Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 75 (1984)

Heft: 4

Artikel: Recherche et dosage de traces de fluorescéine dans les essais de coloration en hydrogéologie = Trace determination of fluorescein in tracer studies in hydrogeology

Autor: Aubort, J.-D. / Etournaud, A.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982713

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Trav. chim. aliment. hyg. 75, 415–420 (1984)
Présenté le 3 mai 1984. Accepté le 16 juin 1984

Recherche et dosage de traces de fluorescéine dans les essais de coloration en hydrogéologie

Trace Determination of Fluorescein in Tracer Studies in Hydrogeology

J.-D. Aubort et *A. Etournaud*
Laboratoire cantonal, Epalinges-Lausanne

Introduction

La fluorescéine est un traceur couramment utilisé en hydrogéologie. A la résurgence des eaux étudiées, la présence du colorant peut être observée soit directement dans des échantillons d'eau prélevés à intervalles réguliers, soit après adsorption sur du charbon actif contenu dans des dispositifs «fluocapteurs».

Les techniques proposées pour la détection et le dosage de la fluorescéine sont généralement la photométrie et la fluorimétrie, appliquées directement pour les échantillons d'eau ou, pour le charbon actif des «fluocapteurs», après extraction avec une solution d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol (1 et références citées). Ces méthodes ne permettent cependant pas une appréciation sûre lorsque le colorant est présent en traces. Les limites de détection sont souvent insuffisantes et, par ailleurs, des interférences avec la fluorescence bleue-blanche des acides humiques, également fixés par le charbon actif, gênent considérablement la détection du traceur et peuvent conduire à de graves erreurs d'interprétation.

Le présent travail propose une méthode d'extraction, de concentration et de séparation de la fluorescéine basée sur l'emploi de micro-colonnes de polyamide, dont les avantages ont déjà été décrits (2). Le dosage du traceur est ensuite effectué par spectrophotométrie d'absorption, de préférence en mode «dérivée seconde».

Partie expérimentale

Réactifs

Fluorescéine (Merck n° 3990)
Acide formique 98% p. a.
Méthanol p. a.

Méthanol-ammoniaque 25% 95 : 5 (v/v)
Polyamide MN-SC 6 pour la chromatographie sur colonne 0,05–0,16 mm (Macherey-Nagel)
Solutions standard de fluorescéine:

- solution stock à 0,1 mg/ml: dissoudre 10,0 mg de fluorescéine dans 100 ml de mélange méthanol-ammoniaque
- solutions de travail à 0,05–0,1–0,15–0,2 μg/ml: diluer respectivement 5, 10, 15 et 20 μl de solution stock à 10 ml avec le mélange méthanol-ammoniaque.

Equipement

Pipettes «Pasteur», ∅ intérieur env. 6 mm, longueur totale env. 150 mm.
Evaporateur rotatif.
Lampe ultra-violette avec filtre à 365 nm.
Spectrophotomètre à double faisceau permettant l'enregistrement de spectres entre 400 et 600 nm en absorbance avec, de préférence, le mode «dérivée seconde».
Cuvettes pour la spectrophotométrie de 10 mm de chemin optique, en verre optique ou quartz.

Mode opératoire

Echantillons d'eau

Acidifier la prise d'échantillon (10 à 500 ml selon la teneur présumée et la sensibilité recherchée) avec quelques gouttes d'acide formique à pH 3–4 (papier pH).

Préparer une première micro-colonne de polyamide *sèche* de la manière suivante:

Introduire un très petit tampon d'ouate au début de la partie effilée d'une pipette «Pasteur» et ajouter avec une spatule de la poudre de polyamide de manière à constituer une colonne de 15 à 20 mm de hauteur après tassement.

Faire passer l'échantillon acidifié à travers cette micro-colonne de polyamide en procédant, pour des volumes supérieurs à quelques dizaines de millilitres, par siphonnage.

