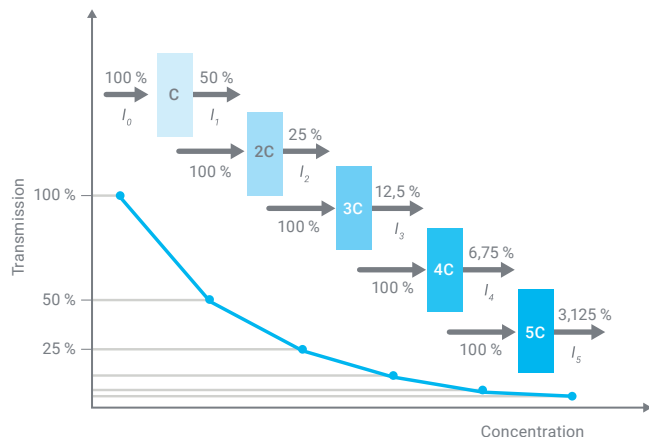


Figure 32. Transmittance et concentration – loi de Beer.

La combinaison des deux lois donne la loi de Beer-Bouguer-Lambert :

$$T = I/I_0 = e^{-kbc}$$

où **c** est la concentration de l'espèce absorbante (habituellement exprimée en grammes par litre ou en milligrammes par litre). L'équation peut être transformée en une expression linéaire en passant par le logarithme, et est généralement exprimée sous forme de logarithme décimal :

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \Sigma bc$$

où **A** est l'absorbance et Σ le coefficient d'absorption molaire ou coefficient d'extinction molaire. Cette expression est connue sous le nom de loi de Beer. La figure 33 donne l'absorbance en fonction de la concentration.

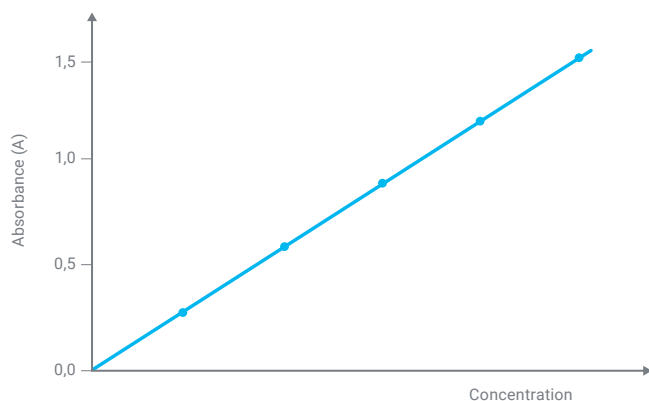


Figure 33. La loi de Beer-Bouguer-Lambert décrit une relation linéaire entre l'absorbance de la lumière incidente et la concentration de la molécule.

Le coefficient d'extinction (ϵ) est caractéristique d'une substance donnée dans des conditions précisément définies, incluant la longueur d'onde, le solvant et la température. En pratique, le coefficient d'extinction mesuré dépend également en partie des caractéristiques de l'instrument employé. C'est pour ces raisons qu'on n'utilise généralement pas de valeurs prédéfinies pour le coefficient d'extinction en analyse quantitative. On construit plutôt une courbe d'étalonnage ou de travail pour la substance à analyser à l'aide d'une ou de plusieurs solutions étalons de concentrations en analyte connues.

Pour les transitions électroniques, la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité est relativement grande. Il est donc fort probable qu'à température ambiante, toutes les molécules se trouvent dans l'état électronique fondamental. L'absorption et le retour à l'état fondamental sont des processus rapides et l'équilibre est atteint très rapidement. De ce fait, l'absorption de lumière UV-Visible est quantitativement extrêmement exacte. La relation linéaire simple entre l'absorbance et la concentration ainsi que la facilité relative de la mesure de la lumière UV-Visible ont fait de la spectroscopie UV-visible la base de milliers de méthodes analytiques quantitatives. En supposant que la loi de Beer est respectée pour le spectre d'ordre zéro, il existe une relation linéaire similaire entre la concentration et l'amplitude pour tous les ordres de dérivée des spectres :

Ordre zéro : $A = \epsilon bc$

Dérivée première : $dA/d\lambda = (d\epsilon/d\lambda)bc$

Dérivée d'ordre n : $d^n A/d\lambda^n = (d^n \epsilon/d\lambda^n)bc$

à λ , où **A** est l'absorbance, ϵ le coefficient d'extinction, **b** le trajet optique de l'échantillon et **c** la concentration de l'échantillon.

Pour la quantification d'un seul composant, la sélection des longueurs d'onde est plus difficile avec les dérivées de spectre qu'avec les spectres d'absorbance, car il existe à la fois des pics positifs et des pics négatifs. Les dérivées d'ordre pair comportent un maximum ou un minimum de pic à la même valeur λ_{max} que le spectre d'absorbance, mais cette longueur d'onde est un point de passage par zéro pour les dérivées d'ordre impair. Prendre la différence entre le plus haut maximum et le plus bas minimum donne le meilleur rapport signal sur bruit (S/B), mais peut accroître la sensibilité aux interférences d'autres composants.

Pour obtenir des résultats exacts, il faut que l'échantillon à analyser contienne uniquement le composant absorbant sur lequel a été effectué l'étalonnage. Si l'échantillon est une solution, il convient de prendre comme blanc un échantillon pur du solvant. Il est éventuellement possible de procéder à une correction pour tenir compte d'un composant interférent avec une seconde longueur d'onde.

Mesures de concentration

L'une des applications les plus courantes du spectrophotomètre UV-Vis est la quantification simple d'une concentration. Il est possible d'utiliser un spectrophotomètre UV-Vis, couplé à un accessoire du type sonde d'immersion à fibre optique, pour effectuer des mesures directement dans le récipient à échantillon, sans avoir besoin de transférer l'échantillon dans une cuve.

[En savoir plus.](#)



4.4 Cinétique

L'analyse de la cinétique d'une réaction est essentielle pour comprendre le déroulement des réactions en chimie et en biochimie. La spectrophotométrie UV-Vis est une technique idéale pour cette application, car elle ne détruit pas l'échantillon. Cette technique peut être employée lorsque le changement affectant le réactif ou les produits provoque un changement de l'absorbance à une longueur d'onde spécifique au cours du temps. Un système UV-Vis à balayage rapide peut effectuer plusieurs balayages durant la réaction, ce qui permet de visualiser la réaction et de faciliter la sélection des longueurs d'onde utilisées pour le calcul de la vitesse.

