



Saclay

# *L'exposition chronique des écosystèmes et du public aux éléments en trace*

15 Septembre 2003

## **Les éléments en traces : spéciation et outils associés**

Commissariat à l'Énergie Atomique

Direction de l'Énergie Nucléaire

Département de Physico-Chimie

Service d'Etude du Comportement des Radionucléides

Laboratoire de Spéciation des Radionucléides et des Molécules

C. Moulin et collaborateurs



Saclay

**Spéciation** : détermination des différentes formes sous lesquelles un agent chimique est présent dans un milieu donné. Chaque forme est définie par :

- sa **composition chimique** et/ou
- ses **caractéristiques physiques détaillées** et/ou
- ses **effets biochimiques et toxicologiques**

**Importance de ne pas seulement connaître la concentration mais aussi la spéciation de l'élément pour évaluer son impact**

**Besoin pour des méthodes spectrométriques :**

**RMN, EXAFS, ES-SM, SLRT, HPLC-ICP/SM**

**$10^{-2}$  M**

**$10^{-6}$  M**

**$10^{-8}$  M**



Saclay

# Intérêt de la spéciation ?

La forme physico-chimique d'un élément peut impacter

- sur l'aspect procédé : **EXTRACTION**

*Cs -calixarène, Zr - TBP, Ln/An -diamide/BTP*

- sur l'aspect environnemental : **MIGRATION**

*U, I avec les matières organiques (substances humiques)*

- sur l'aspect biologique : **TOXICITE**

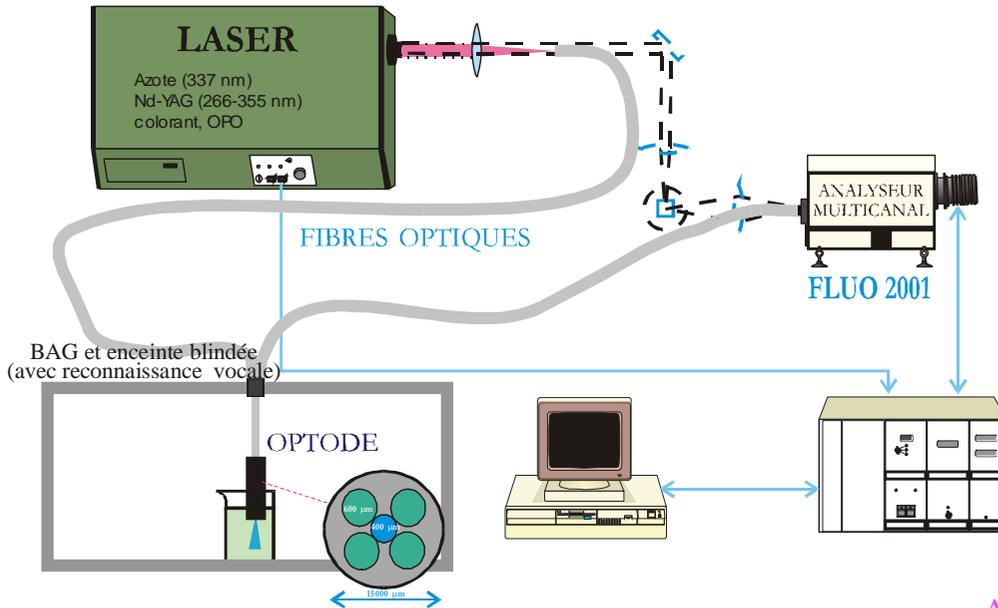
*Décorporation des actinides et des lanthanides*

# SPECTROFLUORIMETRIE LASER A RESOLUTION TEMPORELLE

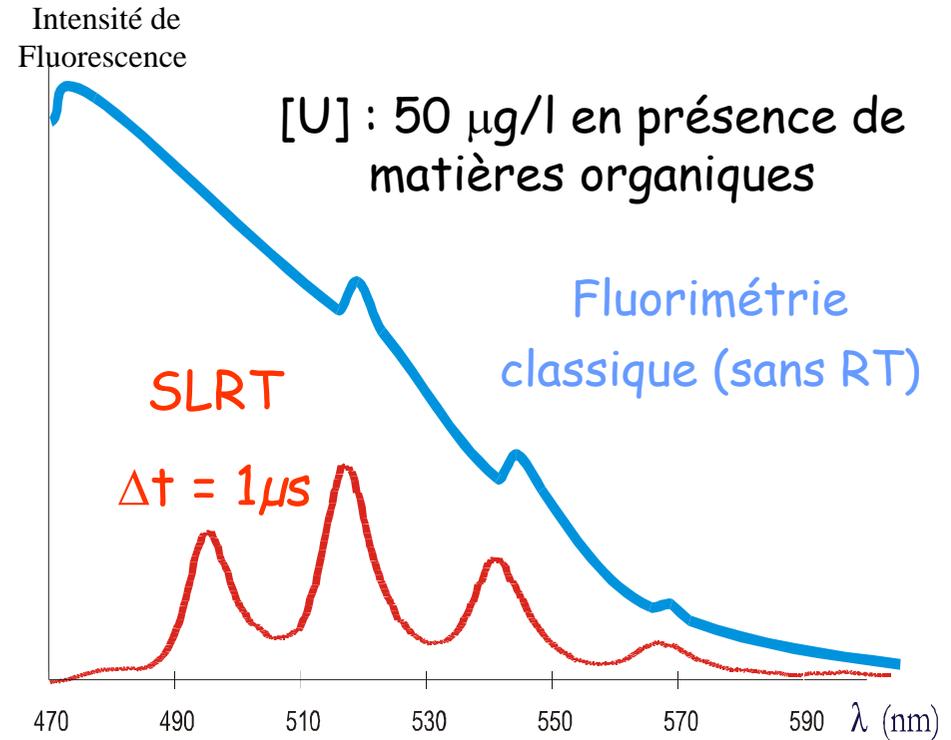
## Principe

Saclay

- Excitation par un laser pulsé
- Résolution temporelle du signal de fluorescence
- Elimination des fluorescences parasites à temps de vie courts



BECQUEREL 1871, MAUCHIEN 1982



CEA, CNRS, ANDRA, COGEMA,  
JAERI, Ispra, Karlsruhe, Los Alamos,

Applied Spectroscopy 47, 2007 (1993), Fres. J. Anal. Chem. 361,81 (1998)



# SPECTROFLUORIMETRIE LASER A RESOLUTION TEMPORELLE

Saclay

## Avantages

- **Sélectivité**
- **Sensibilité**
- Rapidité
- Dynamique
- Mesure à distance

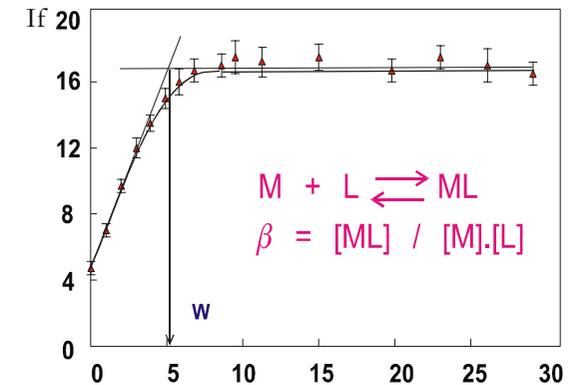
## - Spéciation :

