

50376
1987
157

50376
1987
157

N° d'ordre: 737

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

JEAN-PAUL EBENGA



SYNTHESE ET CARACTERISATION D'UN MODELE ORIGINAL DE
SUBSTANCE HUMIQUE

Thèse corrigée après avis du jury

Soutenue le 16 Juillet 1987 devant le jury composé de

Mme	F.	ERB	Président
MM.	M.	DORE	Rapporteur
	J.P.	CATTEAU	Rapporteur
	A.	LABLACHE-COMBIER	Rapporteur
	M.	IMBENOTTE	Examineur
	J.	POMMERY	Examineur

A la mémoire de ma mère APENDI Thérèse

A mon père BAMONIME - AYOUBA François

*A mes filles EBENGA-APENDI Isabelle
EBENGA-APENDI Adeline
EBENGA-APENDI Charyse*

A ma femme BARALONGA-OGNONGO Thérèse qui m'a souvent encouragé. Que le terme de ce travail soit l'expression de notre réussite.

A mes frères et soeurs qui m'ont aidé matériellement, et sans oublier à tous mes amis

Témoignage d'affection

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire du Département Toxicologie-Hydrologie-Hygiène que dirige Madame le Professeur F. ERB à la Faculté de Pharmacie - Université du Droit et de la Santé de LILLE II.

Je tiens à lui exprimer ma profonde et sincère gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, proposé ce sujet qui m'a conduit à utiliser diverses techniques spectrométriques et électrochimiques, et fait l'honneur de présider ce jury. Qu'elle soit remerciée pour l'intérêt constant qu'elle a manifesté tout au long de ce travail et pour les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer.

Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de LILLE I et du Laboratoire de Chimie Organique-physique (LA CNRS n° 351), en acceptant d'être mon Directeur de thèse et Rapporteur, m'a facilité la préparation d'un Doctorat ès Sciences Physiques. Je suis très honoré de sa présence dans ce jury et qu'il trouve ici, l'expression de ma très profonde reconnaissance et de mes très vifs remerciements.

Je remercie vivement Monsieur M. DORE, Directeur du Laboratoire de Chimie de l'Eau et des Nuisances, Professeur à l'Université de POITIERS, pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury, malgré ses nombreuses charges universitaires.

Que Monsieur J.P. CATTEAU, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de LILLE I, trouve ici l'expression de ma très sincère reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail à travers la collaboration et les discussions fructueuses que nous avons eues.

Je suis redevable à Messieurs M. IMBENOTTE et J. POMMERY, respectivement Maître-Assistant et Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie - Université de LILLE II, pour avoir examiné ce travail. Leur goût de la perfection et leur rigueur m'ont permis de mener à terme cette étude relative aux substances humiques. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance et de mes vifs remerciements.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire avec lesquels une ambiance chaleureuse a toujours existé, en particulier Madame Christine GONTIER qui, avec soin et beaucoup de patience, m'a énormément aidé dans la dactylographie et la mise en page de ce mémoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I <i>LIMITES ACTUELLES DANS LA CONNAISSANCE DE LA STRUCTURE ET DES PROPRIETES COMPLEXANTES DES SUBSTANCES HUMIQUES</i>	4
1. Rappels sur les différentes origines des substances humiques	5
2. Rappels sur les interactions en milieu hydrique	7
3. Détermination des paramètres complexants: méthodes analytiques, approches théoriques couramment employées et leurs limites	9
4. Rappels sur la composition structurale des substances humiques	44
5. Essais de modélisation	53
6. Conclusion: insuffisance de caractérisation	56
CHAPITRE II <i>DEFINITION D'UNE DEMARCHE ANALYTIQUE: APPLICATION A UN MATERIEL HUMIQUE EXISTANT</i>	57
1. Choix des méthodes pour la caractérisation structurale	59
2. Méthodes électrochimiques et mathématiques retenues pour l'étude des propriétés complexantes	68
3. Application à l'acide humique FLUKA (AHF)	83
CHAPITRE III <i>PREMIER ESSAI DE MODELISATION: SYNTHESE A PARTIR DE L'HYDROQUINONE</i>	109
1. Procédé de synthèse	110
2. Caractérisation du modèle humique hydroquinone (MHH)	112

CHAPITRE IV PRESENTATION D'UN MODELE HUMIQUE ORIGINAL OBTENU PAR SYNTHESE A PARTIR DE L'ACIDE GENTISIQUE	129
1. Mode opératoire pour la synthèse du modèle humique gentisique (MHG)	130
2. Caractéristiques structurales	132
3. Proposition de l'étape initiale du mécanisme de synthèse	150
4. Propriétés complexantes	159
CONCLUSION GENERALE	173
LEXIQUE	177
TRAVAUX PUBLIES ET COMMUNIQUES	178
ANNEXE	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181
TABLE DES MATIERES	198

INTRODUCTION

Les substances humiques représentent 60 à 80% de carbone organique dissous dans les eaux de surface. Cette abondance rend nécessaire leur élimination au cours des traitements de potabilisation de l'eau. Les études entreprises sur ce type de macromolécules ont montré que:

- leur élimination n'est que très partiellement réalisée au cours de différentes étapes de traitement de l'eau
- elles constituent des précurseurs de composés organohalogénés potentiellement toxiques qui se forment lors de la désinfection de l'eau par chloration
- elles interagissent avec les polluants pour former des complexes solubles, colloïdaux ou particulaires, eux-mêmes difficilement éliminables.

Leur rémanence après traitement a conduit les Chimistes à essayer de préciser la structure et les interactions en milieu hydrique de ces molécules. Malheureusement, l'absence de molécule humique de référence a retardé cette démarche. Elle nous a conduit à constater, dans le premier chapitre de ce mémoire, une dispersion des données favorisée par le manque de rigueur dans l'utilisation des moyens d'investigation analytique.

Le recours à des composés humiques de "référence" (ALDRICH ou FLUKA) a été envisagé dans un premier temps. Cependant, la faible représentativité de tels matériaux ne fait que contribuer à entretenir une confusion dans l'interprétation des résultats, certains auteurs allant même jusqu'à dénoncer leur utilisation pour des études de caractère fondamental (MALCOLM et Mc CARTHY, 1986).

Pour ce qui nous concerne, dans le deuxième chapitre de ce mémoire, nous définissons une démarche analytique qui est appliquée au matériel humique FLUKA, afin d'apprécier les limites de sa représentativité et de justifier ainsi la synthèse d'un modèle humique nouveau.

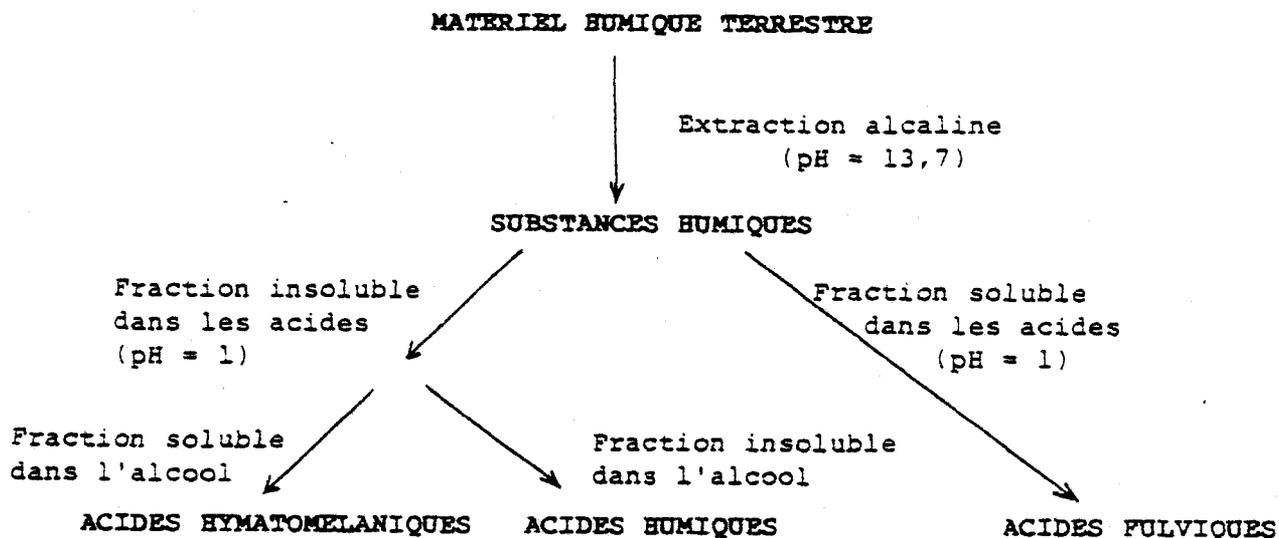
Pour cette synthèse, le choix de la molécule de départ s'est fait en tenant compte des connaissances de base sur la structure des substances humiques: structure polyphénol qui nous a conduit à une première tentative à partir de l'hydroquinone. Nous décrivons, dans le troisième chapitre de ce mémoire, le procédé retenu et les caractéristiques structurales et complexantes du matériau obtenu.

Le contrôle du mécanisme de synthèse et l'importance des fonctions carboxyliques nous ont amené à reconsidérer le protocole de cette synthèse et à l'appliquer à l'acide gentisique pour l'élaboration d'un modèle original que nous caractérisons dans le quatrième chapitre de ce mémoire.

CHAPITRE I

**LIMITES ACTUELLES DANS LA CONNAISSANCE DE LA STRUCTURE ET DES PROPRIETES
COMPLEXANTES DES SUBSTANCES HUMIQUES**

Le terme "substances humiques" était, à l'origine, employé pour désigner les matériaux organiques résultant de l'évolution et de la dégradation des végétaux, extraits des sols à l'aide de solutions aqueuses alcalines. KONONOVA (1966) propose un schéma d'extraction et de classification de ces substances suivant leur solubilité à différents pH:



Cette classification illustre non seulement les différents stades d'évolution des substances humiques, mais également leur différence d'origine.

1- RAPPELS SUR LES DIFFERENTES ORIGINES DES SUBSTANCES HUMIQUES

Parmi toutes les hypothèses concernant l'origine des substances humiques, celles émises par MINDERMAN (1979) sont les plus complètes.

Dégradation des plantes

La lignine des plantes mortes réagit avec les protéines de la flore du sol pour donner naissance à un complexe lignoprotéique stable.

Synthèse bactérienne utilisant les cellules végétales

Les microorganismes forment, à partir des tissus végétaux, des composés polymérisés qui sont libérés dans l'environnement après leur mort.

Polycondensation chimique

Les petites molécules issues de la dégradation des tissus végétaux sont utilisées par des microorganismes comme source d'énergie nécessaire à leur métabolisme. Il se forme des produits résiduels tels des phénols et des acides aminés qui, excrétés dans l'environnement, sont soumis à des oxydations chimiques, des polymérisations et des polycondensations diverses.

Substances résultant du métabolisme des plantes

Certaines substances synthétisées par les cellules des plantes ne sont utilisées par ces dernières qu'en très petite quantité. On les appelle "substances du métabolisme secondaire". Ces produits, complexes par définition, s'accumulent dans l'environnement.

Cas des substances humiques d'origine aquatique

Les substances humiques, qui sont responsables de la coloration brun-jaune des eaux de surface (REUTER et PERDUE, 1977) peuvent, soit se former directement dans l'eau par décomposition des microorganismes (partie autochtone), soit provenir du lessivage et de l'érosion des sols (partie allochtone).

La diversité dans l'origine des substances humiques va se traduire par une très grande variabilité de leur structure. Celle-ci va en effet dépendre de la végétation, de la population et de l'activité microbiennes, des conditions d'humidité et de température, des caractéristiques physico-chimiques des sols, des sédiments et des eaux. Cependant, la caractérisation des substances humiques aquatiques a surtout été envisagée du point de vue de leurs interactions avec les micropolluants organiques et minéraux de l'environnement. Il nous a donc semblé opportun de rappeler quelles sont ces interactions et les moyens analytiques de leur mise en évidence.

2- RAPPELS SUR LES INTERACTIONS EN MILIEU HYDRIQUE.

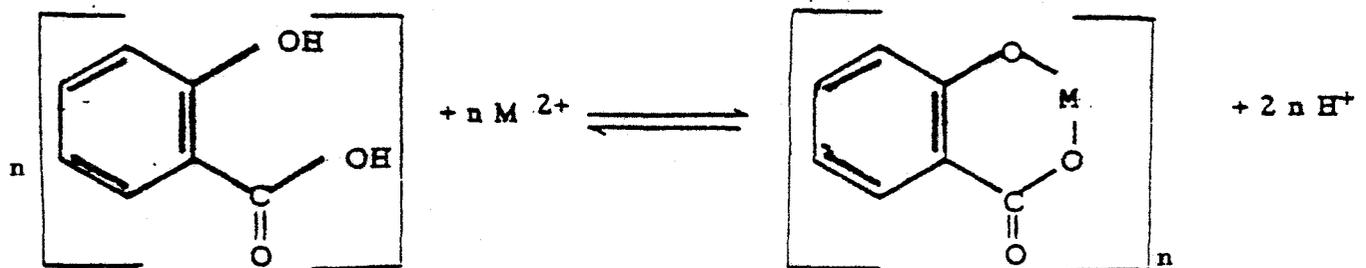
Les substances humiques établissent soit directement, soit par l'intermédiaire de substances particulières (argile: kaolinite et montmorillonite) des interactions avec les micropolluants organiques (MALLEVIALLE, 1974; CARLBERG et MARTINSEN, 1982) et minéraux (BUFFLE, 1977). Nous ne rappellerons ici que celles se produisant en milieu parfaitement soluble et relatives aux ions minéraux. Nous distinguerons dans ce domaine, les interactions pouvant s'établir par des sites spécifiques (la plupart) et conduisant à une véritable complexation, de celles qui résultent des propriétés "particulières" à la molécule humique et se traduisant par une complexation "non spécifique".

2.1- Complexation des cations métalliques

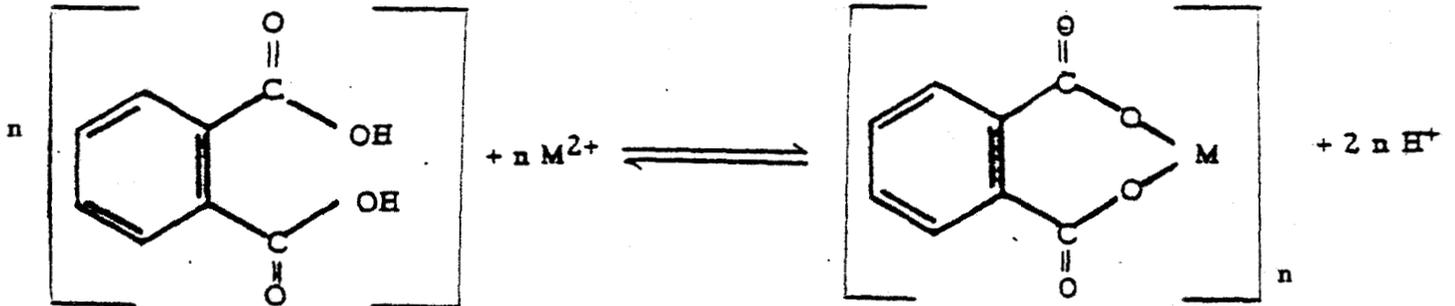
SCHNITZER et SKINNER (1965) ont mis en évidence la participation des groupements fonctionnels carboxyle et hydroxyle dans la complexation des cations métalliques, par blocage sélectif de ces groupements:

- hydroxyle de type phénol et alcool, effectué par acétylation des substances humiques au moyen de l'anhydride acétique
- hydroxyle de type phénol et carboxyle, par méthylation
- phénol. Les substances humiques subissent d'abord une méthylation, puis les groupements carboxyle sont déméthylés par saponification, suivie d'une acidification du milieu réactionnel
- hydroxyle et carboxyle par acétylation et méthylation
- carboxyle par estérification.

Les résultats de cette étude ont montré que les groupements hydroxyle de type alcool n'interviennent pas dans la complexation des cations métalliques alors que ceux de type phénol et carboxyle réagissent selon le mécanisme:



Les cations métalliques sont également complexés par l'intermédiaire de deux groupements carboxyle situés en ortho sur un noyau aromatique:



Ces deux processus de complexation des cations métalliques par les substances humiques conduisent à penser qu'il existe deux types de sites simples (salicylique et phtalique), par l'intermédiaire desquels se forment des complexes [substances humiques - cations métalliques]. GAMBLE et coll. (1970), STEVENSON (1976) et BOYD et coll. (1981) ont confirmé l'existence de tels sites en déterminant la variation des constantes de stabilité des complexes [substances humiques - cations métalliques] suivant le degré d'ionisation des substances humiques, ou en examinant par spectrométrie de résonance paramagnétique électronique leur liaison avec les ions métalliques. Les valeurs des constantes de stabilité et la nature des liaisons sont en effet comparables à celles obtenues pour des composés organiques présentant des sites bidentates du type salicylate et phtalate. FRIMMEL et GEYWITZ (1983), en étudiant la complexation du cuivre par des substances humiques aquatiques, montrent la participation des groupements fonctionnels oxygénés de type hydroxyle et carboxyle.

2.2- Autres types d'interactions

Les interactions substances humiques - cations métalliques ne se limitent pas seulement à celles établies par des groupements fonctionnels porteurs de l'hétéroatome oxygène. En effet, la complexité structurale de ces molécules laisse supposer l'intervention d'autres processus:

-interaction avec d'autres hétéroatomes, tels l'azote et le soufre (FRIMMEL et GEYWITZ, 1983; HULJEV et STROHAL, 1983)

-simple phénomène de physisorption

-saturation de la coordinence du métal dans une structure de type chélate (figure I₁). Ceci peut nécessiter le repliement de la molécule, qui peut alors, dans cette conformation, piéger des cations métalliques. Cette possibilité de déformation de la molécule humique est tout à fait

Les sites d'interaction

Leur nature (groupements fonctionnels) permet de préciser la forme chimique des métaux. Leur nombre renseigne sur la stoechiométrie des complexes formés.

Dans le domaine des substances humiques, diverses méthodes analytiques ont été utilisées dans la détermination de ces paramètres. En se référant aux travaux de NEUBECKER et ALLEN (1983), on distingue celles qui font appel à une séparation préalable des espèces chimiques (dialyse, chromatographie par perméation de gel, échange d'ions) de celles qui déterminent directement dans le milieu, la concentration en métal libre ou complexé (méthodes électrochimiques: polarographie - électrode sélective).

3.2- Méthodes analytiques non électrochimiques

La dialyse et la chromatographie par perméation de gel sont souvent combinées à la spectrophotométrie d'absorption atomique pour la détermination de la concentration en métal total dans chaque fraction. Les inconvénients inhérents à ces deux techniques sont:

- pour la dialyse: le temps très long nécessaire pour réaliser la séparation, les grands volumes d'échantillons, les possibilités de rétention du métal sur la membrane

- pour la chromatographie par perméation de gel: les déplacements d'équilibre entre le métal et le ligand, ainsi que l'adsorption de petites molécules de ligand, pouvant entraîner une perturbation dans la répartition des formes libres et complexées des métaux.

Récemment, BECHER et coll. (1983) ont étudié les performances de la chromatographie liquide haute performance combinée à la spectrophotométrie d'absorption atomique. Là encore, la taille moléculaire relativement importante des substances humiques, les phénomènes d'adsorption sur colonne, sont les principaux facteurs limitatifs.

La méthode par échange d'ions (VANDENBERG et KRAMER, 1979) utilise plus couramment le dioxyde de manganèse MnO_2 , considéré comme un faible échangeur d'ion minéral. Cette méthode consiste en l'introduction du MnO_2 dans l'échantillon. Les ions métalliques libres vont s'adsorber sur MnO_2 . La constante de liaison entre les ions métalliques libres et

MnO₂ est suffisamment forte pour lier les ions libres mais pas suffisamment pour rompre les liaisons métal - ligand. Cette méthode est applicable même aux faibles concentrations de ligand. Cependant, ses limites résident en un échange non linéaire lorsque la concentration en métal augmente et en l'adsorption du ligand et du complexe métallique sur MnO₂.

3.3- Méthodes électrochimiques

La polarographie et la potentiométrie par électrode sélective permettent la détermination respectivement des concentrations et des activités en cations métalliques libres. Comme l'a établi HART (1981), elles possèdent les qualités de:

- sélectivité vis-à-vis de l'élément analysé
- faible limite de détection, permettant l'utilisation dans une gamme de très faibles concentrations (10^{-5} - 10^{-8} M)
- rapidité

qui les situent parmi les méthodes les plus performantes dans le domaine de la détermination des paramètres complexants.

3.3.1- Méthodes polarographiques

O'SHEA et MANCY (1976) ont montré les avantages de l'exploitation des mesures polarographiques (figure I₂ et I₃) dans l'étude des phénomènes de complexation des métaux par les ligands dissous dans un milieu aqueux:

- la mesure du potentiel de pic (E_p) relatif à l'élément analysé. La valeur de ce potentiel de pic permet de différencier pour l'élément analysé, l'état libre de l'état complexé
- la mesure du courant de pic (i_p). L'intensité de ce courant est proportionnelle à la concentration en métal libre au niveau de l'électrode
- la détermination simultanée du potentiel de pic (E_p) et du courant de pic (i_p). Ceci permet de distinguer l'état libre de l'état de complexe labile de l'élément analysé
- le dosage de la molécule complexante par l'élément complexé. Ceci permet de différencier les complexes labiles des complexes non labiles.

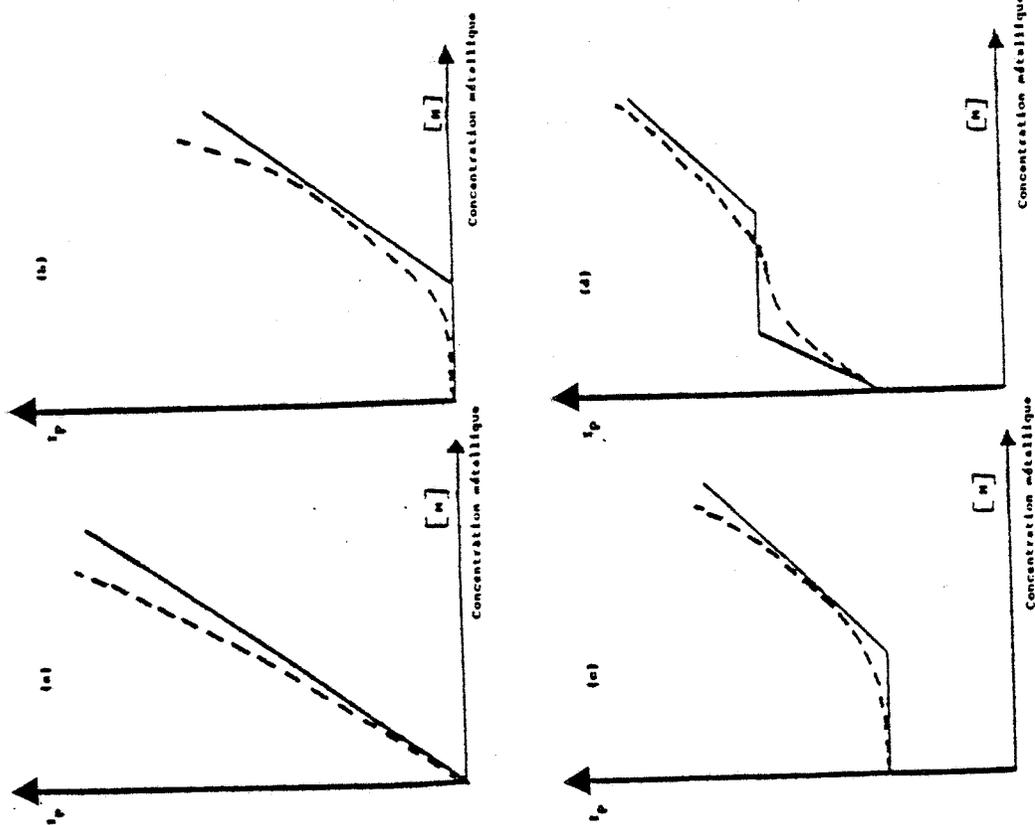


Figure 12 : Courbes obtenues pour le dosage d'un ligand par un métal

- (a) en présence de métal libre ou sous forme de complexes labiles
- (b) cas de complexes stables non labiles
- (c) cas de complexes de faible constante de stabilité mais non labiles
- (d) établissement de complexes stables et labiles suivi de la formation de complexes moins stables non labiles

— Courbe de dosage théorique
 - - - Courbe expérimentale

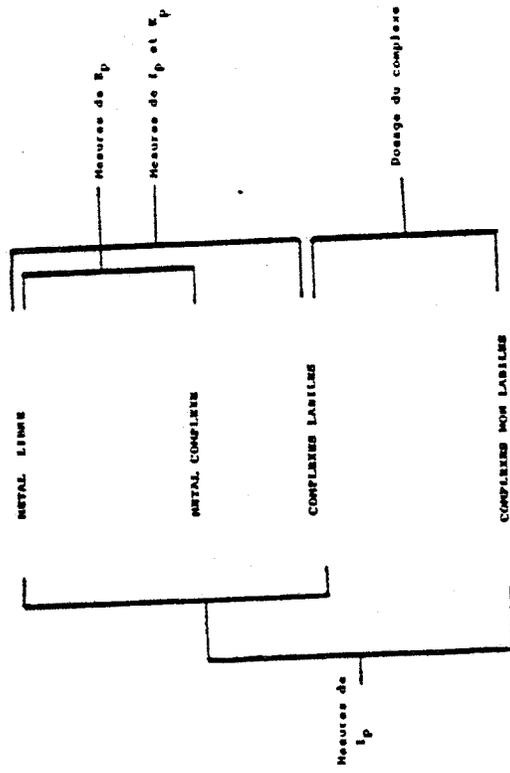


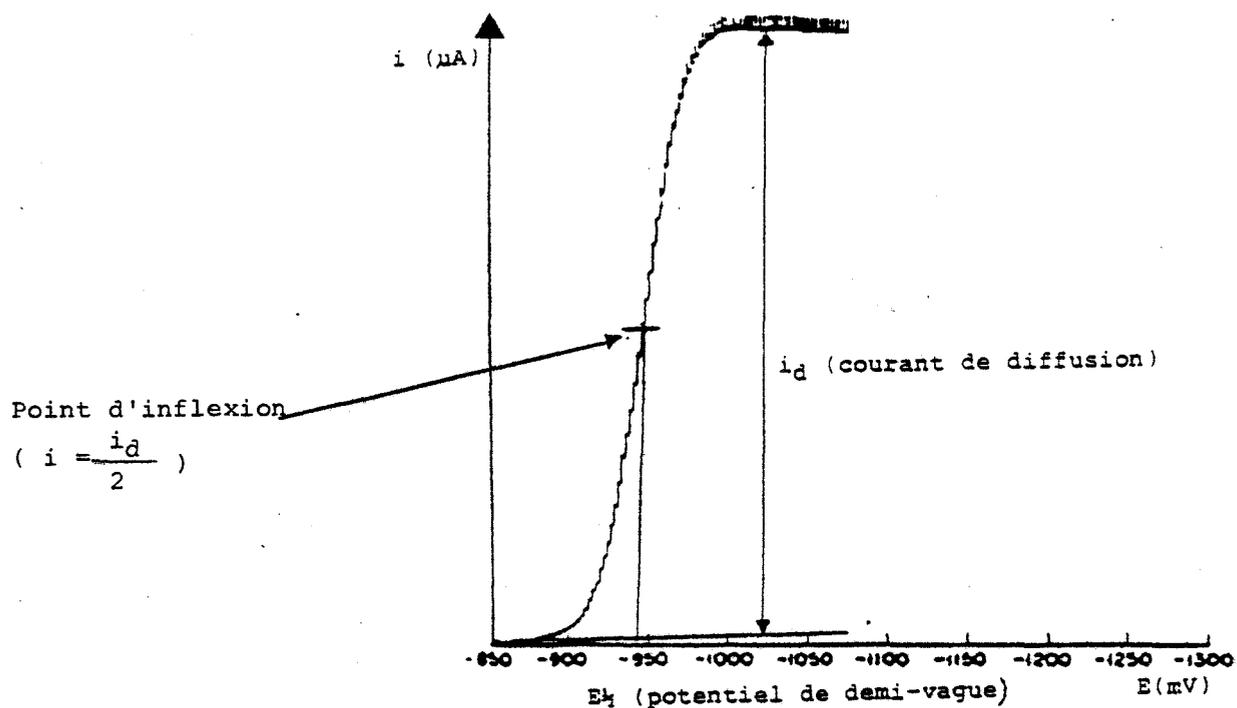
Figure 13 : Schéma des critères d'analyse pour la caractérisation en voltamétrie de redissolution anodique des formes chimiques des métaux



Les techniques polarographiques courantes sont la polarographie classique*, la polarographie différentielle pulsée* et la polarographie impulsionnelle différentielle à redissolution anodique*.