Cinétique à un point

L'analyse cinétique à un point est la méthode la plus simple pour déterminer la vitesse d'une réaction. On choisit une longueur d'onde, correspondant généralement à l'absorbance maximale de l'analyte étudié, et après avoir lancé la réaction, on surveille en continu l'absorbance à cette longueur d'onde. On obtient alors un graphique de l'absorbance en fonction du temps, comme illustré à la figure 34 pour quatre échantillons. Suivre la variation d'absorbance en fonction du temps vous permet d'étudier une réaction ; lorsque l'absorbance cesse de varier, c'est généralement le signe que la réaction est terminée. La figure 34 montre quatre échantillons différents sur une période de 30 minutes.

La mesure d'un seul point a l'avantage de pouvoir recueillir des données quasiment en continu pour les réactions rapides, car le système n'a pas besoin de passer sur une autre longueur d'onde durant la mesure. La vitesse de collecte des données de l'instrument et le temps d'intégration du signal constituent les facteurs limitant la quantité de données qu'il est possible de recueillir.

Plusieurs longueurs d'onde peuvent également être suivies pour les mesures de cinétique. Ceci peut vous donner des indications sur la formation d'un produit de réaction à une longueur d'onde et la disparition d'un autre produit à une autre longueur d'onde.

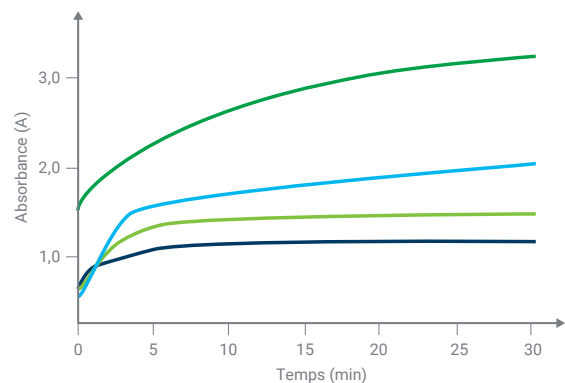


Figure 34. Suivre la variation d'absorbance en fonction du temps vous permet d'étudier une réaction ; lorsque l'absorbance cesse de varier, c'est généralement le signe que la réaction est terminée. Ce graphique montre quatre échantillons différents sur une période de 30 minutes.

Cinétique spectrale

Le balayage d'une gamme de longueurs d'onde au cours du temps peut donner des informations supplémentaires lors de mesures cinétiques. Outre le fait de fournir une indication visuelle de l'avancement d'une réaction (comme illustré à la figure 34), cette mesure vous donne la flexibilité de choisir n'importe quel nombre de longueurs d'onde dans la gamme de balayage afin de calculer la vitesse de la réaction. Vous pouvez, par exemple, analyser la consommation de réactifs ou la formation de produits de réaction au fur et à mesure que la réaction progresse. Lors d'une cinétique spectrale, il est important de vérifier si le système UV-Vis est capable de balayer rapidement la gamme de longueurs d'onde sélectionnée. Un balayage lent limite la quantité de données collectées à chaque longueur d'onde durant la réaction.

Cinétique de mélange rapide

Suivre la vitesse d'une réaction ou la réaction rapide entre deux solutions peut nécessiter un accessoire spécial de mélange rapide ou à flux interrompu. Une fois connectés au spectrophotomètre UV-Vis, ces accessoires assurent l'introduction précise d'au moins deux solutions dans une cellule à circulation placée à l'intérieur du système UV-Vis, où se fait le mélange. L'accessoire à flux interrompu déclenche le démarrage de l'analyse par le système UV-Vis dès que les solutions sont mélangées dans la cellule à circulation. Il est alors possible de modifier le rapport de mélange des solutions ou de thermostatier la cellule à circulation ainsi que les réactifs. Comme la vitesse de collecte est critique, il est important de choisir un système UV-Vis dont la vitesse de collecte de données est suffisante pour recueillir une série de points de données couvrant la durée de la réaction. L'exemple de la figure 36 montre une réaction suivie pendant trois secondes.

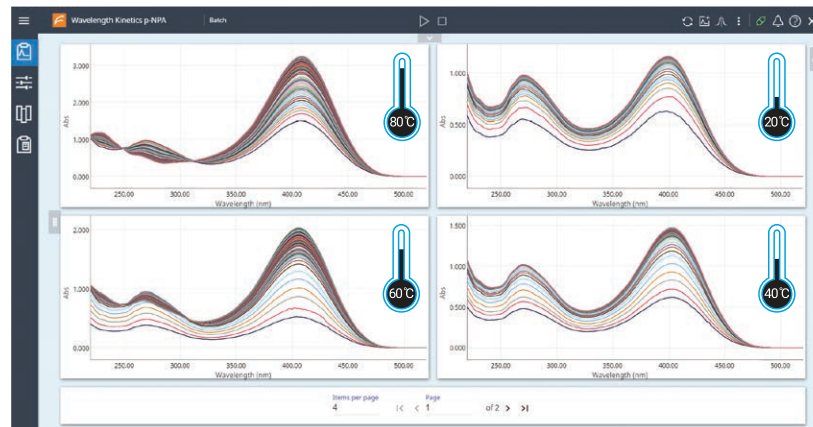


Figure 35. Cinétique spectrale : les spectrophotomètres UV-Vis donnent des informations poussées sur la chimie des réactions. L'effet de la température sur les réactions chimiques peut être observé facilement avec un balayage rapide à plusieurs températures.

[Voici une expérience de cinétique spectrale.](#)

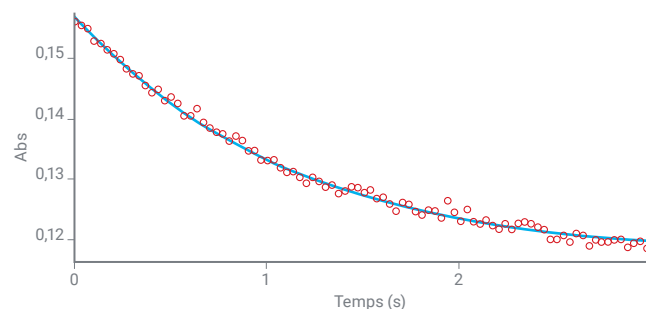


Figure 36. Un spectromètre UV-Vis moderne et un accessoire de mélange rapide permettent de mesurer des réactions se produisant sur quelques secondes. [Voici un exemple d'expérience.](#)

Considérations relatives aux mesures cinétiques

La vitesse d'une réaction peut être influencée par la température. De ce fait, il peut être important de maintenir un échantillon à température constante. Ainsi, la température du corps (37 °C) est souvent choisie pour les réactions biologiques. Des cuves chauffées/refroidies par effet Peltier ou des porte-cuves thermostatés par circulation d'eau sont couramment employés à cette fin avec un système UV-Vis. Ces accessoires peuvent soit maintenir un échantillon à une température spécifique, soit faire varier la température dans le temps (montée en température).

