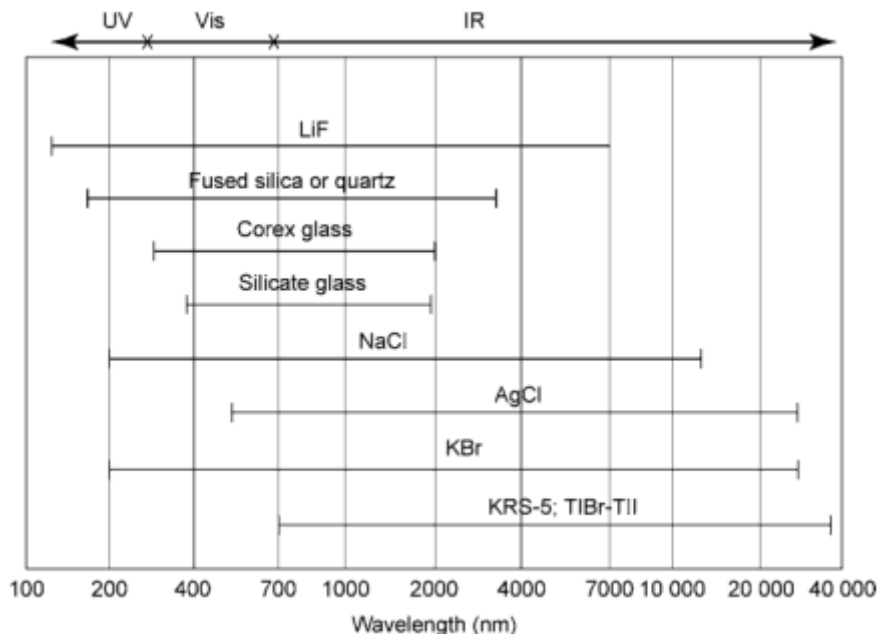


Le mode le plus fréquent de présentation des échantillons est une solution diluée, bien que les gaz et les surfaces solides puissent également être examinés. Des combinaisons de spectrophotométrie UV ou visible ou de spectrofluorimétrie avec HPLC sont particulièrement avantageuses pour la détection sensible et sélective de chromophores et / ou de fluorophores.

Spectrophotométrie ultraviolette et visible

Cellules

Dans la région visible, une paire appariée de cellules de verre peut être utilisée, mais elles sont inappropriées pour la région UV en raison des mauvaises propriétés de transmission du verre dans cette plage. La silice fondue ou les cellules de quartz ont une transmittance élevée de 190 à 1000 nm et sont donc les cellules de choix. La longueur de trajet utilisée est habituellement de 1,00 cm; des cellules à longueur de trajet plus longue sont utilisées pour des médicaments peu absorbants et / ou lorsque la concentration est faible. Des cellules à écoulement conçues pour minimiser l'écoulement turbulent à travers la cellule sont utilisées pour surveiller les changements d'absorbance pendant une réaction, pour des études de dissolution de comprimés, ou pour HPLC ; il faut veiller à ce que les parois des cellules ne bloquent pas le faisceau de rayonnement, sinon des erreurs variables sont introduites. Les cellules équipées d'un thermostat sont utilisées pour des études sur des processus enzymatiques et autres dans lesquels la température est un paramètre clé.



Gammes de transmittance pour divers matériaux optiques. (De Skoog et al., 1996, page 529.)

La manipulation méticuleuse et le soin des cellules est une condition nécessaire pour une mesure précise et

précise. Les cellules doivent être soigneusement nettoyées, remplies d'un solvant approprié et assorties pour une absorbance inférieure à 1%. Chaque paire de cellules doit être marquée sur la base dans un crayon doux pour identifier l'ensemble et son orientation normale. La tolérance sur la longueur du trajet des cellules utilisées est de $\pm 0,005$ cm (Conseil de l'Europe 2002).

Lorsqu'elles sont remplies du même solvant, les cellules destinées à contenir la solution à examiner et le liquide de compensation doivent avoir la même transmittance. Si ce n'est pas le cas, une correction appropriée doit être appliquée. Il est commode de désigner la cellule plus fortement absorbante comme cellule «échantillon», l'autre cellule étant codée comme «référence». De cette manière, la constante de cellule (c'est-à-dire la différence d'absorbance à la longueur d'onde de mesure lorsqu'elle est remplie de solvant) sera positive et pourra ainsi être soustraite de chaque lecture d'absorbance. De plus, la possibilité d'une «erreur d'oscillation» introduite en changeant aléatoirement l'orientation de la cellule au cours d'une série de mesures est éliminée. La «constante de cellule» doit être vérifiée régulièrement à la longueur d'onde de mesure lorsqu'elle est remplie avec un solvant approprié, ou en balayant la ligne de base sur la plage de longueurs d'onde.