- [espèces]
- stœchiométrie
- constante de complexation
- degré d'hydratation

**Limitations :** Th, Pu et Np non fluorescents en solution

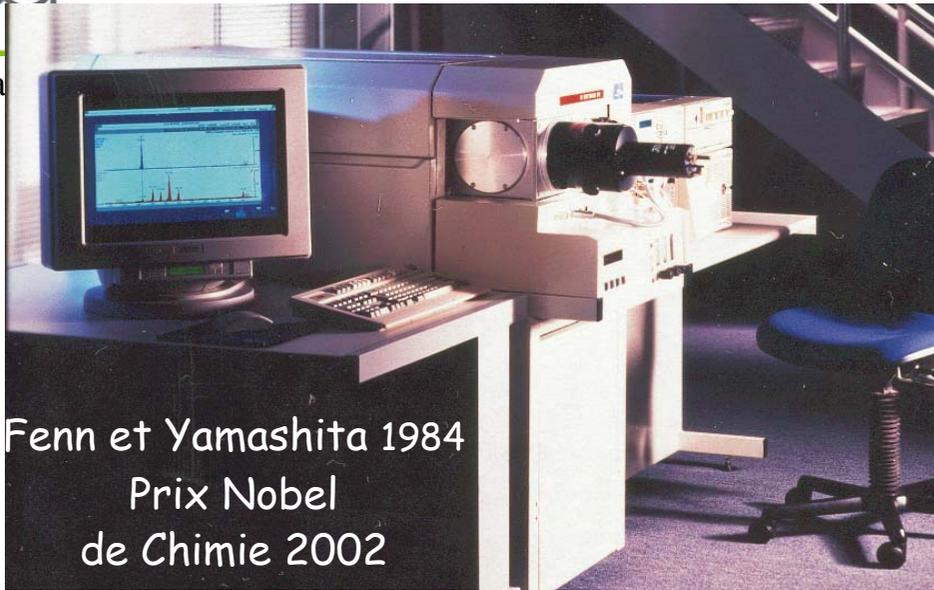
Eléments	Limite de détection (M)	Limite en Spéciation
Uranium	$5.10^{-13}$	$10^{-8} M$
Curium	$5.10^{-13}$	$10^{-8} M$
Américium	$10^{-9}$	$10^{-6} M$
Eu, Tb,...	$5.10^{-12}$	$10^{-8} M$

**Titrage par fluorescence :** accès à la stœchiométrie et à la constante de complexation

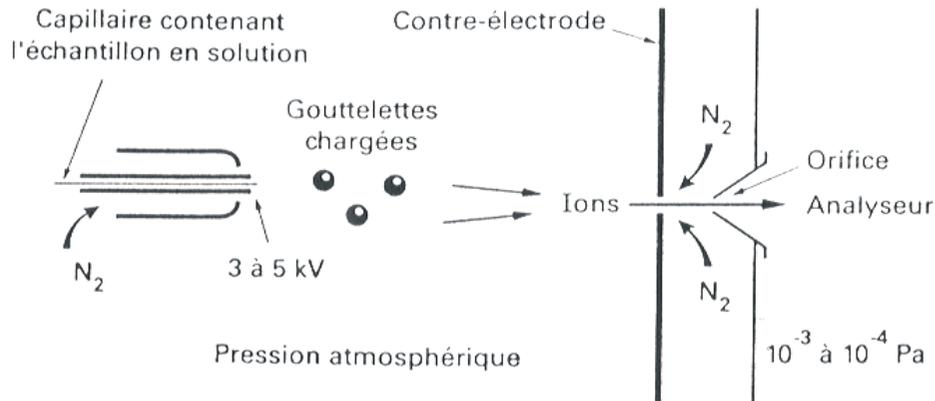


Analytical Chemistry 60, 1296 (1988)  
 Analytica Chimica Acta 253,220 (1989)  
 Analytica Chimica Acta 254,145 (1991)  
 Radiochimica Acta 61,15 (1993)

# ElectroSpray - Spectrométrie de Masse (ES-SM)



Electrospray SM : Triple quadripôle ou Q-TOF



## Spéciation

Mode d'ionisation doux

Introduction directe ou via HPLC

Femtomoles

Access à la masse exacte

Masse → 10<sup>6</sup>

Séquençage

(protéomique, génomique)



# ElectroSpray - Spectrométrie de Masse (ES-SM)

Saclay

## Avantages

- Multi-élémentaire
- Sensibilité et Sélectivité (accès à l'isotopie)
- Analyse structurale
- Speciation (organique, inorganique, complexe) ( $\mu\text{M}$ )

## Limitations

- Non intrusivité doit être confirmée (de la phase liquide à la phase gazeuse)

## Etude

# Les substances humiques : structure inconnue Matières organiques issues de la dégradation des sols Complexants des radionucléides

- *Site de stockage → Migration/Rétention ?*
- *Environnement → Biodisponibilité*

## Objectifs

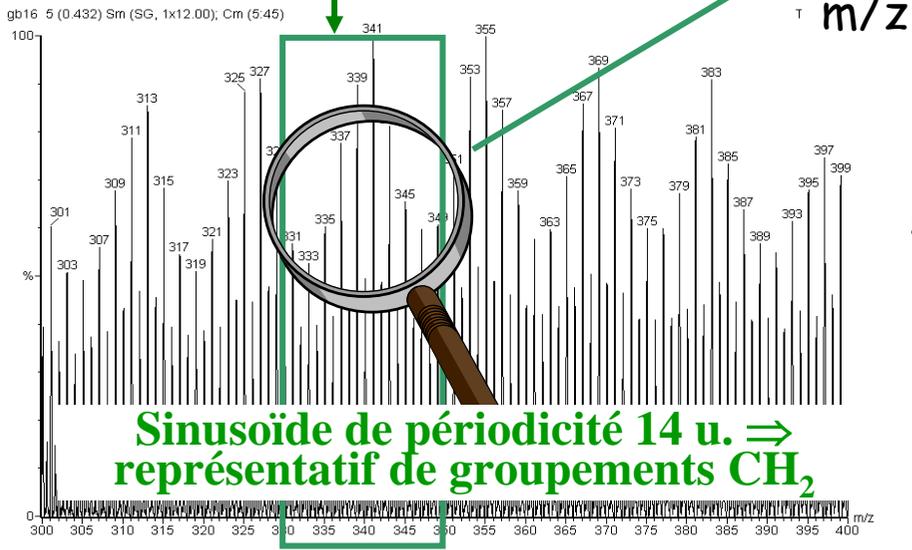
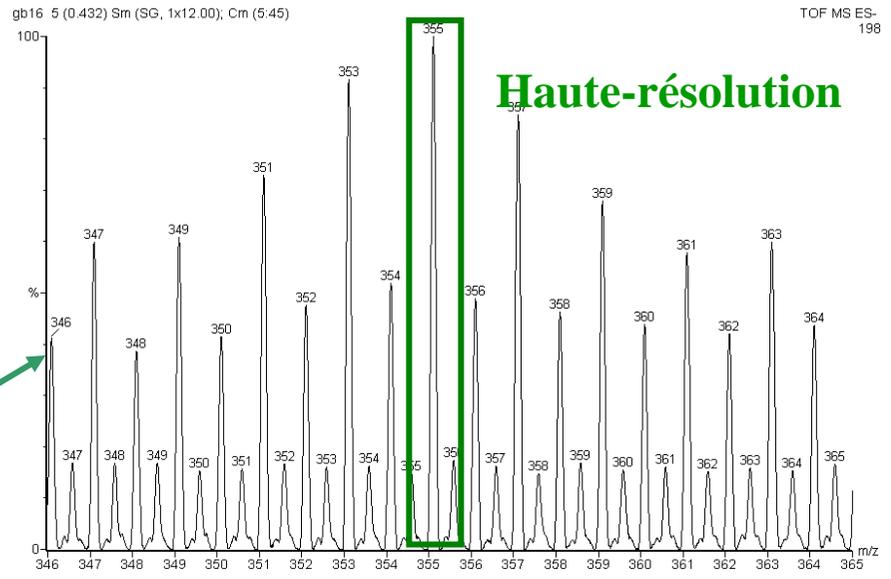
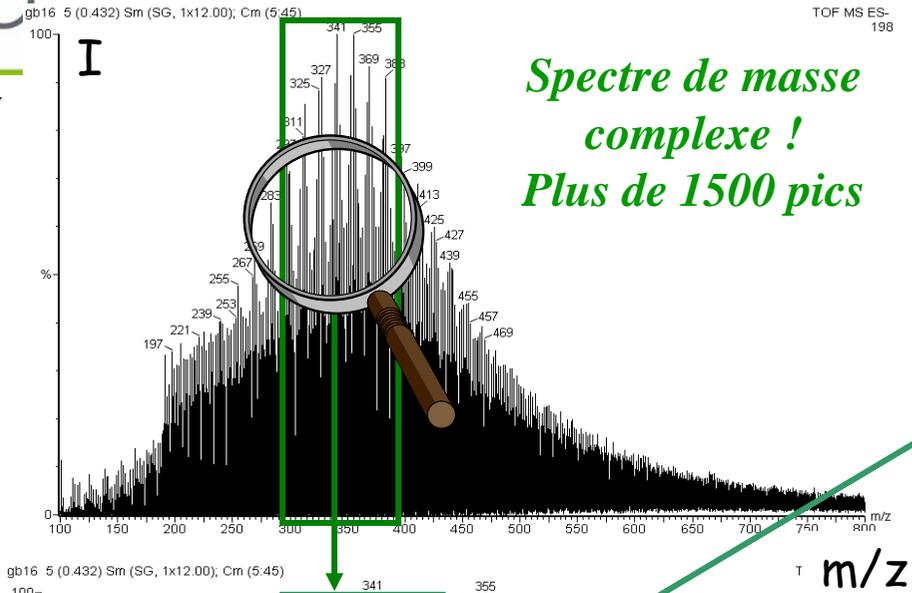
- Quelle est la structure des SH
- Comment se complexent les radionucléides avec les SH