Il est nécessaire de tenir compte de l'exactitude et de la reproductibilité de la température, car de légères variations de température ou la vitesse de variation de la température peuvent avoir un effet important sur les résultats. Certains systèmes permettent de mesurer la température des échantillons directement dans la cuve (plutôt que de simplement mesurer la température du porte-cuve). Cette option, associée à une rétroaction vers le système de régulation de la température, assure généralement une meilleure régulation de la température de l'échantillon. Des sondes de température placées dans l'échantillon peuvent aussi servir à enregistrer la température de l'échantillon en plus des données d'absorbance.

Il est également important d'agiter les échantillons de manière uniforme et reproductible. Lors de la mesure de réactions à température ambiante, l'agitation permet de garantir l'homogénéité du mélange de réactifs durant la réaction. Avec les échantillons thermostatés, l'agitation garantit l'absence de gradient de température dans l'échantillon.

En cas de mesure de systèmes complexes, il peut être préférable d'utiliser une sonde à fibre optique. Un câble de fibre optique permet de diriger la lumière provenant du spectrophotomètre jusque dans l'échantillon, à l'extérieur du spectrophotomètre UV-Vis. Ceci peut être utile pour mesurer un procédé de fabrication à circulation dans lequel l'échantillon subit une température ou une pression extrême, ou lorsqu'il n'est pas possible physiquement de le faire entrer dans le compartiment de l'échantillon du spectrophotomètre.

Une [démonstration d'expériences cinétiques](#) peut être consultée sur le site [agilent.com](#).

4.5 Mesure de la couleur

La couleur est une propriété importante d'un matériau. La couleur de la matière est liée à son absorptivité ou à sa réflectivité de longueurs d'onde spécifiques de lumière. L'œil humain voit la couleur complémentaire de celle qui est absorbée, comme indiqué aux figures 37 et 38.

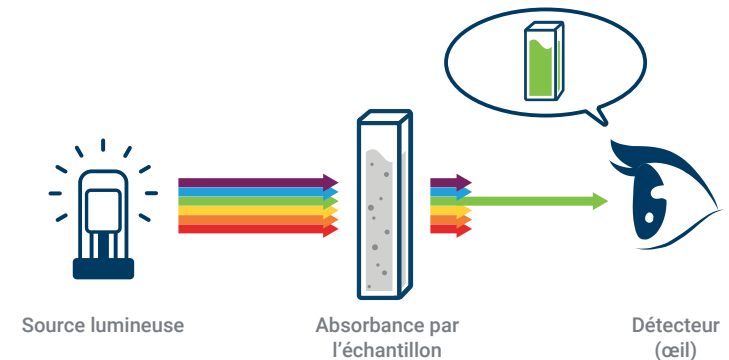


Figure 37. Transmission et couleur. Tout comme le détecteur du spectrophotomètre, notre œil voit la lumière transmise par une surface ou renvoyée par cette surface. Nous percevons cela comme la couleur de l'objet.

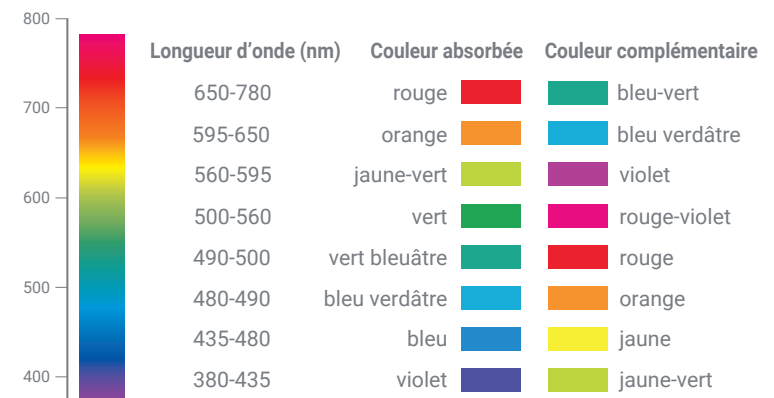


Figure 38. Longueurs d'onde de lumière associées à différentes couleurs (gauche), et couleur de la lumière absorbée et couleur complémentaire associée vue par l'œil humain (droite).

En pratique, la génération et la sensation de couleur sont des phénomènes extrêmement complexes qui dépendent de nombreux facteurs, notamment :

- le spectre de la lumière arrivant sur l'objet (cf la différence de couleurs entre le coucher du soleil et le milieu de la journée),
- la structure en surface d'un matériau solide (les écailles d'un poisson ou les plumes d'un oiseau sont des exemples dans lesquels la structure physique de la surface modifie la couleur perçue),
- l'angle de vue (certaines surfaces, telles que les peintures nacrées, changent de couleur en fonction de l'angle d'observation par rapport à la surface).

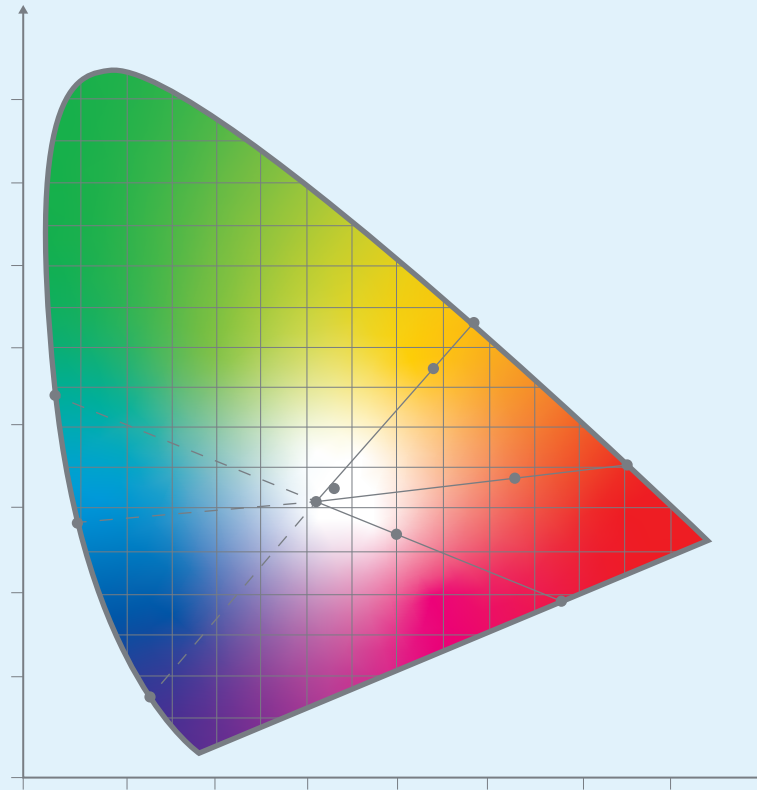
Des systèmes de mesure de couleur spécialisés, tels que le CIE L*a*b, ainsi que des instruments de mesure de la couleur, ont été développés. Une fois équipés d'un logiciel adapté, la plupart des spectrophotomètres peuvent servir à mesurer la couleur. La perception de la couleur est également influencée par la surface et sa capacité à produire une réflectance spéculaire (du type miroir) ou diffuse (dispersion). Du fait de ces facteurs, la mesure de la couleur peut nécessiter des accessoires particuliers pour collecter et observer la réflectance spéculaire et diffuse à différents angles de vue.

