

Spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible

L'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1100 nm, a été abondamment étudiée d'un point de vue fondamental. Cette partie du spectre est désignée par l'UV/Visible, parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'oeil humain.

Les calculs de concentration qui découlent de la loi de Beer et Lambert ont donné naissance à la méthode connue sous le terme général de **colorimétrie**. Cette méthode s'applique non seulement aux composés qui possèdent un spectre d'absorption dans le visible mais aussi à tous ceux qui conduisent au moyen d'un réactif spécifique à un dérivé permettant une mesure d'absorbance.

1. Introduction :

Le spectre électromagnétique représente la répartition des ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde, de leur fréquence ou bien encore de leur énergie.

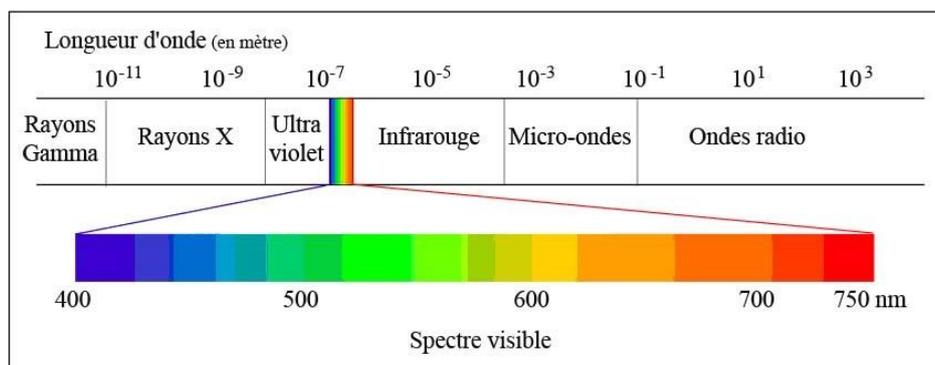


Figure 1. Spectre électromagnétique

La spectrométrie UV-Visible repose sur l'interaction de la matière et du rayonnement électromagnétique dans le domaine 180-800 nm.

2. Domaine énergétique :

$100 < \lambda \text{ (nm)} < 200 \rightarrow$ lointain UV.

$200 < \lambda \text{ (nm)} < 400 \rightarrow$ UV (proche).

$400 < \lambda \text{ (nm)} < 800 \rightarrow$ visible.

Les appareils courants fonctionnent à partir de 200 nm. Donc le lointain UV n'est pas accessible aux mesures dans ces conditions.

3. Propriétés des UV :

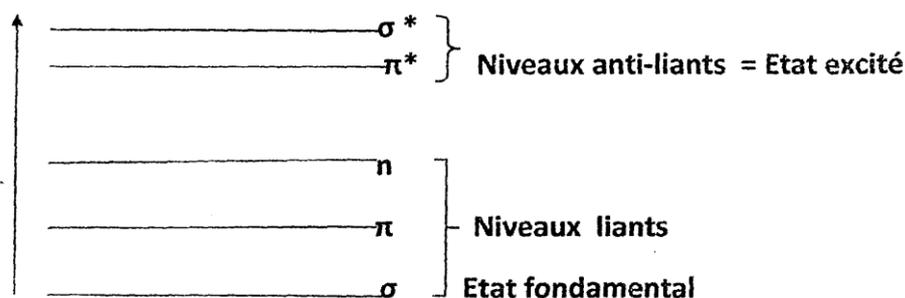
210-280 nm → Propriétés bactéricides (désinfection), UV-C

280-315 nm → favorise la production de la vitamine D, qui est un antirachitique (rachitisme), en favorisant l'assimilation du calcium, UV-B.

315-400 nm → favorise la pigmentation de la peau, UV-A et on parle de puvathérapie.

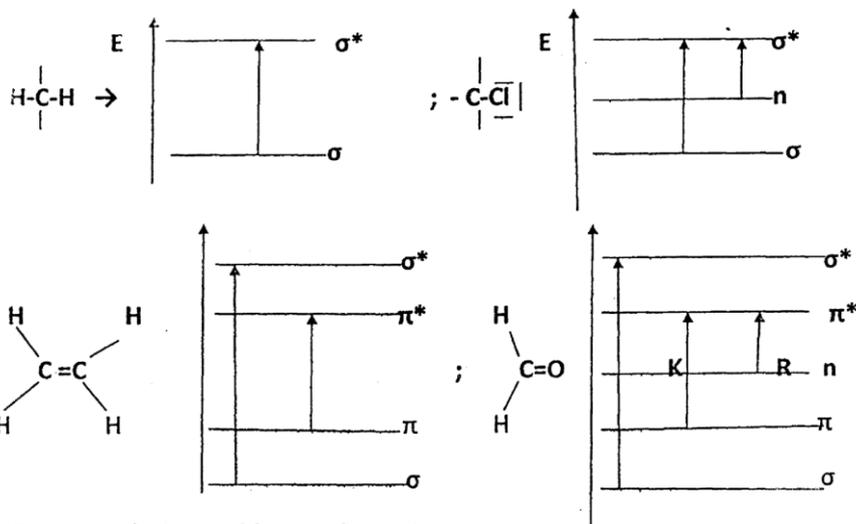
4. Théorie UV-Visible

Rappelons le diagramme simplifié d'une molécule qui représente les niveaux Energétiques électroniques d'une molécule.