3.3.1.1- Polarographie classique à courant continu

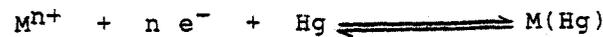
On réalise une électrolyse en appliquant une différence de potentiel uniformément croissante entre deux électrodes, dont l'une est impolarisable (électrode de référence), et l'autre essentiellement polarisable, adopte le potentiel qu'on lui impose (électrode de mesure qui est généralement constituée par du mercure s'écoulant dans un tube capillaire et qui s'en détache régulièrement sous forme de gouttes sphériques). On mesure en fonction de la différence de potentiel appliquée, le courant passant dans la solution supposée contenir un ou plusieurs éléments oxydables ou réductibles. On trace ainsi des courbes intensité - potentiel de divers éléments réagissant à l'électrode de mesure, courbes qui se présentent en forme de vague:



La hauteur des vagues est proportionnelle à la concentration de l'élément dosé. Le point d'inflexion de chaque courbe (potentiel de demi-vague) est caractéristique de l'élément.

* Cf lexique page 177

L'équation générale de la courbe intensité-potential s'exprime, en considérant la réduction d'un élément électroactif M^{n+} à l'électrode à goutte de mercure avec formation d'un amalgame, par:



Cette réaction électrochimique réversible ressemble à celle de l'oxydo-réduction: oxydant + $n e^{-}$ réducteur.

La relation entre potentiel (E) et courant (i) d'électrolyse s'écrit:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{K_{red}}{K_{ox}} + \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{i_{d,ox} - i}{i - i_{d,red}}$$

E_0 : potentiel standard de l'amalgame

K_{red} : coefficient de proportionnalité spécifique de l'élément réducteur

K_{ox} : coefficient de proportionnalité spécifique de l'élément oxydant

$i_{d,red}$: courant de diffusion de l'élément réducteur

$i_{d,ox}$: courant de diffusion de l'élément oxydant

R : constante des gaz parfaits

T : température absolue

F : constante de Faraday

n : nombre d'électrons mis en jeu pendant la réaction.

La forme réduite n'étant pas en solution mais dans l'amalgame, $i_{d,red}=0$.

Par conséquent:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{K_{red}}{K_{ox}} + \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{i_{d,ox} - i}{i}$$

Pour $E=E_{1/2}$, potentiel de demi-vague caractéristique d'un élément, on a $i = \frac{i_{d,ox}}{2}$

$$E_{1/2} = E_0 + \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{K_{red}}{K_{ox}}$$

$$\text{d'où } E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{i_{d,ox} - i}{i}$$

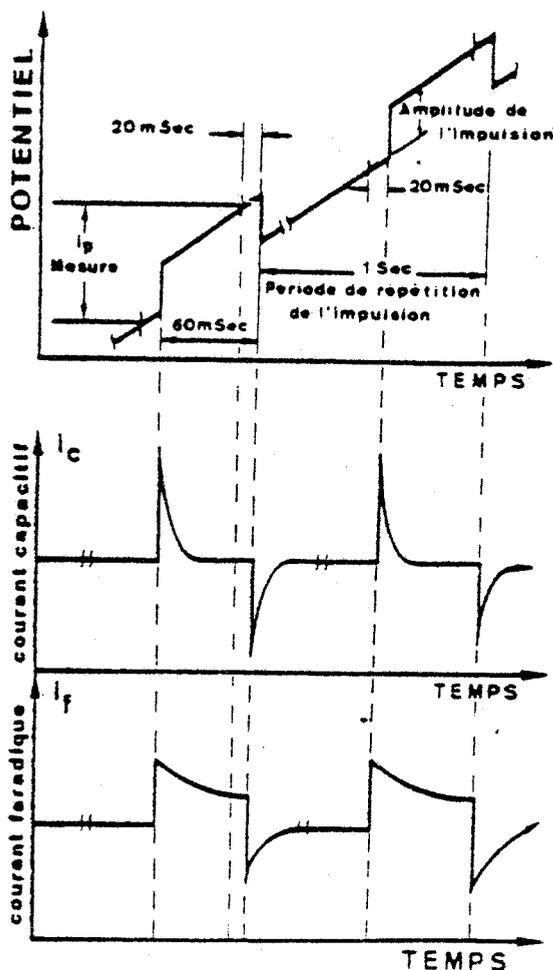
La polarographie classique peut être utilisée en analyse quantitative pour le dosage des éléments amalgamables avec le mercure, à des concentrations allant de 10^{-3} à 10^{-6} M.

3.3.1.2- Polarographie différentielle pulsée

Les conditions opératoires de la polarographie classique sont respectées, sauf en ce qui concerne l'application de tension (par impulsions) et de la mesure du courant (en discontinu).

Principe:

Contrairement à la polarographie classique où la tension est appliquée d'une façon continue, en polarographie différentielle pulsée, on surimpose des impulsions de courtes durées (60 millisecondes), répétées et périodiques (1 seconde). La mesure du courant (i) constitué de deux principales composantes que sont le courant capacitif et le courant faradique, est effectuée par différence entre le courant détecté à la fin d'une impulsion (pendant les dernières 20 millisecondes de l'impulsion) et le courant détecté avant l'impulsion (pendant les 20 millisecondes qui précèdent l'impulsion)



Ce procédé permet de réduire l'influence du courant capacitif (responsable de la faible sensibilité de la polarographie classique) qui décroît rapidement dans les premières 40 millisecondes de l'impulsion. La limite de détection en polarographie différentielle pulsée se trouve ainsi abaissée et atteint des concentrations de l'ordre de $10^{-8}M$.

Par cette technique, les vagues des courbes intensité-potential observées en polarographie classique sont remplacées par des pics symétriques. Ils sont obtenus en dérivant deux fois l'équation:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{i_{d\text{ox}} - i}{i}$$

$$\frac{dE}{di} = - \frac{RT}{nF} \left(\frac{1}{i} + \frac{1}{i_{d\text{ox}} - i} \right)$$

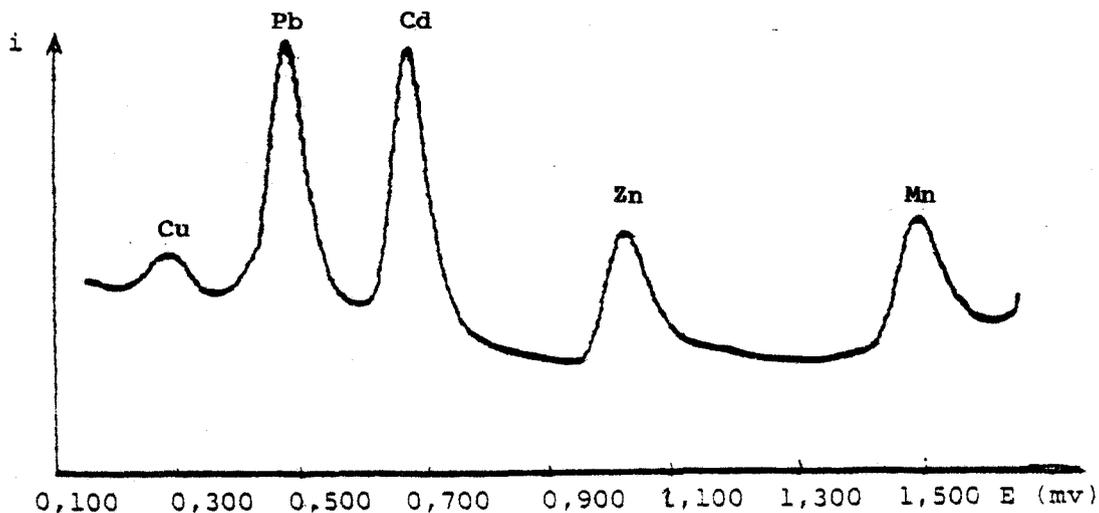
$$\frac{d^2E}{di^2} = \frac{RT}{nF} \left(\frac{1}{i^2} - \frac{1}{(i_{d\text{ox}} - i)^2} \right)$$

Pour $i = \frac{i_{d\text{ox}}}{2}$ $\frac{d^2E}{di^2} = 0$. Pour $E = E_{1/2}$ qui correspondait au point d'inflexion de la vague polarographique, la dérivée est à son extrémum et on peut donc écrire:

$$\frac{di}{dE} = - \frac{nF}{4RT} i_{d\text{ox}} = - \frac{nF K_{\text{Ox}}}{4RT} \text{Ox}_s$$

Ox_s = concentration de l'oxydant dans la solution car $i_{d\text{ox}} = K_{\text{Ox}} \cdot \text{Ox}_s$.

Le tracé de $\frac{di}{dE} = f(E)$ remplace la vague polarographique par un pic dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en solution de chacun des éléments analysés:



3.3.1.3- Polarographie impulsionnelle différentielle à redissolution anodique*

Dans ce cas, une première différence par rapport à la polarographie classique ou à la polarographie différentielle pulsée, réside dans le principe de fonctionnement de l'électrode de mesure. En effet, l'électrode de mercure ne fonctionne plus en goutte tombante*. Après sa formation à l'extrémité du capillaire, elle reste suspendue durant toute la période de l'analyse (goutte pendante)*.

Principe:

L'analyse s'effectue suivant trois étapes:

- sous agitation de la solution, la réduction des éléments électro-réductibles est réalisée à un potentiel fixe appelé potentiel de pré-électrolyse



- après arrêt de l'agitation, on laisse s'équilibrer le système tout en continuant l'électrolyse

- la redissolution de l'amalgame



s'opère en ramenant lentement le potentiel vers des valeurs positives. Ce balayage de potentiel s'effectue soit de façon continue (polarographie ou voltamétrie de redissolution anodique* soit en superposant de petites impulsions à une variation continue (polarographie impulsionnelle différentielle à redissolution anodique)*. Lorsque le potentiel approche celui du couple Red/Ox: élément électroactif / amalgame (M/M(Hg)), la redissolution commence et la mesure du courant est effectuée.

L'électrode de mesure fonctionne donc d'abord comme une cathode pour permettre la réduction des éléments analysés, puis comme anode lors de

* Cf lexique page 177

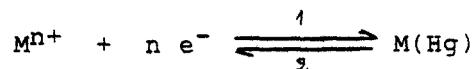
leur redissolution. Le polarogramme se présente sous forme de pics comme en polarographie différentielle pulsée et la limite de détection est de 10^{-10} M.

3.3.1.4- Applications de la PIDRA

Du fait de son meilleur seuil de détection, la PIDRA est bien adaptée à la mesure des faibles concentrations des métaux en interaction avec les substances humiques, la détermination des paramètres complexants s'effectuant à partir des mesures de variation de l'intensité de courant (i) et de potentiel de demi-vague ($E_{1/2}$).

3.3.1.4.1- Utilisation de l'intensité de courant de redissolution anodique (i) pour la détermination des concentrations en métal libre

En PIDRA, la réaction électrochimique de l'élément électroactif M^{n+} au niveau de l'électrode de mesure peut être représentée par l'équation:



Les études réalisées par SHUMAN et WOODWARD (1973; 1977), reprises par BHAT et coll. (1981), BHAT et WEBER (1982) ont montré que le courant de redissolution anodique (sens 2) peut être considéré comme proportionnel à la concentration d'un élément électroactif.

$$i = \delta \cdot [M^{n+}]$$

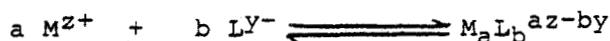
δ est une constante empirique dont la valeur dépend de la géométrie de la cellule d'analyse, de l'efficacité de la redissolution du métal amalgamé et de sa diffusion dans la goutte de mercure.

3.3.1.4.2- Utilisation des concentrations en métal libre pour le calcul de la constante conditionnelle de stabilité (K')

Dans la littérature, il existe deux types de formulation pour présenter les phénomènes de complexation. L'un est basé sur la charge anionique du ligand, sans présumer de la localisation de ses sites d'interaction avec le métal; l'autre met en jeu la compétition entre le métal et les protons labiles de certains groupements fonctionnels portés par le ligand.

Formulation faisant appel à la charge du ligand

ZUNINO et coll. (1972), pour déterminer la constante de complexation de la matière organique de l'eau vis-à-vis des cations métalliques, ont proposé une formulation basée sur la charge anionique de la molécule complexante. A l'équilibre, l'équation chimique de la réaction de complexation peut s'écrire:



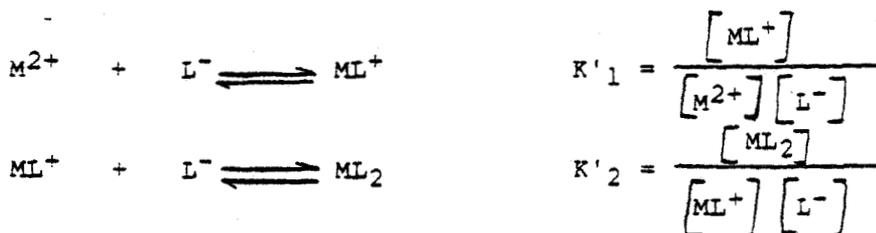
a, b et z, y : coefficients stoechiométriques et valeurs absolues des charges, respectivement du cation métallique M et de la molécule organique complexante L

$M_a L_b^{az-by}$: complexe anionique ou neutre

La constante conditionnelle de stabilité est:

$$K' = \frac{[M_a L_b^{az-by}]}{[M^{z+}]^a [L Y^{-}]^b}$$

Si le cation métallique est divalent et si la molécule présente une charge négative, K' est égale au produit des constantes des deux équilibres successifs:



$$K' = K'_1 K'_2 = \frac{[ML_2]}{[M^{2+}][L^-]^2}$$

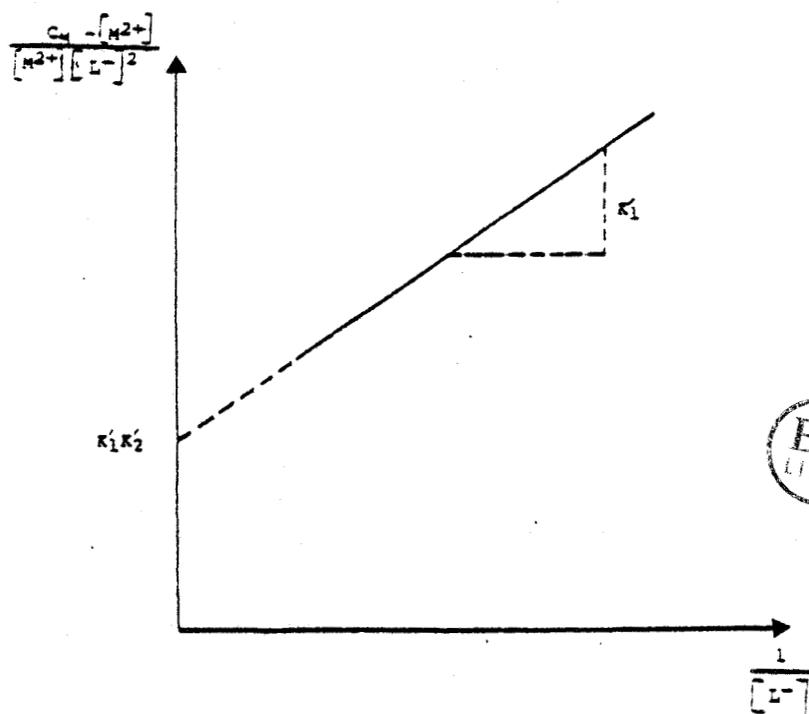
La détermination des constantes intermédiaires K'_1 , K'_2 , ... peut être préférée à celle de la constante globale K' . C'est ainsi que TAKAMATSU et YOSHIDA (1978) ont appliqué cette formulation pour déterminer les constantes conditionnelles de stabilité K'_1 et K'_2 dans le cas des complexes du cuivre, plomb et cadmium avec les acides humiques.

La concentration en métal totalement libre M^{2+} et la concentration totale C_M sont liées suivant:

$$\begin{aligned} C_M &= [M^{2+}] + [ML^+] + [ML_2] \\ &= [M^{2+}] + K'_1 [M^{2+}][L^-] + K'_1 K'_2 [M^{2+}][L^-]^2 \end{aligned}$$

$$\text{d'où } \frac{C_M - [M^{2+}]}{[M^{2+}][L^-]^2} = \frac{K'_1}{[L^-]} + K'_1 \cdot K'_2$$

Le tracé de la droite $\frac{C_M - [M^{2+}]}{[M^{2+}][L^-]^2} = f\left(\frac{1}{[L^-]}\right)$ permet d'obtenir les constantes K'_1 et K'_2



Mc KNIGHT et coll. (1983) ont appliqué cette formulation dans le cas des complexes [acides fulviques-cuivre] et en ayant recours à un ajustement par la méthode des moindres-carrés.

Formulation faisant intervenir la compétition entre le cation métallique et les protons de groupements fonctionnels

Dans le cas d'eaux de surface, SHUMAN et WOODWARD (1973; 1977), ont montré que l'équilibre de complexation peut s'écrire:



M : cation métallique (les charges sont omises pour simplification)

L : molécule organique complexante.

La constante de stabilité de cette réaction est:

$$K = \frac{(M_a L_b)}{(M')^a (L')^b}$$

(M') : activité du cation métallique non complexé par L

(L') : activité de la molécule organique complexante non engagée dans la réaction de complexation considérée

(M_aL_b) : activité du complexe formé

Tenant compte des conditions expérimentales (pH, température, force ionique,...), la constante conditionnelle de stabilité s'écrit:

$$K' = \frac{[M_a L_b]}{[M']^a [L']^b}$$

[M_aL_b]: concentration du complexe

[M'] = [M] + [ML_I] + [ML_{II}] + + [ML_N] : concentration du cation métallique non complexé par L, et où L_I, L_{II}, L_{III},

L_N représentent toute molécule complexante autre que L

[M] : concentration du cation métallique totalement libre

[L'] = [L] + [H₁L] + [H₂L] + ... + [H_NL] + ... + [M_IL]

+ [M_{II}L] + ... + [M_NL]: concentration de la la molécule organique non engagée dans la complexation de M

$[L]$: concentration de la molécule organique libre

$M_I, M_{II}, M_{III}, \dots, M_N$: cations métalliques autre que M,

faiblement liés à la molécule organique et déplaçables par ce dernier pendant la complexation

n : nombre de protons liés à la molécule organique et susceptibles d'être substitués par un cation métallique M pendant la réaction de complexation.

Selon ce qui précède et après avoir explicité les concentrations des éléments qui entrent dans l'expression de la constante conditionnelle de stabilité, on peut observer que la réaction de complexation consiste surtout en un échange ionique compétitif entre un cation métallique et un proton labile porté par la molécule organique.

Pour déterminer cette constante conditionnelle de stabilité, deux méthodes, basées sur des représentations graphiques, sont généralement utilisées:

- la méthode de SHUMAN et WOODWARD (1973; 1977) qui utilise la variation de la concentration en métal libre mesurée par l'intensité du courant

$$i = \delta \cdot [M']$$

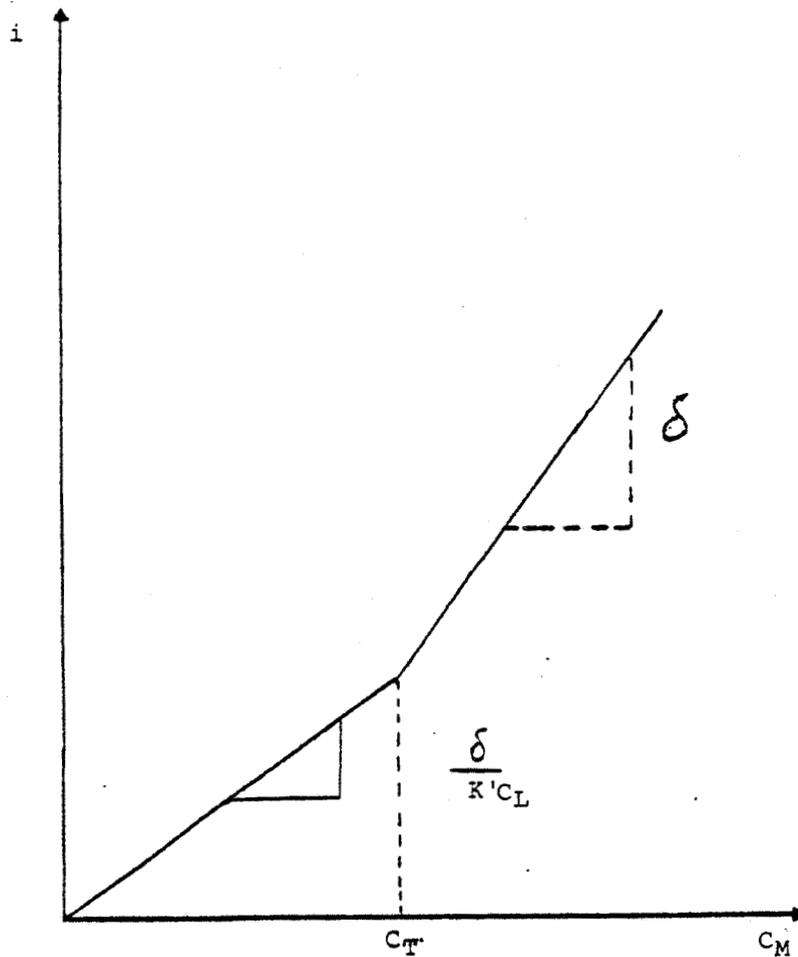
$$C_M = [M'] + a [M_a L_b] = \text{concentration totale en métal}$$

$$C_L = [L'] + b [M_a L_b] = \text{concentration totale en ligand}$$

$$K' = \frac{\frac{1}{a} \left(C_M - \frac{i}{\delta} \right)}{\left(\frac{i}{\delta} \right)^a \left[C_L - \frac{b}{a} \left(C_M - \frac{i}{\delta} \right) \right]^b}$$

Pour des complexes de stoechiométrie 1:1 $K' = \frac{\left(C_M - \frac{i}{\delta} \right)}{\left(\frac{i}{\delta} \right) \left[C_L - C_M + \frac{i}{\delta} \right]}$

La courbe $i = f (C_M)$ présente deux parties distinctes:



- une première partie où le cation métallique se trouve totalement complexé,

$$C_L > C_M$$

$$[M'] = \frac{i}{\delta} \ll C_M < C_L$$

L'expression de la constante conditionnelle de stabilité du complexe formé se réduit à:

$$K' = \frac{C_M}{\left(\frac{i}{\delta}\right) (C_L - C_M)} \quad \text{d'où} \quad i = \frac{\delta C_M}{K' (C_L - C_M)}$$



Cette partie de la courbe de complexation peut être obtenue en traçant $i = f\left(\frac{C_M}{C_L - C_M}\right)$ qui est une droite de pente égale à $\frac{\delta}{K'}$

- une deuxième partie où la concentration du cation métallique est plus importante que celle de la molécule organique complexante

$$C_M \gg C_L$$

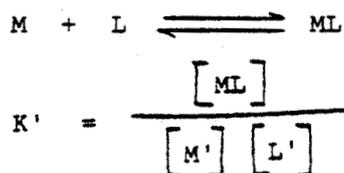
Le courant i vaut alors $\delta \cdot (C_M - C_L)$. δ peut être obtenu par la pente de la courbe $i = f(C_M)$ dans cette deuxième partie.

On peut ainsi, à partir des valeurs des pentes, déterminer aisément la valeur de la constante conditionnelle de stabilité K' .

Les deux parties de la courbe de complexation $i = f(C_M)$ sont séparées par une cassure pour une valeur $C_M = C_T$ qui représente la capacité complexante du ligand organique.

Récemment, cette méthode a été utilisée par GIANNISSIS et MARTIN (1984) dans le cadre des complexes entre l'acide humique Fluka et le cuivre.

- la méthode de RUZIC (1982) applicable à des complexes de stoechiométrie 1:1



$L_T = [L'] + [ML]$: concentration totale de ligand pouvant complexer le métal M

L' : concentration de la molécule complexante libre

$M_T = [M'] + [ML]$: concentration totale du cation métallique

$[M']$: concentration du métal libre

$[ML]$: concentration du complexe formé

$$K' = \frac{[ML]}{[M'] (L_T - [ML])}$$

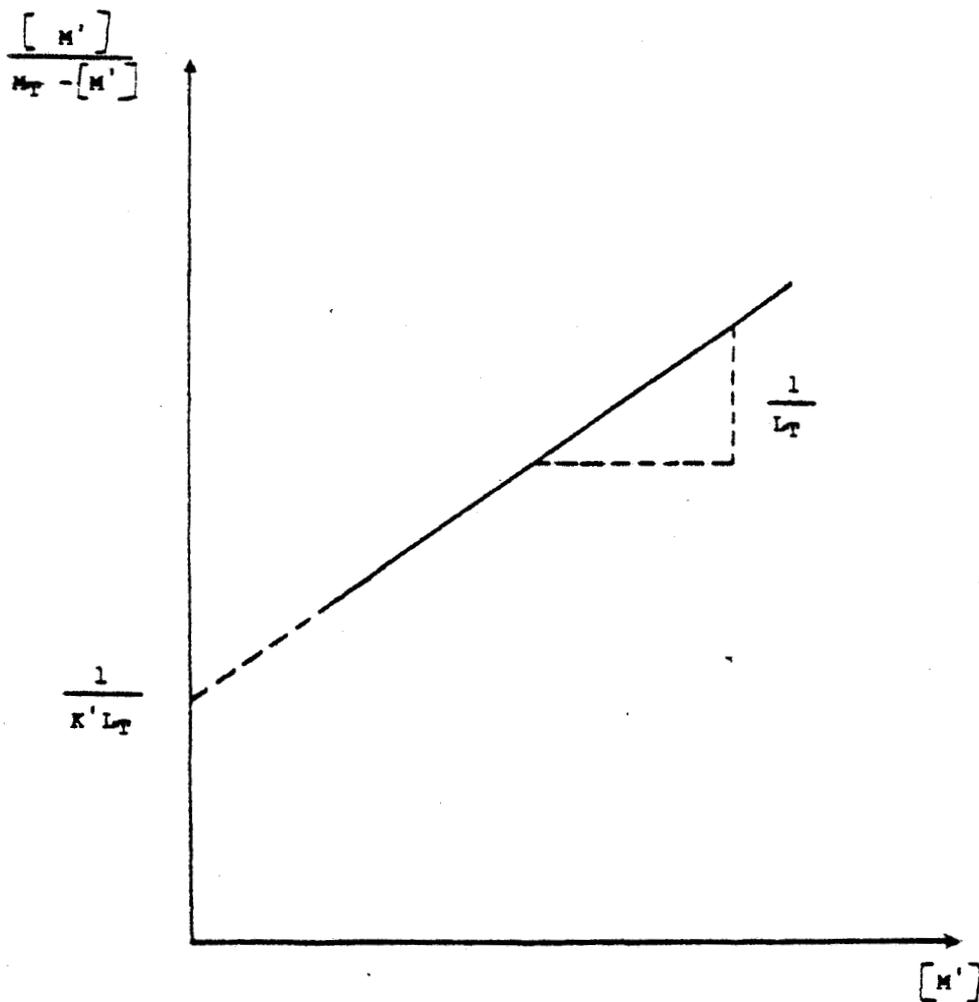
$$K' [M'] L_T - K' [ML] [M'] = [ML]$$

$$K' [M'] L_T = [ML] (1 + K' [M'])$$

$$\frac{[M']}{[ML]} = \frac{1}{K' L_T} + \frac{K' [M']}{K' L_T} = \frac{1}{K' L_T} + \frac{[M']}{L_T}$$

$$\text{d'où } \frac{[M']}{M_T - [M']} = \frac{1}{K' L_T} + \frac{[M']}{L_T}$$

Le tracé de $\frac{M'}{M_T - M'} = f([M'])$ donne une droite qui permet la détermination de la constante conditionnelle de stabilité K' et le calcul de la capacité complexante.



Cette méthode est souvent employée dans la détermination des capacités complexantes et des constantes conditionnelles de stabilité des complexes formés entre les substances humiques dissoutes dans les eaux naturelles et les ions métalliques (EL MEDNAOUI et coll., 1984; FISCHER et coll., 1984).