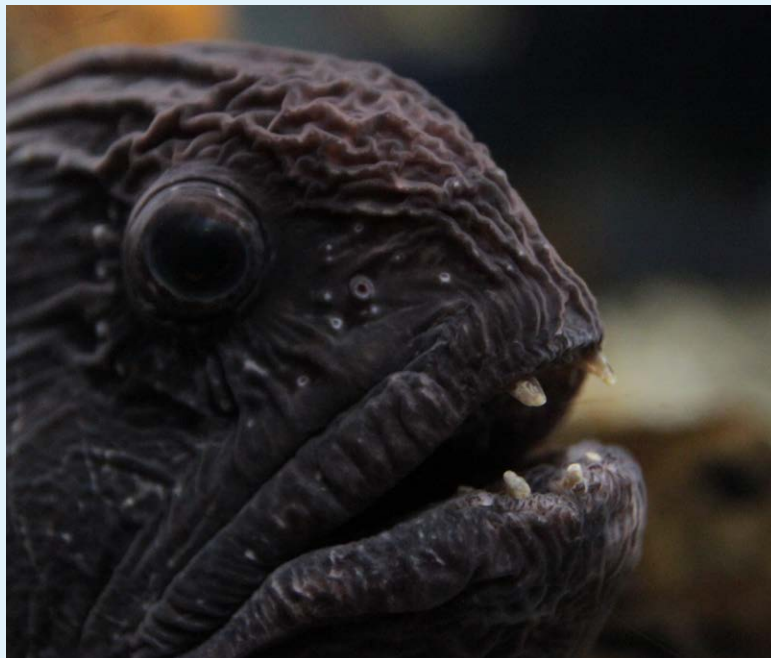
Un instrument de mesure de la couleur prend le spectre UV-Vis d'un échantillon et le convertit en trois coordonnées chromatiques qui situent la couleur dans un espace chromatique tridimensionnel (cf image sur le côté). Les trois coordonnées définissent la luminosité, la saturation et la teinte. La luminosité indique si la couleur est claire ou foncée. La saturation mesure la « pureté de la couleur », et la teinte correspond à la couleur spectrale dominante, similaire aux couleurs d'un arc-en-ciel.

En plus de pouvoir mesurer des correspondances de couleur (par exemple en mesurant la couleur d'une peinture sur un produit manufacturé), un spectrophotomètre UV-Vis peut également servir à mesurer une variation de couleur dans une solution. Les mesures UV-Vis sont souvent utilisées dans ce but afin d'évaluer si une réaction a eu lieu ou est en cours, sans inspection visuelle. Les tests colorimétriques sont l'une des plus vastes applications de la spectrophotométrie UV-Vis.

Mesure de la couleur

Les spectrophotomètres UV-Vis sont utilisés pour mesurer la couleur de liquides et de solides. Mesurer la lumière visible transmise à travers une solution ou un matériau, ou la lumière qui est réfléchiée par une surface permet de calculer la couleur de ce liquide ou matériau. Une série de trois nombres est utilisée pour indiquer les coordonnées de la couleur mesurée dans un « espace chromatique ». [En savoir plus.](#)





À quel point le noir est-il noir ? Demandez à un poisson des grands fonds

Les chercheurs ont découvert que de nombreux poissons des abysses possèdent une peau ultra-noire, qui réfléchit moins de 0,5 % de la lumière incidente. Cette caractéristique leur permet de rester indétectables lorsqu'ils chassent. Les espèces qui évoluent dans ces eaux profondes très sombres utilisent souvent l'éclat de la bioluminescence pour mieux voir leurs proies ou leurs prédateurs. La peau ultra-noire absorbe la lumière de la bioluminescence, ce qui permet aux poissons de rester hors de vue.

Des chercheurs du Smithsonian National Museum of Natural History et de l'Université Duke ont mesuré la réflexion de la peau de ces poissons, qui absorbe 99,5 % de la lumière. Cette valeur est comparable à celle du superbe oiseau de paradis (99,95 %) et du matériau le plus noir jamais fabriqué, le Vantablack, qui absorbe 99,96 % de la lumière.

Le mécanisme employé par ces poissons pour absorber la lumière pourrait trouver des applications dans les panneaux solaires, les télescopes, les caméras et les systèmes de camouflage.

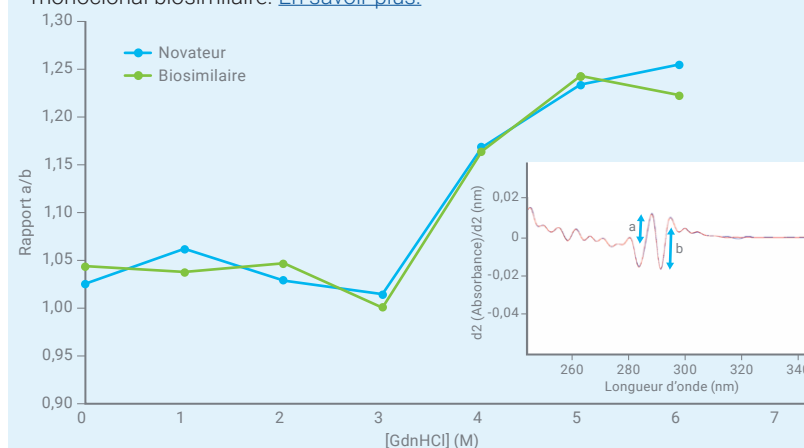
[Lire les résultats de la recherche.](#)

4.6 Modifications structurales des composés

La spectroscopie UV-visible peut être utilisée pour déterminer de nombreuses caractéristiques physicochimiques des composés. Ces mesures pourront identifier un composé ou déterminer des propriétés particulières.