Collaboration avec UMR-EVRY  
Analyse et Environnement

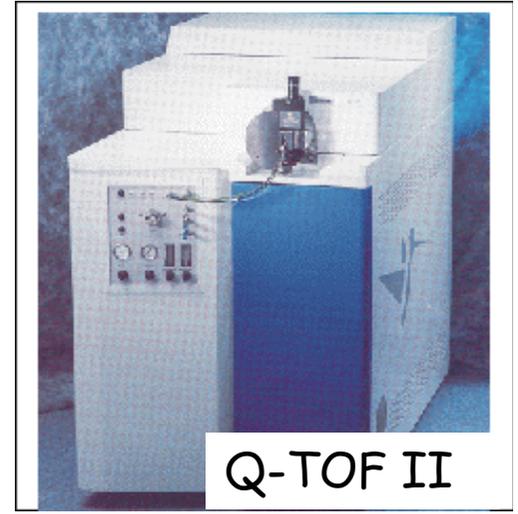


Saclay

# Apport de la spectrométrie de masse haute résolution



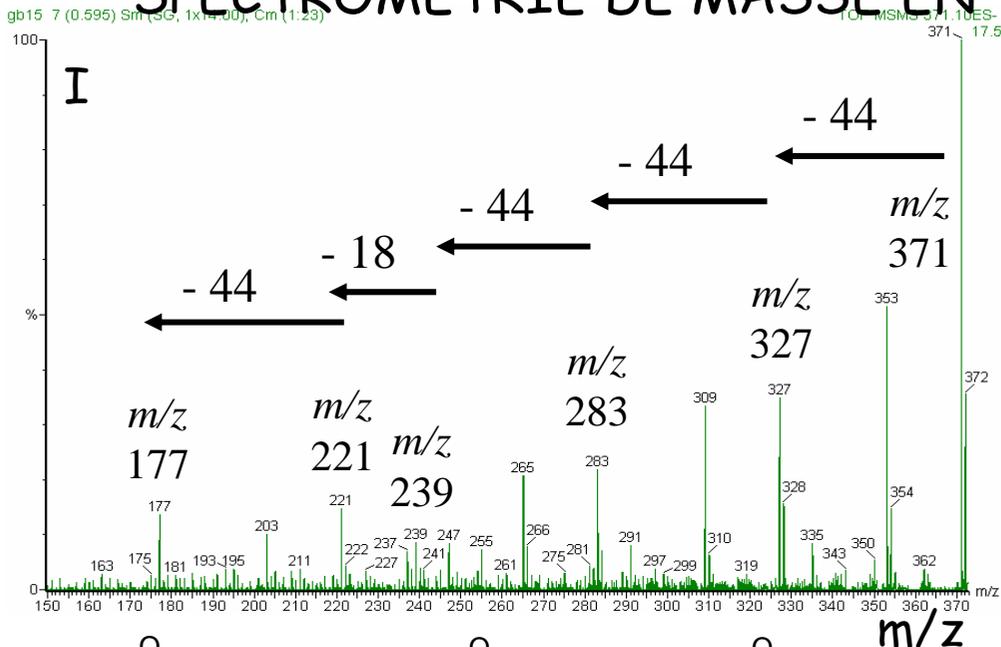
Possibilité de sélectionner un ion donné pour le fragmenter (lego inversé !)





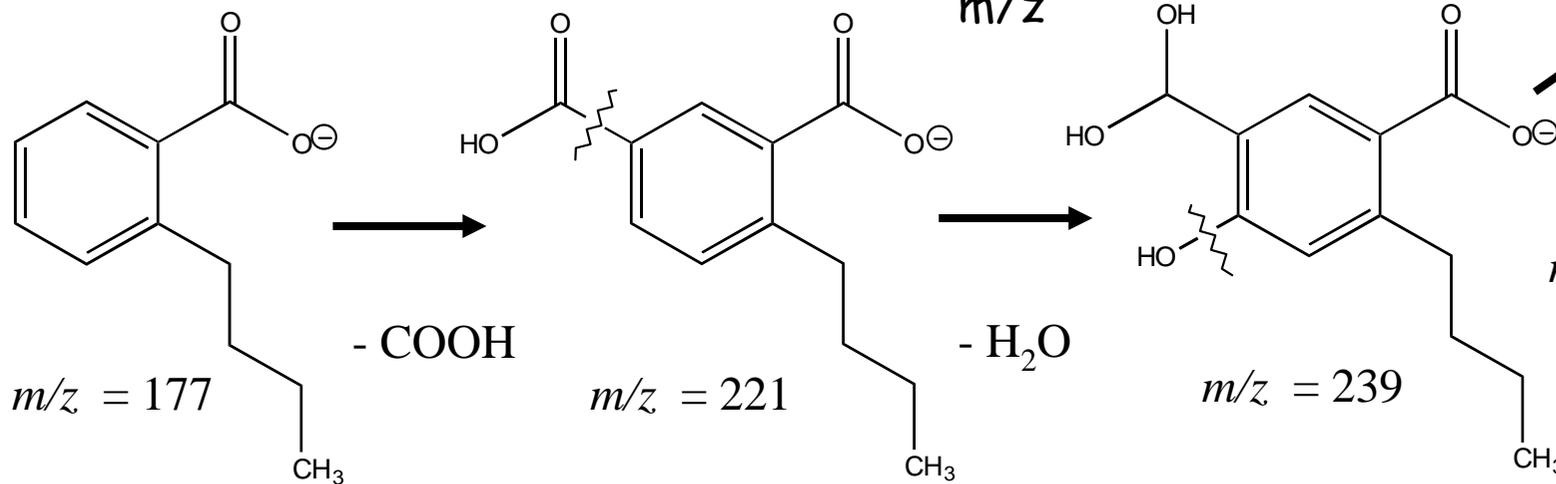
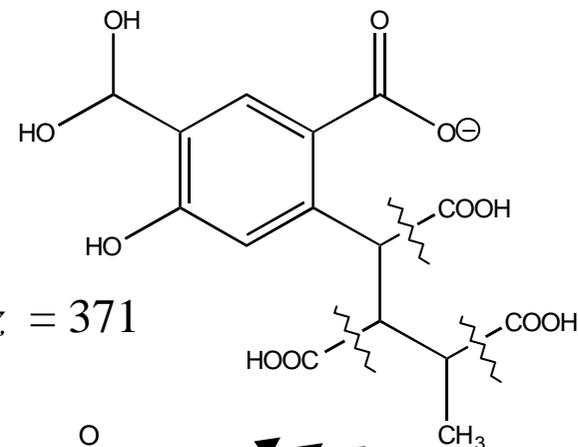
Saclay

# SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM ou MS-MS



**MS-MS sur pic à  $m/z$  371**

Même procédure effectuée sur 20 pics différents



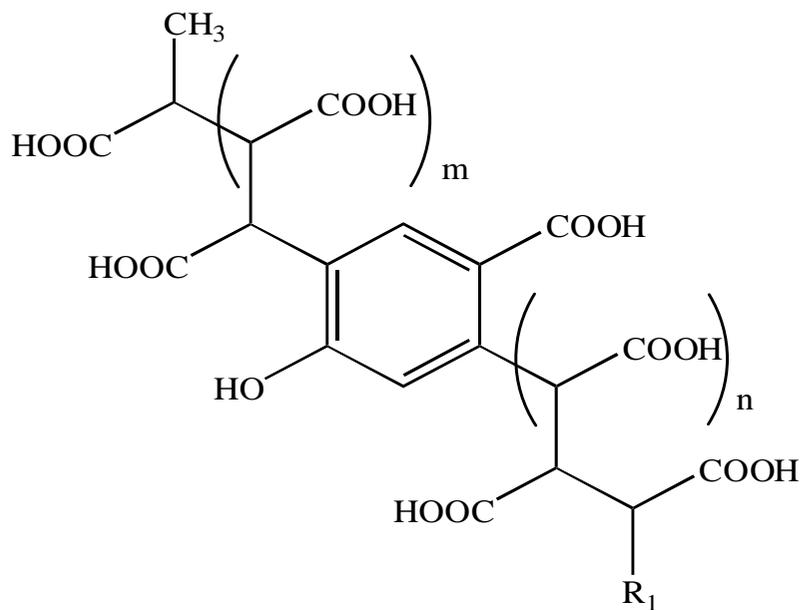
3 étapes (- 3 COOH)  
 $m/z$  intermédiaires 283, 327



Saclay

# Identification de la structure des SH par technique expérimentale

Formule moléculaire générale des  
acides fulviques



famille impaire de  $[M-H]^-$ ,  $R_1 = CH_3$

famille paire de  $[M-H]^-$ ,  $R_1 = NH_2$

Agrégats d'entités carboxy  
phénoliques  
(masse 200-500)  
liées par liaisons H

SH : Supra molécules  
et non macromolécules

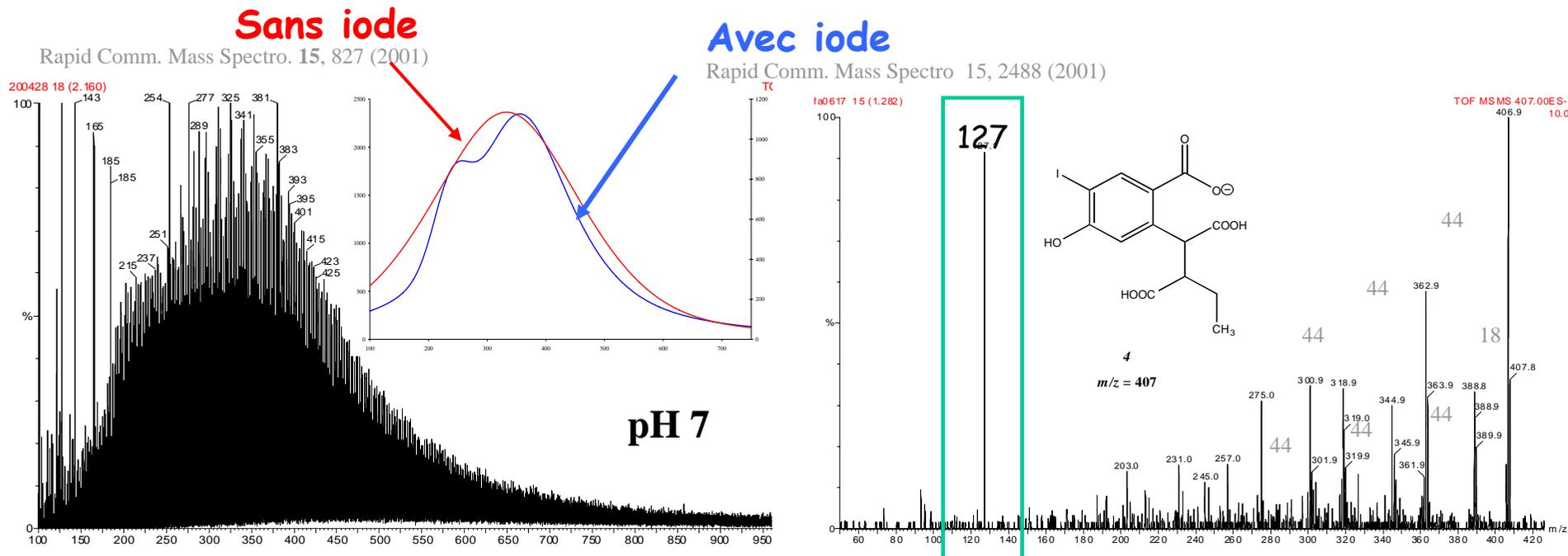
Rapid Comm. Mass Spectro. **15**, 827 (2001)



Saclay

# Présence de quantité importante d'iode dans des prélèvements de matières organiques

## Caractérisation de l'interaction iode - substances humiques



MEME STRUCTURE IDENTIFIEE PREALABLEMENT PAR MS-MS MAIS AVEC PERTE DE I

Iode lié de façon covalente sur les groupements aromatiques des SH

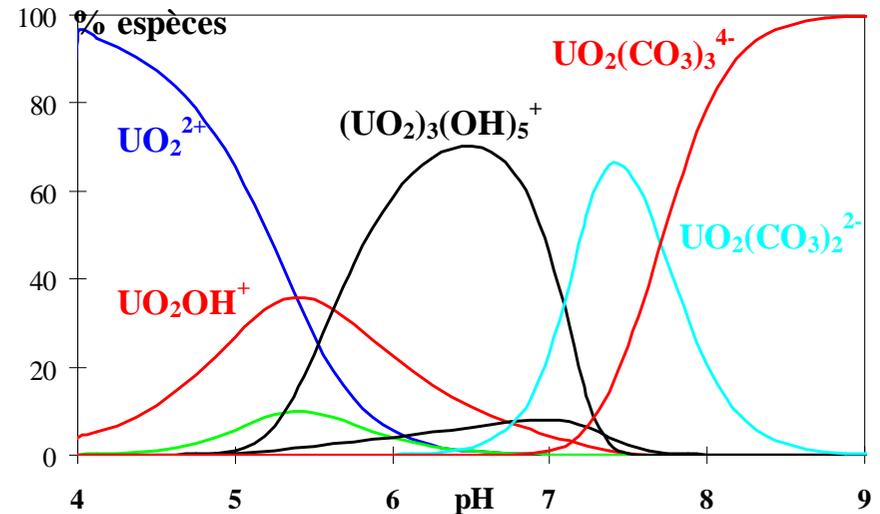


# Interaction de l'uranium avec les substances humiques

Saclay → Spéciation de l'uranium en milieu environnemental mais

chimie de l'uranium complexe

Espèces hydroxylés, carbonates,  
polymériques, mixtes



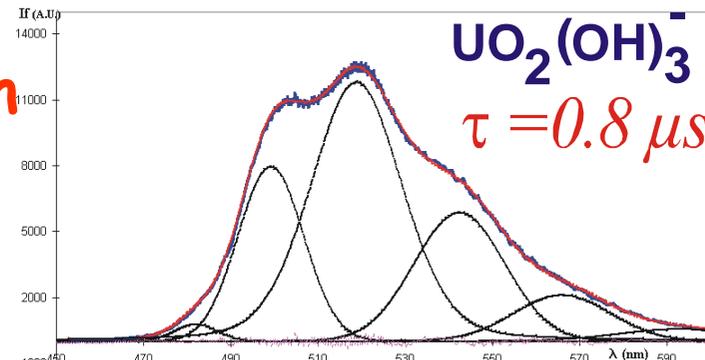
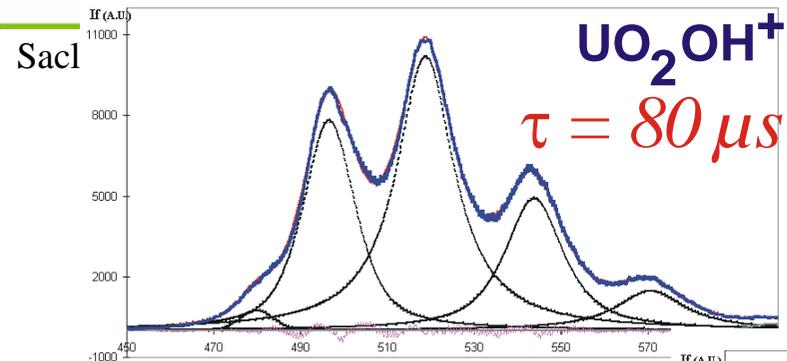
Utilisation de la SLRT pour :