3.3.1.4.3- Utilisation du potentiel de demi-vague ($E_{1/2}$) pour la détermination de la constante conditionnelle de stabilité (K')

Le potentiel de demi-vague n'est pas une constante mais une caractéristique qui dépend entre autre, de l'engagement du cation dans une espèce chimique particulière, de sa relative stabilité lors de l'analyse polarographique (complexe électrolabile). LINGANE (1935) a été le premier à utiliser la variation du potentiel de demi-vague ($E_{1/2}$) pour quantifier les phénomènes de complexation. En effet, pour un élément quelconque, la variation du potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ relatif à son état libre ou complexé, est reliée à la constante de stabilité et à la concentration de la molécule complexante, par la relation:

$$\Delta E_{1/2} = (E_{1/2})_{\text{libre}} - (E_{1/2})_{\text{complexé}} = 2,303 \frac{RT}{nF} \log K' + j \cdot 2,303 \frac{RT}{nF} \log C_L$$

K' : constante conditionnelle de stabilité du complexe formé

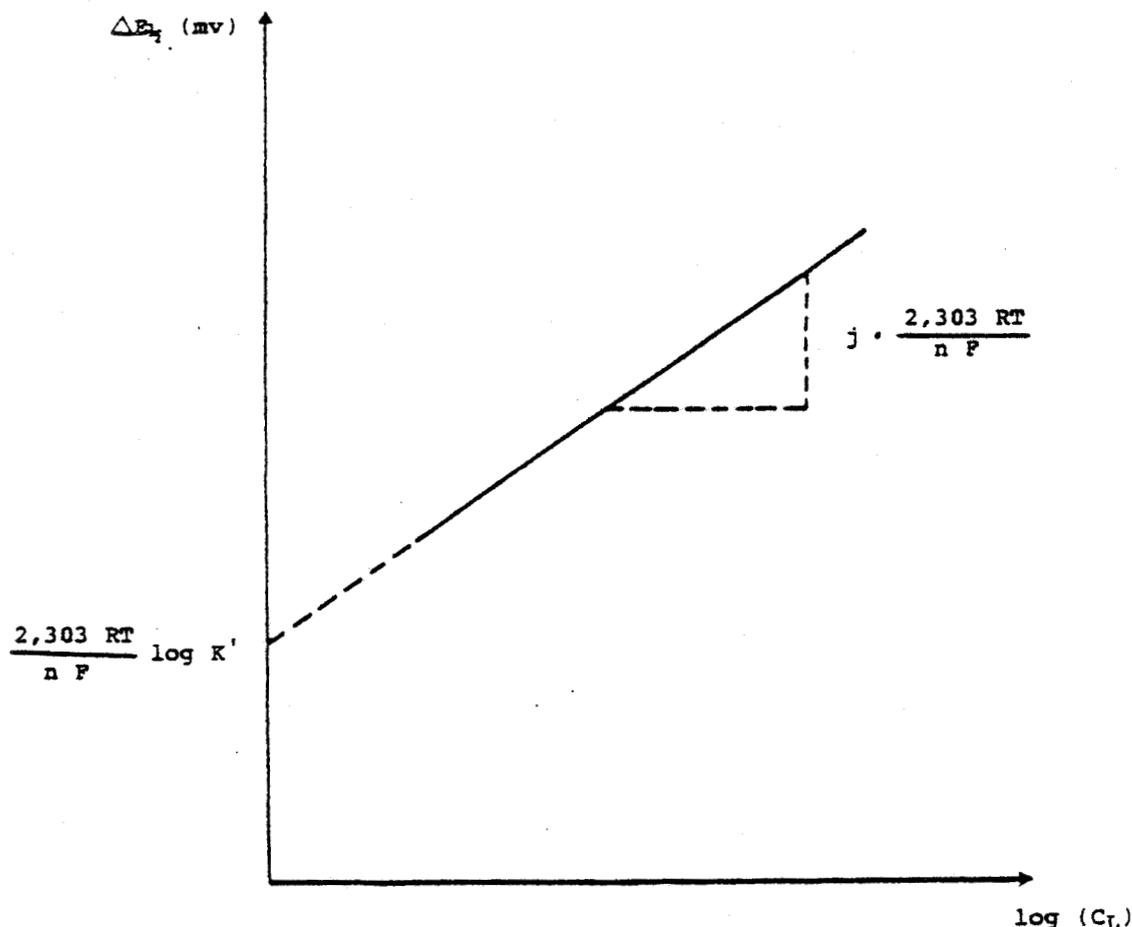
j : nombre de sites de complexation de la molécule complexante L

n : nombre d'électrons mis en jeu

C_L : concentration totale de la molécule complexante

F : constante de FARADAY.

Le tracé de la courbe $\Delta E_{1/2} = f(\log C_L)$ donne une droite dont la pente permet d'obtenir le nombre de sites j de la molécule complexante et l'ordonnée à l'origine, la constante conditionnelle de stabilité K' .



Cette variation de potentiel a été observée par WILSON et coll. (1980) et CORRALES (1984) en effectuant le dosage du cuivre par les substances humiques, sans que l'exploitation de la méthode de LINGANE ait été envisagée. Par contre, ERNST et coll. (1975) ont appliquée cette méthode pour déterminer les constantes conditionnelles de stabilité des complexes du cuivre et du plomb avec les acides humiques. Le cuivre forme des complexes plus stables que le plomb. GIANNISSIS (1986) a obtenu par cette méthode, une constante conditionnelle de stabilité de $2 \cdot 10^7 M^{-1}$ pour le complexe formé entre l'acide humique FLUKA et le cuivre. Mais c'est surtout dans le domaine des complexes minéraux que cette méthode trouve son plus grand champ d'application. Ainsi BILINSKI et coll. (1976) ont montré que les carbonates de plomb et de cuivre, qui sont les espèces minérales solubles les plus fréquentes dans le milieu aquatique naturel, ont une stabilité proche. Par contre, les carbonates et hydroxydes de zinc et de cadmium sont de faible stabilité.

Cependant l'application de l'équation de LINGANE nécessite que certaines conditions soient remplies:

- le coefficient de diffusion du complexe formé doit être le même que celui du cation métallique
- le complexe obtenu doit être électrochimiquement labile
- au sein de la solution il ne doit pas y avoir de gradient de concentration en molécule complexante
- la réduction du cation métallique doit être électrochimiquement réversible
- un seul type de complexe doit exister dans la gamme de concentrations en ligand.

3.3.1.5- Limites d'utilisation des données polarographiques

Si les méthodes polarographiques présentent de nombreux avantages dans la détermination des paramètres complexants, l'exploitation des données qu'elles fournissent, relatives à l'intensité du courant et au potentiel $E_{Red/Ox}$ d'un cation métallique étudié, ne doit cependant être envisagée qu'après avoir respecté rigoureusement quelques conditions opératoires. En effet, de nombreux travaux récents ne cessent de faire état des facteurs limitatifs des méthodes polarographiques. Le non respect de ces facteurs invalide très souvent les résultats expérimentaux.

3.3.1.5.1- Modification de la force ionique du milieu

Une modification des caractéristiques du milieu d'analyse entraîne des variations de potentiel et d'intensité du tracé polarographique. KOLTHOFF et LINGANE (1952) ont montré que ces variations dépendent de la force ionique I du milieu, définie comme:

$$I = \sum_i z_i^2 C_i$$

z_i : charge d'un ion i

C_i : concentration de l'ion i

L'équation chimique de la réduction à l'électrode d'un ion métallique M^{n+} est



Si cette réaction est réversible et très rapide par rapport à la vitesse de diffusion des ions métalliques de la solution d'analyse vers la surface de la goutte de mercure, cette dernière peut être assimilée à une électrode polarisée. Ce type particulier de polarisation est appelée "polarisation de concentration". A chaque point de la vague polarographique, le potentiel d'électrode peut s'écrire:

$$E = E_a^\circ - \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{C_a^\circ f_a}{a_{\text{Hg}} C_s^\circ f_s}$$

C_a° : concentration de l'amalgame formé à la surface de la goutte de mercure

C_s° : concentration de l'ion métallique réductible à la surface de la goutte de mercure

f_a : coefficient d'activité de l'amalgame

f_s : coefficient d'activité de l'ion métallique

a_{Hg} : activité du mercure dans l'amalgame

E_a° : potentiel standard de l'amalgame.

Puisque l'amalgame contient très peu de métal, a_{Hg} peut être prise comme égale à l'activité du mercure pur, donc assimilée à une constante.

$$E = \mathcal{E} - \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{C_a^\circ f_a}{C_s^\circ f_s}$$

$$\text{où } \mathcal{E} = E_a^\circ + \frac{RT}{nF} \text{Log } a_{\text{Hg}}$$

Etant donné que les ions métalliques atteignent l'électrode de mercure uniquement par diffusion (dans le milieu d'analyse il existe un excès d'électrolyte support), la relation qui lie le courant à la concentration de l'ion métallique peut s'écrire:

$$i = k_s (C_s - C_s^\circ)$$

C_s : concentration totale de l'ion métallique dans la solution d'analyse.

k_s : coefficient de proportionnalité.

C°_s diminue lorsque le courant augmente. A la valeur maximale du courant de diffusion i_d , C°_s est très petit et négligeable devant C_s .

$$id = k_s \cdot C_s$$

$$C^{\circ}_s = C_s - \frac{i}{k_s} = \frac{id - i}{k_s} = C_s \frac{id - i}{id}$$

Pour $i = \frac{id}{2}$, $C^{\circ}_s = \frac{C_s}{2}$

D'autre part , $C^{\circ}_a = \frac{i}{k_a}$ où

k_a est un coefficient de proportionnalité qui dépend de la diffusion du métal réduit dans l'amalgame.

$$E = \mathcal{E} - \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{f_a k_s}{f_s k_a} - \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{i}{id - i}$$

Le potentiel de demi-vague est

$$E_{1/2} = \mathcal{E} - \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{f_a k_s}{f_s k_a}$$

d'où $E = E_{1/2} - \frac{0,0591}{n} \log \frac{i}{id - i}$

Ces relations montrent que le potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ dépend du coefficient d'activité f_a du métal dans l'amalgame et du coefficient d'activité f_s de l'ion métallique dans la solution d'analyse. f_a est pratiquement égal à 1 car l'amalgame formé sur la goutte de mercure est en très faible quantité et $f_s \ll 1$ en raison de l'électrolyte support. La plus ou moins grande valeur de f_s dépendra donc de la valeur de la force ionique I du milieu d'analyse, dont les variations entraîneront inévitablement des modifications du potentiel de demi-vague. La position des polarogrammes est donc bien liée à la force

ionique du milieu d'analyse.

Ceci montre que la méthode de dosage complexométrique par ajout dosé, proposée par certains auteurs (EL MEDNAOUI et coll., 1984; CORRALES, 1984), ne peut être envisageable que lorsque l'électrolyte support du milieu d'analyse a une force ionique suffisamment élevée pour que les ajouts métalliques ne la modifient pas. Il convient donc de choisir la force ionique de telle façon qu'un compromis soit trouvé entre l'absence de complexation de la part de l'électrolyte support et la constance de cette force ionique au cours de l'analyse.

3.3.1.5.2- Existence de phénomènes d'adsorption au niveau de l'électrode

De nombreux travaux ont montré que l'électrode de mesure est souvent le siège de diverses réactions qui entraînent des perturbations des mesures polarographiques. BREZONIK et coll. (1976), BUFFLE et GRETER (1979) ont montré que les valeurs de potentiel et du courant anodique étaient perturbées par la présence de composés organiques dissous. Les perturbations sont dues à l'adsorption de ces composés sur l'électrode de mesure. Elles se manifestent par une augmentation de l'intensité du courant anodique, des déplacements des potentiels vers des valeurs positives et des élargissements des pics. Les modifications causées par ces phénomènes d'adsorption sont souvent irréversibles, et provoquent de ce fait une surestimation de la concentration du cation métallique libre et une sous-estimation de la constante de stabilité du complexe formé.

Ces études montrent nettement la nécessité de vérifier l'absence de phénomènes d'adsorption au niveau de l'électrode. CORRALES (1984) a étudié ces phénomènes dans le cas de l'acide humique FLUKA en analysant les courbes d'électrocapillarité (tension interfaciale en fonction du potentiel appliqué à l'électrode à goutte de mercure), avant et après solubilisation de différentes concentrations de ligand. Les courbes paraboliques demeurent parfaitement symétriques et superposables jusqu'à une concentration de 500 mg.l^{-1} en acide humique FLUKA, et prouvent d'après l'auteur, l'absence des phénomènes d'adsorption.

Cependant, une telle vérification ne constitue pas une preuve définitive. En effet, ces courbes obtenues lorsque l'électrode de mercure fonctionne en goutte tombante* établissent seulement l'absence d'adsorption

* Cf lexique page

lorsque le temps de contact entre la goutte de mercure et le ligand ne dépasse pas quelques secondes. Lorsque ce temps de contact se prolonge (quelques minutes lorsque l'électrode fonctionne en goutte pendante*), on ne doit pas négliger l'intervention de tels phénomènes.

3.3.1.5.3- Perturbation du courant d'électrolyse

Influence du pH

La valeur du pH du milieu d'analyse doit être maintenue constante durant toute l'expérience. En effet, WAHDAT et NEEB (1983) ont observé qu'à pH=2 l'intensité du pic relatif à un cation métallique est plus importante qu'à pH=4,5 tandis que QUENTEL et coll. (1986), en étudiant l'influence des substances organiques dissoutes sur le dosage du plomb en milieu marin, ont montré que l'intensité du pic de courant est plus faible à pH=1 qu'à pH=2. Ceci limite les études de la spéciation des métaux en fonction du pH et compromet les résultats acquis dans ce domaine (FLORENCE, 1977).

Influence du caractère tensioactif du ligand

JACOBSEN et LINDSETH (1976) ont montré que la détermination des concentrations des métaux en polarographie, dans un milieu contenant des composés tensioactifs (surfactants) peut conduire à des résultats erronés.

CISZEWSKI et LUKASZEWSKI (1983) ont étudié l'influence de la n-nonylamine, de la di-n-hexylamine, du chlorure de tétrabutylammonium et du bromure de cétyltriméthylammonium, qui sont des surfactants cationiques, sur l'intensité des pics polarographiques du thallium, du plomb, du cadmium, de l'étain et de l'indium. Celles du thallium, du plomb et du cadmium diminuent tandis que celles de l'indium et de l'étain peuvent soit augmenter, soit diminuer très fortement.

BEVERDIDGE et PICKERING (1984) ont signalé que les surfactants de différemment chargés tels que le chlorure de diméthylammonium, l'alkylbenzène sulfonate de sodium et l'octadécylamine éthoxylate de sodium, provoquent une augmentation de 20% d'intensité du pic de cuivre, 10% pour le plomb, mais une suppression de la réponse du cadmium. Contrairement à CISZEWSKI et LUKASZEWSKI (1983), ces auteurs n'observent pas une relation entre le type de surfactant et les modifications de taille

des pics.

En ce qui concerne les substances humiques qui sont également des composés tensioactifs, seuls les travaux de KOZARAC et coll. (1986) qui ont montré l'influence de ces molécules sur la réduction du cadmium. Les substances humiques ont un effet inhibiteur sur l'intensité du pic du cadmium, dépendant de leur concentration et du pH du milieu d'analyse. Ces auteurs insistent sur l'importance de ce problème dans les études de spéciation des métaux traces dans les eaux naturelles.

3.3.1.5.4- Importance du choix du potentiel de préélectrolyse

FIGURA et McDUFFIE (1979; 1980) montrent que l'utilisation d'un potentiel d'électrodéposition trop négatif peut causer la réduction directe de complexes normalement non labiles du cadmium, plomb, cuivre avec l'EDTA. Ainsi, pour le complexe [Cu-EDTA], on observe un signal lorsque l'électrodéposition s'effectue à $E = -0,6V$ alors que ce signal est presque inexistant à $E = -0,2V$.

Le choix du potentiel d'électrodéposition sera donc très important pour la détermination des paramètres complexants et la mise en évidence du caractère électrochimiquement labile de complexes humiques.

3.3.1.5.5- Non respect de la cinétique de formation du complexe

La détermination des paramètres complexants sans définition préalable du temps nécessaire au bout duquel l'équilibre entre la forme libre et la forme complexée d'un cation métallique est atteint, conduit inévitablement à des résultats inexacts. C'est malheureusement le cas dans certains travaux où, sans données expérimentales sur la cinétique de complexation d'un cation métallique, les paramètres complexants sont déterminés en se basant arbitrairement:

- soit sur un temps de contact bref (5 minutes à une heure) entre cation métallique et molécule complexante (CHAU et LUM-SHUE-CHAN, 1974),
- soit sur un temps de contact "relativement" long (48 heures) (TAKAMATSU et YOSHIDA, 1978).

3.3.1.5.6- Variabilité des conditions et valeurs expérimentales

Pour illustrer les limites d'utilisation des données polarographiques, nous avons regroupé (tableau I₂), les conditions d'analyse et de détermination des constantes de stabilité publiées dans la littérature, relatives à différents complexes [substances humiques-cation métallique].

Il apparaît que:

- le préalable cinétique est presque toujours ignoré
- le nitrate de potassium (KNO₃) est généralement retenu comme électrolyte support, mais dans une gamme très étendue de force ionique (10⁻³ M à 10⁻¹ M).
- les potentiels d'électrodeposition ne sont jamais justifié (ni en fonction du ligand, ni en fonction du cation).

Il en résulte que les valeurs des constantes de stabilité des complexes varient suivant le pH du milieu d'analyse, la nature de la molécule complexante, du métal et de la méthode de traitement de données. Ceci rend très délicate l'exploitation comparée de ces constantes.

3.3.2- Méthode potentiométrique par électrode sélective d'un ion

L'électrode sélective d'un ion (ESI) est une technique électrochimique qui, comme la polarographie, est sensible à l'ion libre de l'élément étudié

La diffusion de cet ion au travers la membrane qui limite sélective, provoque l'apparition d'une différence de potentiel avec la solution analysée.

Cette différence de potentiel est donnée par l'équation suivante:

$$E = E_{\text{réf}} + E'_{\text{réf}} + E_m$$

$$E_{\text{réf}} + E'_{\text{réf}} = \text{constante}$$

$$E_m = E_2 - E_1 = \frac{RT}{nF} \log \frac{a_2}{a_1}$$

Complexe formé	Force ionique et nature de l'électrolyte support	pH	Préalable cinétique et Techniques utilisées	Potentiel d'électrodeposition (E ₀)	Constantes de stabilité et méthodes de détermination	Références
AFS - Cd	0,1 M (KNO ₃)	7 6	n.o " ASV	-0,800 V (n.j) "	K = 2.10 ⁶ K = 4.10 ⁶ a	BHAT et WEBER (1982)
AHS - Cu	0,1 M (KNO ₃)	6,1	n.o DPP	-0,500 V "	K = 6,31.10 ¹⁶ b	ERNST et Coll. (1975)
AHS - Pb	"	6,1	n.o DPP DPASV	-1 V "	K = 6,31.10 ¹⁴ K = 10 ⁴	
AHF - Cu	0,02 M (KNO ₃)	7,9	n.o DPASV	-0,400 V "	K = 3,91.10 ⁶ c	CORRALES (1984)
AHF - Cd	"	"	"	-0,800 V	K = 8,48.10 ⁵	
AHF - Pb	"	"	"	-0,600 V	K = 1,04.10 ⁷	
AHF - Cu	0,001 M (KNO ₃)	7	o. DPASV	-1,00 V "	K = 10 ⁷ b	GIANNISSIS et MARTIN (1984)
AFE - Cu	0,01 M (KNO ₃)	n.1	24h DPASV	-0,950 V "	K ₁ = 3,16.10 ⁵ b K ₂ = n.d	STERRIT et LESTER (1984)
AFF - Cd	"	"	"	"	K ₁ = 3,98.10 ⁵ K ₂ = n.d	

Tableau I : Conditions d'analyse et valeurs des constantes conditionnelles de stabilité de quelques complexes [substances humiques - cation métallique] en polarographie

Détermination selon la méthode de :

- a) SCATCHARD (1949, 1950)*
- b) SHUMAN et WOODWARD (1973 ; 1977)
- c) RUZIC (1982)

- n.i : non indiqué
- n.j : non justifié
- n.o : non observé
- n.d : non détecté

- AFE : Acides fulviques extraits des eaux
- AFS : Acides fulviques extraits des sols
- AHF : Acides humiques FLUKA
- AHS : Acides humiques des sols



* voir développement dans chapitre II.2.3.2.

E_m : Potentiel mesuré

E_1 : Potentiel de la solution interne de l'électrode, d'activité a_1

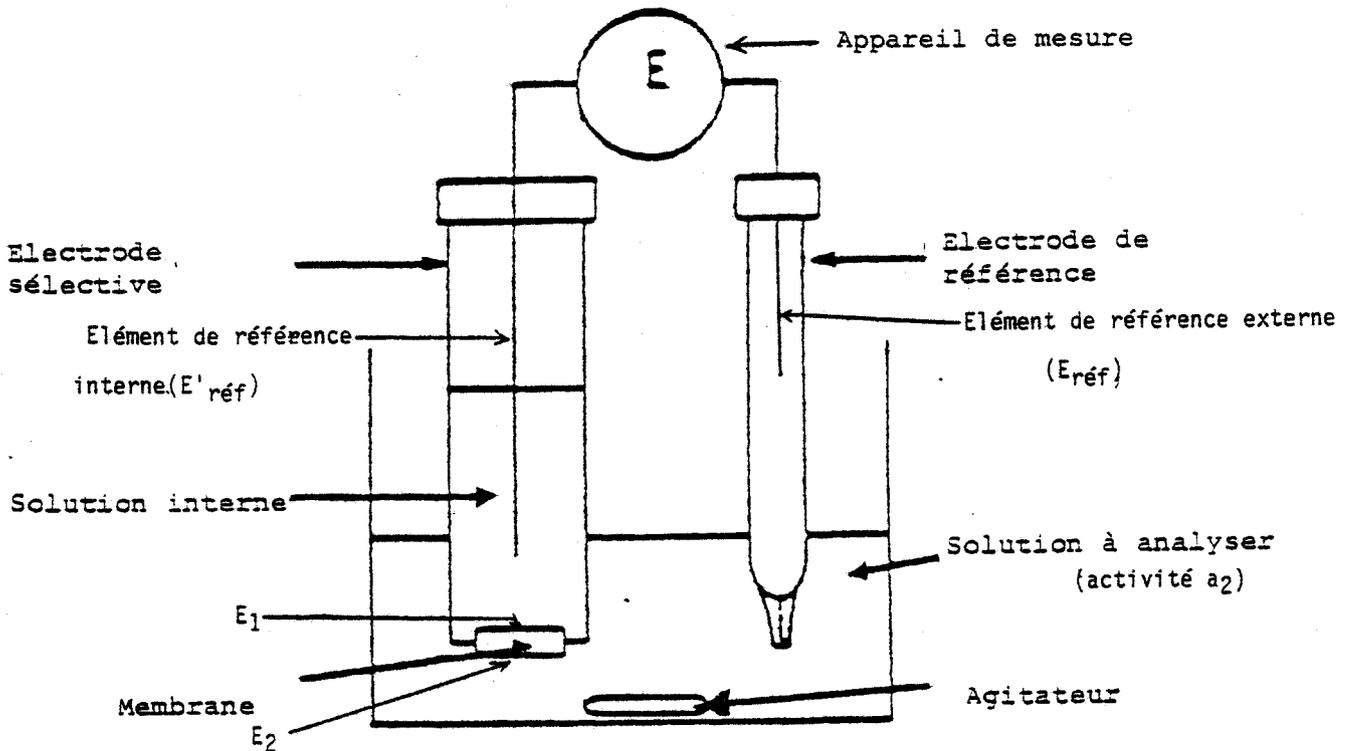
E_2 : Potentiel dû à la solution analysée d'activité a_2

R : Constante des gaz parfaits

T : température absolue

n : nombre d'électrons mis en jeu pendant la réaction redox

L'emploi de l'électrode sélective est basé sur la mesure de l'activité de l'ion libre.



Cette méthode, d'une mise en oeuvre très rapide, est très largement employée pour la détermination des paramètres complexants des substances humiques.

3.3.2.1- Détermination des paramètres complexants

3.3.2.1.1- Capacité complexante et constante de stabilité pour des complexes 1:1

RAMAMOORTHY et KUSHNER (1975) ont utilisé des électrodes sélectives pour déterminer la capacité complexante des eaux de rivière contenant des substances humiques; vis-à-vis du mercure, du plomb, du cuivre et cadmium. La constante conditionnelle de stabilité est calculée suivant l'équation:

Le calcul de cette constante conditionnelle de stabilité est rendu possible en supposant que les complexes formés entre les molécules organiques et les cations métalliques sont de stoechiométrie 1:1. Ce qui ramène l'expression précédente à la forme:

$$K' = \frac{[\text{Cation métallique lié}]}{[\text{Cation métallique non lié}] [\text{Composé organique non lié}]}$$

Les valeurs des capacités complexantes et des constantes de stabilité des complexes, sont données ci-dessous

MÉTAL	CONSTANTE DE STABILITE (M ⁻¹)	CAPACITE COMPLEXANTE (M)
Hg	1,25 ± 0,46 x 10 ⁶	5,5 x 10 ⁻⁵
Pb	8,88 ± 3,8 x 10 ³	1,9 x 10 ⁻⁵
Cu	5,01 ± 1,58 x 10 ³	2,54 x 10 ⁻⁵
Cd	4,69 ± 0,9 x 10 ³	5,4 x 10 ⁻⁶

3.3.2.1.2- Constante de stabilité pour des complexes
faisant intervenir un nombre moyen de sites

BUFFLE et coll. (1977) admettent l'existence de complexes [substances humiques-cations métalliques] de stoechiométrie 1:1. Dans cette hypothèse, l'équation chimique de réaction de complexation s'écrit:

$$K' = \frac{[ML^{2-x}] [H^+]^x}{[M^{2+}] [LH_x]}$$

$$[M^{2+}]_{\text{total}} = [M^{2+}] + [ML^{2-x}]$$

Si on désigne par: ζ_p = titre pondéral, M = masse molaire du ligand, la conservation de la matière du point de vue.

$$\frac{(\zeta_p L)_{\text{total}}}{M} = \frac{[LH_x]}{\nu} + \frac{[ML^{2-x}]}{\nu}$$

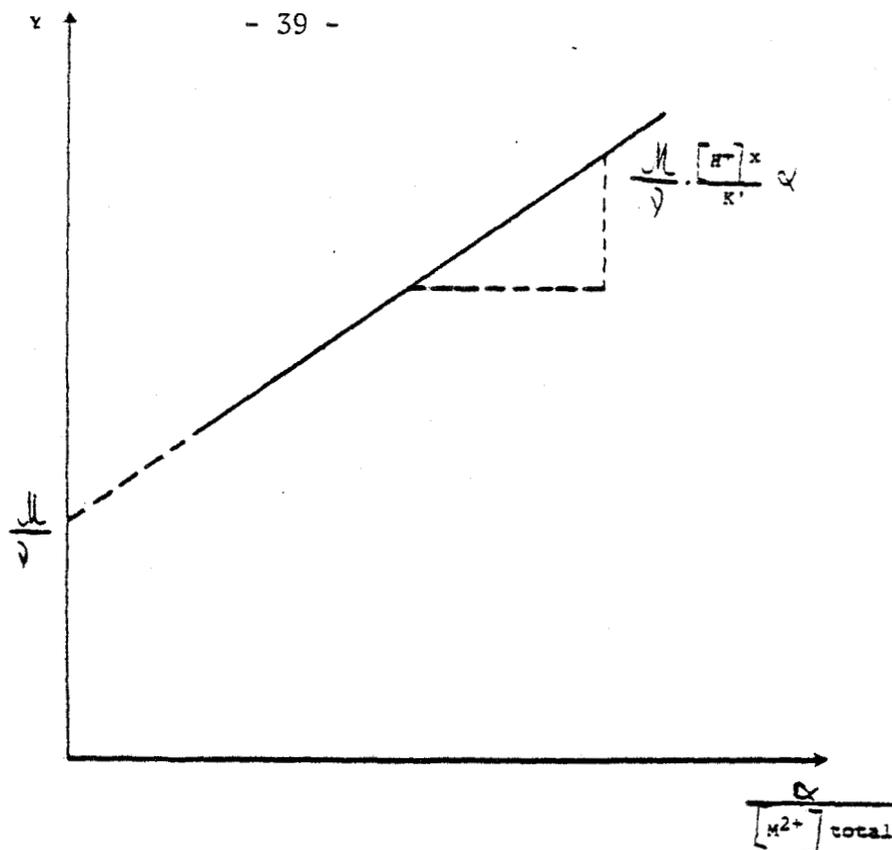
avec $(\zeta_p L)$ = titre pondéral de la matière organique L
 ν = nombre moyen de sites de complexation

En combinant les relations précédentes, on trouve :

$$Y = \frac{(\zeta_p L)_{\text{total}}}{[M^{2+}]_{\text{total}}} \cdot \frac{\alpha}{\alpha - 1} = \frac{M}{\nu} + \frac{M}{\nu} \frac{[H^+]^x}{K'} \frac{\alpha}{[M^{2+}]_{\text{total}}}$$

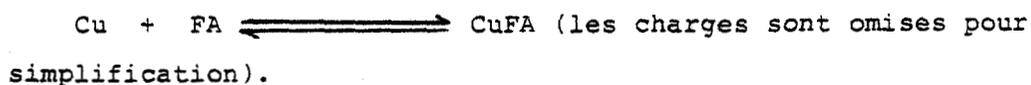
$$\text{avec } \alpha = \frac{[M^{2+}]_{\text{total}}}{[M^{2+}]}$$

En traçant la courbe $Y = f\left(\frac{\alpha}{[M^{2+}]_{\text{total}}}\right)$ qui est une droite dans le cas des complexes 1:1, la constante conditionnelle de stabilité K' et la masse molaire M du ligand, peuvent être obtenues:



3.3.2.1.3- Constantes de stabilité pour des complexes faisant intervenir des classes différentes de sites

La complexation du cuivre par les acides fulviques a été étudiée par BRESNAHAN et coll. (1978) à l'aide de l'électrode sélective. L'équation générale de la réaction est:



La constante conditionnelle de stabilité du complexe est:

$$K' = \frac{[\text{Cu FA}]}{[\text{Cu}] ([\text{FA}] - [\text{Cu FA}])}$$

[Cu] : concentration du cation libre ou hydraté

[CuFA] : concentration du complexe formé

[FA] : concentration totale des acides fulviques.