Études de conformation

La spectroscopie UV-Vis peut donner des informations sur la structure des protéines. La spectrophotométrie UV-Vis est également non destructive, ce qui permet de ne pas sacrifier les échantillons précieux. Ceci fait de la méthode UV-Vis la solution idéale à appliquer avant une analyse par des techniques du type LC ou spectroscopie de masse. Ceci est démontré dans la comparaison d'un anticorps monoclonal novateur et d'un anticorps monoclonal biosimilaire. [En savoir plus.](#)



4.7 Température de fusion des acides nucléiques et des protéines

La spectroscopie UV-Vis est couramment employée en sciences de la vie pour analyser des biomolécules, telles que les protéines et les acides nucléiques. Le spectre d'absorbance des protéines est dû à l'absorbance des acides aminés aromatiques suivants : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Une analyse multicomposants peut servir à déterminer le nombre de chaque acide aminé aromatique présent dans une protéine intacte.

Une protéine à température ambiante a une structure tertiaire ou une conformation spécifique qui, à son tour, crée un environnement électronique particulier pour les acides aminés aromatiques. Une autre application de la spectroscopie UV-Vis consiste à exposer les protéines à la chaleur ou à des dénaturants chimiques. Ceci amène la protéine, à une certaine température et à une certaine concentration, à se déplier ou à fondre et ainsi à perdre sa

structure. Au cours de ce processus, l'environnement électronique des acides aminés aromatiques change, ce qui provoque des modifications ou des décalages spectraux.

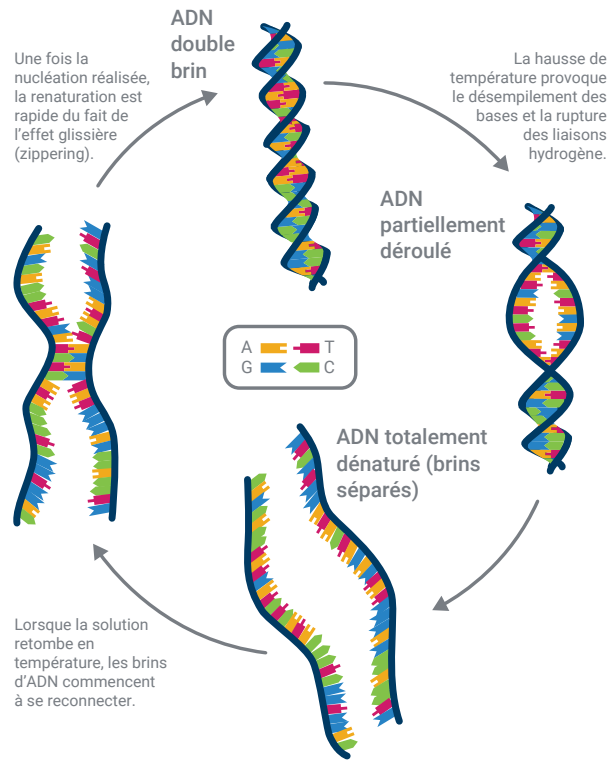


Figure 39. Sous l'effet de la chaleur, les brins de la double hélice d'ADN se déroulent. Ceci augmente l'absorbance de la lumière UV à 260 nm. Lorsque l'ADN est refroidi, les brins se rejoignent.

Dans son état natif, l'acide désoxyribonucléique (ADN) comprend deux brins de molécules de désoxyribonucléotides enroulées en hélice autour du même axe. Les brins sont liés par des liaisons hydrogène entre les bases dénommées purine et pyrimidine – l'adénine est liée à la thymine (A-T) et la guanine est liée à la cytosine (G-C). Ces bases sont les principaux responsables de l'absorbance UV de l'ADN et des autres types d'acides nucléiques, avec un maximum de pic à 260 nm. Comme dans tout système multicomposants, l'absorption observée pour n'importe quelle molécule d'acide nucléique devrait être égale à la somme des absorbances individuelles :

$$A_{\text{ADN}} = A_{\text{adénine}} + A_{\text{guanine}} + A_{\text{cytosine}} + A_{\text{thymine}}$$

Cependant, l'absorbance observée est toujours bien inférieure à la valeur prévue, car les liaisons hydrogène entre les bases modifient leur environnement électronique. Lorsqu'une molécule est chauffée, les liaisons hydrogènes cassent, la double hélice se déroule et l'absorbance augmente en se rapprochant de la valeur prévue correspondant à la somme de l'absorbance de toutes les bases (cf figure 39). Ce processus de dénaturation est appelé « fusion » ou « fusion thermique ». Dans une expérience de fusion thermique, la température d'une solution d'acide nucléique double brin est augmentée par palier, et l'absorbance à 260 nm est mesurée à chaque température puis tracée pour obtenir une courbe de fusion (comme illustré à la figure 40). Le point intermédiaire de la gamme de températures dans laquelle se produit la fusion correspond à la valeur T_m . La valeur T_m d'un échantillon d'acide nucléique particulier dépend principalement du pourcentage de paires G-C dans l'échantillon, chacune de ces paires contenant trois liaisons hydrogène (par comparaison, chaque paire A-T contient deux liaisons hydrogène). Plus le pourcentage de paires G-C dans l'échantillon augmente, plus la valeur T_m observée augmente.

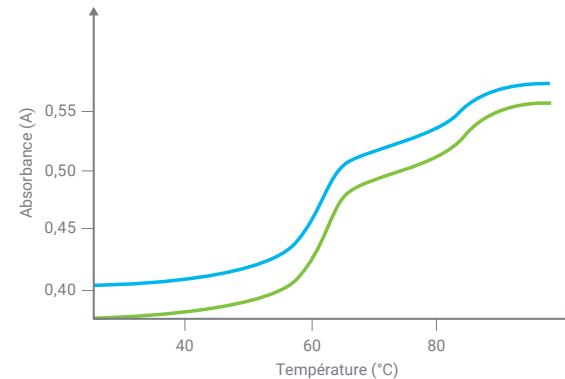


Figure 40. La mesure de l'absorbance à 260 nm, lorsque la température augmente, donne ce graphique caractéristique d'une « fusion » de l'ADN. La variation d'absorbance indique les multiples transitions qui se produisent lorsque l'hélice d'ADN se déroule.