- 1) caractériser l'ensemble des complexes de l'uranium
- 2) calculer les cst d'interaction U-SH via titrage à bas niveau
- 3) évaluer l'effet de la spéciation pour les calculs d'impact

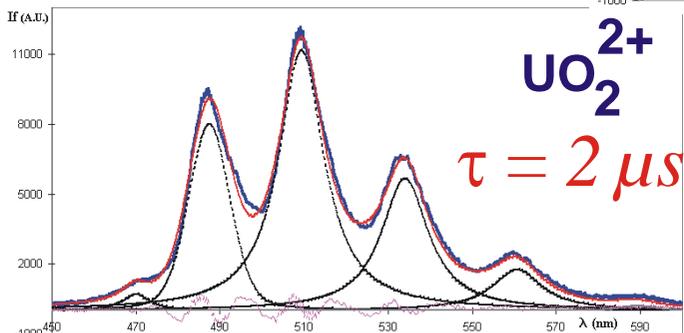


# SPECIATION PAR SLRT DU SYSTEME U-HYDROXO

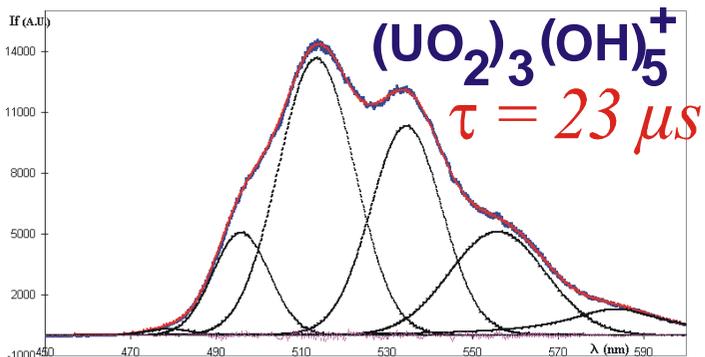
Identification spectrale et temporelle



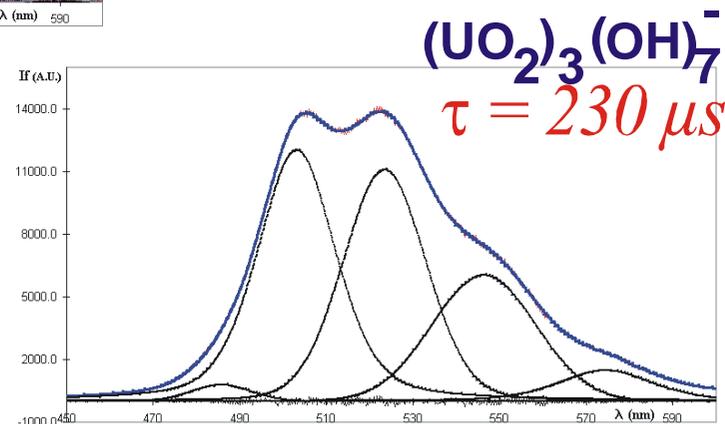
Emission de l'état excité (20500 cm<sup>-1</sup>) vers les 5 états fondamentaux (0, 855, 1710, 2565, 3420 cm<sup>-1</sup>)



Stabilisation de l'état excité avec la complexation : shift rouge et ↗ LMH



APPLIED SPECTROSCOPY 52, 528 (1998)

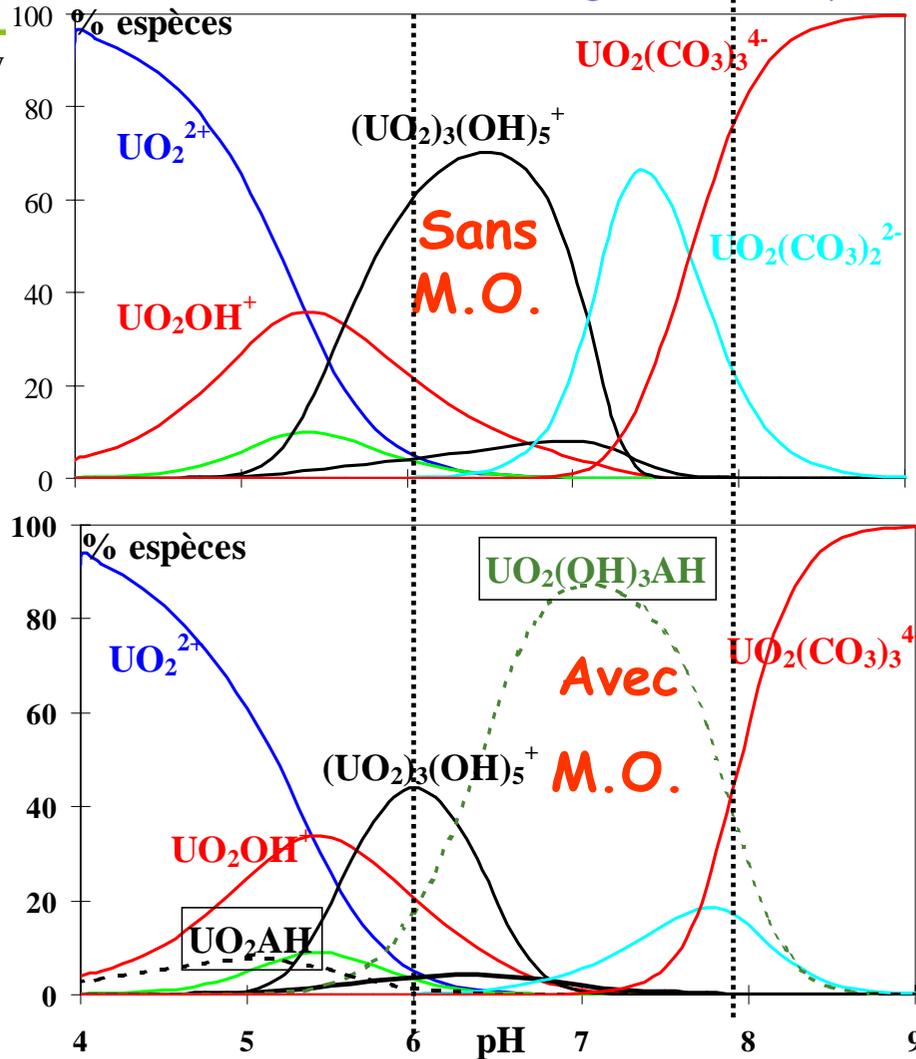


## Interaction U-SH



## Impact sur la spéciation de U(VI) en présence de SH

Programmes européens HUMICS et HUPA



Détermination  
des constantes d'interaction  
par titrage SLRT  
pour  $\text{UO}_2\text{AH}$  :  $\log K = 5.4$  et  
pour  $(\text{UO}_2)(\text{OH})_3\text{AH}$  :  $\log K = 6.7$

Prédominance  
de l'espèce mixte  
 $(\text{UO}_2)(\text{OH})_3\text{AH}$   
à pH neutre

*Radionuclide speciation in the environment : a review.*  
*Radiochimica Acta 89, 773 (2001)*

## Etude

Collaboration avec DSV/DBJC



Expliquer pourquoi suite à l'accident de Tchernobyl (1986), plusieurs espèces de champignon étaient fortement contaminées en  $^{137}\text{Cs}$

*Piste : Une étude préalable (Steglich et al) avait montré que la molécule Norbadione A contenue dans ces champignons complexe le Cs*