Ces auteurs n'ont pas déterminé la constante conditionnelle de stabilité K' du complexe formé. Ils ont appliqué la théorie de SCATCHARD (1949) et coll. (1950) (que nous développerons dans le chapitre II

paragraphe 2.3.2) qui permet de calculer les constantes de stabilité relatives à chaque classe de sites complexants:

Si i est une classe particulière de sites complexants des acides fulviques, K_i' la constante conditionnelle de stabilité relative à cette classe et n_i le nombre moyen de ces sites, on peut écrire:

$$\frac{\bar{\gamma}}{[\text{Cu}]} = K_i' \bar{\gamma} + K_i' n_i, \text{ avec } \bar{\gamma} = \frac{[\text{Cu FA}]}{[\text{FA}]}$$

En traçant la courbe $\frac{\bar{\gamma}}{[\text{Cu}]} = f(\bar{\gamma})$, on obtient:

- soit une droite, quand il existe une seule classe de sites. Dans ce cas, la détermination des paramètres complexants est simple car, quand $\bar{\gamma} = 0$, $\bar{\gamma} = n_i$ et la pente de la droite nous donne une valeur égale à $-K_i'$
- soit une courbe, quand il existe plusieurs classes de sites. Dans ce cas, ces classes sont réparties en groupes de nombre moyen n_1, n_2, \dots , et des calculs permettent de les déterminer, ainsi que leurs constantes conditionnelles de stabilité correspondantes K_1', K_2', \dots

3.3.2.2- Limites d'utilisation de l'électrode sélective d'un ion

Contrairement à la polarographie, rien au travers des travaux publiés ne permet de supposer une perturbation de la lecture du potentiel sous l'effet du pH ou du pouvoir tensioactif des substances humiques. La modification de la force ionique peut cependant perturber les équilibres et surtout, provoquer des modifications de potentiel. Ainsi RECHNITZ et KENNY (1970) lors du dosage du cuivre, ont observé que la présence d'acide nitrilotriacétique (NTA) provoquait une diminution du potentiel initial à pH constant. BHAT et coll. (1981) ont observé également une diminution du potentiel initial lors du dosage du cuivre en présence d'acides fulviques.

Cette modification n'a pas été prise en compte par TAKAMATSU et YOSHIDA (1978) alors que les concentrations en acides humiques variaient de $0,2$ à 5g.l^{-1} . Une autre critique peut être émise concernant cette étude. En effet il a été procédé au calcul de la concentration de ligand libre à partir de valeurs de pK_a préalablement obtenues en l'absence de cation complexable alors qu'il est bien établi que la complexation modifie

les pK_a . Cette modification est d'ailleurs mise à profit dans la méthode de SCHWARZENBACH (1950) pour la détermination des constantes de stabilité.

Aucune de ces remarques n'apparaît dans les travaux publiés jusqu'à présent, les auteurs ne se contentant que de faire état des critiques concernant l'appareillage.

Le "vieillissement" de l'électrode

Il est dû à l'altération de l'électrolyte support et/ou de la membrane. Il entraîne une variation continue du potentiel normal (quelques millivolts par mois) et diminue la sensibilité de l'électrode (BUFFLE et MALLEVIALLE, 1974).

Le temps de réponse

Il dépend de la concentration de l'ion à analyser. Ce temps varie de 1 à 5 minutes pour des concentrations supérieures à 10^{-3} M et de 10 à 15 minutes pour des concentrations inférieures à 10^{-3} M.

La sensibilité et la sélectivité

En milieu naturel, la médiocre sensibilité (10^{-6} M - 10^{-7} M selon le type d'électrode) (BUFFLE et MALLEVIALLE, 1974; BUFFLE et GRETER, 1979), ainsi que les nombreuses interférences, limitent l'utilisation de cette technique pour la détermination des paramètres complexants.

Pour remédier à la médiocre limite de détection, SAAR et WEBER (1979; 1980) proposent de remplacer la méthode graphique d'étalonnage par un traitement algébrique. En effet, quand la molécule complexante est absente du milieu d'analyse, les réponses de l'électrode peuvent s'écrire sous la forme d'un polynôme:

$$\log [M^{2+}] = \sum_{i=0}^n a_i (mv)^i$$

$[M^{2+}]$: concentration du métal libre

mv : potentiel mesuré à l'électrode sélective

a_i : coefficients de regression du polynôme

n : ordre du polynôme.

Une matrice de transformation est établie qui permet de calculer la concentration en cation métallique libre à partir de chaque valeur de potentiel lu après ajout d'acides fulviques.

Cependant ces auteurs ne tiennent pas compte de la modification de la force ionique qu'entraîne obligatoirement l'introduction du ligand. La matrice précédemment définie dans le milieu d'étalonnage, n'est donc pas transférable au milieu contenant les acides fulviques.

3.2.3- Variabilité des conditions et valeurs expérimentales

Comme pour la polarographie, nous avons recensé tableau I_{III} les valeurs des constantes et des conditions d'analyse publiées.

On observe que:

- les auteurs choisissent en général une force ionique relativement élevée (0,1 M) et ils n'observent pas de préalable cinétique pour l'établissement de l'équilibre
- la variabilité observée dépend essentiellement du pH et du mode de calcul et non des différences de force ionique

Il est intéressant d'observer dans le cas de complexes [acides fulviques des eaux-cuivre] (STERRIT et LESTER, 1984) qu'il existe un rapport de 1 à 10 dans les constantes de stabilité établie en polarographie (cf tableau I_I) et par électrode sélective. Cette différence est certainement à rapprocher avec une destabilisation des complexes lors de l'analyse polarographique.

Ainsi dans un domaine aussi vaste et complexe que celui des interactions avec les substances humiques en milieu hydrique, l'absence de caractérisation semble prévaloir, du fait d'un manque de rigueur dans l'application et l'exploitation des méthodes d'analyse. Malgré cet état d'imprécision, la recherche de modélisation des interactions est une démarche qui a déjà été entreprise (BOURG, 1979). Mais en la circonstance, l'accent a peut-être été trop mis sur le comportement du cation métallique et pas assez sur celui du ligand. Une meilleure caractérisation structurale du ligand nous paraît être indispensable. Il nous a donc semblé nécessaire de rappeler les connaissances concernant la composition structurale de substances humiques qui ont conduit à différentes tentatives de modélisation.

Complexes formés	Force ionique et nature de l'électrolyte support	pH	Préalable cinétique et Temps de contact		Constantes de stabilité et méthodes de détermination	Références	
SHE - Cu	0.1 M (NaNO ₃)	8	n.o	n.i	$K = 2.63.10^3$	a	BUFFLE et Coll. (1977)
APS - Cu	"	5	"	"	$K = 10^4$		
"	"	3	"	"	$K = 1.99.10^3$		
APS - Pb	"	5	"	"	$K = 1.26.10^4$		
"	"	3	"	"	$K = 3.98.10^2$		
APS - Cu	0.1 M (KNO ₃)	6	"	"	$K_1 = 1.10^6$	b	BRESNAN et Coll. (1978)
"	"	5	"	"	$K_2 = 6.10^3$		
"	"	4	"	"	$K_1 = 10^6$		
"	"	4	"	"	$K_2 = 12.10^3$		
"	"	4	"	"	$K_1 = 4.10^5$		
"	"	4	"	"	$K_2 = 9.10^3$		
AFE - Cu	"	6	"	"	$K_1 = 13.10^5$		
"	"	5	"	"	$K_2 = 7.10^3$		
"	"	5	"	"	$K_1 = 9.10^5$		
"	"	4	"	"	$K_2 = 5.10^3$		
APS - Cd	0.1 M (NaOH 0.05M- NaClO ₄ 0.5 M)	6.23	n.o	48 heures	$K_1 = 1.8.10^4$	c	TAKAMATSU et YOSHIDA (1978)
"	"	5.36	"	"	$K_2 = 3.5.10^3$		
"	"	4.26	"	"	$K_1 = 7.6.10^3$		
"	"		"	"	$K_2 = 2.2.10^3$		
APS - Cd	0.1 M (KNO ₃)	8	n.o	n.i	$K = 43.10^3$	b	SAAR et WEBER (1979)
"	"	7	"	"	$K = 21.10^3$		
"	"	6	"	"	$K = 12.10^3$		
"	"	5	"	"	$K = 6.3.10^3$		
"	"	4	"	"	$K = 1.7.10^3$		
AFE - Cd	"	8	"	"	$K = 12.10^3$		
"	"	7	"	"	$K = 8.1.10^3$		
"	"	6	"	"	$K = 4.8.10^3$		
"	"	5	"	"	$K = 3.10^3$		
"	"	4	"	"	$K = 1.4.10^3$		
SHE - Cd	n.i	5	n.o	n.i	$K_1 = 6.75.10^5$	b	ALBERTS et GIESY (1983)
"	"	5	"	"	$K_2 = 1.35.10^3$		
SHE - Cu	"	5	"	"	$K_1 = 3.31.10^6$		
SHE - Pb	"	5	"	"	$K_2 = 7.76.10^4$		
"	"	5	"	"	$K_1 = 1.23.10^5$		
"	"	5	"	"	$K_2 = 10^2$		
AFE - Cu	0.001 M (KNO ₃)	6.25	n.o	n.i	$K_1 = 10^6$	c	de KNIGHT et Coll. (1983)
"	"		"	"	$K_2 = 5.01.10^7$		
"	"		"	"	$K_3 = 7.94.10^7$		
AFE - Cu	0.01 M (KNO ₃)	6.5	n.o	24 heures	$K_1 = 3.16.10^6$	d	STERRIT et LESTER (1984)
"	"	"	"	"	$K_2 = 1.25.10^5$		
"	"	"	"	"	$K_1 = 10^7$	e	
"	"	"	"	"	$K_2 = 2.51.10^5$		
"	"	"	"	"	$K_1 = 5.01.10^4$	d	
AFE - Cd	"	"	"	"	$K_2 = 6.31.10^3$		
"	"	"	"	"	$K_1 = 1.58.10^5$	e	
"	"	"	"	"	$K_2 = 8.6$		
AFE - Pb	"	"	"	"	$K_1 = 1.99.10^6$	d	
"	"	"	"	"	$K_2 = 2.51.10^5$		
"	"	"	"	"	$K_1 = 1.99.10^6$	e	
"	"	"	"	"	$K_2 = 7.94.10^4$		



Tableau III: Conditions d'analyse et constantes conditionnelles de stabilité de quelques complexes substances humiques-cation métallique en potentiométrie (électrode sélective d'un ion ESI)

Détermination selon la méthode de :
 a) BUFFLE et Coll. (1977)
 b) SCATCHARD (1949 ; 1950)
 c) ZUNINO et Coll. (1972)
 d) SCHUMAN et WOODWARD (1973 ; 1977)
 e) RUZIC (1982)

n.i. : non indiqué
 n.o. : non observé

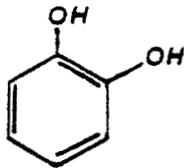
AFE : Acides fulviques extraits des eaux
 APS : Acides fulviques extraits des sols
 SHE : Substances humiques extraites des eaux

4- RAPPELS SUR LA COMPOSITION STRUCTURALE DES SUBSTANCES HUMIQUES

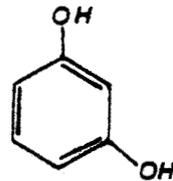
Une analyse des résultats présentés dans la littérature conduit à observer l'existence d'éléments structuraux communs, et d'autres caractéristiques des milieux d'origine.

4.1- Eléments structuraux communs

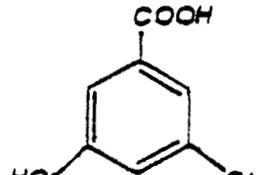
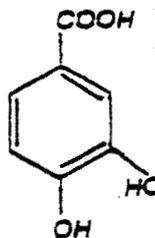
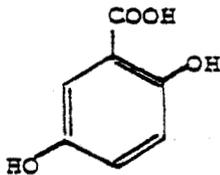
La technique de dégradation chimique utilisant d'une part, des réactifs oxydants tels que le monoxyde de cuivre en milieu alcalin (SCHNITZER et KHAN, 1972), l'acide peracétique (SCHNITZER et SKINNER, 1974), le permanganate de potassium (KHAN et SCHNITZER, 1971; SCHNITZER et ORTIZ DE SERRA, 1973; LIAO et coll., 1982), et d'autre part, des réactions d'hydrolyse alcaline (NEYROUD et SCHNITZER, 1975; LIAO et coll., 1982), a permis l'identification de certaines molécules:



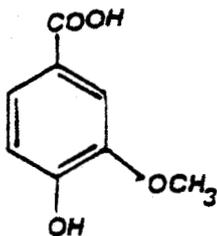
Dihydroxy- 1,2 benzène



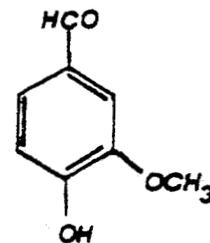
Dihydroxy- 1,3 benzène



Acides dihydroxy- 2,5, 3,4 et 3,5 benzoïques



Acide hydroxy-4 méthoxy-3 benzoïque (acide vanillique)



Hydroxy-4 méthoxy-3 benzaldéhyde (vanilline)

De plus en plus, on substitue aux méthodes de dégradation chimique, non quantitatives, les techniques classiques d'analyse physico-chimique.

Les études effectuées par spectrométrie infra-rouge (BAILLY, 1974; RUGGIERO et coll., 1980; TORRI et TORRI, 1986) ont révélé l'existence des groupements fonctionnels:

- hydroxyle de type phénol et alcool
- carbonyle de type aldéhyde, cétone et/ou quinone
- carboxyle
- amine ou amide
- des noyaux aromatiques ou des chaînes carbonées aliphatiques et ramifiées ou linéaires, insaturées ou non.

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton a permis à RUGGIERO et coll. (1980), HATCHER et coll. (1981), TORRI et TORRI (1986), d'identifier des protons aliphatiques et aromatiques (figure I₄) malgré le comportement paramagnétique des substances humiques, pendant que MIKITA et coll. (1981), WERSHAW et coll. (1981) ont identifié des atomes de carbone aliphatique et aromatique par RMN ¹³C.

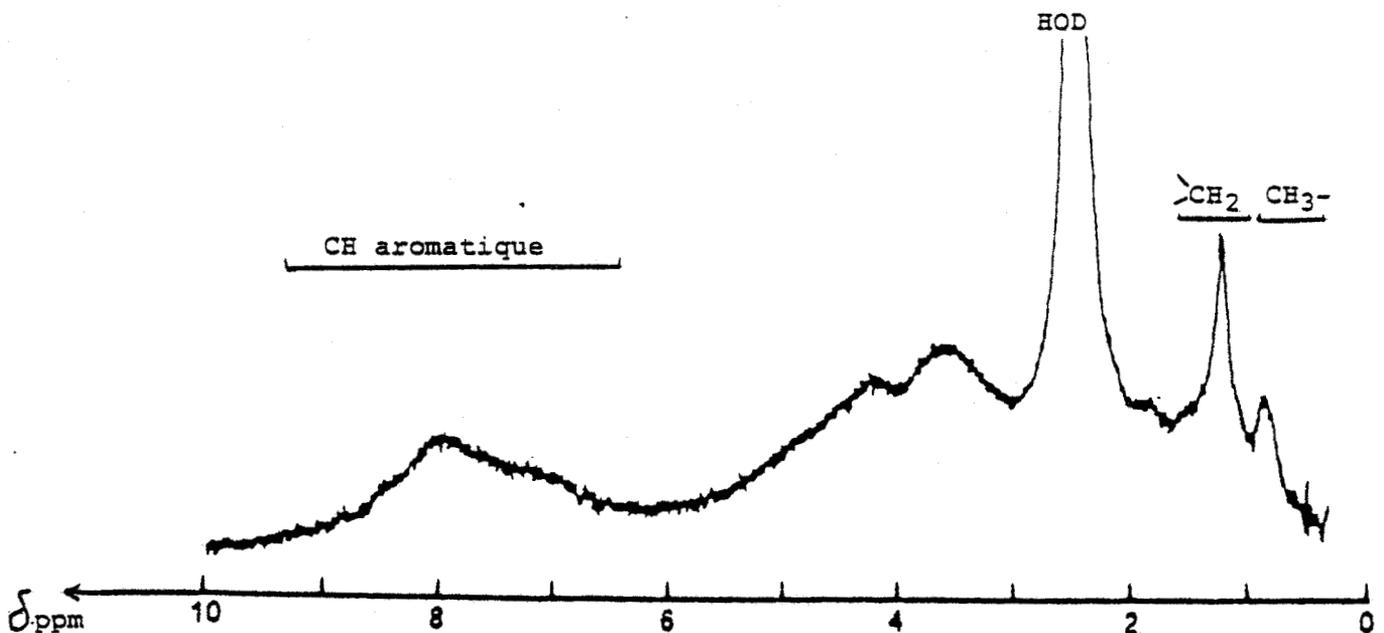


Figure I₄ : Spectre RMN¹H révélant la présence de protons aliphatiques dans la structure des acides fulviques naturels (RUGGIERO et Coll., 1980)

La spectrométrie de masse couplée à la pyrolyse a été utilisée par HAIDER et SCHULTEN (1985), BRUCHET et coll. (1986) qui ont mis en évidence des sucres et des acides aminés.

4.2- Quelques différences structurales

Les différences structurales entre les substances humiques terrestres et aquatiques apparaissent plus nettement au niveau de leur composition élémentaire et de leur taille moléculaire.

4.2.1- Composition élémentaire des substances humiques

La revue bibliographique effectuée par VISSER (1983) (tableau I_{III}) montrant des résultats obtenus par ALBERTS et coll. (1976), WEBER et WILSON (1977), permet d'observer qu'en moyenne:

- la teneur en oxygène des substances humiques aquatiques est plus importante que celle des substances humiques terrestres

- la teneur en carbone et en azote des substances humiques aquatiques est plus faible que celle des substances humiques terrestres

- pour les deux types d'environnement, la teneur en oxygène est plus importante pour les acides fulviques que pour les acides humiques alors que cet ordre est inversé dans le cas du carbone

- le rapport O/C pour les acides fulviques est proche de l'unité.

ELEMENT CHIMIQUE	ENVIRONNEMENT AQUATIQUE WEBER et WILSON (1977)		ENVIRONNEMENT TERRESTRE ALBERTS et Coll. (1976)	
	Acides humiques	Acides fulviques	Acides humiques	Acides fulviques
C	57,0 ± 4,0	46,0 ± 5,0	59,0 ± 2,0	47,0 ± 4,0
H	4,4 ± 1,0	4,0 ± 0,4	4,6 ± 0,9	4,1 ± 1,0
N	2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,3	3,5 ± 0,7	2,1 ± 1,2
O	37,1 ± 5,2	48,6 ± 4,5	33,0 ± 1,9	46,4 ± 2,2
O/C	0,651	1,056	0,559	0,987

Tableau I_{III}: Comparaison des compositions élémentaires de substances humiques naturelles suivant leur origine (VISSER, 1983)

La composition élémentaire des substances humiques est donc le reflet de leur origine. Cependant, ce paramètre n'est pas toujours très fiable, et des disparités peuvent être observées pour une même substance humique, en fonction de son mode d'extraction, de purification et de l'époque de prélèvement. Pour illustrer ce propos, nous avons rassemblé les résultats obtenus par différents auteurs pour l'acide humique FLUKA qui montrent l'absence de fiabilité de ce matériau.

ACIDE HUMIQUE FLEKA	MALLEVIALLE (1974)	BULJEV et STROHAL (1983)	STERLINK et Coll. (1983)	CROUE (1984)
C %	55,1	53,80	50,2	38,23
H %	5,9	5,33	4,7	4,45
O %	n.i	25,0	n.i	34,45
N %	0,6	0,52	0,0	0,43
P %	n.i	0,03	n.i	n.i
S %	n.i	2,45	7,8	2,39
résidu	10,7	12	7,8	26

n.i : non indiqué

4.2.2- Taille moléculaire des substances humiques

De nombreuses techniques sont utilisées: la cryoscopie (SCHNITZER et DESJARDINS, 1962; DE BORGER et DE BAKER, 1968), le titrage potentiométrique par électrode sélective (BUFFLE et coll. 1977), la chromatographie par perméation de gel (WERSHAW et PINCKNEY, 1973) et l'ultrafiltration (AIKEN, 1984). En ce qui concerne le titrage potentiométrique, il s'agit d'une méthode dont la mise en oeuvre difficile suppose de plus l'établissement exclusif de complexes de stoechiométrie 1:1, hypothèse non valable dans le cas des interactions substances humiques-cations métalliques. En ce qui concerne la cryoscopie, sa principale limite est la faible solubilité des substances humiques dans l'eau et surtout dans les solvants organiques (WILSON et WEBER, 1977).

La chromatographie par perméation de gel, bien qu'étant d'un emploi courant, présente également quelques inconvénients. FAURE et coll. (1975), HINE et BURSILL (1984), ont montré les difficultés rencontrées dans l'étalonnage des gels à l'aide de molécules de masse molaire comparable mais de structure différente de celle des substances humiques. En plus, il a été observé que l'élution des substances humiques est anormalement retardée non par encombrement stérique, mais à cause de l'adsorption qui peut s'établir entre les substances humiques et les gels par l'intermédiaire soit des interactions entre noyaux aromatiques, soit par liaisons hydrogène entre groupements hydroxyle et carboxyle et/ou carboxyle. Il en résulte une sous-estimation de la taille moléculaire.

L'ultrafiltration semble être la technique la plus répandue. Cependant des limitations au niveau de la stricte mise en oeuvre de cette méthodologie (BUFFLE et coll., 1978) et sur lesquelles nous aurons l'occasion de revenir (Cf Chapitre II), en restreignent encore l'utilisation dans le domaine des substances humiques.

La taille moléculaire de 200 - 10⁶ (SCHNITZER et KHAN, 1972; BUFFLE et coll., 1977) des substances humiques augmente des acides fulviques aux acides hymatomélaniques, sans que les limites entre ces différentes classes soient rigoureusement établies. L'exemple des acides fulviques est de ce point de vue très révélateur, puisque selon les auteurs, d'importantes disparités peuvent être constatées dans le tableau ci-après.

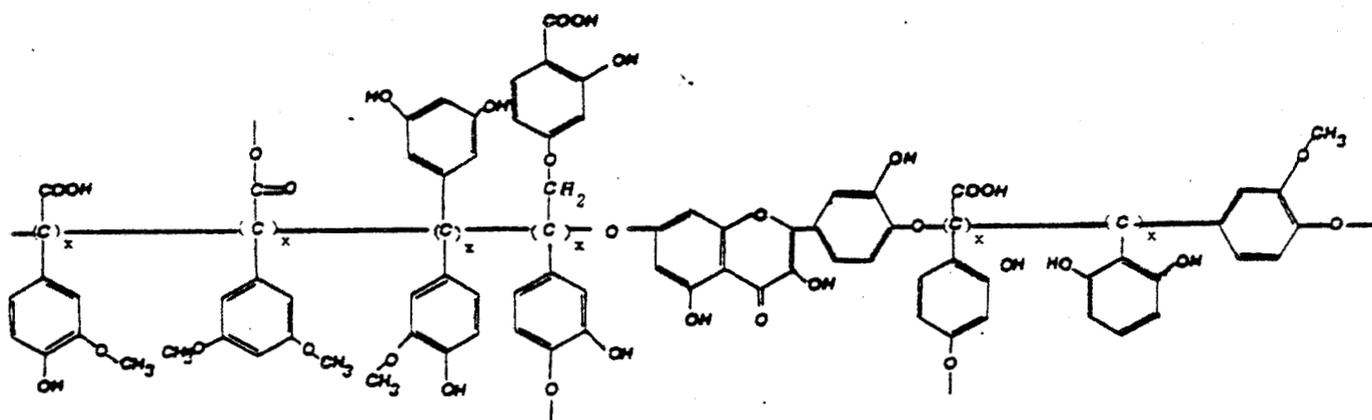
D'autres facteurs peuvent intervenir pour expliquer cette disparité, la méthode d'extraction (extraction alcaline utilisée pour les substances humiques terrestres, extraction par adsorption sur résines Amberlite XAD pour les substances humiques aquatiques).

Taille moléculaire des acides fulviques	REFERENCE
290-300	KHAN et SCHNITZER (1971)
950	SCHNITZER et KHAN (1972)
700	GARDINER (1974)
500-5000	BUFFLE (1977)
1800-1500	AIKEN (1984)

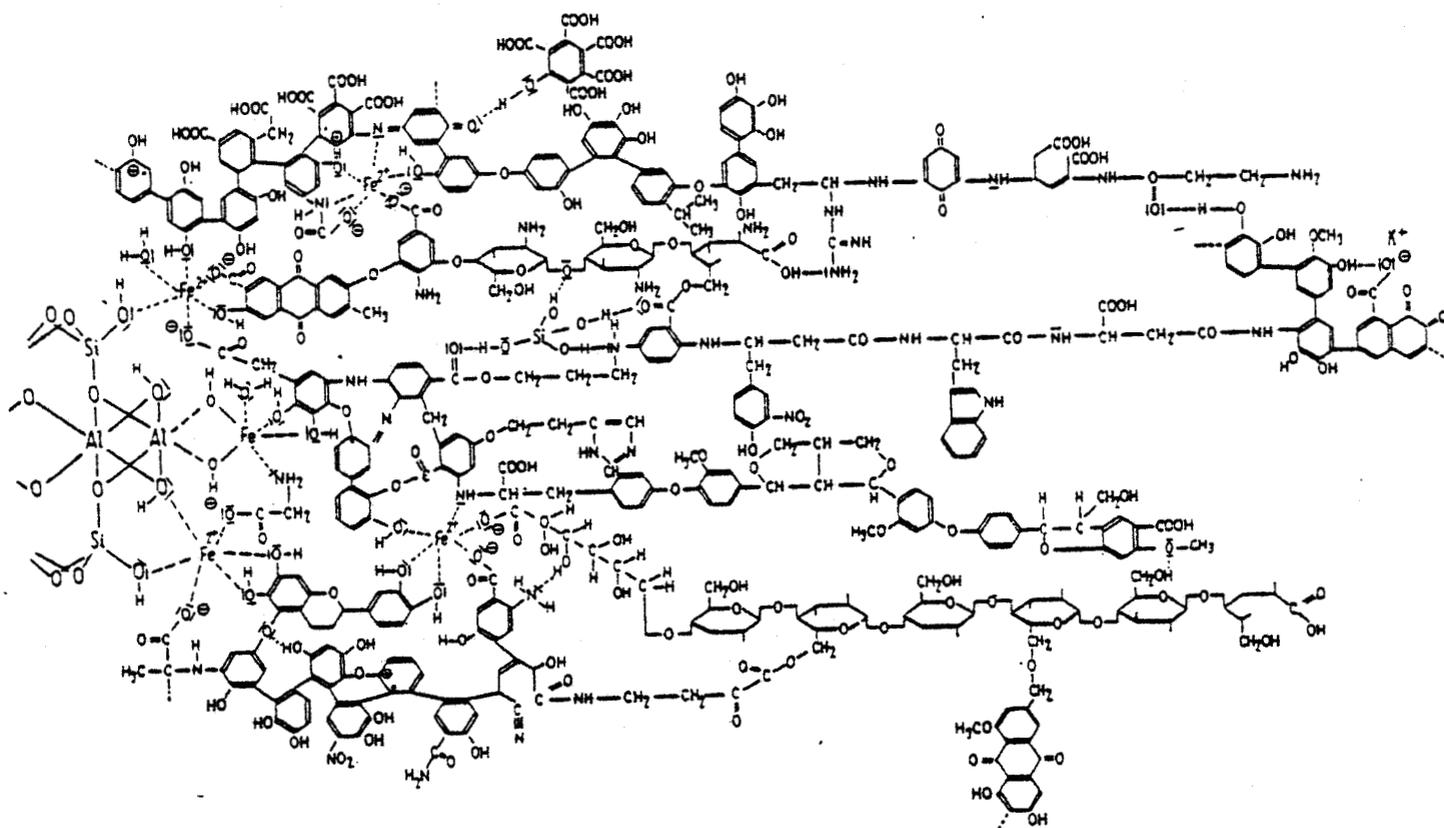
4.3- Schémas structuraux existants

On trouve dans la littérature de nombreuses propositions de schémas structuraux pour les substances humiques.