Exemples : Représenter les transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$

Pour les molécules suivantes : CH_4 , CH_3Cl , C_2H_4 , $\text{H}-\text{C}-\text{H}$



NB : $n \rightarrow \sigma^*$ observable pour $\lambda > 200\text{nm}$.

Figure 2. Diagramme simplifié d'une molécule avec les niveaux Energétiques électroniques

5. Les différentes types de transitions électroniques

- **électrons concernés** : électrons les plus éloignés du noyau
- **électrons de valence (couche externe)**: soit électrons impliqués dans des liaisons (simples et multiples) soit électrons non liés (paires libres)

Les transitions électroniques dans la molécule (Figure 2) sont à l'origine de l'absorption du faisceau incident lors de l'analyse dans le domaine UV-visible effectué à l'aide du spectrophotomètre

Les transitions électroniques correspondent aux passages des électrons des orbitales moléculaires liants ou non liants remplies, vers des orbitales moléculaires anti liants non remplies.

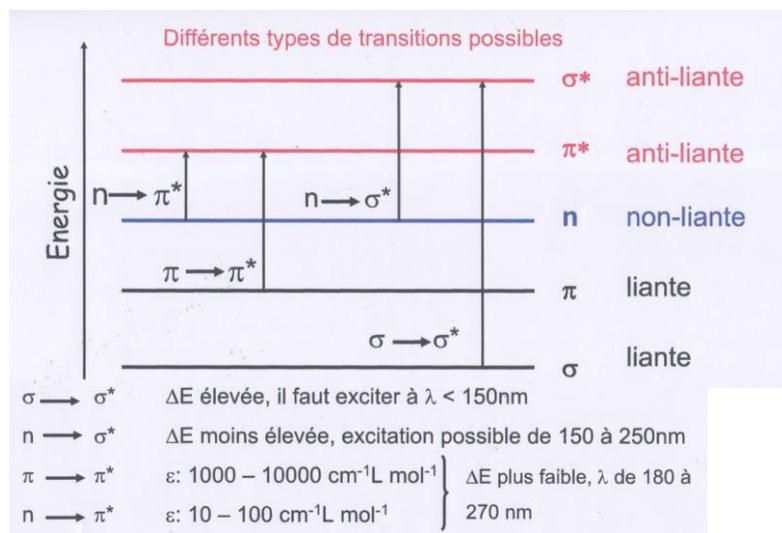


Figure 3. Les différents types de transition en spectroscopie UV-VIS

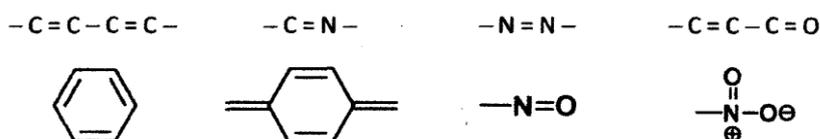
L'absorption d'un photon dans le domaine UV-visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés chromophores :

La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu.

6. Les groupements chromophores

Les groupes chromophores (du grec khrôma : couleur et phero : je porte) sont responsables de l'aspect coloré des colorants organiques : ce sont des groupements d'atomes comportant une ou plusieurs doubles liaisons conjuguées qui permettent l'absorption de la lumière dans le domaine visible ou l'ultraviolet.

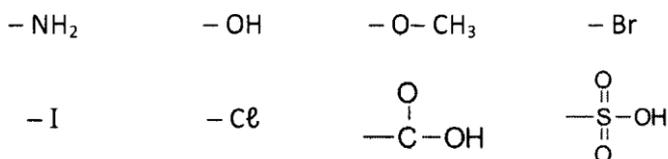
Exemple :



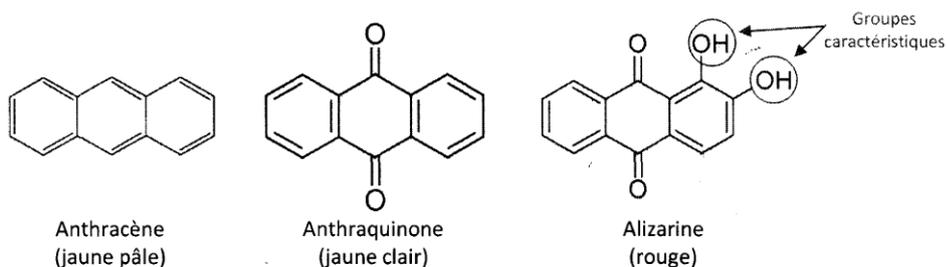
Chromo- phore	Example	Excitation	λ_{max} , nm	ϵ	Solvent
C=C	Ethene	$\pi \rightarrow \pi^*$	171	15.000	hexane
C≡C	1-Hexyne	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10.000	hexane
C=O	Ethanal	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	290 180	15 10.000	hexane hexane
N=O	Nitro- methane	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	275 200	17 5.000	ethanol ethanol
C-X X=Br X=I	Methyl bromide Methyl iodide	$n \rightarrow \sigma^*$ $n \rightarrow \sigma^*$	205 255	200 360	hexane hexane

7. Groupes auxochromes

Les groupes auxochromes (ou groupes caractéristiques) sont des groupements d'atomes pouvant changer la fréquence d'absorption d'un groupe chromophore



Exemple



8. Les principales transitions observables en spectrométrie UV-Visible

Transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$:

Elle correspond au passage d'un électron d'une orbitale moléculaire (OM) liante σ à un OM anti liante σ^* .