Pour effectuer des analyses de la fusion d'une protéine ou d'un ADN, le spectrophotomètre UV-Vis doit être équipé d'un moyen permettant de faire varier la température de l'échantillon de manière exacte et reproductible. De récentes avancées dans les instruments de spectrophotométrie permettent de réduire de façon importante la durée des mesures de fusion thermique, et d'atteindre une plus grande précision en température qu'auparavant. Les systèmes d'analyse de fusion thermique dans l'UV-Vis sont disponibles avec des sondes de température intégrées à la cuve, ce qui peut servir à réguler précisément la température des solutions durant l'expérience. Une agitation est également prévue à l'intérieur de la cuve pour garantir le chauffage homogène des échantillons. En cas de nombreux échantillons à analyser, un support multicellules est intégré à l'instrument ou fourni avec ce dernier.

La plupart des accessoires de régulation de la température à effet Peltier nécessitent un bain-marie avec un circuit de refroidissement à eau pour refroidir les éléments du système à effet Peltier. Là encore, de récentes innovations permettent désormais d'utiliser des systèmes à effet Peltier refroidis à l'air dans le bloc de la cellule. La gamme de températures requise va généralement de 0 à 110 °C et, en plus de la surveillance de la température

Analyse de la fusion thermique des acides nucléiques

La régulation de la température de l'échantillon est un critère essentiel du système d'analyse de fusion thermique UV-Vis. Un chauffage rapide et reproductible peut être assisté par l'emploi d'une sonde de température placée dans la cuve.

[En savoir plus.](#)



et de l'agitation intégrées, permet de réaliser des montées en température de l'échantillon aussi vite que possible durant l'analyse.

4.8 Analyse multicomposants

Les analyses multicomposants à l'aide de spectres UV-Vis existent depuis quasiment aussi longtemps que les analyses monocomposant. Toutefois, elles n'étaient pas appliquées à grande échelle, car les techniques employées dans l'analyse multicomposants donnaient souvent des résultats incorrects. Un spectrophotomètre UV-Vis moderne et bien conçu permet d'obtenir des données plus exactes. Les techniques modernes d'ajustement de courbe donnent aussi des résultats plus exacts et, et c'est peut-être le plus important, indiquent quand les résultats sont incorrects.

Principe de l'additivité

Selon la loi de Beer, l'absorbance est proportionnelle au nombre de molécules qui absorbent un rayonnement à une longueur d'onde spécifiée. Ce principe reste vrai en présence de plusieurs espèces absorbantes. Toutes les méthodes quantitatives multicomposants reposent sur le principe selon lequel l'absorbance d'un mélange, à une longueur d'onde donnée, est égale à la somme des absorbances de chaque composant du mélange à cette longueur d'onde.

Une approche simple de l'analyse multicomposants repose sur des mesures à plusieurs longueurs d'onde, dont le nombre est égal au nombre de

composants dans le mélange. Les longueurs d'onde choisies correspondent généralement aux maximums d'absorbance de chacun des composants. Pour l'étalonnage, l'absorbance d'étalons de concentrations connues en composants purs est mesurée afin de déterminer le coefficient d'extinction pour chaque composant à chaque longueur d'onde sélectionnée. L'absorbance du mélange à chaque longueur d'onde est égale à la somme de l'absorbance de chaque composant à chaque longueur d'onde, qui dépend du coefficient d'extinction et de la concentration de chaque composant. Ainsi, pour deux composants x et y, les équations sont :

$$A'_{(x+y)} = A'_x + A'_y = e'_x b c_x + e'_y b c_y$$

et

$$A''_{(x+y)} = A''_x + A''_y = e''_x b c_x + e''_y b c_y$$

où :

- A' est l'absorbance à la longueur d'onde ' ,
- A'' est l'absorbance à la longueur d'onde " ,
- e' est l'absorptivité molaire à la longueur d'onde ' ,
- e'' est l'absorptivité molaire à la longueur d'onde " ,
- c est la concentration,
- b est le trajet optique.

Il est facile de résoudre ces équations pour déterminer la concentration de chaque composant. Si les mesures étaient toujours parfaites, il serait possible d'obtenir des résultats exacts, même pour les mélanges complexes de composants présentant des spectres très similaires. En pratique, cependant, il y a toujours des erreurs de mesure. Ces erreurs peuvent affecter de manière significative l'exactitude des résultats en cas de chevauchement spectral important. La figure 41 montre une simulation de mélange de deux composants sans chevauchement des spectres aux maximums d'absorbance.

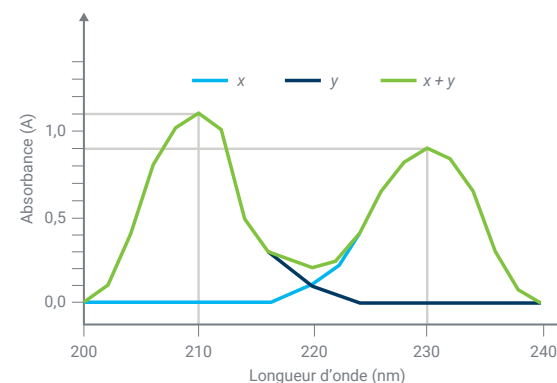


Figure 41. Mélange de deux composants avec léger chevauchement spectral.

Par comparaison, la figure 42 montre une simulation de mélange de deux composants avec chevauchement important des spectres aux maximums d'absorbance.

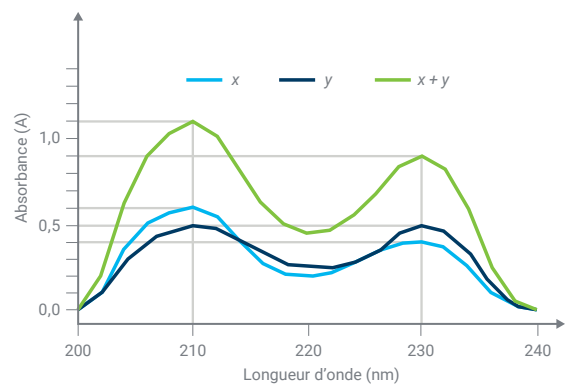


Figure 42. Mélange de deux composants avec chevauchement spectral important.