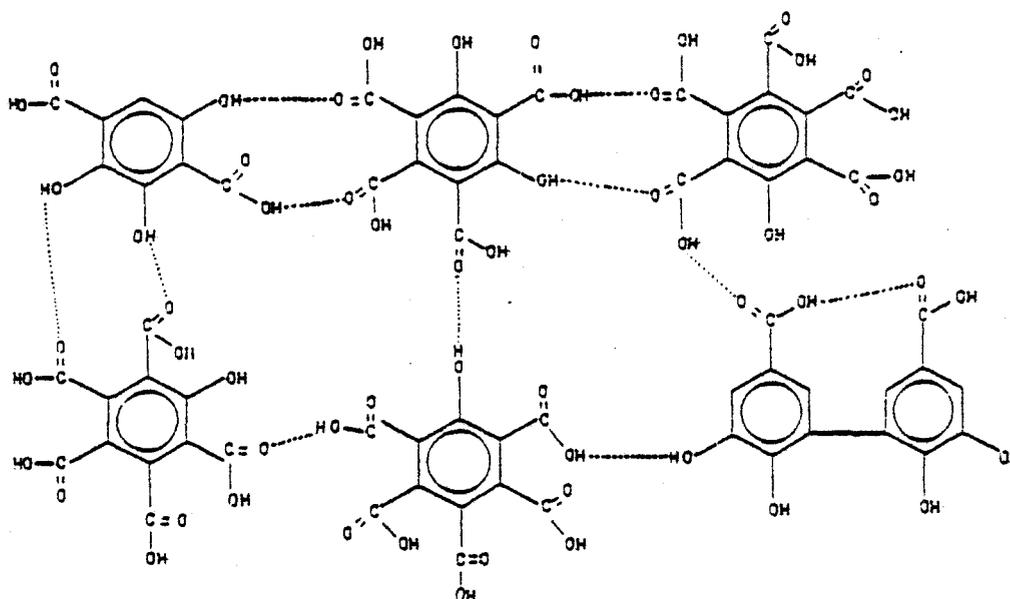
- CHRISTMAN et GHASSEMI (1966) ne prenant en compte que le rôle prépondérant que joue la lignine dans la formation des substances humiques, suggèrent un schéma dans lequel l'effet mésomère assuré par des liaisons multiples conjuguées pourrait expliquer la coloration des eaux de rivières par les acides fulviques



- KLEINHEMPEL (1970) considérant les modes d'assemblage moléculaire et ionique, a proposé une structure chimique des acides humiques compatible à l'établissement d'une structure macromoléculaire et avec toutes les possibilités de complexation et de chélation. Cette structure montre également le rôle que jouent les cations métalliques dans les multiples possibilités d'élaboration et de conformation de molécules humiques. Ceci explique la relative complexité de ce schéma qui se veut avant tout exhaustif

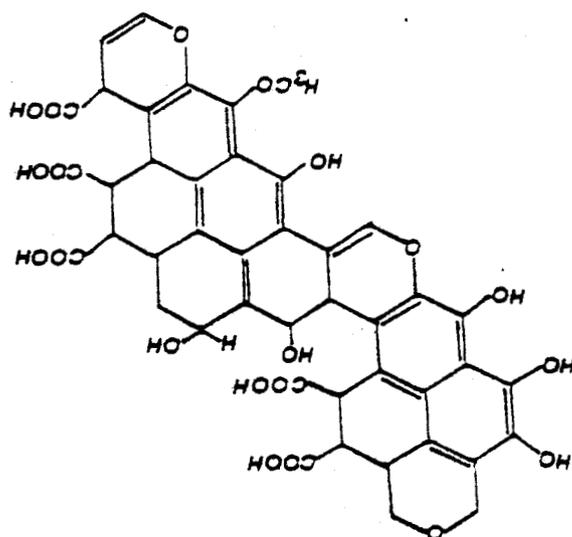


- SCHNITZER et KHAN (1972) ont proposé un schéma structural d'acide fulvique. Il comporte essentiellement des noyaux aromatiques portant des groupements fonctionnels carboxyliques, phénoliques, reliés par des liaisons hydrogène. Ce schéma est caractérisé par l'existence de cavités dans lesquelles peuvent être séquestrés des polluants organiques et par la présence de groupements salicyliques et phtaliques responsables des propriétés complexantes vis-à-vis des métaux



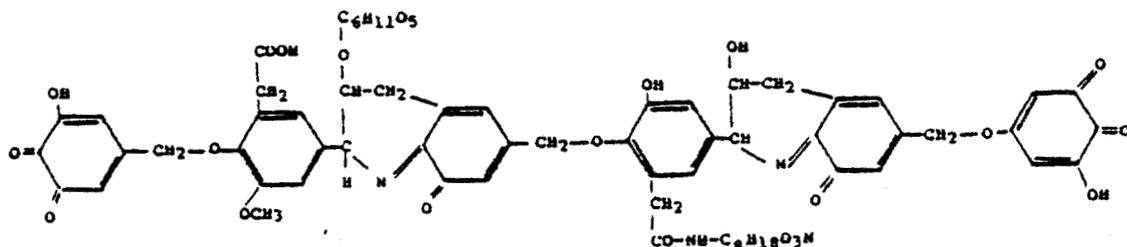
Cette structure a été sévèrement critiquée (MAXIMOV et coll., 1977) surtout à cause de la relativement faible énergie des liaisons hydrogène qui est incompatible avec la stabilité des édifices macromoléculaires humiques. De plus, on remarque l'absence de structure aliphatique généralement rencontrée dans les acides fulviques comme précédemment indiqué.

- Le schéma proposé par FUCHS cité par BUFFLE (1977) correspond bien à la répartition des groupements fonctionnels des acides humiques mais n'explique pas les changements de conformation de ces macromolécules appréciées par des études rhéologiques et des mesures de variation de potentiel-Zeta (GIANNISSIS, 1986). De plus, ce schéma présente les acides humiques comme des systèmes polycondensés, ce qui est en désaccord avec leurs diagrammes de diffraction des rayons X.

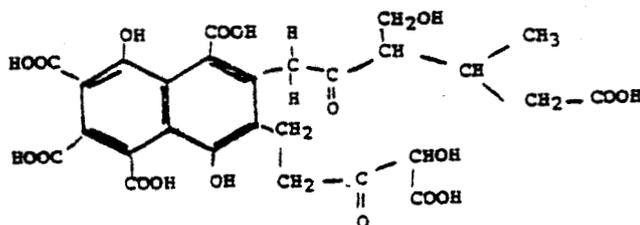


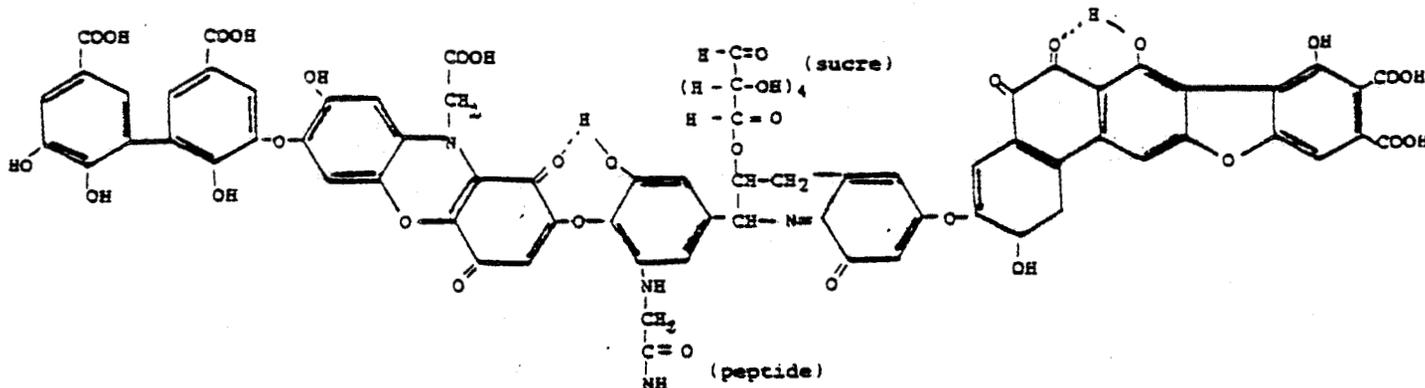
Une structure polymère moins rigide comprenant des noyaux aromatiques comportant des fonctions -OH et C=O (quinone) reliés par des groupements -CH₂-O- et CH-N-, nous paraîtrait plus représentative.

- La formule de DRAGUNOV cité par ROOCK (1977) se rapproche des précédents critères mais ne prend pas en compte l'existence possible de fonctions carboxyliques aromatiques

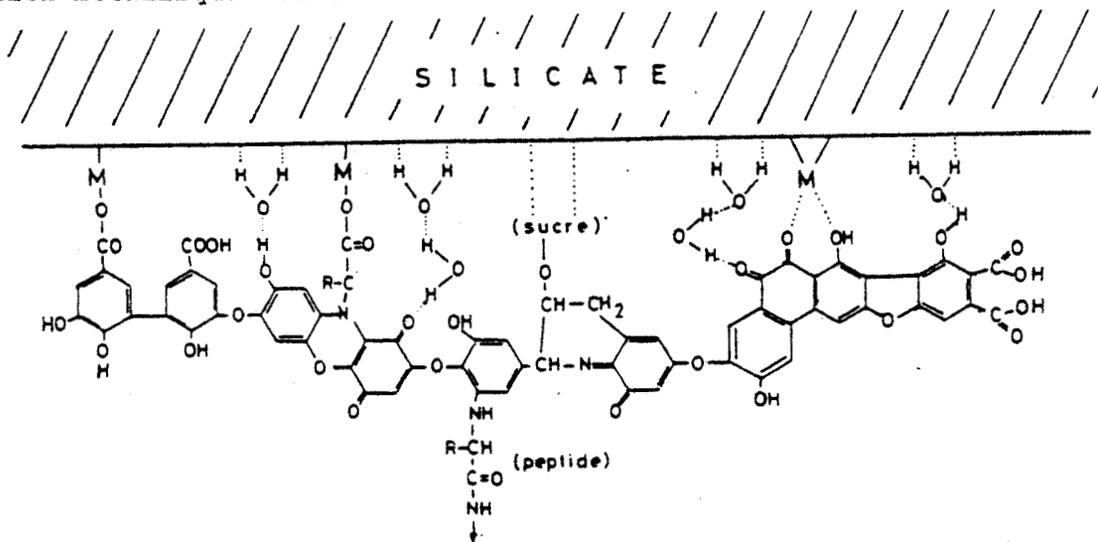


- STEVENSON (cité par BUFFLE, 1977) propose deux schémas respectivement d'acide fulvique et d'acide humique. On observe pour le premier des sites chélatants portés par des groupements flexibles plus ou moins longs et pour le second des peptides et des sucres, éléments structuraux pouvant également assurer l'établissement d'interactions avec des ions métalliques.

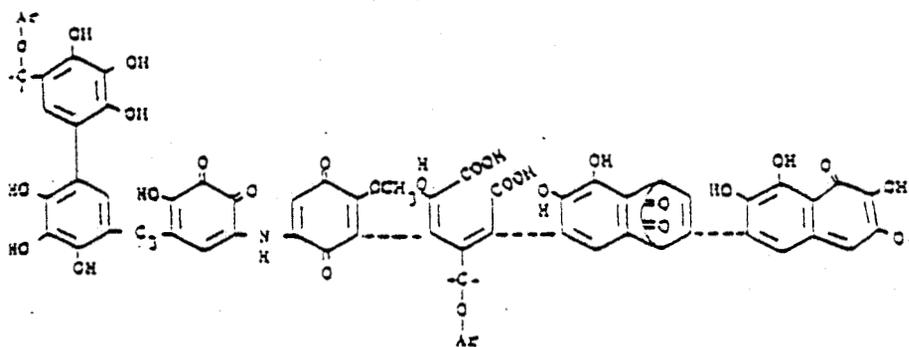




L'acceptation de ces deux modèles interdit toute possibilité de formation d'acide humique à partir de l'acide fulvique et inversement. Ces deux modèles qui montrent une faible taille moléculaire des acides humique et fulvique, sont incompatibles avec les larges absorptions qui caractérisent les spectres infra-rouge des substances humiques. Le modèle acide humique, quant à lui, permet surtout d'expliquer le rôle que peuvent jouer ces molécules dans la déstabilisation de certains édifices particuliers (argile, kaolinite) par séquestration et extraction d'un cation métallique stabilisant.



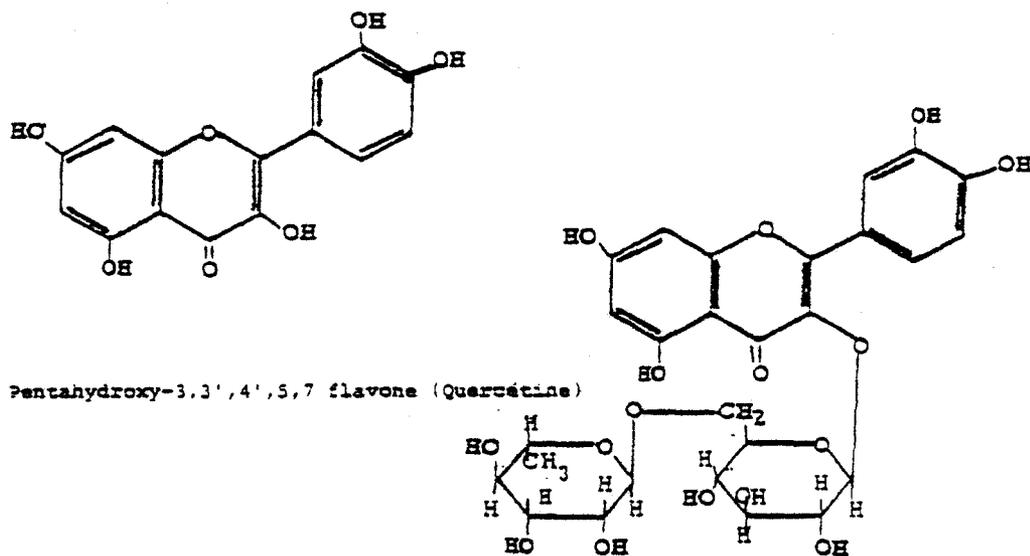
- FLAIG (cité par KALINOWSKI, 1987) a proposé un modèle d'acide humique en se basant sur la structure de la lignine dont certains monomères issus de sa décomposition, se seraient transformés en donnant des groupements quinone, polymérisés en associant des molécules azotées



Ce modèle est caractérisé par l'absence d'une structure aliphatique et de groupements carboxyliques portés par des cycles aromatiques. Toute existence de sites de complexation de type salicylate et phtalate se trouve donc écartée. De plus, la stabilité de cette structure est assurée essentiellement par des liaisons reconnues de faible énergie, ce qui est incompatible avec la stabilité de l'édifice macromoléculaire des substances humiques.

5- ESSAIS DE MODELISATION

STEELINK et coll. (1983) utilisent la quercétine et la rutine pour tenter d'identifier dans les spectres RMN ^1H et ^{13}C de substances humiques aquatiques, des groupements fonctionnels caractéristiques de ces molécules.



De même, MALLEVIALLE (1974) choisit successivement le phénol et l'acide salicylique comme modèle simple pour l'étude du mécanisme de l'action de l'ozone. Depuis, il s'est développé des approches de modélisation:

- soit par le calcul
- soit par synthèse bactérienne
- soit encore par synthèse chimique.

5.1- Modélisation par le calcul

MURRAY et LINDER (1983) ont élaboré un programme informatique qui, d'une façon aléatoire, construit de petites entités structurales et les associe au moyen de liaisons covalentes. Les édifices théoriques résultants révèlent la présence de sites potentiels de complexation intermoléculaire par le biais d'atomes d'oxygène susceptibles de participer à la sphère de coordination d'un métal.

Cependant, la composition élémentaire de tels édifices est exempte d'azote; de plus ce procédé ne permet pas de progresser dans la compréhension du mécanisme d'interaction des substances humiques avec les cations métalliques. Enfin, cette modélisation ne prend pas en compte les possibilités de déformation et de réarrangement des molécules humiques.

5.2- Modélisation par voie de synthèse

5.2.1- Synthèse bactérienne

KOSINKIEWICZ (1977a) a montré que la culture de bactéries *Pseudomonas acidovorans* et *Pseudomonas* sp dans un milieu enrichi en tyrosine et constitué soit de glucose, soit de glucose et d'extrait de levure, conduit à la formation de composés organiques à groupements phénoliques. Ces derniers subissent diverses oxydations dues à l'action phénoloxydase de ces bactéries, stimulées par la présence de tyrosine. L'acidification du surnageant du milieu de culture conduit à la précipitation de polymères de couleur brun-noir. Ces polymères présentent des propriétés physico-chimiques (couleur, taille moléculaire) semblables à celles des substances humiques naturelles.

Ce procédé de synthèse présente cependant quelques inconvénients. Des quantités significatives de substances humiques issues des bactéries, ne sont obtenues qu'après au moins douze semaines d'incubation à 28°C. Une étude réalisée sur leur masse molaire (KOSINKIEWICZ, 1977b) montre qu'elles sont constituées de fractions de taille moléculaire supérieure à 100 000 (8% - 12%) et de taille moléculaire située entre 40 000 et 50 000 (38% - 46%). Ceci indique une prédominance de formation de substances humiques de masse molaire élevée, ce qui n'est pas le cas des substances humiques aquatiques.

Afin d'améliorer le rendement de synthèse, KOSINKIEWICZ (1977c) introduit des stimulateurs phénoloxidasiques: aniline, azobenzène et chloraniline. Cependant, seule une augmentation de la vitesse de formation est observée dans le milieu de culture.

5.2.2- Synthèse chimique

CORNEC et BRUSSET (1950) ont montré que l'oxydation en milieu basique de molécules organiques polyphénoliques, en particulier celles susceptibles de donner des structures quinoniques, conduit à la formation de produits brunâtres dits "acides humiques". Ces auteurs ont utilisé la molécule d'hydroquinone qui a été soumise à différents oxydants tels le peroxyde d'hydrogène, le persulfate de sodium, l'hypochlorite de sodium et l'air. En solution alcaline, le persulfate de sodium s'est révélé l'oxydant le mieux adapté à la transformation rapide de l'hydroquinone. En effet, alors que les autres oxydants donnent des rendements infimes, même après plusieurs jours de réaction, l'oxydation au persulfate de sodium fournit 90% de rendement en masse, relativement à l'hydroquinone. Après une heure d'oxydation, les acides humiques sont isolés par acidification du mélange réactionnel, au sein duquel ils précipitent.

En remplaçant le persulfate de sodium par le persulfate d'ammonium, ces auteurs ont observé une forte diminution du pH du milieu réactionnel. Cette variation de pH, qui persiste même en présence d'un excès de base, favorise la formation de quinhydrone. Cette constatation a conduit les auteurs à effectuer l'oxydation de l'hydroquinone dans un milieu tampon. L'oxydation dans un tampon ammoniacal ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) à $\text{pH} = 9,5$, conduit à la formation d'un produit de couleur noire et dont l'analyse élémentaire indique la présence d'azote. A pH compris entre 11,2 et 12,2, maintenu par ajout d'hydroxyde de sodium, l'oxydation conduit à un produit brun ne contenant pas d'azote. La quantité d'acides humiques obtenue est relativement plus importante dans le deuxième milieu.

Au niveau de la précipitation, les auteurs ne précisent pas ni la valeur de pH , ni le temps nécessaire, ni le réactif utilisé. Seules les substances humiques de faible masse molaire (acides fulviques) étant solubles en milieu acide, on peut s'attendre à ce que seules les substances humiques de plus haute masse molaire précipitent.

Néanmoins, ce procédé présente les avantages de rapidité et de facilité de mise en oeuvre. Il doit constituer, à condition de le contrôler, un moyen permettant de progresser vers la modélisation des substances humiques.

6- CONCLUSION: INSUFFISANCE DE CARACTERISATION

A la méconnaissance des processus d'élaboration des substances humiques s'ajoutent les imprécisions sur leurs interactions en milieu hydrique avec les cations métalliques. Ces imprécisions sont dues essentiellement à une mauvaise maîtrise de techniques d'analyse cependant performantes et à l'oubli systématique de certaines propriétés de ces molécules.

Les résultats spectroscopiques, d'analyse élémentaire et de détermination de la taille moléculaire des substances humiques mettent en évidence des différences de structure dues à la variabilité de leurs classes et de leurs origines.

Seule la synthèse chimique d'un matériel humique original et sa caractérisation au moyen d'une démarche analytique rigoureuse doivent permettre de progresser vers une meilleure modélisation des substances humiques.

CHAPITRE II

**DEFINITION D'UNE DEMARCHE ANALYTIQUE :
APPLICATION A UN MATERIEL HUMIQUE EXISTANT**

Comme il a été montré dans le chapitre précédent, des molécules de structure chimique relativement simple du genre acide salicylique (MALLEVIALLE, 1974), glycine (ERNST et coll., 1975), rutine et quercétine (STEELINK et coll., 1983), ont été utilisées dans des études visant à représenter:

- la structure des substances humiques aquatiques
- leurs interactions avec les cations métalliques.

Actuellement, les matériaux humiques commerciaux (FLUKA et ALDRICH) sont largement utilisés, soit lors d'études d'identification de groupements fonctionnels par RMN ^1H et ^{13}C (STEELINK et coll., 1983), soit lors d'études de complexation du cadmium (CORRALES, 1984) et du cuivre (GIANNISSIS, 1986).

Au laboratoire du département de Toxicologie-Hydrologie-Hygiène (Université LILLE II), l'acide humique FLUKA (AHF) a été expérimenté afin d'apprécier les modifications de biodisponibilité des métaux en interaction avec les substances humiques (POMMERY et coll., 1985; POMMERY, 1985). Nettement moins utilisé, l'acide humique ALDRICH a été choisi par LANDRUM et Coll. (1984), HAAS et KAPLAN (1985), du point de vue de la complexation de polluants organiques.

Notre choix s'est porté sur l'acide humique FLUKA dont la plus grande utilisation fait à l'heure actuelle le composé de référence, alors que sa provenance demeure imprécise* et surtout que, paradoxalement, aucune étude structurale n'a encore été entreprise.

Nous n'intégrerons dans notre démarche analytique que des techniques physico-chimiques les moins perturbatrices à l'égard de la structure de la molécule humique. Nous n'avons donc pas eu recours à la pyrolyse, technique pourtant très utilisée à l'heure actuelle (HAIDER et SCHULTEN, 1985; BRUCHET et coll., 1986). L'étude des propriétés complexantes vis-à-vis du cadmium sera basée sur l'exploitation des méthodes électrochimiques.

* Il s'agit d'un produit extrait d'une grotte située dans le Sud de l'Allemagne

1- CHOIX DES METHODES POUR LA CARACTERISATION STRUCTURALE

1.1- Détermination de la taille moléculaire

L'ultrafiltration nous paraît être la technique la plus fiable. Elle est d'une mise en oeuvre simple et peut être considérée comme une technique préparative bien adaptée au fractionnement des composés macromoléculaires. Néanmoins, quelques précautions sont nécessaires à l'emploi de cette technique. MANKA et REBHUN (1982) ont en effet montré que la pression d'azote utilisée et la concentration en substance humique, peuvent perturber la détermination de la taille moléculaire. BUFFLE et coll. (1978) recommandent de ne pas ultrafiltrer au delà de 90% du volume initial. Il convient également d'évoquer:

- les risques de réarrangement moléculaire des substances humiques, notamment par voie radicalaire, consécutif à la concentration
- les risques de variation de structure tertiaire sous l'effet des modifications de pH au cours de l'ultrafiltration.

Afin d'éliminer ces différents risques de perturbation, nous avons effectué l'ultrafiltration dans les conditions suivantes:

- 100ml d'une solution d'acide humique à la concentration de $2g.l^{-1}$ dans un milieu minéral synthétique (MMS) sont introduits dans une cellule de type Amicon M402 munie d'un dispositif permettant le lavage en dynamique. Le lavage a été effectué au moyen de la solution de MMS jusqu'à disparition de l'absorption UV dans l'ultrafiltrat
- le pH a toujours été contrôlé et égal à 8 dans le perméat. Ce dernier a été fractionné en cascade sur les différentes membranes microporeuses en respectant leurs conditions de pH et de pression présentées ci-dessous

TYPE DE MEMBRANE	pH limite	PRESSION MAXIMALE	POINT DE COUPURE
XM 300	2 < pH < 11	10-25 psi (0,7-1,7 atm)	300.000
XM 50	2 < pH < 11	10-25 psi (0,7-1,7 atm)	50.000
YM 5	2 < pH < 11	70 psi (4,7 atm)	5.000
* UM 2	< 12	110 psi (6,7 atm)	1.000
* YCO 5	< 9	110 psi (6,7 atm)	500

* membranes utilisées pour le fractionnement du modèle original (Cf. IVème chapitre)

Nous avons également retenu la chromatographie par perméation de gel afin de préciser la limite supérieure de la taille moléculaire du matériel humique. L'élution est effectuée sur gel Sepharose 4B, de domaine de fractionnement compris entre 6.10^4 et 2.10^7 . Cette élution est maintenue constante en débit ($9,1 \text{ mL. cm}^{-1}.\text{h}^{-1}$) grâce à une pompe péristaltique GILSON Minipuls 2. La détection UV à 220nm est assurée en continu au moyen d'une cuve à circulation équipant un spectrophotomètre PYE-UNICAM SP8-400. L'étalonnage de la colonne de perméation est réalisée à l'aide de quatre solutions de dextran Fluka ($M= 5.10^5, 11.10^4, 4.10^4$ et 6.10^3).

1.2- Spectrophotométrie U.V

Malgré l'absence de bandes d'absorption caractéristiques dans le spectre UV des substances humiques, cette technique a été retenue pour deux raisons:

- tout d'abord, pour apprécier au moyen de la mesure des coefficients d'extinction molaire (ϵ), le degré de polysubstitution des noyaux aromatiques qui sont les principaux groupements fonctionnels
- ensuite, pour mesurer la répartition des divers groupements fonctionnels dans chaque fraction d'ultrafiltration.

Les spectres U.V entre 180nm et 400nm sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible PYE UNICAM SP8-400.

1.3- pHmétrie

Cette technique a été retenue afin:

- d'évaluer la proportion de groupements fonctionnels chimiquement distincts
- d'évaluer l'acidité de chaque type de groupement fonctionnel
- de préciser les valeurs des pKa correspondants.

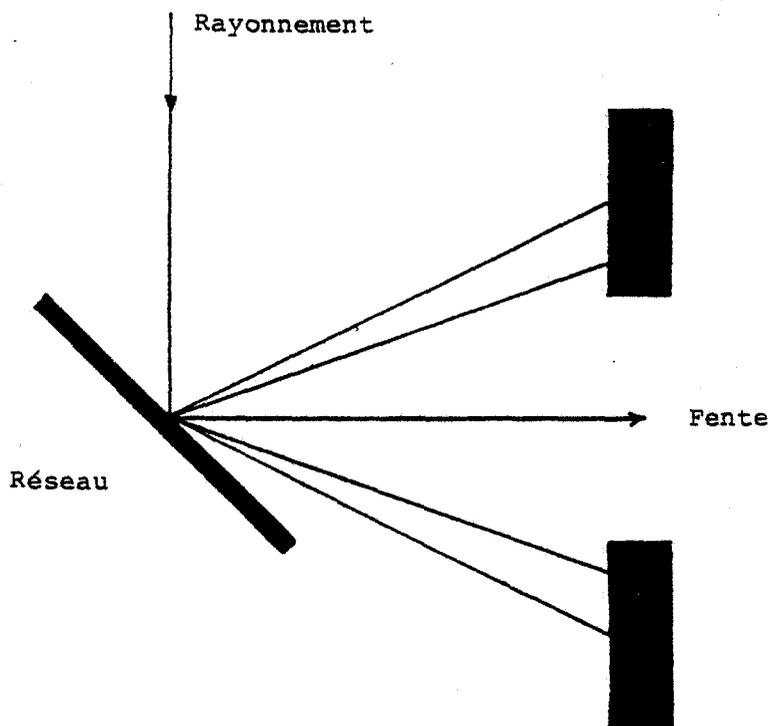
Pour cette étude, les substances humiques dissoutes dans 100ml de soude (0,1N) de laquelle le gaz carbonique a été éliminé par dégazage à l'azote pendant 30 minutes, sont dosés par une solution d'acide chlorhydrique (0,5N). Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode de verre et d'une référence au calomel reliées à un pHmètre USB TACUSSEL.