Domaine spectral : UV lointain

Transitions $n \rightarrow \sigma^*$:

Les composés constitués d'un ou plusieurs atomes (O, N, S, Cl) porteurs de doublets électroniques libres présentent ce type de transitions.

Les énergies mises en jeu sont généralement inférieures à celles des transitions $\sigma - \sigma^*$.

Elles correspondent à des longueurs d'onde comprises entre 150 et 250 nm.

Transitions $n \rightarrow \pi^*$

Elle correspond au passage d'un électron d'un doublet à un OM antiliante π^* .

Elle se produit dans le cas d'un doublet d'un hétéroatome dans un système insaturé. Exemple : le groupement carbonyle $>C=O$ (270-280 nm).

Transitions $\pi \rightarrow \pi^*$

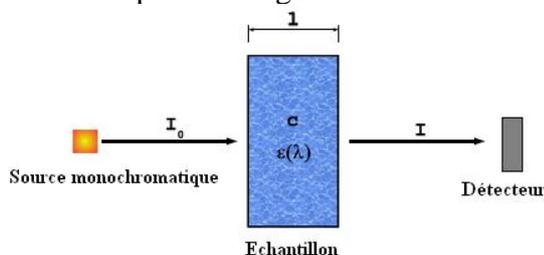
Les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée conduisent à une forte bande d'absorption vers 170 nm avec un coefficient d'absorption allant de 1000 à plus de 10 000 $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Transition $d \rightarrow d$

Elle concerne les métaux de transition ayant des électrons dans les (OM) d. Elles sont à l'origine de la couleur de nombreux sels inorganiques.

9. Grandeurs mesurées en spectroscopie

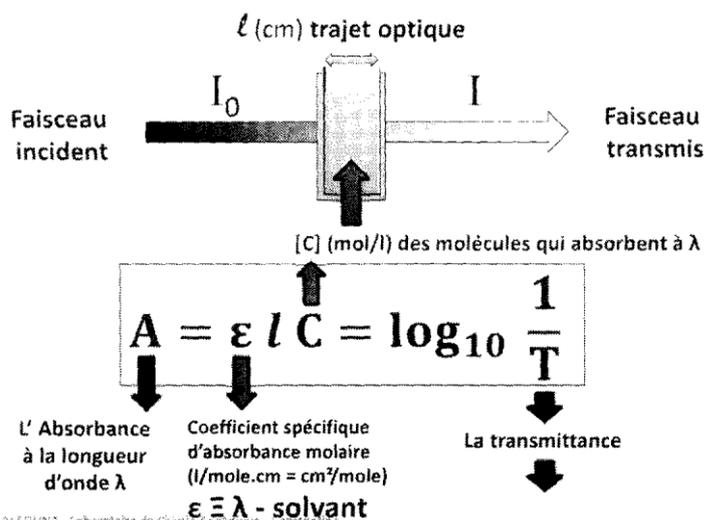
On mesure alors l'intensité I de la radiation transmise inférieure à l'intensité I_0 de la radiation incidente pour la longueur d'onde utilisée.



9.1. Loi de Lambert-Beer

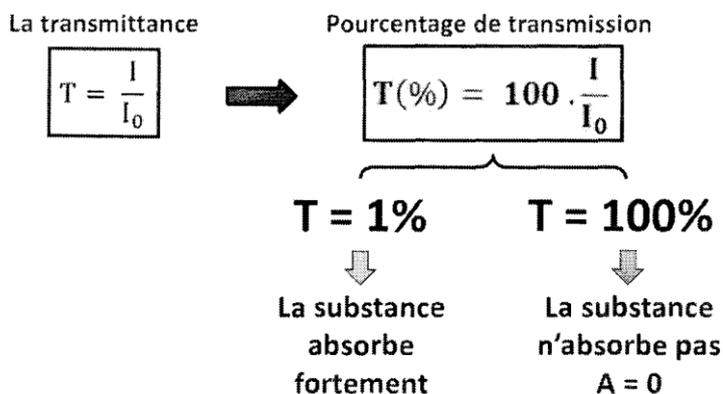
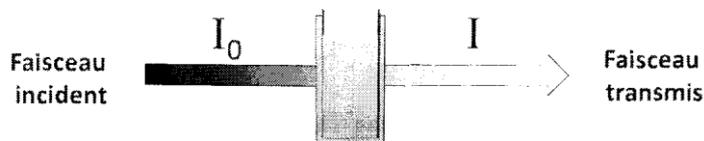
On peut alors déterminer : - l'absorbance A de la solution :

$$A = \log I_0/I \quad \text{et} \quad A = \log I_0/I = -\log T$$



La transmittance T de la solution :

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



Cette dernière grandeur est très utile en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert. Plus un composé est absorbant, plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est élevée.

9.1.1. Validité de la loi de Beer Lambert

1. Lumière utilisée doit être monochromatique (ϵ et λ constantes)
2. Pas de réaction soluté-solvant
3. Solution non fluorescente et non hétérogène (ex : colloïdale).
4. Concentrations faibles ($< 10^{-2}$ M).