## Objectifs

Comprendre l'interaction de la Norbadione avec le Cs

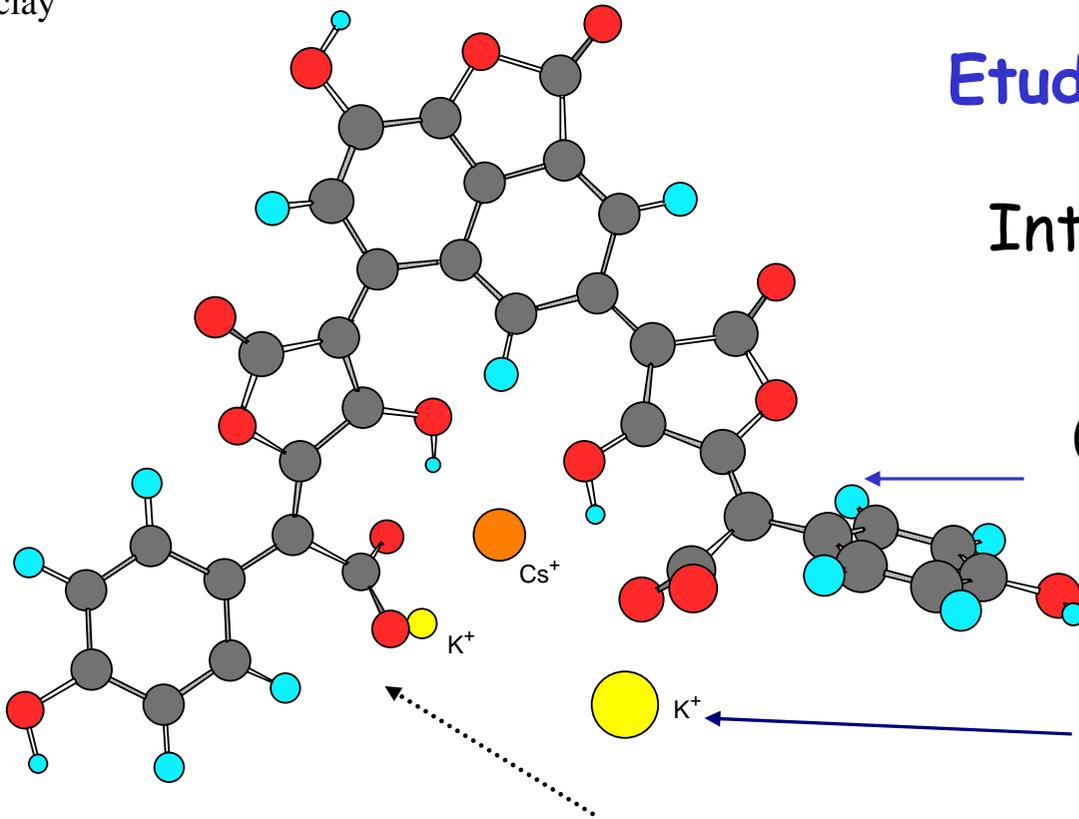
Synthétiser la molécule à des fins de décontamination

# Interaction entre Norbadione et Cs

Collaboration avec DSV/DBJC



## Etude ES-MS



Interaction avec gpt pulvinique

Stœchiométrie 1-1

(Cs piégé par les 2 gpt pulviniques  
et entouré par 2 K)

$$\log \beta = 4.6$$

Stœchiométrie 1-2

(le 2<sup>ème</sup> Cs remplace 1 K !)

$$\log \beta = 9.5$$

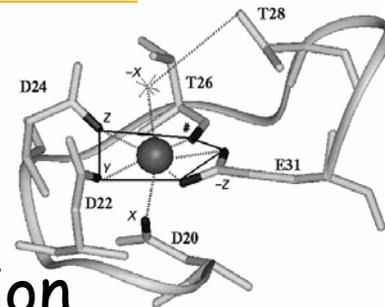
*Norbadione A: Synthetic Approach to the Bis(pulvinic) Moiety and Cesium Complexation Studies. Angewandte Chemie 42, 1289 (2003)*



Saclay

# Etude

Collaboration avec DSV/DIEP



	X	*	Y	*	Z	G	#	/	-X	*	*	-Z
loop 1:	D		D		D	N		T	T			E
loop 2:	D		D		D	N		T	D			E
loop 3:	D		D		D	N		L	S			E
loop 4:	D		D		D	N		H	N			E

Métaux lourds ↔ détection et detoxification

- Développement de senseur fluorescent
- Biorémediation

## Objectifs

Changer la spécificité calcium d'une protéine (Calmoduline)

via mutation pour complexer les lanthanides

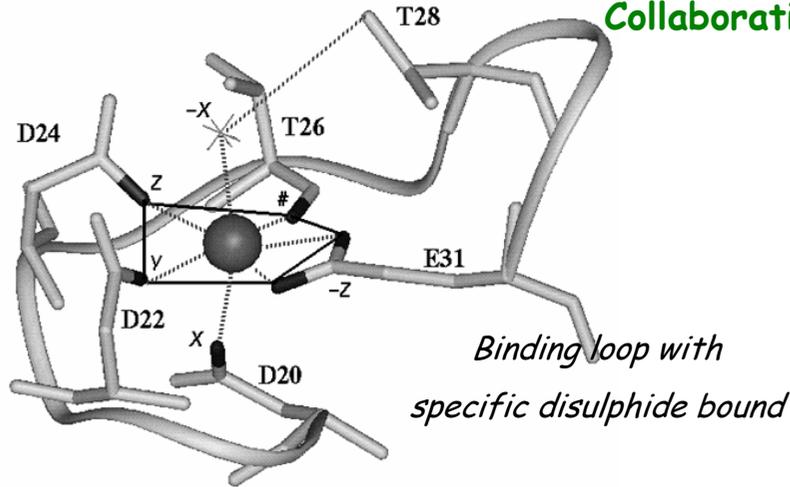
Calculer les constantes de dissociation



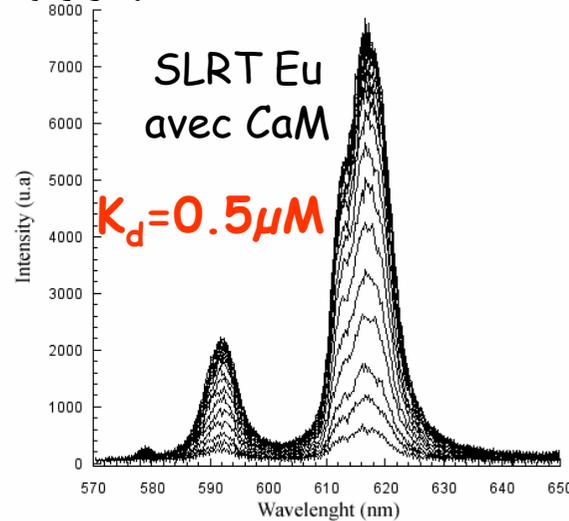
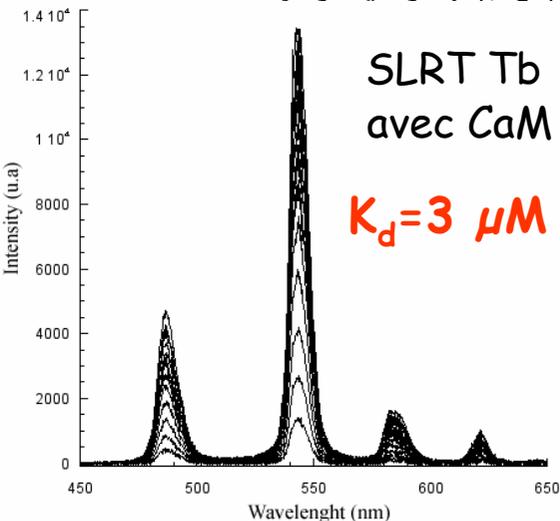
Saclay