Laver la colonne avec de petites portions d'eau distillée, jusqu'à ce que l'éluat soit neutre (papier pH).

Eluer la fluorescéine avec de petites portions de méthanol, au total env. 5 ml, recueillir l'éluat dans un ballon «cœur» de 25 ml.

Ajouter 2 ml d'eau distillée à l'éluat, évaporer le méthanol sous vide à température modérée.

Acidifier la solution aqueuse restante avec 1 goutte d'acide formique.

Préparer une seconde micro-colonne de polyamide de la manière suivante:

Mettre en suspension de la poudre de polyamide dans de l'eau distillée (10 ml/g), introduire un très petit tampon d'ouate au début de la partie effilée d'une pipette «Pasteur» et faire passer un volume suffisant de suspension de polyamide pour constituer une colonne de 10 à 15 mm de hauteur après drainage. Rincer la colonne avec env. 1 ml d'eau distillée.

Faire passer la solution aqueuse acidifiée à travers cette micro-colonne, laver avec de petites portions d'eau distillée jusqu'à ce que l'éluat soit neutre (papier pH).

Dispositifs «fluocapteurs»

Sécher le fluocapteur à poids constant à l'étuve à 50 °C.

Placer une aliquote ou la totalité du charbon actif granulé dans un «erlen» de 25 ml, ajouter 10 ml de mélange méthanol-ammoniaque. Laisser reposer 1 heure en agitant de temps en temps.

Décanter la phase liquide, la filtrer sur laine de verre directement dans un ballon «cœur» de 50 ml.

Répéter l'extraction avec 10 ml de mélange méthanol-ammoniaque.

Evaporer les extraits réunis *à très petit volume* sous vide, à basse température.

Reprendre le résidu par 2 à 3 ml d'eau distillée, acidifier à pH 3 à 4 avec de l'acide formique.

Faire passer cette solution sur une micro-colonne de polyamide de 10 à 15 mm de hauteur préparée avec une suspension aqueuse comme indiqué ci-dessus.

Poursuivre comme sous «Echantillons d'eau» à partir de «Laver la colonne avec de petites portions d'eau distillée . . .».

Examen qualitatif

Observer la coloration de la zone supérieure de la deuxième micro-colonne de polyamide (tranche de 1–3 mm) et sa fluorescence en lumière ultra-violette à 365 nm.

Une coloration jaune et la fluorescence jaune-verte caractéristique de la fluorescéine permettent de conclure à la présence du traceur dans l'échantillon examiné. La limite de détection lors de l'examen de la fluorescence est de l'ordre de quelques dizaines de nanogrammes.

Examen spectrophotométrique

Eluer la deuxième micro-colonne de polyamide avec 3 ml de mélange méthanol-ammoniaque, recueillir l'éluat directement dans une cuvette pour la spectrophotométrie.

Enregistrer le spectre dans le visible entre 400 et 600 nm, de préférence en mode «dérivée seconde», la cuvette de référence contenant le mélange méthanol-ammoniaque.

Enregistrer de la même manière les spectres des solutions standard de fluorescéine (solutions de travail).

Il est également possible de procéder à un examen fluorimétrique ou, mieux encore, spectrofluorimétrique sur l'éluat de la seconde micro-colonne de polyamide.

Calculs

Lorsque les spectres d'absorption sont enregistrés en mode «dérivée seconde», mesurer les hauteurs des pics par la méthode de la tangente, illustrée à la figure 1, pour l'échantillon et les standards de fluorescéine. La teneur en traceur de l'échantillon (eau du charbon actif du «fluocapteur») est calculée à partir de la droite d'étalonnage obtenue avec les 4 solutions standard de fluorescéine.