9.1.2. Additivité des absorbances

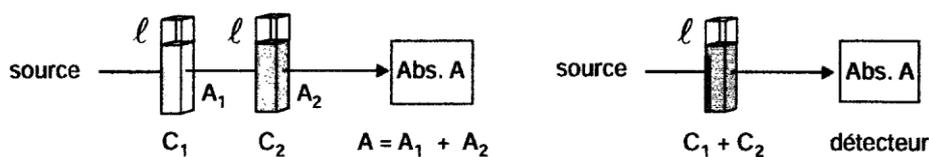
La loi de Lambert-Beer est additive (mais pas la transmittance) : si la solution contient différentes substances qui absorbent dans une longueur d'onde donnée, l'absorbance totale pour cette longueur d'onde est la somme des absorbances de chaque substance.

Pour un mélange comprenant n composés $C_1, C_2, C_3, \dots, C_n$

Les absorbances à la même longueur d'onde λ : $A_1, A_2, A_3, \dots, A_n$

$$A_t = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = \epsilon_1 l c_1 + \epsilon_2 l c_2 + \epsilon_3 l c_3 + \dots + \epsilon_n l c_n$$

Cas des mélanges et additivité des absorbances



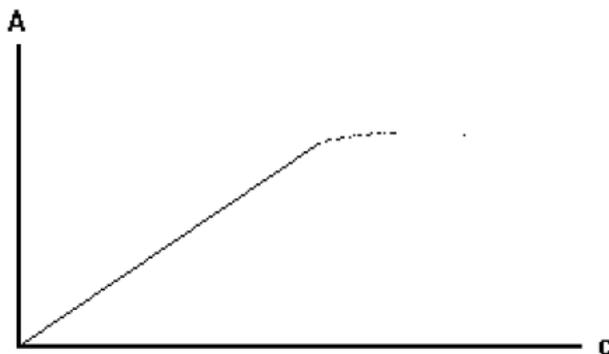
Additivité des absorbances

Pour toute longueur d'onde, l'absorbance d'un mélange est égale à la somme des absorbances de chaque composant du mélange (pris à la même concentration) pour cette longueur d'onde

$$A = A_1 + A_2 = \epsilon_1 l c_1 + \epsilon_2 l c_2 = l(\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2)$$

Remarques :

- La loi de Lambert-Beer a des limites. $A = f(C)$ n'est linéaire que dans un intervalle de concentrations réduit :



D'autres facteurs peuvent dégrader la loi de Lambert-Beer :

- Erreur de lecture du détecteur : le domaine de mesure est idéal pour $20\% < T < 60\%$
- Erreur due à la lumière diffuse (un peu de lumière arrive au détecteur sans traverser la solution)
- Erreur due à des particularités chimiques
- Aberrations optiques (diffusions, réflexions, diffractions in désirées)

9.2. Absorbance spécifiques $E^{1\%}$ (ou $A^{1\%}$)

On obtient l'absorbance spécifique : absorbance qu'aurait une solution de produit de concentration 1% (1g/100 ml) examinée sous une épaisseur de 1cm à une longueur d'onde donnée. Conditions de validité : la loi de Beer-Lambert est valable pour : une lumière monochromatique donnée (λ_{max}).

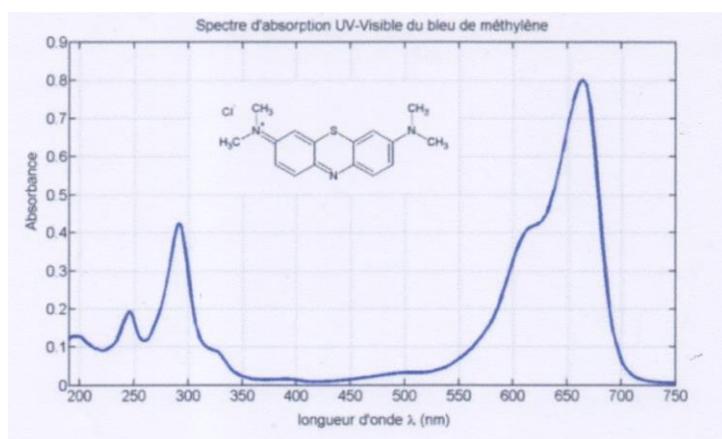
10. Interprétation d'un spectre UV-visible :

10.1. Le spectre d'absorption : $A = f(\lambda)$

- En réalisant la mesure de l'absorbance d'une solution à différentes longueurs d'onde, on peut tracer un spectre d'absorption : $A = f(\lambda)$
- On observe alors une ou plusieurs bandes d'absorption assez larges passant par un maximum d'absorption pour une longueur d'onde donnée λ_{\max} .

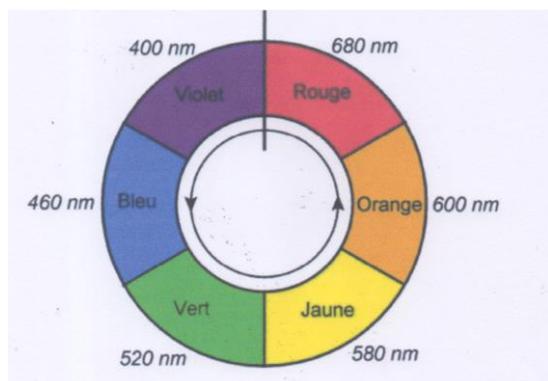
Par exemple, avec le bleu de méthylène, on obtient :

Un spectre UV-Visible fait apparaître l'absorbance $A = \log I_0/I$ en fonction de la longueur d'onde.