1.4- Spectrométrie infra-rouge

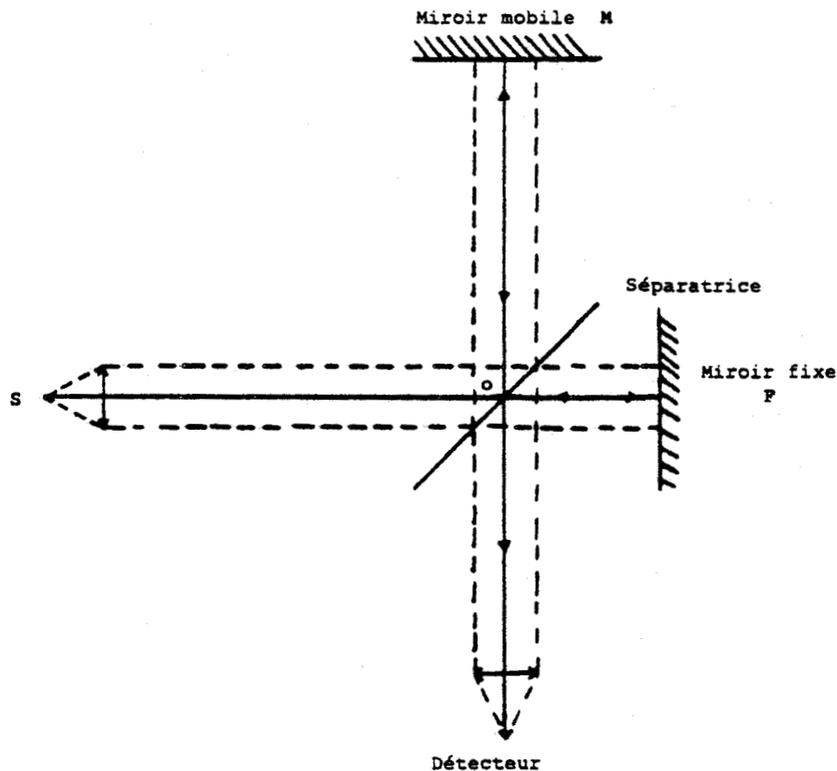
Bien que très utilisée, ainsi que nous l'avons vu dans le premier chapitre, cette technique est cependant limitée du fait de la faible résolution des spectres. C'est pourquoi nous utiliserons la spectrométrie infra-rouge par transformée de Fourier qui présente de nombreux avantages par rapport à la spectrométrie infra-rouge classique.

1.4.1- Principe de la spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)

Pour mesurer l'intensité du rayonnement émis par un échantillon en fonction de la fréquence, la spectrométrie infra-rouge classique utilise un système dispersif constitué de réseaux. Les fréquences sont réparties en bandes qui sont dirigées vers une fente puis un détecteur :



La spectrométrie infra-rouge par transformée de Fourier n'utilise pas de système dispersif. Toutes les radiations lumineuses transmises par l'échantillon sont reçues simultanément par un détecteur. Cette détection est rendue possible par l'utilisation de l'interféromètre de Michelson :



L'obtention d'un spectre, c'est-à-dire d'une représentation de l'intensité des radiations en fonction de leur nombre d'onde ($\bar{\nu}$), résulte du traitement mathématique du signal détecté sous forme d'interférogramme.

1.4.2- Principe de fonctionnement de l'interféromètre de MICHELSON

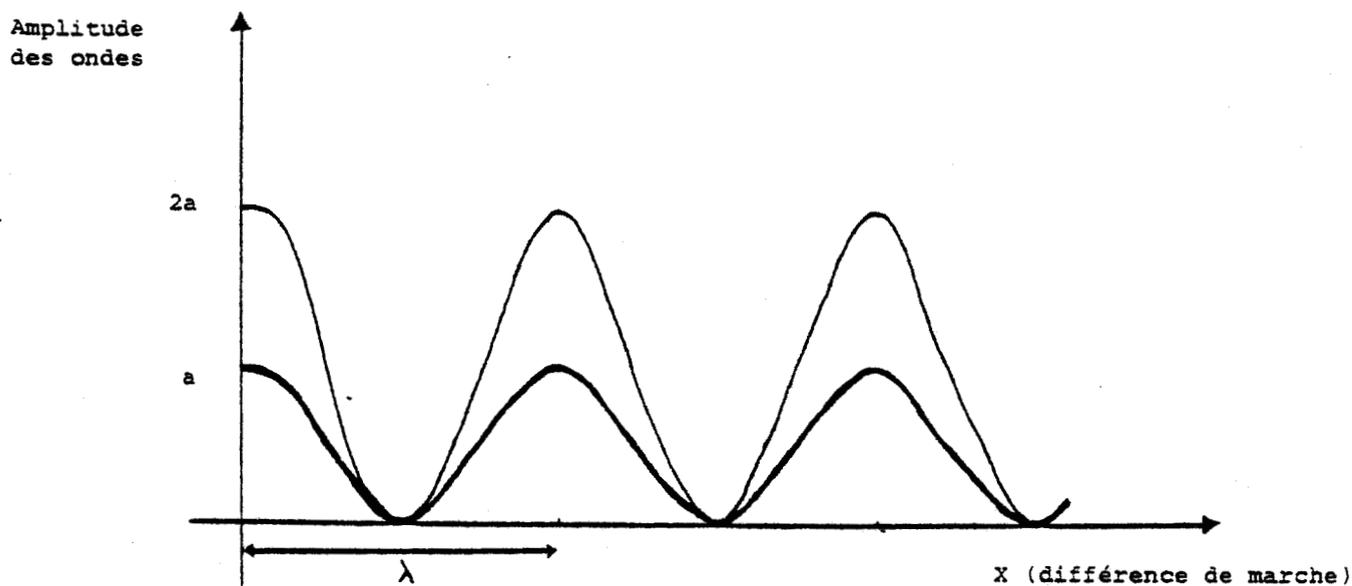
C'est un dispositif qui peut séparer un faisceau de radiations lumineuses en deux voies et les recombinaer de telle façon que les variations d'intensité du faisceau résultant puissent être mesurées par un détecteur en fonction de la différence de marche.

L'interféromètre est constitué de deux miroirs plans perpendiculaires entre eux. L'un est mobile et peut donc se déplacer le long de son axe à vitesse constante, l'autre est fixe. Entre les deux, se trouve une lame séparatrice fixe placée à 45° du rayonnement lumineux provenant de l'échantillon. Si on considère ce rayonnement dont la direction est perpendiculaire au miroir fixe, la lame séparatrice le divise en deux parties, l'une est transmise vers le miroir fixe, l'autre est réfléchie vers le miroir mobile. Après leur réflexion sur chacun des miroirs, ces deux parties du rayonnement se recombinaent au niveau de la lame séparatrice en un seul faisceau qui est dirigé vers le détecteur. On peut donc déterminer une différence de marche $d = 2 (OM - OP)$ entre les

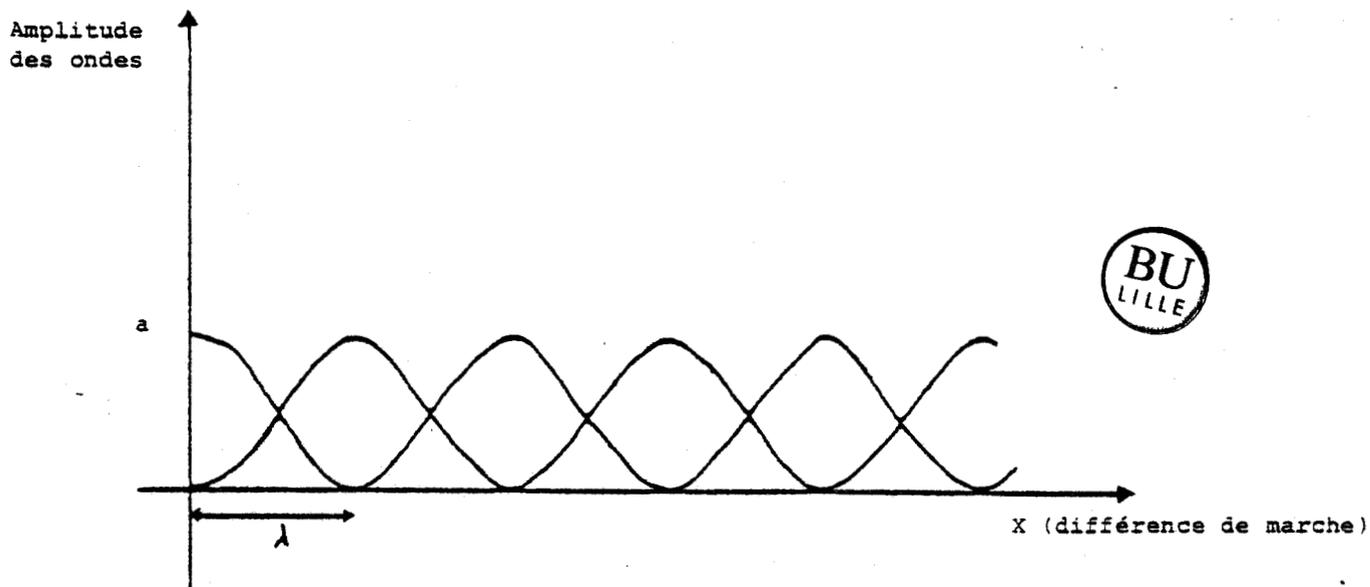
deux faisceaux qui ont été réfléchis sur les deux miroirs. De leur recombinaison résulte un système d'interférences lumineuses.

Cas d'une source de lumière monochromatique de longueur d'onde λ

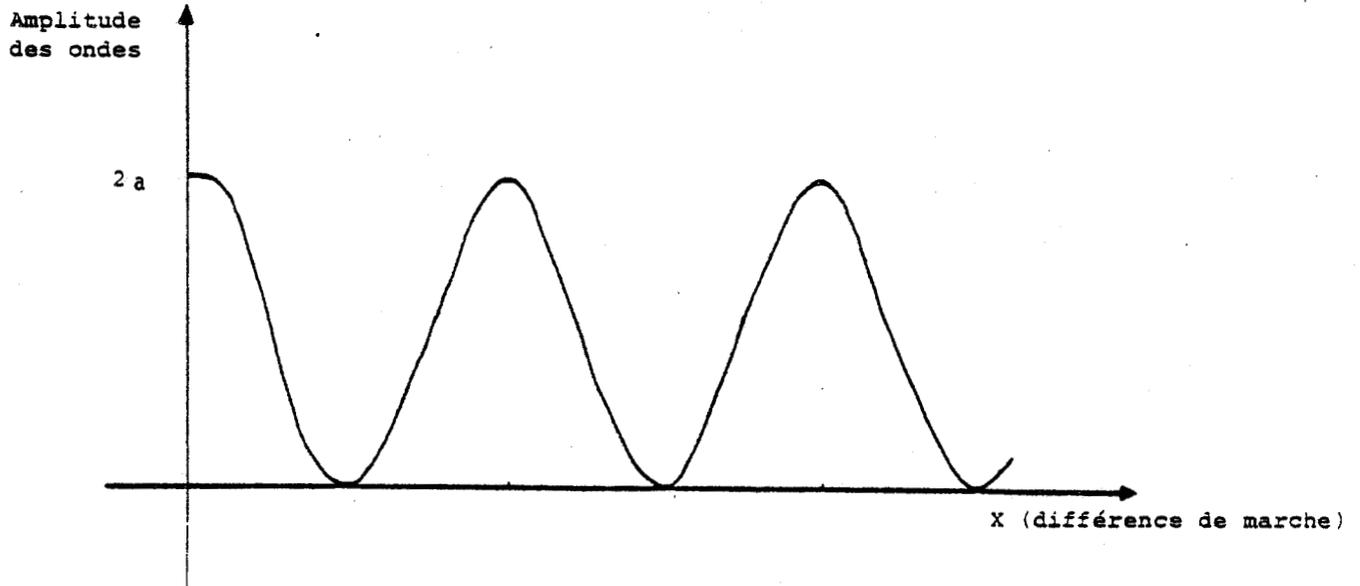
Quand le miroir fixe et le miroir mobile sont équidistants de la séparatrice, les deux faisceaux après réflexion sur chacun des miroirs, se combinent en phase sur la séparatrice, leur différence de marche est nulle. Le détecteur enregistre donc la somme des ondes des deux faisceaux :



Si le miroir mobile est déplacé de $\lambda/4$, la différence de marche entre les faisceaux est de $\lambda/2$, ils sont déphasés de 180° . L'interférence est destructive et le détecteur enregistre une intensité nulle :

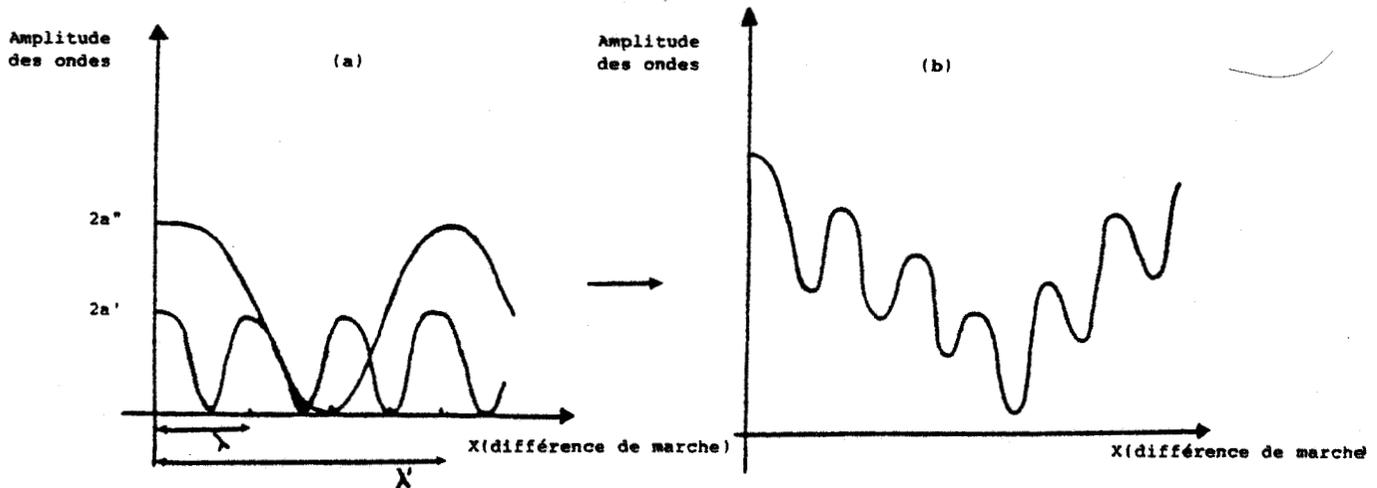


Si on déplace à nouveau le miroir de $\lambda/4$, les deux faisceaux redeviennent en phase et l'intensité mesurée est au maximum. Donc, à chaque déplacement d'une longueur d'onde, ce modèle d'interférences constructives et destructives va se répéter en formant une vibration sinusoidale: c'est l'interférogramme:



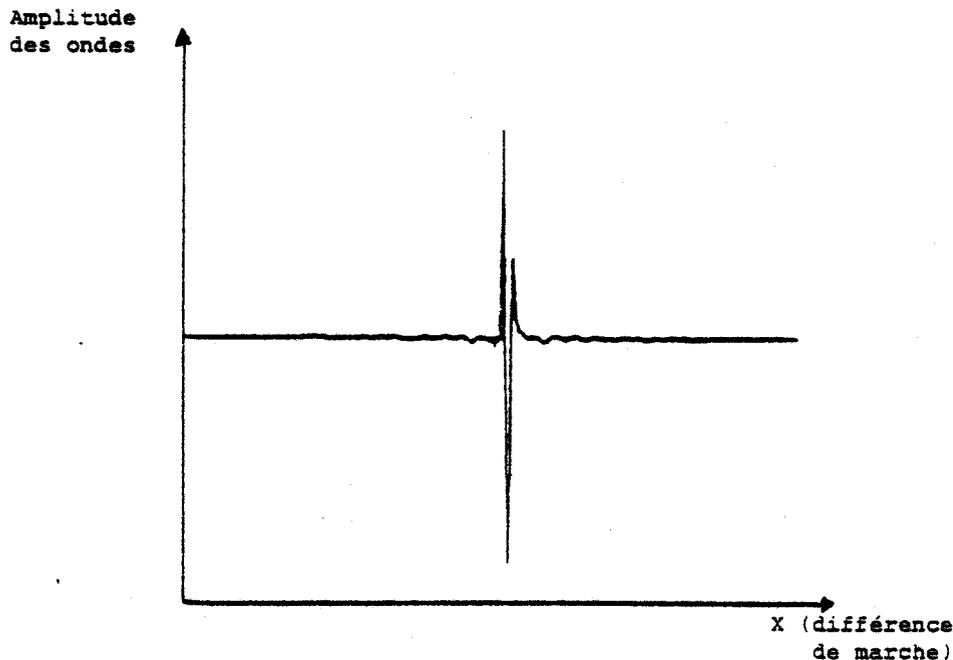
Cas d'une source de lumière composée de deux fréquences

Dans ce cas, deux vibrations sinusoidales d'amplitude $2a'$ et $2a''$ interfèrent



Cas d'une source de lumière polychromatique

Pour une lumière polychromatique, les ondes ne s'ajoutent que lorsque la différence de marche est nulle. On obtient une interférence constructive totale. En s'éloignant de cette condition, les interférences deviennent destructives et le signal de l'interférogramme s'annule rapidement :



L'étude théorique établit que cet interférogramme qui est défini comme une fonction du temps $I(t)$, car le miroir mobile se déplace à vitesse constante, est une transformée de Fourier de la grandeur physique qui est le spectre. Il est donc possible de calculer le spectre par traitement informatique de l'interférogramme mesuré.

Malgré quelques inconvénients qui affectent surtout l'amplitude du signal:

- efficacité de la lame séparatrice,
- réponse du détecteur

cette technique de spectrométrie infra-rouge par transformée de Fourier présente beaucoup plus d'avantages que la spectrométrie infra-rouge classique.

1.4.3- Avantages présentés par l'IRTF

Avantage de Fellgett

Soit M le nombre d'éléments spectraux compris dans la zone à étudier et t le temps de cette étude. Avec un spectromètre dispersif, chaque élément est observé pendant le temps t/M et le rapport signal sur bruit est proportionnel à $\sqrt{t/M}$. Grâce au dispositif de l'interférométrie, chaque élément est exploré pendant le temps total par la méthode dite "multiplex" et le rapport signal sur bruit est alors proportionnel à \sqrt{t} . Le gain de la méthode, soit $G = \sqrt{M}$ est appelé avantage de Fellgett.

Avantage de Jacquinot

C'est la grande étendue que l'on peut donner au faisceau lumineux sans nuire à la résolution du spectre. L'énergie lumineuse dans un spectromètre équipé d'un système dispersif est limitée par le monochromateur tandis que le spectromètre interférométrique laisse passer toute la lumière à travers l'interféromètre, l'ouverture de celui-ci ayant un diamètre de 5 cm. Ce gain en énergie est de l'ordre de 100 par rapport à un spectromètre à système dispersif de même résolution. Il rend en plus les spectromètres interférométriques accessibles aux études à très haute résolution.

Avantage sur la résolution

Contrairement au spectromètre à système dispersif qui n'est performant que sur un domaine spectral limité, le spectromètre interférométrique présente une résolution constante sur tout le domaine spectral étudié, qui est très large (400 à 4000 cm^{-1}). Cette résolution est inversement proportionnelle à la différence de marche maximum atteinte par l'interférogramme.

Autres avantages

La spectrométrie IRTF est très rapide dans l'enregistrement d'un spectre. La translation du miroir mobile en travail de routine a une amplitude de l'ordre du millimètre et le temps d'acquisition des informations nécessaire à l'obtention d'un spectre est d'environ une

seconde. Chaque fréquence infra-rouge est modulée par l'interféromètre à sa propre fréquence. Ce procédé permet à la spectrométrie IRTF de réduire remarquablement la lumière parasite.

Pour identifier les différents groupements fonctionnels des substances humiques par spectrométrie infra-rouge, nous avons utilisé le spectromètre IRTF NICOLET du type 7199B. Il est équipé d'une source globar, d'une séparatrice constituée par une lame en bromure de potassium (KBr) et d'un détecteur constitué par un semi-conducteur ternaire HgCdTe.

Du fait d'intenses et larges absorptions infra-rouge centrées à 3400 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} observées sur le spectre de l'eau et gênant l'exploitation des spectres des substances humiques en solution aqueuse, nous avons utilisé le mode d'échantillonnage par pastillage dans KBr. Ceci permet d'explorer une large gamme d'absorption infra-rouge ($400 - 4000\text{ cm}^{-1}$) qui rend plus accessible l'acquisition des absorptions d'élongation et de déformation sur les basses fréquences et facilite ainsi la détermination du degré de substitution des cycles aromatiques.

1.5- Spectrométrie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

L'intérêt de cette technique dans le cas des substances humiques a été révélé par quelques études (STEELINK et coll., 1983) prouvant l'existence d'espèces radicalaires au sein de ces molécules. Nous avons donc retenu cette technique pour préciser les éventuelles propriétés paramagnétiques des composés étudiés.

Les spectres RPE sont enregistrés sur un appareil VARIAN E-109 fonctionnant en bande X, avec une modulation de 100kHz. Les mesures en phase solide sont effectuées dans une cavité E-231 fonctionnant dans le mode TE₁₀₂. Les échantillons sont alors disposés dans des tubes de quartz de 4 mm de diamètre extérieur. Les mesures en phase liquide ont nécessité l'utilisation d'une cavité E-238 fonctionnant dans le mode TM₁₁₀, les échantillons étant disposés dans une cellule plate.

1.6- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les controverses les plus marquées, relatives à l'opportunité de cette technique, concernent les performances de l'appareillage. Ainsi, sur un spectromètre VARIAN HA-100 à 100 MHz, RUGGIERO et coll. (1980) ont obtenu, après 1000 accumulations, des spectres RMN ^1H pour des acides

fulviques, tandis que STEELINK et coll. (1983), même sur un spectromètre VARIAN EM-360 (360 MHz) ont été gênés par un paramagnétisme important.

Notre étude de RMN ^1H et ^{13}C a été effectuée à l'aide d'un spectromètre BRUCKER W.P.80 SY (80MHz), équipé d'un ordinateur Data système Aspect 2000 possédant une mémoire de 48K octets.

2- METHODES ELECTROCHIMIQUES ET MATHEMATIQUES RETENUES POUR L'ETUDE DES PROPRIETES COMPLEXANTES

2.1- Matériel et méthodes

Les solutions titrées en cadmium ont été préparées dans l'eau déminéralisée à partir d'une solution mère de nitrate de cadmium 1g.l^{-1} (MERCK):

Les substances humiques sont solubilisées à la concentration de $0,5\text{ g.l}^{-1}$ dans un milieu minéral synthétique (MMS) de composition

Chlorure de calcium (CaCl_2)	81,06 mg.l^{-1}
Nitrate de sodium (NaNO_3)	4,50 mg.l^{-1}
Chlorure de sodium (NaCl)	14,50 mg.l^{-1}
Sulfate de magnésium hydraté ($\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$)	75,70 mg.l^{-1}
Sulfate de sodium (Na_2SO_4)	39,50 mg.l^{-1}
Bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	135 mg.l^{-1}

Ce milieu est caractérisé par un $\text{pH} = 8$ et une force ionique de $0,006\text{M}$.

Nous avons contrôlé:

- l'absence de précipitation des substances humiques tout au long de l'étude électrochimique (sur plusieurs jours) par centrifugation suivie de la mesure de la D.O de la solution en spectrophotométrie UV

- l'absence des propriétés complexantes du MMS vis-à-vis du cadmium, vérifiée par l'obtention d'une relation linéaire entre l'intensité du courant

de diffusion et la concentration totale en métal.

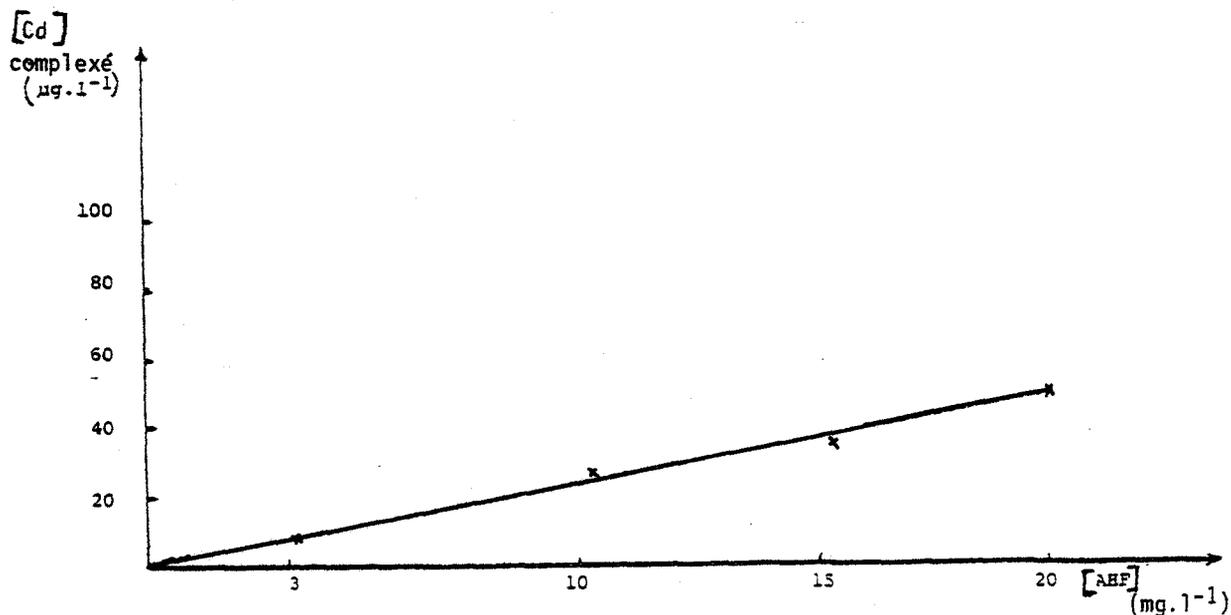
Des quantités croissantes de cadmium sont réparties entre deux séries d'échantillons, la première série étant préparée dans le MMS, la deuxième dans ce milieu minéral contenant les substances humiques à la concentration de 15mg.l^{-1} .

2.1.1- Conditions polarographiques

Sur un polarographe EGG-PARC modèle 174A équipé du système d'électrodes type EGG-PARC modèle 303A SMDE, et relié à un enregistreur PHILIPS-PM 8041, le métal libre est déterminé en parallèle dans les deux séries, selon les conditions suivantes:

- potentiel de préélectrolyse: $-0,9\text{ V}$. Il a été déterminé en considérant le complexe $[\text{Cd-EDTA}]$ comme non labile (FIGURA et Mc DUFFIE, 1979) et en recherchant le potentiel limite (le moins négatif) qui ne provoque pas l'apparition d'un signal de cadmium libre en PIDRA
- modulation d'amplitude: 50mV
- vitesse d'enregistrement: 5mV.s^{-1}
- temps de dégazage à l'azote : 4 minutes
- temps de préélectolyse sous agitation: 3 minutes, dont 30 secondes d'homogénéisation en fin de préélectrolyse et sous arrêt de l'agitation.

L'absence de phénomènes d'adsorption des substances humiques sur l'électrode de mesure a été vérifiée par la linéarité de réponse en cadmium complexé lorsqu'on fait varier en parallèle les concentrations en cadmium total ($0, 15, 50, 75, \dots, 100\mu\text{g.l}^{-1}$) et en substance humique ($0, 3, 10, 15, \dots, 20\text{mg.l}^{-1}$).



2.1.2-Conditions d'analyse potentiométrique

Une électrode sélective du cadmium est utilisée dans cette étude. Elle est de type ORION modèle 94-48, associée à une référence "simple jonction" 90-01, toutes deux reliées à un potentiomètre ORION 701A. Le dosage du cadmium libre est effectué en parallèle dans le milieu minéral ne contenant pas de substances humiques et dans celui qui en contient.

Le temps de réponse de l'électrode est fixé à 5 minutes. Entre chaque mesure, la constance du potentiel initial (potentiel du MMS = -295mV) est vérifiée.