# Interaction entre peptides et Ca/Ln

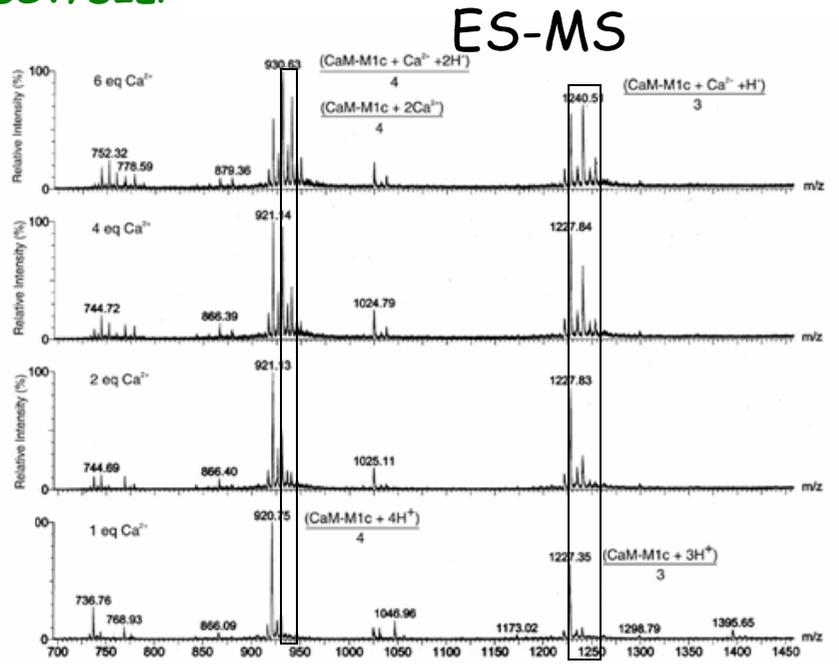
Collaboration avec DSV/DIEP



## Paramecium tetraurelia Calmodulin(CaM)



Engineering new metal site specificity in EF-Hand like peptides. JBIC 8, 334 (2003)



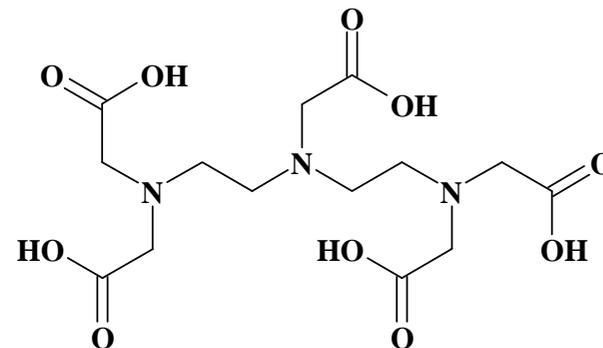
930 1240

Introduction de Ca → pics à 930 et 1240 m/z compatible avec un complexe 1-1 Ca-calmoduline

$K_d = 30 \mu M$  (en accord avec DC)



## Etudes



DTPA :acide diéthylène triaminepentacétique

Comprendre les interactions entre le DTPA (décorporant) et les radionucléides

## Objectifs

Détermination

- de la stœchiométrie,
- de la constante de complexation
- de la première sphère d'hydratation et
- des paramètres thermodynamiques  $\Delta G, \dots$

via une triple corrélation :

**chimie - techniques spectroscopiques - modélisation**

**Collaboration avec DEN/DPC/SCP**

→ *In fine* démarche générique



Saclay

## SPECTROFLUORIMETRIE LASER A RESOLUTION TEMPORELLE

## Sphère d'hydratation et structure

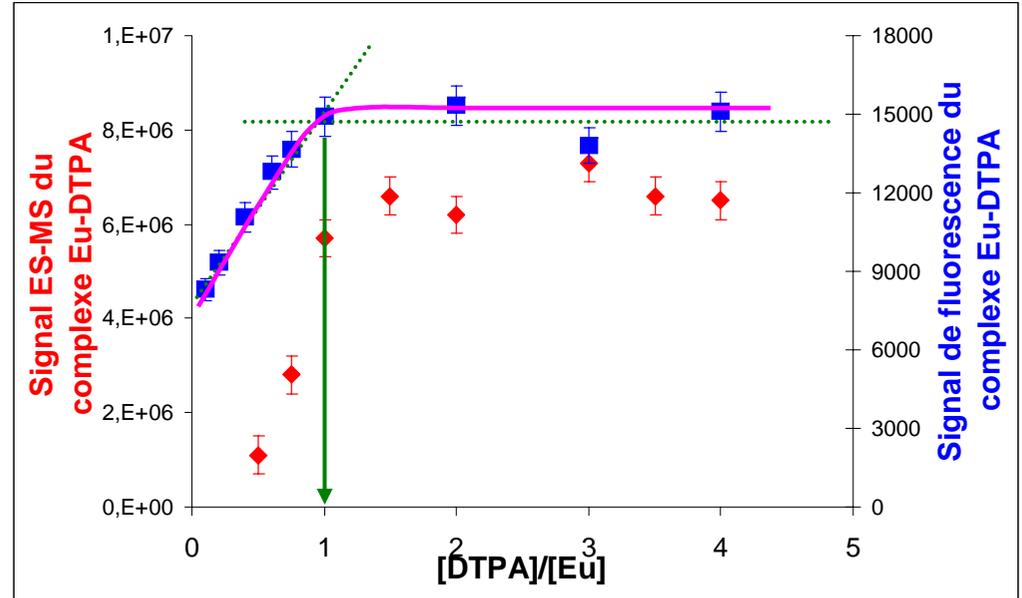
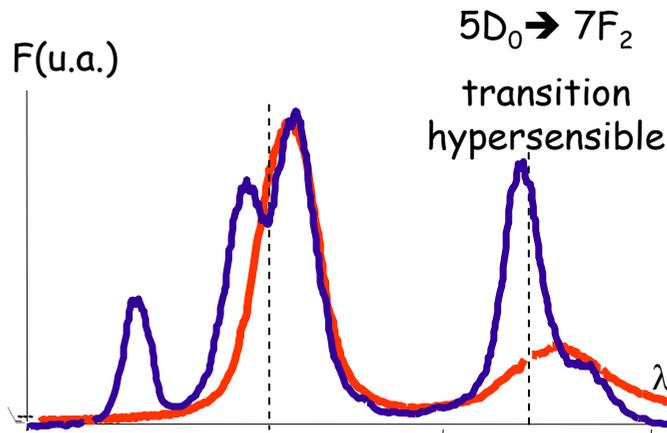


9 molécules  $\text{H}_2\text{O}$   
Structure symétrique

Eu-DTPA (pH 4)  $\tau = 550 \mu\text{s}$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1/\tau - 0.6 \quad \downarrow$$

1 molécule  $\text{H}_2\text{O}$   
Structure dissymétrique



Stœchiométrie 1-1

Régression non linéaire

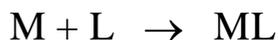
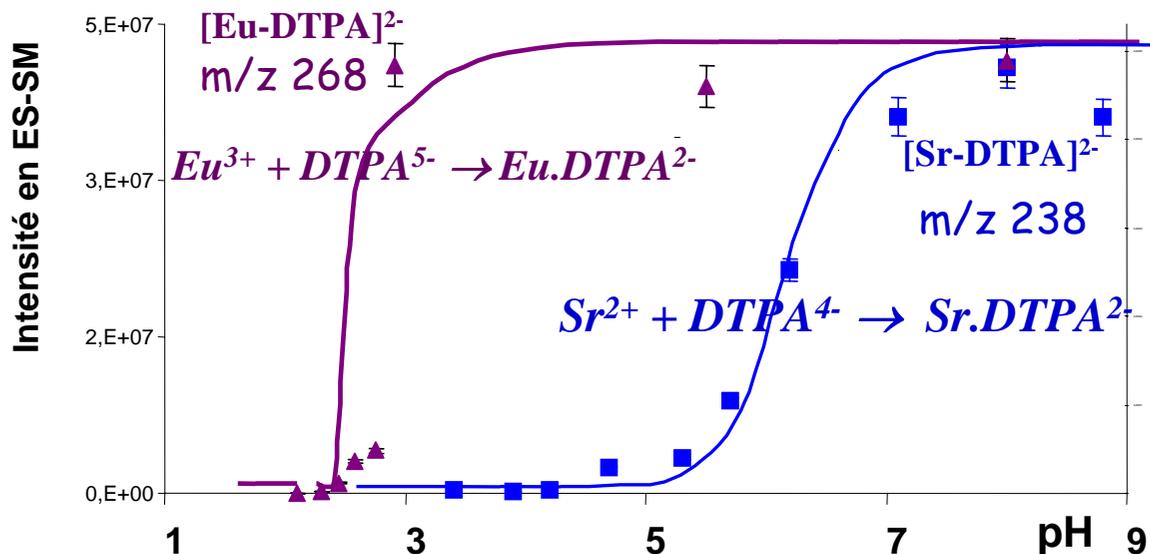
Détermination de la constante de complexation  $10^{22}$