Une molécule est dite colorée parce qu'elle absorbe certaines radiations lumineuses dans le domaine du visible, et pas d'autres. Cela se manifeste par un maximum d'absorption sur le spectre.

Considérons la « roue des couleurs » :



Quand une molécule présente un maximum d'absorbance pour une longueur d'onde λ_{\max} , cela veut dire que la couleur correspondante est la plus absorbée. La couleur perçue est alors sa couleur complémentaire, autrement dit la couleur opposée sur la roue des couleurs.

Pour le bleu de méthylène, $\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$, donc la couleur rouge-orange est absorbée. Comme on pouvait s'y attendre, le bleu de méthylène présente ainsi une coloration bleue, couleur complémentaire de l'orange.

10.2. Différents types d'effet sur le spectre

- **Effet bathochrome** : le chromophore diminue la fréquence d'absorption (augmente le λ_{\max}).
- **Effet hypsochrome** : le chromophore augmente la fréquence d'absorption (diminue le λ_{\max}).
- **Effet hypochrome** : le chromophore diminue l'intensité d'absorption : (diminue ϵ).
- **Effet hyperchrome** : le chromophore augmente l'intensité d'absorption : (augmente ϵ).

Ces effets sont illustrés sur la figure suivante (Figure 4) :

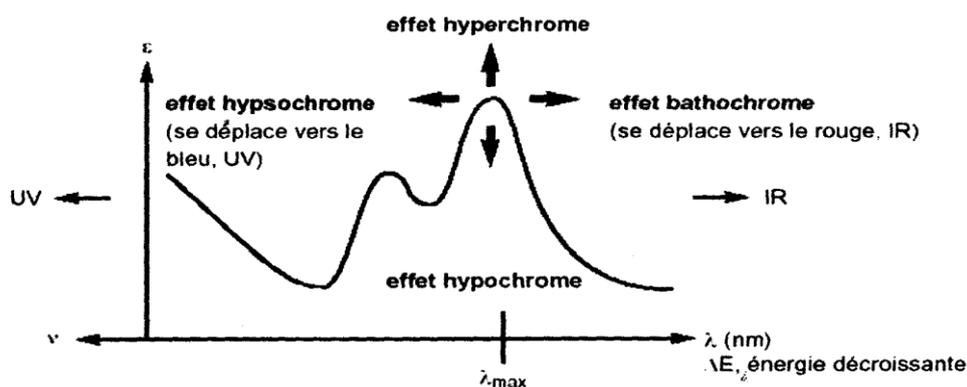
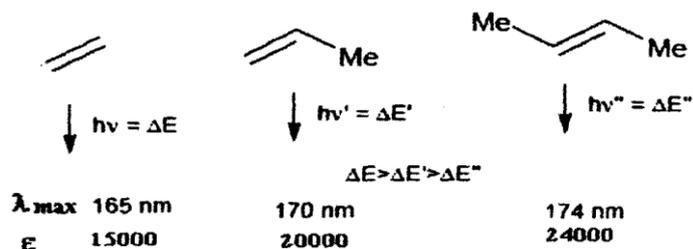


Figure 4. Différents effets sur le spectre

Effet de la substitution

La position de la bande d'absorption dépend de la présence ou non de substituants sur le groupement chromophore. Par exemple, plus le groupe éthylénique est substitué, plus la bande d'absorption due à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est déplacée vers le visible : effet bathochrome.



Les substituants à effet mésomère (auxochromes -OH, -OR, -X, -NH₂, ...) portés par un chromophore C=C ou C=O donnent des effets bathochrome et hyperchrome.

Effet de la conjugaison

La conjugaison est accompagnée par le rapprochement des niveaux d'énergie. Il en découle un effet bathochrome et un effet hyperchrome sur la bande d'absorption correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Le même effet est observé sur la transition $n \rightarrow \pi^*$.

Effet de solvant :

Dans l'eau, spectres très souvent sensibles au pH qui modifie l'ionisation de certaines fonctions chimiques.

La position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution dépendent du solvant. Ces changements traduisent les interactions physiques soluté-solvant qui modifient la différence d'énergie entre état fondamental et état excité.

Par augmentation de la polarité du solvant :

Transition $n \rightarrow \pi^*$: effet hypsochrome

Transition $\pi \rightarrow \pi^*$: effet bathochrome

Effet de pH :

Dans l'eau, les spectres sont très souvent sensibles au pH qui modifie l'ionisation de certaines fonctions chimiques



11. Règles empiriques pour calculer λ_{\max} , règles de Woodward, Fieser

Corrélation entre structure et position des maxima d'absorption (figure 5). Ces règles permettent de prévoir la position de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ des systèmes conjugués suivants :

- carbonylés α, β -insaturés
- diènes conjugués
- carbonyles aromatiques

Et cela par l'addition d'incrément caractéristique à des valeurs de bases.