Les cellules doivent être nettoyées scrupuleusement après utilisation. S'ils ont contenu des solutions aqueuses, ils peuvent être nettoyés facilement par rinçage répété avec de l'eau distillée ou par trempage pendant une nuit dans une solution très diluée de détergent; Des détergents spéciaux doivent être utilisés pour nettoyer les cellules contaminées par du matériel biologique. Périodiquement, il est recommandé de tremper soigneusement les cellules et les bouchons dans une solution fraîche d'acide chromique, puis de rincer abondamment avec de l'eau distillée pour rétablir leur performance. Les cellules qui ont été utilisées avec des solvants organiques nécessitent un soin particulier, une séquence de solvants se terminant par de l'éther spectroscopique étant pratique pour obtenir des cellules sèches et propres. Dans tous les cas, les instructions du fabricant doivent être suivies, lorsqu'elles sont disponibles. Les objets en verre ou en métal tranchants ne doivent pas être introduits dans une cellule, de peur que la surface interne ne soit rayée. Les surfaces optiques extérieures doivent être polies avant utilisation avec un chiffon doux ou un tissu photographique. Les cellules doivent être conservées par paires, à sec et dans un récipient de protection.

Solvants

Les solvants utilisés en spectrophotométrie doivent répondre à certaines exigences pour garantir des résultats efficaces et précis. Le solvant choisi doit dissoudre l'échantillon, tout en étant compatible avec les matériaux de la cuvette. Le solvant doit également être relativement transparent dans la région spectrale d'intérêt. Pour éviter une mauvaise résolution et des difficultés d'interprétation du spectre, un solvant ne doit pas être utilisé pour des mesures proches ou inférieures à son seuil UV (longueur d'onde à laquelle l'absorbance pour le solvant seul approche une unité d'absorbance).

Une fois qu'un solvant est sélectionné sur la base des caractéristiques physiques et spectrales, sa pureté doit être prise en compte. La courbe d'absorbance d'un solvant, telle qu'elle est fournie, doit être lisse (c'est-à-dire ne pas

avoir de pics d'impuretés externes dans la région spectrale d'intérêt). Des solvants spécialement purifiés et certifiés pour une utilisation spectrophotométrique sont disponibles chez les fournisseurs.

Bonnes pratiques de laboratoire

Selon les BPL, les produits chimiques, les réactifs et les solutions doivent être étiquetés pour indiquer l'identité (avec concentration le cas échéant), la date de péremption et les instructions d'entreposage spécifiques. Des informations concernant la source, la date de préparation et la stabilité devraient être disponibles. La date d'expiration peut être prolongée sur la base d'une évaluation ou d'une analyse documentée.

Les dossiers, y compris la caractérisation des articles d'essai et des articles de référence, la date de réception, la date d'expiration, les quantités reçues et utilisées dans les études doivent être conservés. Les procédures de manipulation, d'échantillonnage et de stockage doivent être identifiées afin que l'homogénéité et la stabilité soient assurées dans la mesure du possible et que la contamination et la confusion soient exclues. Les conteneurs de stockage doivent porter des informations sur l'identité, la date de péremption et les instructions de stockage spécifiques. La stabilité des éléments d'essai et de référence dans les conditions de stockage et d'essai doit être connue pour toutes les études.

Fluorimétrie et spectrofluorimétrie

Cellules

Les cellules d'échantillon utilisées dans les mesures de fluorescence peuvent être des tubes ronds ou des cellules rectangulaires similaires à celles utilisées en spectrophotométrie d'absorption, sauf qu'elles sont polies sur les quatre côtés verticaux. Une taille d'échantillon d'essai pratique est de 2 à 3 mL, mais certains instruments peuvent être équipés de petites cellules pouvant contenir de 100 à 300 µL ou d'un porte-capillaire nécessitant une quantité encore plus petite d'échantillon.

La régulation de la température est souvent importante en spectrophotométrie de fluorescence. Pour certaines substances, l'efficacité de la fluorescence peut être réduite de 1 à 2% par degré d'élévation de température. Dans de tels cas, si une précision maximale est souhaitée, des cellules d'échantillon à température contrôlée sont utiles. Pour l'analyse de routine, il peut être suffisant de faire des mesures assez rapidement pour que l'échantillon ne s'échauffe pas de manière significative à partir de l'exposition à la source de lumière intense (USP 2002).

Solvants

Le changement de solvant peut affecter de façon marquée l'intensité et la distribution spectrale de la fluorescence. Il est donc déconseillé de modifier le solvant spécifié dans les méthodes établies sans une étude

préliminaire minutieuse. De nombreux composés sont fluorescents dans les solvants organiques, mais pratiquement non fluorescents dans l'eau; ainsi, un certain nombre de solvants doivent être essayés avant de décider si un composé est fluorescent ou non. Dans de nombreux solvants organiques, l'intensité de la fluorescence est augmentée par l'élimination de l'oxygène dissous, ce qui a un fort effet de trempe. L'oxygène peut être éliminé en faisant barboter un gaz inerte, tel que de l'azote ou de l'hélium, à travers l'échantillon d'essai.