2.2- Etude cinétique

Le préalable cinétique a été respecté en mesurant le cadmium libre par électrode sélective dans la solution contenant la plus forte concentration en métal (10mg.l^{-1}) en interaction avec les substances humiques, à des temps de 5 minutes, une heure, 24 heures, ..., 96 heures.

2.3- Méthodes mathématiques pour le traitement des résultats électrochimiques

Les substances humiques étant des macromolécules, les traitements mathématiques n'envisageant la complexation des cations métalliques que sous l'angle:

- soit de réactions d'échanges ioniques (SCHNITZER et SKINNER, 1965; GAMBLE et coll., 1970; ZUNINO et coll., 1972)

- soit de substitution de protons de la molécule complexante par les cations métalliques (SHUMAN et WOODWARD, 1973; 1977)

sont inadaptés car, les formulations utilisées considèrent des complexes 1:1 ou 1:2 et, l'interaction peut s'effectuer par d'autres processus. Le traitement mathématique qui prend en compte toutes ces possibilités est celui décrit par KLOTZ (1946) et appliqué au cas de la complexation d'une molécule simple par une protéine.

2.3.1- Formulation de KLOTZ

2.3.1.1- Cas d'une molécule présentant un seul site de complexation

A l'équilibre de la complexation du métal M, on peut écrire l'équation:



La constante thermodynamique de cet équilibre est:

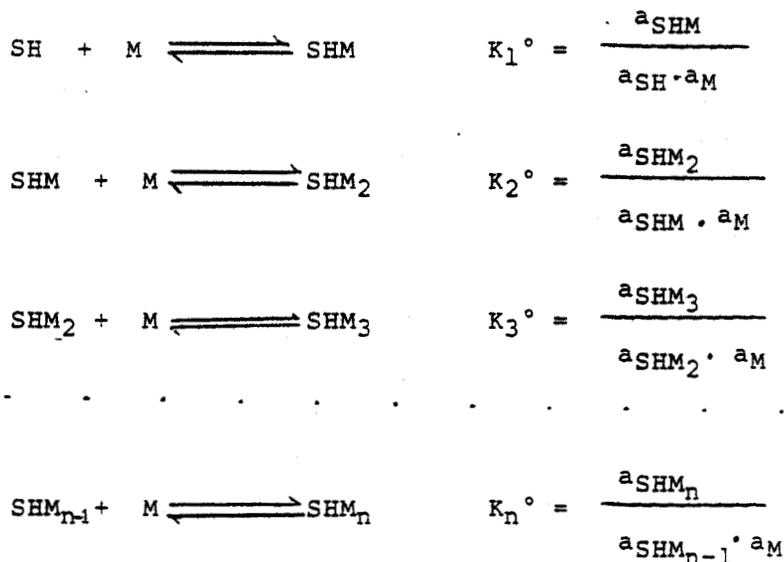
$$K^\circ = \frac{a_{SHM}}{a_M \cdot a_{SH}} = \frac{f_{SHM} \cdot [SHM]}{f_M [M] \cdot f_{SH} \cdot [SH]}$$

a_M , a_{SH} , a_{SHM} sont respectivement les activités de M, SH et SHM
 f_M , f_{SH} , f_{SHM} , les coefficients d'activité
 $[M]$, $[SH]$ et $[SHM]$, les concentrations correspondantes

2.3.1.2- Cas d'une molécule présentant n sites de complexation de même nature

Si les n sites étaient indépendants, ils réagiraient avec l'ion métallique M selon la même constante intrinsèque K° .

Puisque chaque nouvelle interaction de complexation est perturbée électrostatiquement par les ions déjà complexés, le phénomène peut être décrit par une succession d'équilibres:



Cette formulation permet de prendre en compte la succession d'équilibres dans le processus de complexation, mais les constantes $K^{\circ}_1, K^{\circ}_2, \dots, K^{\circ}_n$ sont toutes différentes par suite des interactions entre sites. Si on définit $\bar{\nu}_M^{\circ}$ = nombre moyen de cations métalliques M combinés aux n sites de la molécule SH :

$$\bar{\nu}_M^{\circ} = \frac{a_M \text{ complexé}}{a_{SH} \text{ total}} = \frac{a_{SHM} + 2 a_{SHM_2} + 3 a_{SHM_3} + \dots + n a_{SHM_n}}{a_{SH} + a_{SHM} + a_{SHM_2} + a_{SHM_3} + \dots + a_{SHM_n}}$$

$\bar{\nu}_M^{\circ}$ dépend des constantes des équilibres successifs $K^{\circ}_1, K^{\circ}_2, K^{\circ}_3, \dots, K^{\circ}_n$ et de l'activité du métal (a_M). En effet, à partir de la définition des constantes de stabilité on peut écrire:

$$a_{SHM} = K_1^{\circ} \cdot a_{SH} \cdot a_M$$

$$a_{SHM_2} = K_2^{\circ} \cdot a_{SHM} \cdot a_M = K_1^{\circ} \cdot K_2^{\circ} \cdot a_{SH} \cdot a_M^2$$

$$a_{SHM_3} = K_3^{\circ} \cdot a_{SHM_2} \cdot a_M = K_1^{\circ} \cdot K_2^{\circ} \cdot K_3^{\circ} \cdot a_{SH} \cdot a_M^3$$

$$a_{SHM_n} = K_n^{\circ} \cdot a_{SHM_{n-1}} \cdot a_M = K_1^{\circ} \cdot K_2^{\circ} \cdot K_3^{\circ} \dots K_n^{\circ} \cdot a_{SH} \cdot a_M^n$$

$$\bar{\nu}_M^{\circ} = \frac{K_1^{\circ} a_{SH} a_M + 2 K_1^{\circ} K_2^{\circ} a_{SH} a_M^2 + 3 K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} a_{SH} a_M^3 + \dots + n K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} \dots K_n^{\circ} a_{SH} a_M^n}{a_{SH} + K_1^{\circ} a_{SH} a_M + K_1^{\circ} K_2^{\circ} a_{SH} a_M^2 + K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} a_{SH} a_M^3 + \dots + K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} \dots K_n^{\circ} a_{SH} a_M^n}$$

$$\bar{\nu}_M^{\circ} = \frac{K_1^{\circ} a_M + 2 K_1^{\circ} K_2^{\circ} a_M^2 + 3 K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} a_M^3 + \dots + n K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} \dots K_n^{\circ} a_M^n}{1 + K_1^{\circ} a_M + K_1^{\circ} K_2^{\circ} a_M^2 + K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} a_M^3 + \dots + K_1^{\circ} K_2^{\circ} K_3^{\circ} \dots K_n^{\circ} a_M^n}$$

Lorsque n est supérieur à 2, l'ajustement de cette équation nécessite des estimations de chacune des valeurs K°_i pour les introduire dans le calcul. De bonnes estimations de ces constantes sont très difficiles à obtenir sans connaissance préalable des sites d'interactions réels entre ligand et cation (TANFORD, 1961). Le problème posé par la méthode de KLOTZ est donc de parvenir à des estimations fiables, essentielles pour modéliser mathématiquement ces interactions.

2.3.2- Formulation de SCATCHARD

2.3.2.1- Principe

Pour éviter cette difficulté, SCATCHARD (1949), SCATCHARD et coll. (1950) proposent une autre représentation mathématique qui regroupe les sites de complexation en classes. Pour ce qui est des constantes d'équilibre, dans le cas d'une complexation des ions métalliques M par les substances humiques (SH), la constante intrinsèque qui tient compte des différents équilibres successifs est:

$$K_M^\circ = \frac{a_{SH \text{ lié à } M}}{a_M \cdot a_{SH}}$$

Si l'on cherche à établir la correspondance entre K_M° (constante moyenne) et chacune des constantes des n équilibres élémentaires, on obtient:

$$K_M^\circ = \frac{a_{SHM} + a_{SHM_2} + a_{SHM_3} + \dots + a_{SHM_n}}{a_M \cdot a_{SH}}$$

$$K_M^\circ = \frac{K_1^\circ a_M a_{SH} + K_1^\circ K_2^\circ a^2_{MASH} + K_1^\circ K_2^\circ K_3^\circ a^3_{MASH} + \dots + K_1^\circ K_2^\circ K_3^\circ \dots K_n^\circ a^n_{MASH}}{a_M \cdot a_{SH}}$$

$$K_M^\circ = K_1^\circ + K_1^\circ K_2^\circ a_M + K_1^\circ K_2^\circ K_3^\circ a^2_M + \dots + K_1^\circ K_2^\circ K_3^\circ \dots K_n^\circ a^{n-1}_M$$

Au lieu de déterminer cette constante K_M° ou les constantes $K^\circ_1, K^\circ_2, K^\circ_3, \dots, K^\circ_n$, SCATCHARD (1949) SCATCHARD et coll. (1950) définissent des constantes conditionnelles moyennes associées à chaque classe de sites. L'expression mathématique qui prend en compte la notion de classes de sites associées à des constantes est:

$$\bar{v} = \sum_{i=1}^m N_i \frac{K_i [M]}{1 + K_i [M]}$$

m : nombre de classes de sites complexants portés par la molécule SH

N_i : nombre de sites complexants de classe i

K_i : constante conditionnelle de complexation relative à la classe i

[M] : concentration en cation métallique libre.

2.3.2.2- Analyse de FLETCHER

FLETCHER et coll. (1970) ont montré que l'expression précédente est équivalente à celle proposée par KLOTZ (1946). En effet, en tenant compte des conditions expérimentales (température, pH, force ionique), cette équation se transforme en:

$$\bar{\gamma} = \frac{K_1 [M] + 2 K_1 K_2 [M]^2 + \dots + n K_1 K_2 \dots K_n [M]^n}{1 + K_1 [M] + K_1 K_2 [M]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [M]^n}$$

en posant $C_1 = K_1$; $C_2 = K_1 K_2$; ... ; $C_n = K_1 K_2 \dots K_n$

$$1 + C_1 [M] + C_2 [M]^2 + \dots + C_n [M]^n = P_n [M]$$

avec $C_i > 0$

$$\bar{\gamma} = \frac{[M]}{P_n [M]} \left[\frac{d}{d[M]} \left\{ P_n [M] \right\} \right]$$

Le polynôme $P_n [M]$ possède n racines (certaines peuvent être multiples ou complexes) et on peut écrire:

$$P_n [M] = C_n ([M] - R_1) ([M] - R_2) \dots ([M] - R_n) = C_n \prod_{i=1}^n ([M] - R_i)$$

où R_i est racine de $P_n [M] = 0$

La résolution de l'équation $P_n [M] = 0$ conduit à différents types de racines:

Cas I: Racines réelles et distinctes

$$\frac{\bar{\gamma}}{[M]} = \frac{\sum_{i=1}^n \prod_{j \neq i} ([M] - R_j)}{\prod_{j=1}^n ([M] - R_j)}$$

$$\bar{\gamma} = \frac{[M]}{[M] - R_1} + \frac{[M]}{[M] - R_2} + \dots + \frac{[M]}{[M] - R_n}$$

Chaque racine réelle R_i doit être négative car le polynôme $P_n [M]$ possède des coefficients positifs. Donc $K_i = -1/R_i$ est positif et en remplaçant dans l'équation précédente, on obtient :

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n \frac{K_i [M]}{1 + K_i [M]}$$

Cette expression est

N_i est égal à 1. On peut donc conclure que si $P_n[M]$ possède n racines réelles distinctes, l'équation de SCATCHARD est équivalente à celle de KLOTZ.

Cas II : Racines réelles doubles

$$P_n[M] = \prod_{i=1}^m ([M] - R_i)^{P_i}$$

m : nombre de racines distinctes

P_i : multiplicité de la racine R_i .

$$\bar{y} = \frac{K_1 [M] + 2 K_1 K_2 [M]^2 + \dots + n K_1 K_2 \dots K_n [M]^n}{1 + K_1 [M] + K_1 K_2 [M]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [M]^n} = \sum_{i=1}^m P_i \frac{[M]}{[M] - R_i}$$

Comme $K_i = -\frac{1}{R_i}$, on obtient

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^m P_i \frac{K_i [M]}{1 + K_i [M]}$$

La relation précédente montre l'existence de m classes de sites complexants, p_i sites et une constante moyenne K_i relative aux sites d'une classe. Cette représentation mathématique est la plus utilisée dans les réactions de complexation car elle est bien représentative des phénomènes d'interaction.

Les constantes obtenues par cette relation de SCATCHARD peuvent être reliées aux constantes d'équilibres successifs définies dans la relation de KLOTZ. En effet, s'il existe un seul site:

$$\bar{y} = \frac{K_1 [M]}{1 + K_1 [M]}$$

Mais, si nous normalisons par rapport à la représentation des constantes conditionnelles de stabilité (K'), la relation précédente se transforme en

$$\bar{Y}' = \frac{K_1' [M]}{1 + K_1' [M]}$$

Cas III: Racines complexes et réelles

De telles racines complexes se rencontrent toujours par paires conjuguées et leurs termes sont des facteurs quadratiques de $P_n[M]$. Elles sont de la forme $[M]^2 + 2\alpha[M] + \beta$ où α et β sont des nombres réels et β est positif.

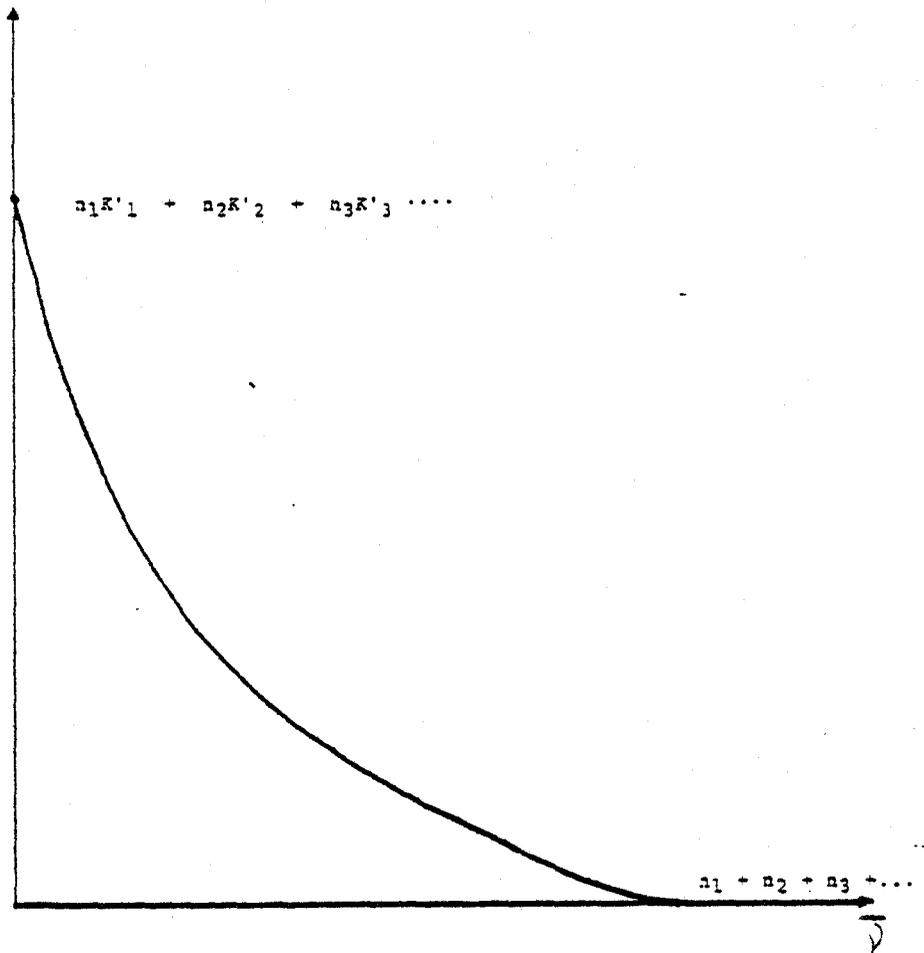
$$P_n [M] = C_n \left[\prod_{j=1}^q ([M]^2 + 2\alpha_j [M] + \beta_j) \right] \prod_{i=1}^{n-2q} ([M] - R_i)$$

$$\bar{Y} = \sum_{j=1}^q \frac{2 [M] ([M] + \alpha_j)}{([M]^2 + 2\alpha_j [M] + \beta_j)} + \sum_{j=1}^{n-2q} \frac{K_j [M]}{1 + K_j [M]}$$

Dans le second terme de l'équation précédente, les valeurs de K_j ne sont pas toutes distinctes (il peut y avoir des racines multiples). Cette forme de \bar{Y} ne permet pas l'interprétation chimique car les termes quadratiques ne peuvent pas représenter des sites distincts sur une macromolécule. Ces facteurs quadratiques ne sont que le reflet mathématique de l'interdépendance des réactions de complexation.

La représentation graphique de la complexation de l'ion M par les sites (n_1, n_2, n_3, \dots) de nature différente, donne une courbe dont les intersections avec les axes d'ordonnées et d'abscisses sont respectivement $n_1 K'_1 + n_2 K'_2 + n_3 K'_3 + \dots$ et $n_1 + n_2 + n_3 + \dots$

$\frac{y}{[x]}$



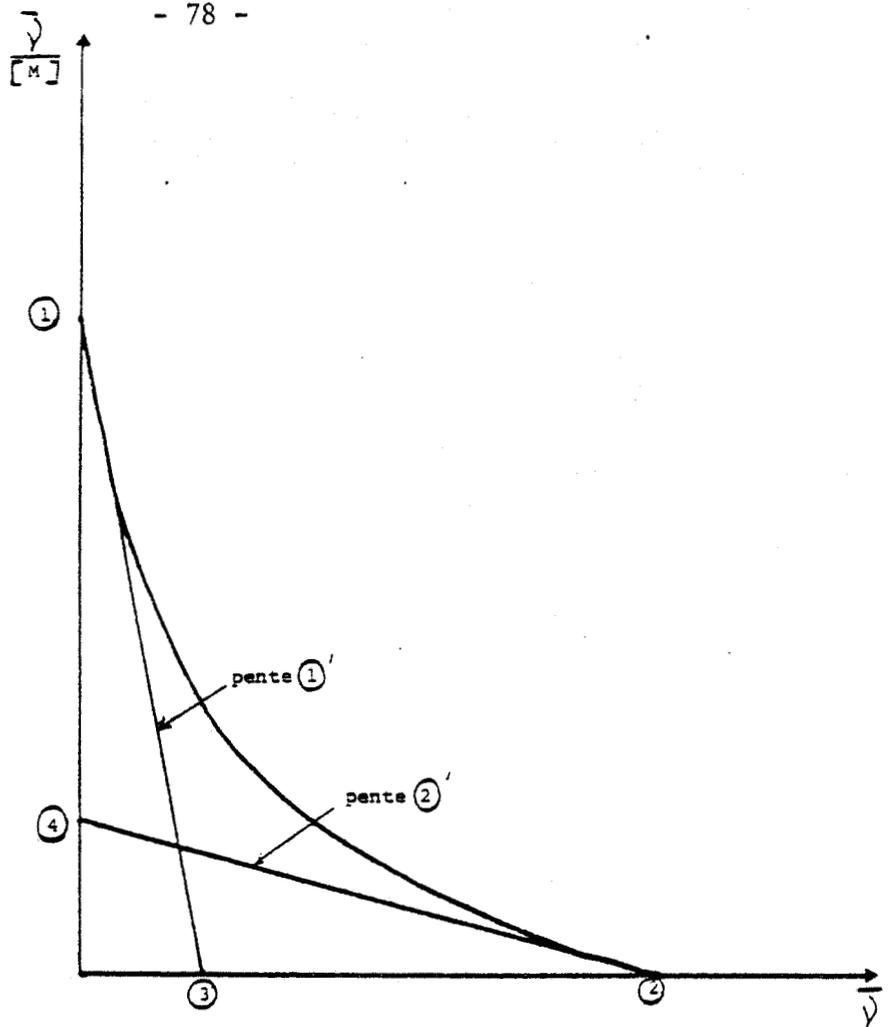
Nous retiendrons le principe de cette formulation qui pour certains ne se réduirait qu'à un simple artifice mathématique (PERDUE et LYTE, 1983), mais permet selon nous la prise en compte de plusieurs sites de complexation. Les conditions d'applicabilité ont été récemment précisées par NORBY et coll. (1980), KLOTZ (1982) et KETELSLEGGERS et coll. (1984) :

- obtention d'une courbe expérimentale dont la convexité doit être dirigé vers l'origine
- respect d'un état d'équilibre entre forme métallique libre et complexée.

2.3.2.3- Détermination des paramètres complexants: constante de stabilité et nombres de sites

2.3.2.3.1- Première méthode: exploitation des pentes asymptotiques et des valeurs limites de la courbe expérimentale

La méthode décrite par KLOTZ et HUNSTON (1971) permet, à partir de la représentation graphique de SCATCHARD, de déterminer graphiquement les valeurs limites de la courbe aux points (1) et (2) et des asymptotes aux points (3) et (4) .



* Intersection ①

Lorsque $\bar{Y} \rightarrow 0$, $[M] \rightarrow 0$

$$\lim_{[M] \rightarrow 0} \left(\frac{\bar{Y}}{[M]} \right) = \sum_{i=1}^n n_i K_i = N \cdot \frac{\sum_{i=1}^n n_i K_i}{\sum_{i=1}^n n_i} = N \cdot K' \text{ ①}$$

avec $N = n_1 + n_2 + \dots + n_n$

et $K' \text{ ①} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i K_i}{\sum_{i=1}^n n_i}$ déterminé au point ①



* Intersection (2)

$$\bar{v} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i [SH]}{1 + K_i [SH]} \cdot \frac{\left(\frac{1}{[SH]}\right)}{\left(\frac{1}{[SH]}\right)} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i}{\frac{1}{[SH]} + K_i}$$

$$\frac{\bar{v}}{[SH]} \rightarrow 0 \text{ lorsque } [SH] \rightarrow \infty$$

$$\lim_{[SH] \rightarrow \infty} \bar{v} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i}{K_i} = \sum_{i=1}^m n_i = n \text{ (2) , nombre de sites déterminés au point 2}$$

* Pente (1)'

$$\frac{d\left(\frac{\bar{v}}{[SH]}\right)}{d\bar{v}} = \frac{d\left(\frac{\bar{v}}{[SH]}\right)}{d[SH]}$$

$$\frac{d\left(\frac{\bar{v}}{[SH]}\right)}{d[SH]} = \sum_{i=1}^m (-1) \frac{n_i K_i}{(1 + K_i [SH])^2} \cdot K_i = - \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i^2}{(1 + K_i [SH])^2}$$

$$\text{et } \frac{d\bar{v}}{d[SH]} = \sum_{i=1}^m \left[\frac{n_i K_i}{1 + K_i [SH]} + (-1) \frac{n_i K_i \cdot A \cdot K_i}{(1 + K_i [SH])^2} \right] = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i}{1 + K_i [SH]^2}$$

$$\text{donc } \frac{d\left(\frac{\bar{v}}{[SH]}\right)}{d\bar{v}} = - \frac{\sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i^2}{1 + K_i [SH]^2}}{\sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i}{(1 + K_i [SH])^2}}$$

$$\lim_{[SH] \rightarrow 0} \left[\frac{d\left(\frac{\bar{v}}{[SH]}\right)}{d\bar{v}} \right] = - \frac{\sum_{i=1}^m n_i K_i^2}{\sum_{i=1}^m n_i K_i} = - K' \text{ (1)' déterminé par la pente (1)'}$$

* Intersection (3)

$$\text{La pente (1)} = - \frac{\text{Intersection (1)}}{\text{Intersection (3)}}$$

$$\text{L'intersection (3)} = \frac{- \sum_{i=1}^H n_i K_i' (1)}{- \sum_{i=1}^H K_i' (1)} = \frac{\sum_{i=1}^H n_i K_i' (1)}{\sum_{i=1}^H K_i' (1)}$$

* Pente (2')

$$\frac{d \left(\frac{\bar{y}}{[SH]} \right)}{d(\bar{y})} = - \frac{\sum_{i=1}^H \frac{n_i K_i^2}{(1 + K_i [SH])^2} \cdot \frac{1}{[SH]^{-2}}}{\sum_{i=1}^H \frac{n_i K_i}{(1 + K_i [SH])^2} \cdot \frac{1}{[SH]^{-2}}} = \frac{\sum_{i=1}^H \frac{n_i K_i^2}{\left(\frac{1}{[SH]} + K_i \right)^2}}{\sum_{i=1}^H \frac{n_i K_i}{\left(\frac{1}{[SH]} + K_i \right)^2}}$$

$$\lim_{[SH] \rightarrow \infty} \left[\frac{d \left(\frac{\bar{y}}{[SH]} \right)}{d(\bar{y})} \right] = - \frac{\sum_{i=1}^H n_i}{\sum_{i=1}^H \frac{n_i}{K_i}} = - K' (2)' \text{ déterminé par la mesure de la pente (2)'}$$

* Intersection (4)

$$\text{La pente (2)'} = - \frac{\text{intersection (4)}}{\text{intersection (2)}} . \text{ On obtient donc :}$$

$$\begin{aligned} \text{intersection (4)} &= - \left(- K' (2) \cdot n (2) \right) \\ &= K' (2) \cdot n (2) \end{aligned}$$

Dans le cas d'un système complexant qui présente deux sites différents n_1 et n_2 avec $n_1 = n_2 = 1$, toutes les relations obtenues ci dessus, se simplifient :

Intersection (1) : $K' (1) = K'_1 + K'_2$

Intersection (2) : $n (2) = 1 + 1 = 2$

Intersection (3) : $\frac{n (2) K' (1)}{K' (1)'} = \frac{(K'_1 + K'_2)^2}{K_1'^2 + K_2'^2}$

Mais, lorsque la molécule complexante présente plusieurs types de sites avec n_1, n_2, n_3, \dots différents de 1, les considérations précédentes ne sont plus valables. Le nombre de sites de chaque type et la constante conditionnelle de stabilité correspondante sont déterminés de la manière suivante:

- n_1 est considéré comme relatif au site où le complexe formé est le plus stable. Le nombre de sites n_1 est donné par la valeur à l'intersection 3. Cette valeur permet de calculer K'_1 (qui est considérée comme la constante relative aux premiers sites de complexation plus stable) en utilisant à $\bar{v} = 0$, le produit de la valeur de l'intersection ① avec celle de la pente asymptotique. Ce produit donne la valeur de la tangente asymptotique qui est égal à $n_1 K'_1{}^2$. Ces valeurs obtenues de n_1 et K'_1 permettent de déterminer celle de \bar{v}_1 . En traçant la courbe $\frac{\bar{v} - \bar{v}_1}{[M]} = f(\bar{v} - \bar{v}_1)$, n_2, K'_2 et sont déterminés en utilisant le même raisonnement que précédemment, puis n_3, K'_3, \dots

2.3.2.3.2- Deuxième méthode: ajustement de courbes

On effectue d'abord le tracé de la courbe $\log \frac{x}{1+x} = f(\log x)$ et on la superpose à celle obtenue à partir de $\log \bar{v} = f(\log [M])$

Lorsqu'il existe n sites de même nature, la superposition des courbes s'établit lorsque:

$$y = \frac{\bar{v}}{n} \quad \text{et} \quad x = K \cdot [M] \quad \text{ou soit} \quad \log n = \log \bar{v} - \log y \quad \text{et}$$

$$\log K = \log x - \log M. \quad \text{En effet,}$$

$$\bar{v} = \frac{n K [M]}{1 + K [M]} \qquad \frac{\bar{v}}{n} = \frac{K [M]}{1 + K [M]} = \frac{x}{1 + x} = y$$

Lorsqu'il existe n sites de nature différente, le nombre n_1 de sites et la constante correspondante K'_1 peuvent être déterminés en superposant les courbes pour les faibles valeurs de \bar{v} . Le tracé $\bar{v} - \bar{v}_1 = f(\log [M])$ permet de déterminer n_2 et K'_2 , ainsi de suite...

Des deux méthodes, la première est la plus largement employée comme en témoigne la littérature (TUSCHALL et BREZONIK, 1983; Mc PHERSON et SUMMERS, 1986). Nous aurons cependant recours aux deux méthodes pour conforter les résultats obtenus dans le cadre de ce travail.

3- APPLICATION A L'ACIDE HUMIQUE FLUKA (AHF)

3.1- Caractérisation structurale

3.1.1- Taille moléculaire

La répartition des tailles moléculaires obtenues après ultrafiltration et lyophilisation est la suivante:

TAILLE MOLECULAIRE (TM) DE DIFFERENTES FRACTIONS DE AHF	PROPORTION MASSIQUE
① $TM > 3.10^5$	76 %
② $3.10^5 > TM > 5.10^4$	19,50 %
③ $5.10^4 > TM > 5.10^3$	0,87 %
④ $5.10^3 > TM$	3,40 %

Afin de préciser la limite supérieure, nous avons procédé à la chromatographie par perméation de gel (figure II₁). Au vu de l'étalonnage effectué, nous n'avons pu préciser la limite supérieure qui se situe toutefois au-dessus de 5.10^5 . Il est à remarquer d'autre part l'absence de concordance de résultats avec l'ultrafiltration qui indiquait 76% au-dessus de 3.10^5 et seulement 3,4 % en dessous de 5.10^3 .