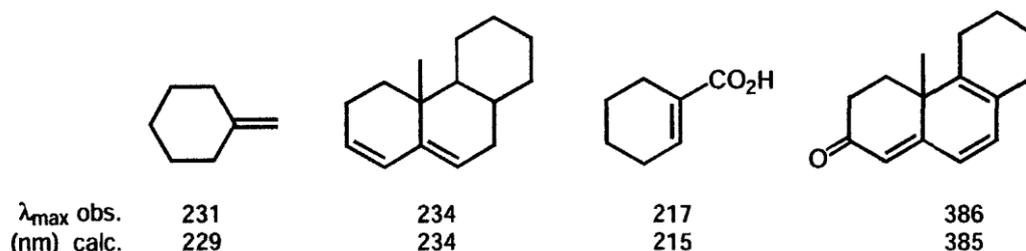


Figure 5. Correspondance entre les valeurs calculées et expérimentales pour quelques Composés organiques présentant des insaturations.

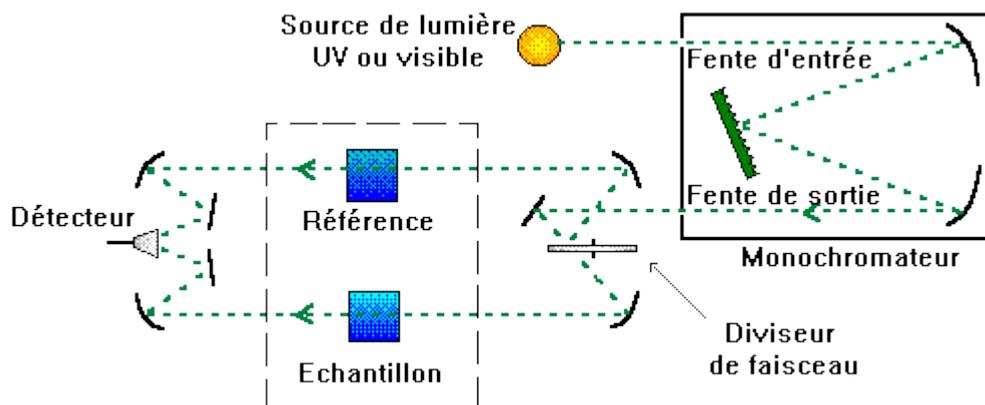


Figure 7. Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau

1. Les sources lumineuses

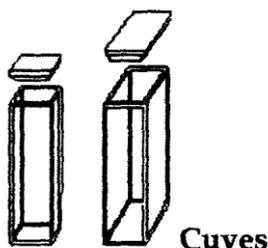
Elle est constituée par :

- Une lampe à décharge au deutérium utilisée dans le domaine de 190 à 400 nm.
- Une lampe à filament de tungstène pour la région allant de 350 à 800 nm.
- Une lampe à décharge au xénon.

2. Cuve

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. Elle doit être transparente aux radiations d'étude. Par exemple en UV, les cuves sont en quartz

La longueur de la cuve est = 1 à 100 mm (standard 1 cm)



Cuves

3. Le monochromateur

L'élément de base est un prisme, un réseau ou un filtre coloré. Il est composé principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie.

Le monochromateur est utilisé pour extraire du rayonnement émis par les sources une bande spectrale très étroite dont on peut faire varier la longueur d'onde.

4. Les détecteurs :

Le détecteur fournit une tension électrique proportionnelle à l'intensité du rayonnement, qui est ensuite convertie en absorbance ou transmittance via une calibration de l'appareil.

Parmi les détecteurs en trouve :

- Photodiode (semi-conducteur)
- Barrette de diodes
- Photomultiplicateur

5. Traitement des données

Les spectrophotomètres actuels sont en général pilotés par des ordinateurs équipés de logiciels plus ou moins sophistiqués.

12. Echantillonnage

Les composés peuvent être étudiés dans divers états physiques (gazeux, liquide, solide) Généralement, les spectres sont enregistrés à partir de solutions diluées.

12.1. Choix de Solvant

Pour l'étude en solution, le solvant doit être convenablement choisi : il doit dissoudre le produit et être transparent (n'absorbe pas) dans la région examinée.

L'éthanol à 95% est le solvant le plus utilisé ; il est suffisamment bon solvant pour beaucoup de composés organiques.

- pouvoir de dissolution
- transparent dans la zone d'intérêt
- spectrophotométrique grade : absence d'impuretés, agents stabilisants
- solvants volatils : boucher la cellule

Quelques solvants utilisés en spectroscopie U.V.

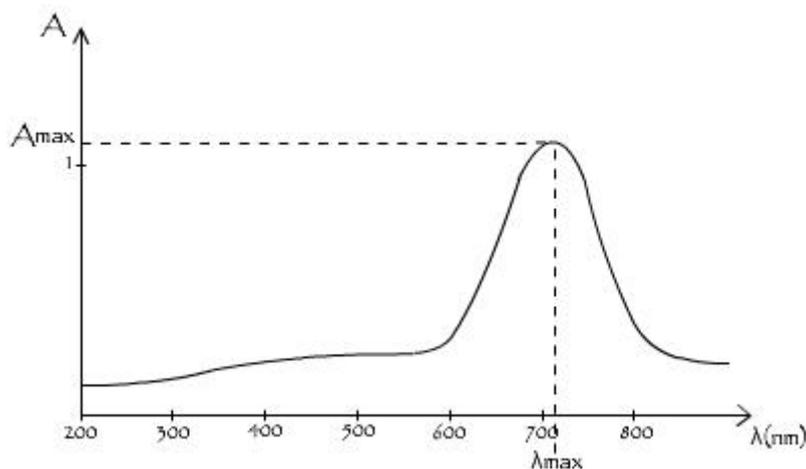
<u>Solvant</u>	<u>Longueur d'onde minimum (en nm)</u> <u>(une cellule d'un cm, en m)</u>
-Acétonitrile	190
-Eau	191
-Cyclohexane	195
-Hexane	201
-Méthanol	203
-Ethanol	204
-Ether	215
-CH ₂ Cl ₂	220
-CHCl ₃	237
-CCl ₄	257