Avec léger chevauchement spectral			Avec chevauchement spectral substantiel		
$A'(x+y) = 1,1 + 0,0 = 1,1$			$A'(x+y) = 0,6 + 0,5 = 1,1$		
$A''(x+y) = 0,0 + 0,9 = 0,9$			$A''(x+y) = 0,4 + 0,5 = 0,9$		

Pour un mélange de x et y où $c_x = c_y = 1$, l'absorbance mesurée devrait être comme suit :

Si une erreur de 10 % se produit lors de la mesure de $A'_{(x+y)}$ et $A''_{(x+y)}$, c'est-à-dire si $A'_{(x+y)} = 0,99$ (- 10 %) et $A''_{(x+y)} = 0,99$ (+ 10 %), le calcul quantitatif donne les résultats figurant dans le tableau 6 :

			Léger chevauchement spectral	Chevauchement spectral substantiel	
Composant	Concentration nominale	Concentration calculée	% d'erreur	Concentration calculée	% d'erreur
x	1	0,9	-10 %	0,0	-100 %
y	1	1,1	+10 %	1,98	+98 %

Méthode des moindres carrés

L'effet du bruit aléatoire peut être réduit par l'utilisation d'informations spectrales supplémentaires, autrement dit, il est possible d'utiliser pour la quantification une série de points de données au lieu de deux points de données seulement. Dans ce système dit « surdéterminé », un ajustement par les moindres carrés des spectres standard sur le spectre de l'échantillon mesuré permet d'obtenir des résultats quantitatifs (1,2). La figure 43 représente un spectre du mélange à deux composants de la figure 42 avec une erreur aléatoire de 10 % à chaque point de mesure.

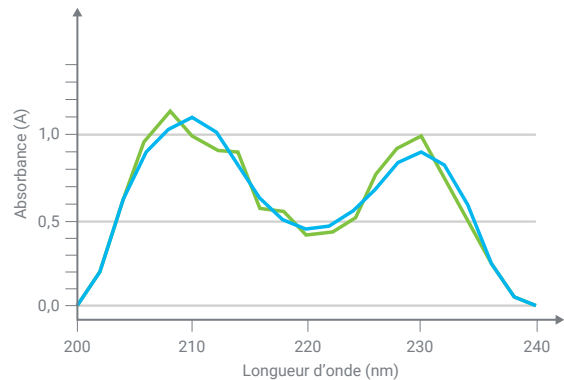


Figure 43. Spectre d'un mélange avec 10 % d'erreur aléatoire à chaque longueur d'onde.

Avec 21 points de données (à intervalles de 2 nm, de 200 à 240 nm), les résultats quantitatifs de la méthode des moindres carrés ont une erreur < 1 %, comparativement à une erreur d'environ 100 % pour les mesures habituelles à deux longueurs d'onde, comme indiqué dans le tableau 7.

Tableau 7. Comparaison des résultats d'une analyse multicomposants obtenus avec les méthodes des équations simultanées simples et des moindres carrés.

			En utilisant 210 nm et 230 nm uniquement	En utilisant 200 – 240 nm	
Composant	Concentration nominale	Concentration calculée	% d'erreur	Concentration calculée	% d'erreur
x	1	0,0	-100 %	1,003	+0,3 %
y	1	1,98	+98 %	0,995	-0,5 %

Cette méthode permet d'analyser des mélanges plus complexes, et des mélanges simples de composants présentant des spectres similaires. Le résidu du calcul des moindres carrés est un bon indicateur de la qualité de l'ajustement entre les spectres standard et les spectres de l'échantillon, et est donc un bon indicateur de l'exactitude probable des résultats.

Un exemple d'analyse multicomposants est la quantification de cinq hémoglobines dans du sang avec une préparation d'échantillon minimale (3). La figure 44 présente les spectres d'absorption de dérivés de l'hémoglobine. Cette analyse a été réalisée précédemment à l'aide de diverses techniques analytiques, y compris la spectroscopie et les titrages.

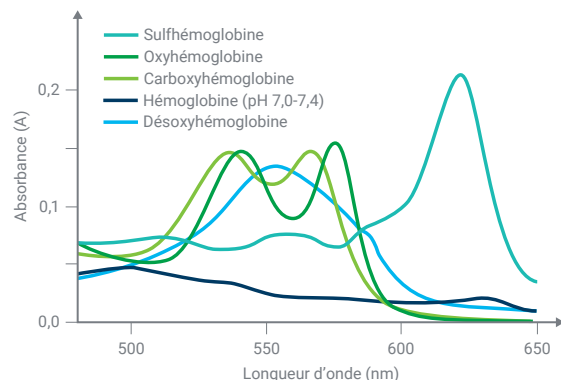


Figure 44. Spectres d'absorption de dérivés de l'hémoglobine.

Autres méthodes

Parmi les autres méthodes statistiques de l'analyse multicomposants, citons l'analyse partielle par les moindres carrés (PLS), la régression par analyse sur composantes principales (PCR) et la régression multiple des moindres carrés (MLS). En théorie, ces méthodes présentent certains avantages par rapport à celles mentionnées précédemment. Toutefois, le processus d'étalonnage peut s'avérer beaucoup plus complexe.

Conditions relatives à l'échantillon

Les méthodes des équations simultanées simples et des moindres carrés ne donnent des résultats exacts que si l'étalonnage est effectué avec des étalons ou des mélanges d'étalons purs pour chaque composant présent dans l'échantillon qui contribue au spectre UV-visible. L'échantillon inconnu ne doit pas avoir d'autre capacité d'absorption.

Exigences instrumentales

La quantification monocomposant est normalement réalisée en mesurant, avec le même instrument, un étalon ou une série d'étalons puis un échantillon inconnu. Ce processus d'étalonnage devrait supprimer le biais instrumental, rendant la précision absolue de la longueur d'onde et la précision photométrique absolue relativement sans importance. D'autre part, la reproductibilité photométrique est essentielle pour obtenir des résultats précis. Si les mesures sont uniquement réalisées au maximum d'absorbance, la reproductibilité de la longueur d'onde a également peu d'importance car la vitesse de variation de l'absorbance avec la longueur d'onde est faible. Toutefois, si l'on utilise une longueur d'onde située en bordure de bande, la reproductibilité de la longueur d'onde devient particulièrement importante. Enfin, la plage linéaire instrumentale est critique, car le processus d'étalonnage repose sur une relation linéaire. Les analyses multicomposants exactes requièrent d'excellentes performances en termes de rapport signal sur bruit, tout particulièrement en cas d'utilisation de la méthode des équations simultanées simples. Dans la méthode des moindres carrés, les données provenant des bordures des bandes d'absorbance sont incorporées au calcul, rendant également essentielle l'obtention d'une excellente reproductibilité de la longueur d'onde. En outre, comme davantage de données sont nécessaires, le balayage doit être rapide pour obtenir une bonne productivité.