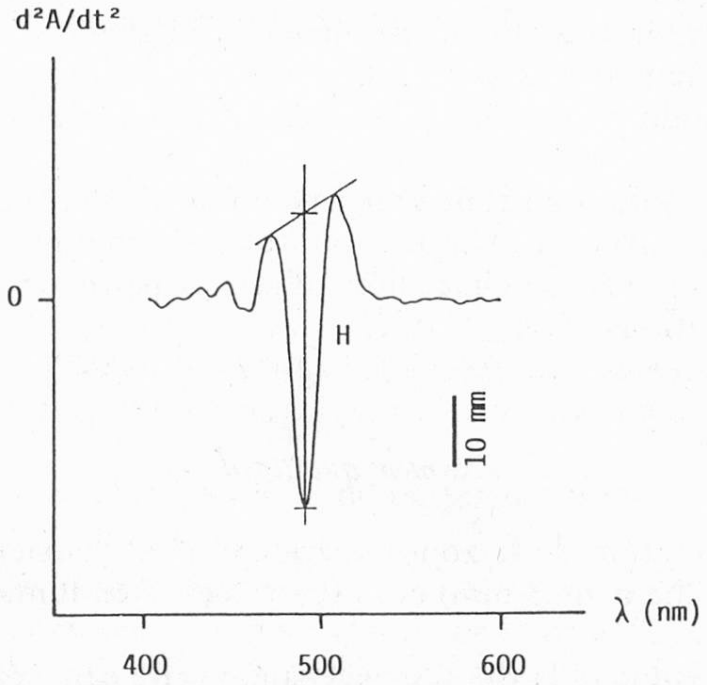

Fig. 1. Spectre en mode «dérivée seconde» d'une solution de 200 ng de fluorescéine dans 3 ml de mélange méthanol-ammoniaque 95 : 5 et illustration du mode de mesure de la hauteur du pic (Conditions expérimentales: spectrophotomètre Kontron AG «UVIKON 810», spectre de 600 á 400 nm à 100 nm/min, largeur de dérivation 4,0 nm, constante de temps 8,0 secondes, échelle de l'enregistreur 0,1%)

Il est possible de procéder plus rapidement, avec une précision généralement suffisante, avec une seule solution standard de fluorescéine (0,1 μg/ml, par exemple). La teneur en traceur de l'échantillon se déduit alors des relations suivantes:

Echantillon d'eau

teneur $= H_{éch.} \cdot C \cdot 3/H_{st.} \cdot V$ (μg fluorescéine/ml)
avec: $H_{éch.}$ = hauteur du pic pour l'échantillon
$H_{st.}$ = hauteur du pic pour le standard
C = concentration de la solution standard de fluorescéine (μg/ml)
V = volume de la prise d'échantillon (ml)

«Fluocapteur»

teneur $= H_{éch.} \cdot C \cdot 3/H_{st.} \cdot M$ (μg fluorescéine/g charbon actif)
avec: M = prise de charbon actif en g.

Les calculs s'effectuent de manière analogue lorsque les spectres d'absorption sont enregistrés en absorbance ou lorsqu'une technique fluorimétrique est utilisée.

Résultats et discussion

Le comportement de la fluorescéine vis-à-vis de la polyamide se caractérise par le fait qu'elle est fixée très efficacement en *milieu aqueux acide,* alors qu'elle est aisément désorbée par le *méthanol, même en milieu neutre.*

Cette propriété distingue la fluorescéine des colorants hydrosolubles acides usuels, notamment les dérivés azoïques sulfonés, qui ne sont élués de la polyamide qu'en milieu *alcalin* (3). L'interprétation de cette différence de comportement fera l'objet d'une communication séparée.

Les acides humiques souvent présents dans les eaux naturelles ont également la propriété de se fixer sur la polyamide en milieu aqueux acide. Ces composés poly-phénoliques ne sont cependant pas désorbés par le méthanol en milieu neutre, contrairement à la fluorescéine. Il est ainsi possible d'opérer une séparation dans d'excellentes conditions, et d'éviter les fâcheuses interférences produites par les acides humiques autant lors d'un examen de la fluorescence que lors d'une appréciation par photométrie ou fluorimétrie.