13. Le spectre UV-Visible

Afin d'obtenir un spectre UV-visible la solution est soumise aux rayonnements dont la longueur est comprise dans l'intervalle 200 - 400 nm (domaine des ultraviolets) et dans l'intervalle 400 - 800 nm (domaine de la lumière visible).

Pour chaque longueur d'onde l'absorbance est mesurée et les données recueillies sont utilisées pour tracer les variations de l'absorbance (en ordonnées) en fonction de la longueur d'onde (en abscisse). Le graphique ainsi obtenu constitue un spectre UV-visible.

Un spectre UV-visible comporte toujours une longueur d'onde (λ_{\max}) pour laquelle l'absorbance est maximale (A_{\max})



λ_{\max} est une grandeur caractéristique propre à chaque espèce chimique.
 λ_{\max} permet donc d'identifier l'espèce chimique en solution.

14. Dosages

Le dosage c'est l'application de la loi de Beer-Lambert donc deux cas sont possibles :

1-La substance à doser possède un pic d'absorption caractéristique dans le visible (substance colorée) ou dans l'UV, on fait alors un dosage direct.

2- La substance à doser ne possède pas de pic d'absorption caractéristique ; il faut alors effectuer une réaction colorée ; on fait alors un dosage indirect.

Les conditions d'une bonne méthode de dosage sont les suivantes :

a-**Spécificité** : la réaction colorée doit être spécifique de la substance à doser (qui doit être seule à réagir avec les réactifs de coloration)

b- **Solubilité** : le produit coloré obtenu doit être soluble; la solution doit être limpide pour permettre une lecture en spectrophotométrie d'absorption.

c- **Stabilité** : la coloration doit être stable généralement il faut une certaine durée de développement de la coloration pour qu'elle soit stable.

d-**Sensibilité** : la réaction colorée doit être sensible, pour permettre de doser des solutions de faibles concentrations .

e- **Proportionnalité** : l'intensité de la coloration obtenue (son absorbance) doit être proportionnelle à la quantité de substance à doser présente ; cela nécessite de mettre les réactifs de coloration en excès (pour que la réaction colorée soit totale), et éventuellement de diluer la solution à doser (pour être dans les conditions de validité de la loi de Beer-Lambert).

Les types de dosage : direct ou indirect

1-Méthode directe

La substance à doser possède un pic d'absorption caractéristique → dosage direct
 Consiste à mesurer A et à calculer c.

Nécessite de connaître le ϵ de la substance à doser à la longueur d'onde choisi λ .

2-Méthodes indirectes : elles ne nécessitent pas de connaître ϵ .

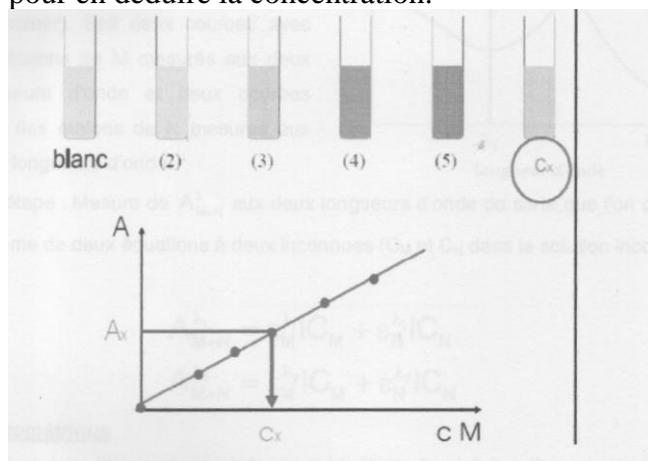
La substance à doser ne possède pas de pic d'absorption caractéristique \rightarrow dosage indirect (transformation).

2.a. Méthode par comparaison avec un étalon unique :

Elle consiste à mesurer dans les mêmes conditions l'absorbance A de la solution à doser et l'absorbance A d'une solution "étalon" de concentration connue c, puis à calculer la concentration de la solution à doser.

2.b-Méthode avec une gamme d'étalonnage :

Consiste à mesurer l'absorbance de différentes solutions contenant des quantités connues et croissantes de l'élément à doser. On trace ensuite la droite $A=f(C)$. On détermine, finalement, l'absorbance de la solution inconnue, puis on reporte cette valeur sur la droite d'étalonnage pour en déduire la concentration.



Il existe plusieurs procédés pour déterminer une concentration par dosage UV-vis.

3. Méthode de l'étalon externe :

On compare l'absorbance (A_S) d'une solution de concentration connue (C_S) à l'absorbance (A_X) d'une solution de concentration inconnue (C_X).