4.9 Exigences relatives à la configuration logicielle

Un logiciel multicomposants spécialisé est disponible pour faciliter la création de modèles de données afin d'analyser les données collectées. Ces logiciels peuvent être soit intégrés au logiciel de commande et de reporting de l'instrument, soit fournis sous forme de packages individuels. La plupart des systèmes UV-Vis sur le marché peuvent exporter les données dans un format standard qui peut être importé dans un logiciel multicomposants afin de traiter les données.

Références :

1. Kisner, H.; Brown, W.; Kavarnos, G. "Multiple analytical frequencies and standards for the least-squares analysis of serum lipids. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1703.
2. Maris M.; Brown, C.; Lavery, D. Nonlinear multicomponent analysis by infrared spectrophotometry. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1694.
3. Zwart, A.; van Kampen, E.; Zijlstra, W. Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed-optics instrument. **Clin. Chem.**, **1984**, *30*, 373.



5. Glossaire

absorbance : 1. caractéristique d'une substance consistant à absorber la lumière ; abrégée A ou Abs.

AQ/CQ : abréviation. contrôle-qualité ou assurance qualité.

arc (lampe) : crée de la lumière par la formation d'un arc électrique ou voltaïque à travers un gaz inerte.

blanc : solvant ou substrat de l'échantillon, sans l'espèce absorbante. Pour la mesure d'échantillons liquides, il s'agit du solvant (souvent de l'eau) dans une cuve. L'absorbance du blanc peut ensuite être soustraite de celle de l'échantillon afin de déterminer l'absorbance due uniquement à l'échantillon.

BPF : abréviation. Bonnes pratiques de fabrication. Couramment utilisées dans l'industrie pharmaceutique et dans d'autres secteurs de production réglementés.

bruit : en termes de spectrophotométrie, le bruit fait référence au signal électrique de fond produit par l'instrument lui-même. S'il est trop important, il peut éclipser le signal de mesure et rendre la distinction entre les deux signaux difficile. Une façon simple d'appréhender ce concept consiste à regarder les étoiles dans une ville, versus dans un endroit isolé. La lumière de fond (« bruit ») produite par les lumières de la ville gêne l'observation des étoiles. Par contre, elles sont plus visibles dans un endroit isolé, où la lumière de fond est négligeable.

caroténoïdes : chromophore lié à la photosynthèse dans certaines plantes, algues et bactéries.

chromophore : partie d'une molécule qui absorbe la lumière

CRM : abréviation. Matériau de référence certifié. Fait référence aux étalons qui ont été certifiés par rapport à un étalon primaire en vue d'une comparaison.

cuve : souvent appelée cellule, la cuve est le récipient qui contient les échantillons liquides. les cuves sont disponibles en différents volumes et trajets optiques. Le matériau constituant la cuve détermine sa transparence optique.

dispersion : effet de la lumière renvoyée par une surface selon des angles aléatoires.

dispersion : en conception optique, fait référence à la capacité d'un dispositif optique à séparer la lumière en ses longueurs d'onde constitutives. Par exemple, de la lumière blanche sur un prisme crée un effet arc-en-ciel par dispersion.

fluorescence : forme de luminescence et caractéristique de certaines molécules à absorber la lumière à une fréquence et à émettre une lumière de courte durée à une autre longueur d'onde.

holographique (optique) : une optique holographique est créée par gravure d'un schéma d'interférence sur une surface optique. Les optiques holographiques peuvent être utilisées à la place de lentilles, de miroirs et d'autres dispositifs optiques. Petites et légères, leur conception permet de les répliquer facilement avec précision.

ligne de base : mesure recueillie en utilisant les mêmes paramètres que pour la mesure de l'échantillon, mais sans que l'échantillon soit en place. Un blanc est généralement utilisé pour la mesure de la ligne de base, car cela permet de soustraire les contributions de l'instrument, du solvant ou de la cuve de la mesure finale de l'échantillon.

oxydes de terres rares : les oxydes d'holmium, de didymium et de samarium sont référencés par des organismes de normalisation et la pharmacopée pour être utilisés dans des mesures de validité de longueur d'onde.

Peltier : un appareil à effet Peltier est un dispositif de chauffage/refroidissement actionné par un couplage thermoélectrique. Le dispositif transfère de la chaleur d'un côté du dispositif à l'autre. Il peut assurer une régulation exacte de la température d'un échantillon.

pharmacopée : document réglementaire énumérant les détails pharmaceutiques ainsi que les procédures d'analyse requises ou recommandées pour l'industrie pharmaceutique.

phosphorescence : forme de luminescence liée à la fluorescence. Caractéristique de certaines molécules consistant à absorber la lumière à une fréquence et à émettre une lumière avec retardement à une autre longueur d'onde.

photochimiques (réactions) : réaction chimique provoquée par l'absorption de lumière.

photosensibilité : sensibilité d'une substance consistant à réagir lorsqu'elle est exposée à de la lumière.

réflexion : décrit le trajet emprunté par la lumière sur un échantillon qui est déviée selon l'angle d'incidence.

qualitatif (mesure) : mesure fournissant des informations non numériques sur l'échantillon, comme l'identification d'une molécule en solution

quantitative (mesure) : mesure résultant en une valeur numérique, par exemple une concentration.

SOP : abréviation. procédure opérationnelle normalisée. document écrit afin qu'une mesure puisse être obtenue en toute sécurité et de manière répétable.

spectre :. gamme de longueurs d'onde. Le spectre électromagnétique. Fait également référence à une donnée de sortie présentée sous forme graphique donnant habituellement une intensité (ou l'absorbance, mesurée par un spectrophotomètre) en fonction de la longueur d'onde.

SST : abréviation. Tests de conformité des systèmes. Test dont le but est de déterminer si le système répond à son objectif.

transmittance : pourcentage de lumière incidente qui est transmise à travers un échantillon.

zéro : équivalent de la fonction « tare » d'une balance ; règle la lecture de l'instrument sur 0 Abs.

Pour en savoir plus :

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Pour acheter en ligne :

www.agilent.com/chem/store

Pour obtenir les réponses à vos questions techniques et accéder
à des ressources dans la communauté Agilent :

community.agilent.com

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

États-Unis et Canada

1- 800- 227- 9770

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com

DE-008895

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
Publié aux États-Unis, 19 août 2025
5980-1397FR