Saclay

# ELECTROSPRAY SPECTROMETRIE DE MASSE

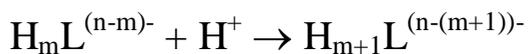
De la  $\phi$  gazeuse à liquide



$$K_{ML} = [ML] / [M] [L]$$



$$K_{MHL} = [M] [HL] / [MHL]$$



$$K_{m+1}^H = [H_{m+1} L^{(n-(m+1)-)}] / [H_m L^{(n-m)-}] [H^+]$$

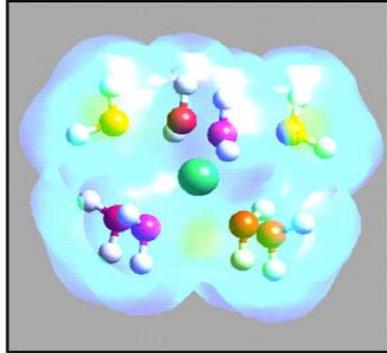
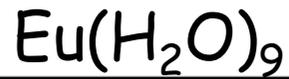
**Corrélation équilibres chimiques et ions détectés en phase gazeuse**  
**→ importance pour des systèmes complexes ou inconnus**

*On the complementary nature of ES-MS and TRLIF for Eu-DTPA speciation studies. Applied Spectro. (Sept 2003).*

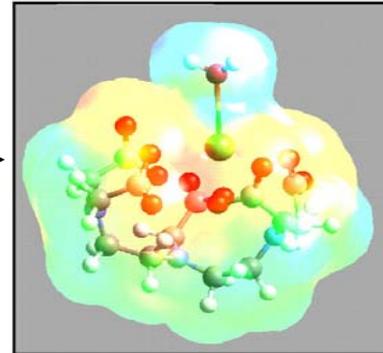
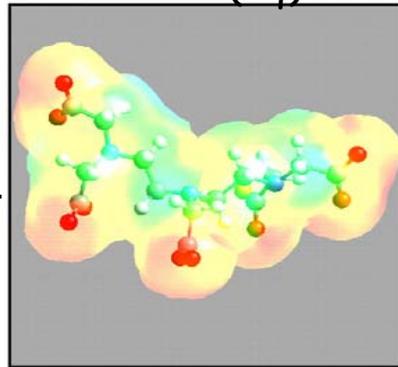


Saclay

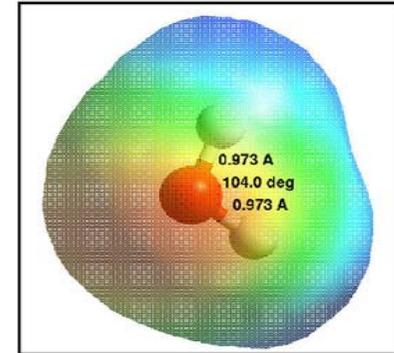
# Eu-DTPA phase solvatée : modélisation et spectroscopie



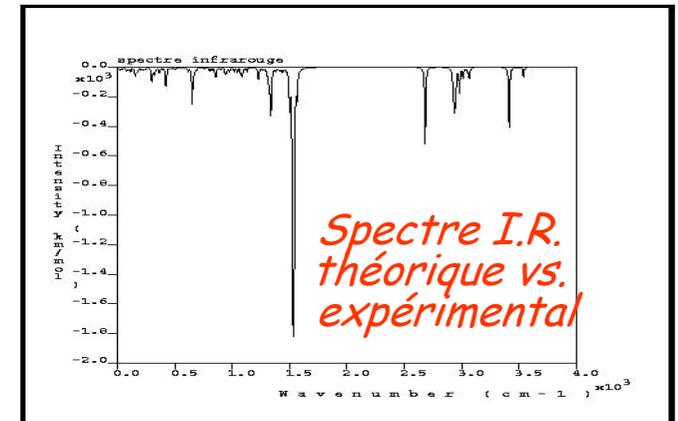
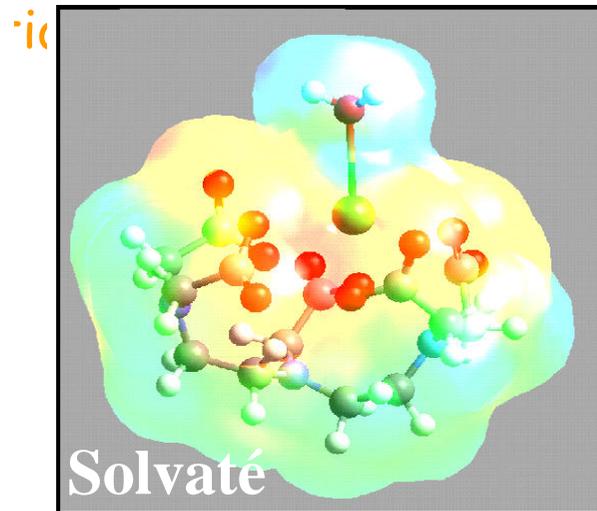
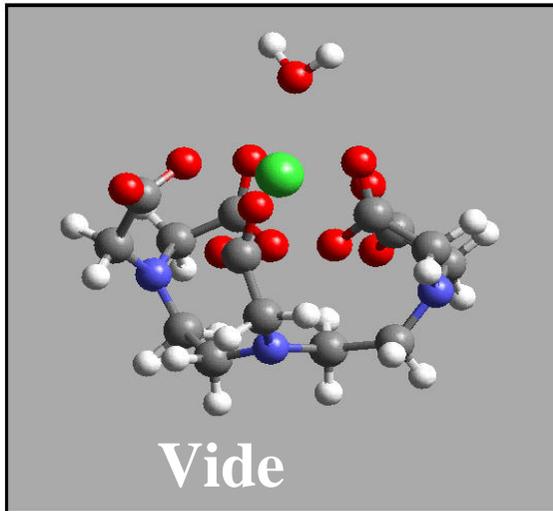
+



+ 8



Approche thermodynamique avec calculs ab initio (J.L. Flèche)



Hydratation en SLRT  
K en SLRT et ES-SM

# Conclusions

La spéciation au niveau du  $\mu\text{M}$  est atteinte

Le couplage techniques séparatives - ICP/MS  
doit permettre d'atteindre la nanospéciation (nM)

La modélisation est un atout supplémentaire  
pour une approche générique

*Poursuite sur des systèmes de plus  
en plus complexes avec d'autres ML, PF, RN*



Saclay

## Remerciements

*Substances humiques* : G. Plancque, B. Amekraz, V. Moulin et UMR Evry

*Spéciation U* : I. Laszak, J.G. Decaillon

*Substances humiques - U et I* : B. Amekraz, V. Moulin, P. Reiller

*DTPA - Eu* : B. Amekraz, E. Ansoborlo, J.L. Flèche, V. Steiner, G. Plancque

*Norbadiolone - Cs* : M. Desage, T. Le Gall, C. Miokowski, B. Amekraz

*Peptide - Ln/Ca* : L. Le Clainche, C. Vita, B. Amekraz, G. Plancque, G. Peltier

*Communauté européenne (IV et V PCRD), Toxicologie Nucléaire (DSV),*

*DEN/Maîtrise des Risques, DEN/DSOE R&D de base*