La loi de Beer-Lambert indique que :

$$A_S = \epsilon l C_S \text{ et } A_X = \epsilon l C_X \text{ d'où } \frac{A_X}{A_S} = \frac{\epsilon l C_X}{\epsilon l C_S} \Leftrightarrow C_X = \frac{A_X C_S}{A_S}$$

4. Méthode de l'étalon interne (ou méthode de l'ajout dosé) :

Le principe consiste à mesurer l'absorbance A_X de la solution de concentration C_X inconnue et de volume V_X . Dans un second temps, on ajoute un volume ΔV (faible par rapport à V_X) d'une solution standard de concentration C_S . L'absorbance A_{XS} est alors mesurée. On a alors que

$$C_X = \frac{A_X C_S \Delta V}{A_{XS} (V_X + \Delta V) - A_X V_X}$$

Cette méthode présente l'avantage de tenir compte des effets de matrice. Par contre, elle est relativement lente, puisqu'elle nécessite un ajout par échantillon. A noter que cette méthode, comme celle de l'étalon externe, suppose que la loi de Beer-Lambert est bien respectée, ce qui n'est pas toujours le cas (notamment pour les solutions concentrées).

15. Application de la spectroscopie UV-visible

1. Analyse qualitative: identification

- Comparaison avec spectres de référence
- Identification délicate car bandes larges : nécessité de confirmer avec autre technique

Le spectre UV ou visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient, il s'agit principalement des molécules contenant :

- un ou plusieurs noyaux aromatiques ;
- des groupements C=O (aldéhydes ; cétones).
- des groupements N=O.
- des groupements N=N.

Les doubles liaisons C=C uniques ont une absorption vers 180-200 nm et sont plus difficiles à observer. Mais dès que deux doubles liaisons sont conjuguées la bande d'absorption se déplace vers la plage 250-400 nm.

Analyse Minérale :

En analyse minérale, on caractérise aussi des ions, généralement en provoquant une absorbance très spécifique avec un réactif approprié.

2- Analyse quantitative

- Au moins un des produits de la réaction absorbant (ou indicateur)
- Représentation $A=f$ (volume de réactif de titrage)
- Courbes de titrage : 2 parties linéaires avant et après PE (point d'équivalence)
- PE = intersection des parties linéaires par extrapolation
- Détermination des points de fin de titrage
- Détermination des constantes thermodynamiques : K_a , K_d , K_{sp}
- Utilisation comme détecteur en HPLC
- Suivi de la cinétique d'une réaction
- Mesures des constantes de dissociation d'acides et de bases ou des constantes de complexation...
- Détermination de la composition d'un mélange (benzène dans le cyclohexane)
- Etude d'isomérisation cis-trans ou de tautomérie.
- Police scientifique et expertise judiciaire
- Environnement :
 - Ozone dans l'aire des villes
 - Métaux lourds dans l'eau
 - Mesure du phénol dans l'eau (à la bande 200-300 nm)
 - Matières organiques, matières en suspension, nitrates contenus dans l'eau

- Lutte antidopage
- Agroalimentaire
- Mesures des couleurs

En Pharmacie

- Dosage du fer dans un médicament
- Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique
- La vitamine B₁₂ ou cyanocobalamine présente un spectre d'absorption avec 3 maximums situés à 278, 361 et 550 nm, le dosage quantitatif s'effectue à 361 nm car l'absorption est très forte à cette longueur d'onde.
- La phytylmenadione ou vitamine K₁ présente un spectre d'absorption à plusieurs bandes situées respectivement à 249, 254, 270 et 285 nm (4 maximums). Le dosage quantitatif s'effectue à 249 nm car c'est la bande représentant l'absorption la plus intense.
- La phénoxyéthylpénicilline est dosée par comparaison à un étalon à 276 nm.
- La vitamine A est dosée à 620 nm après qu'elle ait été saponifiée et transformée par le trichlorure d'antimoine (coloration bleu).
- Les métaux de transition sont dosés après qu'ils aient été transformés en complexes.

Ce dosage s'effectue dans le visible (les complexes sont colorés), exemple $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$.

Lorsque le médicament renferme plusieurs principes actifs et dont les spectres sont partiellement ou totalement confondus, il sera alors utile de procéder à leur séparation par chromatographie (CCM), il sera ensuite possible de réaliser directement sur la plaque en mesurant l'absorption de chaque tache. On peut également éluer le spot par un solvant approprié et doser isolément

Parfums et cosmétiques

Les crèmes solaires contiennent des filtres UV ou écrans solaires ces filtres absorbent les radiations UV les plus dangereuses pour la peau.

Analyse Médical

Plus de 90% des analyses médicales sont basées sur la spectroscopie d'absorption UV-Vis.

Ceci est dû à :

- Une grande sensibilité : limites de détection en spectroscopie d'absorption 10^{-5} à 10^{-7} M.
- Une bonne sélectivité : on peut trouver une longueur d'onde où un seul des analytes absorbe.
- Une bonne exactitude : les erreurs relatives sur la concentration sont de l'ordre de 1-5 %.
- Champ d'application très vaste : même si l'analyte à étudier n'absorbe pas, on peut le faire réagir avec un réactif chromophore pour former un produit absorbant. (Cette réaction de dérivatisation doit être quantitative).
- Une facilité de mise en oeuvre (méthodes automatisées).