Après séparation des acides humiques, la fixation *ultra-compacte* de la fluorescéine en tête de la deuxième micro-colonne de polyamide autorise une détection très sensible. L'examen de la fluorescence à 365 nm peut révéler la présence de quelques dizaines de nanogrammes seulement du traceur.

L'examen par spectrophotométrie dans le visible avec enregistrement de la *dérivée seconde* de l'absorbance permet à la fois de confirmer avec une très grande rigueur l'identité du traceur et de le doser à de très faibles concentrations. Le spectre obtenu avec une solution de 200 ng de fluorescéine dans 3 ml de mélange méthanol-ammoniaque 95 : 5 est représenté à la figure 1. L'emploi de micro-cuvettes pour la spectrophotométrie permettrait d'augmenter encore la réponse.

Dans la pratique, la technique proposée permet de déceler de manière sûre moins de 100 ng de fluorescéine soit, pour un échantillon d'eau de 500 ml, une teneur inférieure à 200 ng/l (200 ppt). Lors de l'examen de dispositifs «fluocapteurs», pour une prise de 5 g de charbon actif granulé, la limite de détection est

de l'ordre de 20 ng/g d'adsorbant. Une appréciation quantitative est également déjà possible à partir de ces teneurs.

Résumé

Une méthode simple est décrite pour la détection et le dosage de traces de fluorescéine dans l'eau ou dans le charbon actif lors d'essais de coloration en hydrogéologie. Le colorant est séparé des acides humiques fortement interférants par chromatographie sur une micro-colonne de polyamide, puis adsorbé de manière compacte en tête d'une seconde micro-colonne. L'examen de la fluorescence à 365 nm permet de déceler moins de 100 ng de fluorescéine. Il est possible de doser des quantités du même ordre de grandeur par spectrophotométrie en mode «dérivée seconde».

Zusammenfassung

Eine einfache Methode zum Nachweis und zur Bestimmung von Spuren von Fluoreszein in Wasser oder in Aktivkohle während Färbversuchen in der Hydrogeologie wird beschrieben. Der Farbstoff wird von den stark interferierenden Humussäuren mittels Chromatographie auf einer Polyamidmikrosäule getrennt, dann auf einer zweiten Mikrokolonne kompakt absorbiert. Die Untersuchung der Fluoreszenz bei 365 nm erlaubt es, weniger als 100 ng Fluoreszein nachzuweisen. Es ist möglich, Mengen gleicher Größenordnung durch Spektrometrie (zweite Ableitung) zu bestimmen.

Summary

A simple method is proposed for the determination of traces of fluorescein in water or activated charcoal in tracer studies in hydrogeology. The dye is separated from the strongly interfering humic acids by chromatography on a micro-column of polyamide and then adsorbed in a compact manner on a second micro-column. Examination of the fluorescence at 365 nm allows the detection of less than 100 ng fluorescein. It is possible to measure quantities of the same order of magnitude using second order derivative spectrophotometry in the visible range.

Bibliographie

1. *Mathey, B.:* La méthode au charbon actif dans les essais de coloration à la fluorescéine. Actes du 4ème Congrès suisse de spéléologie. Neuchâtel, septembre 1970, p. 53–61.
2. *Etournaud, A.* et *Aubort, J.-D.:* Recherche des colorants organiques dans les cosmétiques. I. Rouges à lèvres et fards. Trav. chim. aliment. hyg. **74**, 372–382 (1983).
3. *Davidek, J.* et *Davidkova, E.:* Verwendung von Polyamid bei der Untersuchung wasserlöslicher Lebensmittelfarbstoffe. II. Mitteilung. Isolierung von Farbstoffen aus Lebensmitteln für deren papierchromatographische Trennung. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. **131**, 99–101 (1966).

Dr A. Etournaud
Prof. Dr J.-D. Aubort
Laboratoire cantonal
Les Croisettes
CH-1066 Epalinges