Or nous sommes en dehors du domaine d'exclusion du gel alors que l'élution reste effective. Ceci peut provenir d'une rétention des molécules humiques sur le gel qui entrainerait une sous-estimation de la masse molaire moyenne située ici entre 3.10^5 et 5.10^4 . Une masse molaire moyenne de 10^5 a donc été retenue. Pour la suite de l'étude, nous avons écarté la chromatographie par perméation de gel, technique qui entraîne trop d'erreurs pour le fractionnement des matériaux humiques de faible taille moléculaire.

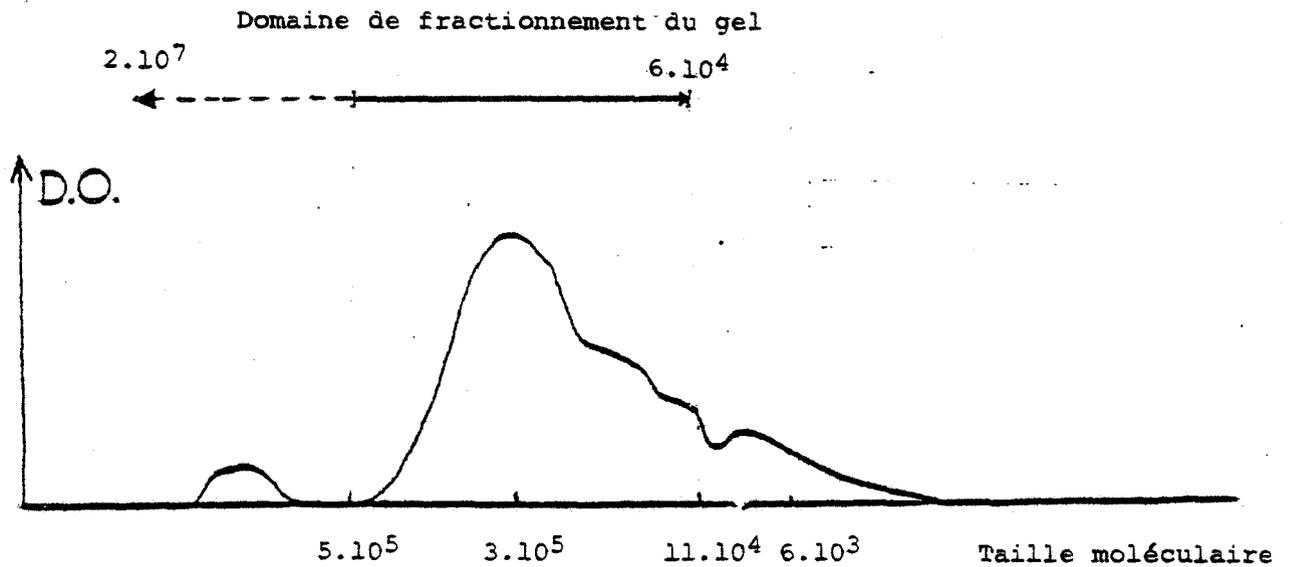


Figure II₁: Répartition de la taille moléculaire de l'AHF obtenue en chromatographie par perméation de gel

3.1.2- Résultats de la spectrophotométrie UV

Le spectre UV de l'AEF en solution dans le MMS ne présente aucune bande caractéristique permettant son interprétation (figure II₂).

L'évolution des absorbances a été suivie à :

- 203nm, correspondant aux transitions $n \longrightarrow \pi^*$ des groupements de type hydroxyle (phénol et/ou alcool) et aux transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ des cycles aromatiques,

- 254nm, correspondant aux transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ généralement attribuées aux cycles aromatiques des substances humiques naturelles.

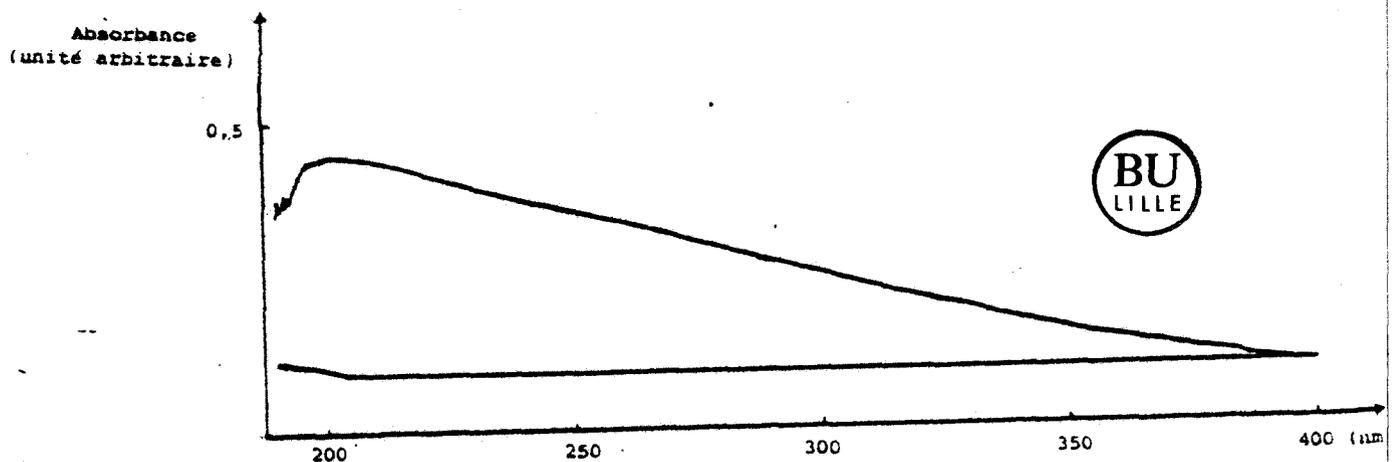


Figure II₂ Spectres d'absorption UV de l'AHF (a) (20 mg.l^{-1} dans le MMS) et du MMS (b)
 fentes : 1 nm Sensibilité : 2 A vitesse d'enregistrement : 5 nm.cm^{-1}

Les valeurs des coefficients d'extinction molaire déterminées dans les conditions suivantes:

- pour une masse molaire moyenne de 10^5 en AHF
- une cuve de trajet optique $\lambda = 1$ cm
- une concentration de 20mg.l^{-1} en AHF

conduisent, en appliquant la relation $D.O = \epsilon \lambda C$, à $\epsilon_{203\text{ nm}} = 4,58.10^5 \text{ m}^2\text{mol}^{-1}$ et $\epsilon_{254\text{ nm}} = 3,6.10^5 \text{ m}^2\text{mol}^{-1}$. Ces valeurs très élevées suggèrent une polysubstitution des cycles aromatiques.

Dans le tableau ci-dessous, nous avons reporté pour les différentes fractions, les pourcentages des teneurs en cycle aromatique, en groupements hydroxyle et les rapports : pourcentage de groupement fonctionnel/pourcentage en masse (valeurs entre parenthèses) de chaque fraction d'ultrafiltration.

	TENEUR EN CYCLES AROMATIQUES	TENEUR EN GROUPEMENTS DE TYPE HYDROXYLE
AHF (non fractionné)	100	100
Fraction ①	80,4 (1,06)	73 (0,96)
Fraction ②	8,5 (0,43)	8,7 (0,45)
Fraction ③	1,2 (1,38)	5,9 (6,78)
Fraction ④	9,4 (2,76)	12,4 (3,65)

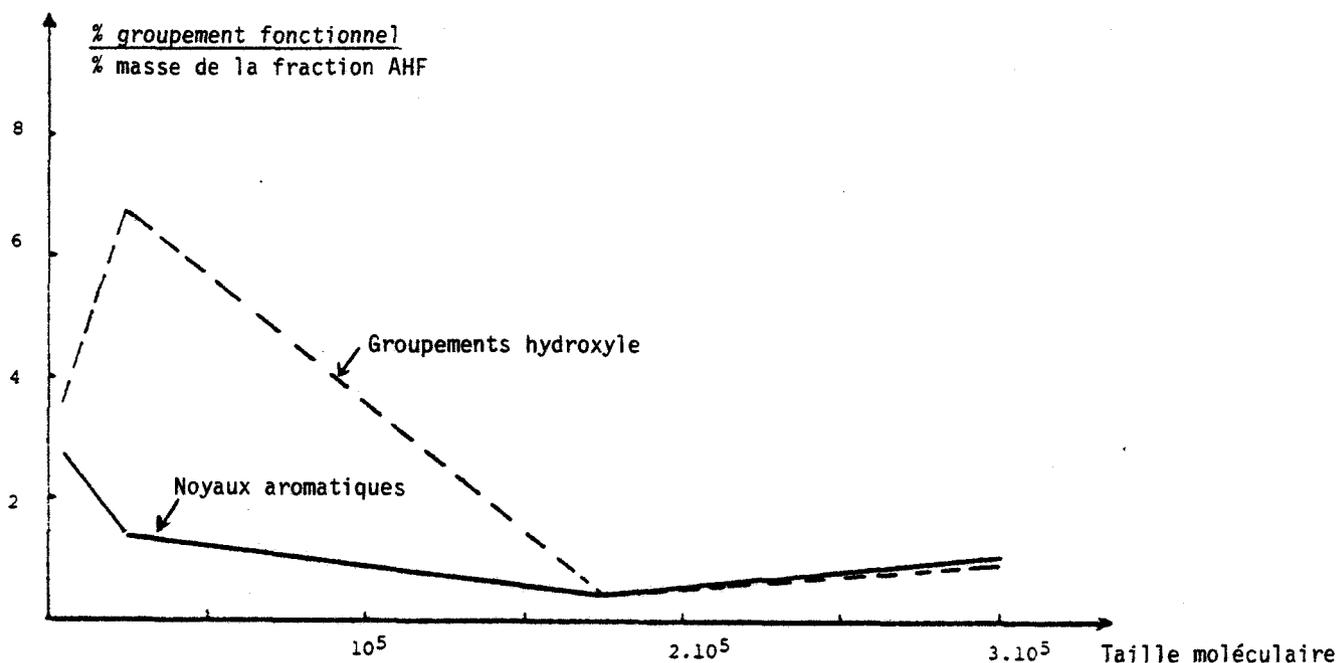
On peut observer que la répartition en cycle aromatique dans chaque fraction est similaire à celle des divers groupements hydroxyle. Les caractères aromatique et hydroxylé (exprimés par unité de masse - valeurs entre parenthèses) sont plus importantes pour les fractions de plus faible taille moléculaire ③ et ④ que pour les fractions ① et ②. Si l'on admet que les acides fulviques ont un caractère aromatique plus élevé que celui des acides humiques (KALINOWSKI et BLONDEAU, 1985), on peut donc dire

que les fractions de faible taille moléculaire de l'AHF seraient proches des acides fulviques, du point de vue structural.

Pour une fraction donnée, le rapport caractère hydroxylé/caractère aromatique conduit à une valeur proche de l'unité, sauf pour la fraction ③ où ce rapport atteint 6,78/1,38 soit 4,9, mettant ainsi en évidence dans cette fraction, l'existence:

- soit de polyphénols
- soit d'une proportion plus importante d'hydroxyles aliphatiques.

La représentation du rapport pourcentage de groupement fonctionnel/pourcentage en masse de chaque fraction en fonction des différentes tailles moléculaires donne des courbes qui révèlent l'hétérogénéité structurale de l'AHF.



Afin de différencier entre tous ces groupements hydroxyle, ceux de caractère aromatique, nous avons eu recours à la méthode des tanins et lignines, méthode utilisée dans les substances humiques par quelques auteurs (MALLEVIALLE, 1974).

3.1.3- Résultats du dosage des tanins et lignines

Le principe de cette méthode (Cf annexe) consiste en une réduction des acides tungstophosphoriques et molybdophosphoriques par les groupements phénol des tanins et lignines, avec production d'une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 700nm.

La difficulté inhérente à cette méthode réside en l'absence de composé phénolique étalon. Un préalable a donc consisté en l'étude de différents composés organiques simples comportant des substituants rencontrés dans la structure des substances humiques naturelles. Les absorbances par mole de groupement fonctionnel phénol (tableau II₁) révèlent une forte perturbation due à :

- l'encombrement stérique moléculaire
- la géométrie de la molécule et, en particulier, aux possibilités de conjugaison.

Néanmoins un calcul approché prenant comme référence les acides dihydroxybenzoïques qui d'une part, sont inclus dans les structures humiques et d'autre part, réagissent de façon semblable lors de ce dosage, permet d'estimer à une centaine le nombre de groupements phénoliques, pour une masse molaire moyenne de 10^5 de l'AHF.

Cependant, l'impossibilité de préciser la nature et la position des différents groupements hydroxyle aromatiques nous a conduit à abandonner cette technique pour la caractérisation des matériaux humiques.

3.1.4- Résultats de l'analyse pHmétrique

100ml d'une solution d'AHF à 100mg dans la soude ont été dosés par de l'acide chlorhydrique sous agitation. On observe (figure II₃) deux points d'inflexion:

- le premier correspondant à $pK_a = 10,1$ attribuable à des groupements fonctionnels de type phénate et nécessitant $1,5 \cdot 10^{-3}$ équivalents H^+ pour leur neutralisation

- le deuxième correspondant à $pK_a = 3,9$ attribuable à des groupements fonctionnels carboxylate et consommant $1,3 \cdot 10^{-3}$ équivalents H^+ .

Avec pour masse molaire 10^5 , on peut estimer respectivement à 1500 et 1300 les groupements phénate et carboxylate par "mole" d'AHF. D'après ces résultats, le rapport de ces groupements est proche de 1. Ceci ne peut cependant être retenu qu'à titre indicatif, compte tenu de l'importance de la taille moléculaire de l'AHF et de ses possibles variations en cours de l'analyse suivant les valeurs de pH (surtout en milieu acide).

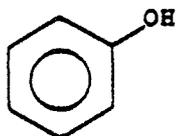
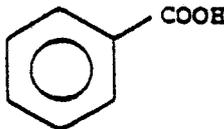
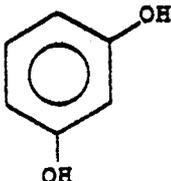
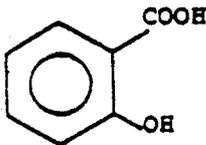
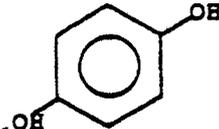
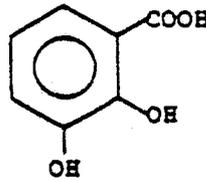
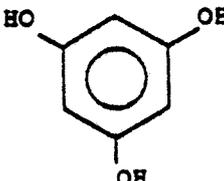
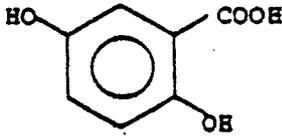
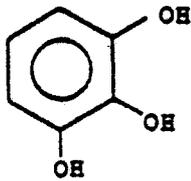
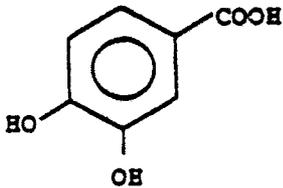
Absorbance		Absorbance	
	100		0
Phénol		Acide benzoïque	
	79,7		7,9
Résorcinol		Acide salicylique	
	55,8		106,8
Hydroquinone		Acide 2,3 di(OH)benzoïque	
	34,4		101,3
Phloroglucinol		Acide 2,5 di(OH)benzoïque (gentisique)	
	55,4		91,6
Pyrogallol		Acide 3,4 di(OH)benzoïque (protocatechique)	



Tableau II₁: Absorbances à 700 nm par mole de groupement fonctionnel phénol (exprimées en % par rapport au phénol) pour différents dérivés.

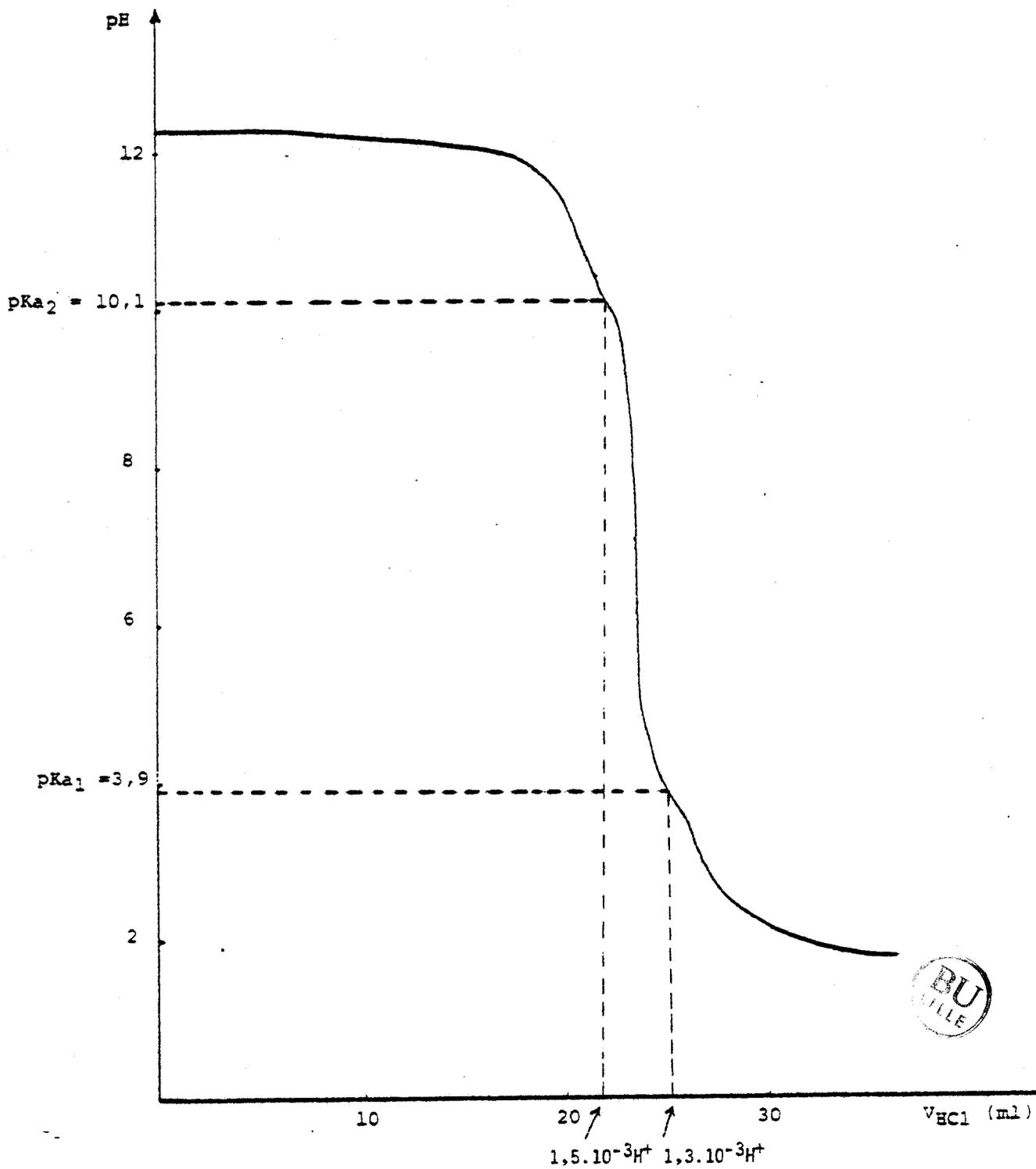


Figure II₃ : Courbe de dosage pHmétrique de l'AHF (100 mg.l⁻¹) dissous dans la soude (0,1 N)

3.1.5- Caractéristiques infra-rouge

Pour l'AHF brut (figure II₄), la présence des cycles aromatiques est confirmée par l'observation des raies attribuées à leurs modes de vibration de cycle (tableau II_{II}). La polysubstitution de ces cycles, mise en évidence en spectrophotométrie UV par les valeurs élevées des coefficients d'extinction molaire, se trouve ici confirmée par la faiblesse des absorptions dues aux vibrations d'élongation de valence CH, attendues vers 3030cm⁻¹ et des vibrations de déformation de ces mêmes liaisons CH. Les fonctions phénol donnent lieu à une absorption à 3420cm⁻¹, conjointement avec les fonctions alcool tertiaire, caractérisées par leur vibration de déformation à 1160cm⁻¹, et plus spécifiquement à 1210cm⁻¹. L'absence de raie entre 3590cm⁻¹ - 3640cm⁻¹ et entre 3500cm⁻¹ - 3550cm⁻¹ montre qu'il n'existe que peu de groupements OH libres de type alcool, phénol et acide carboxylique. Les associations polymères par liaisons hydrogène sont révélées par la raie large observée à 3420cm⁻¹. De plus, la classe d'alcool détectée correspond bien à celle établie par BAILLY (1974) pour les substances humiques extraites des sols. Par contre, l'existence en proportion relativement faible de fonctions de type alcool primaire engagées dans des structures osidiques et détectées par RMN ¹³C (STEELINK et coll., 1983), est confirmée par l'observation d'absorptions caractéristiques à 1350cm⁻¹ et à 1050cm⁻¹. L'azote semble être inclus dans la structure humique sous forme d'amine primaire ou secondaire, et amide. La présence de groupements éthyléniques est d'autre part révélée par leur vibration d'élongation de valence et de déformation. Les structures quinoniques se manifestent par des absorptions à 1620cm⁻¹ et 1720cm⁻¹. La vibration d'élongation de valence des groupements $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}$ associés à des esters est observés à 1350cm⁻¹. Il en est de même pour les vibrations d'élongation de valence $\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}$ de type alcool et phénol observées à 1210cm⁻¹ et 1160cm⁻¹. Il apparaît par contre une raie large centrée sur 1384cm⁻¹ correspondant aux vibrations de déformation des groupements $\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_3$.

En ce qui concerne les fractions (figure II₅ et tableau II_{III}), on observe que celle de TM > 3.10⁵ présente des absorptions significatives à 3420cm⁻¹ et à 1210cm⁻¹ attribuables aux groupements hydroxyle et plus particulièrement de type phénol, ce qui est bien en accord avec les observations UV-Visible établissant la forte représentativité de cette fraction. Les cycles aromatiques sont aussi décelés par leurs modes de

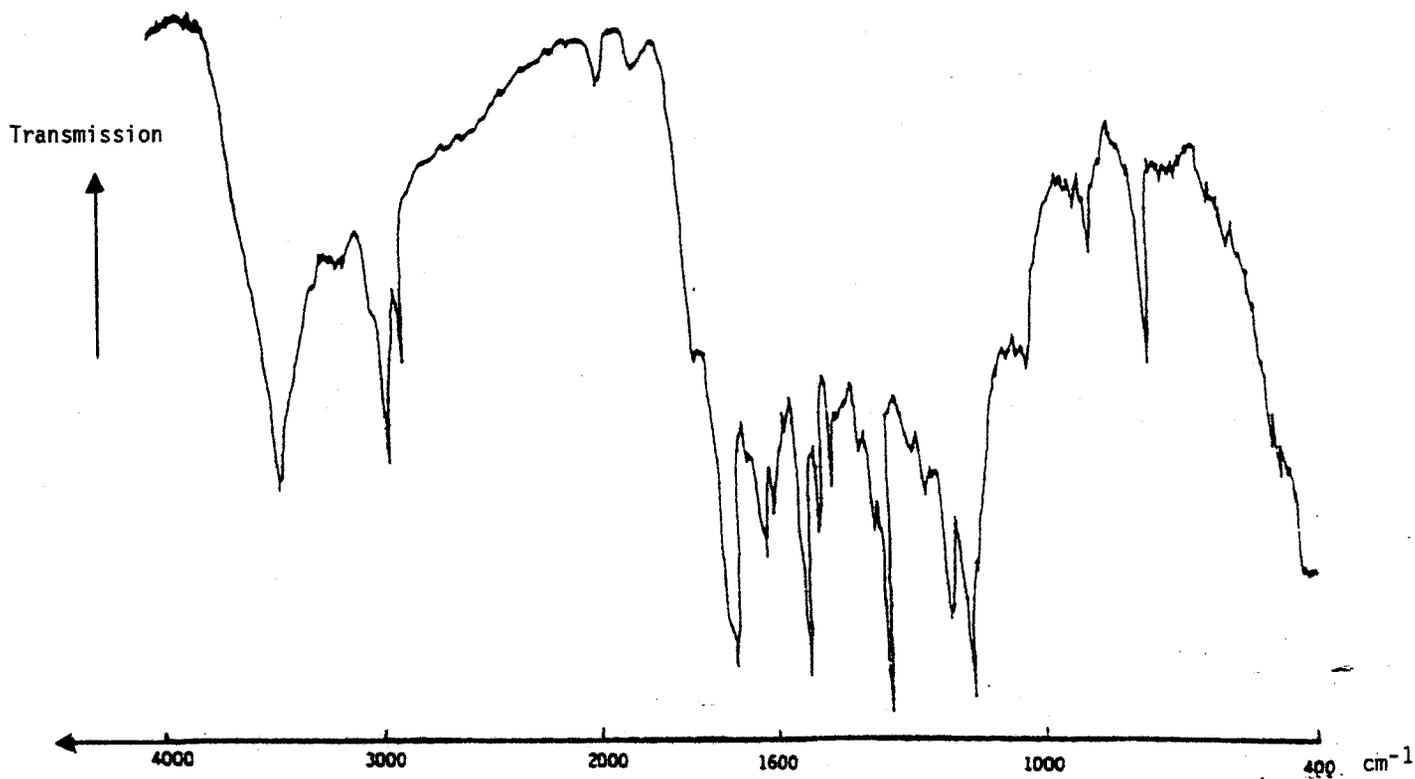


Figure II₄ : Spectre d'absorption infra-rouge de l'AHF

Nombre d'accumulations : 64

Résolution : 4 cm^{-1}



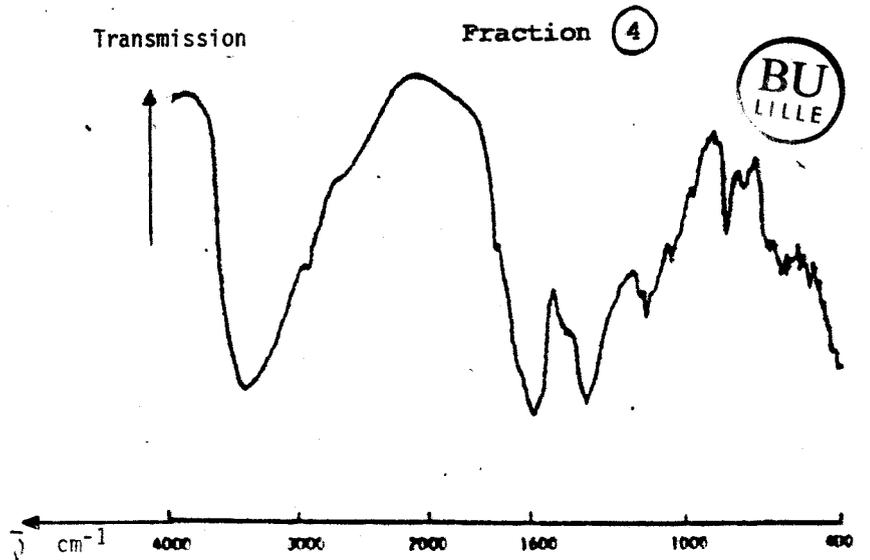
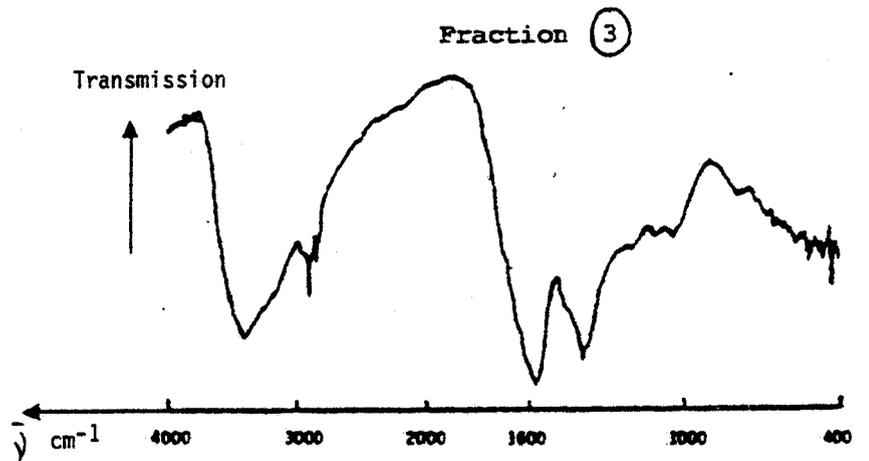
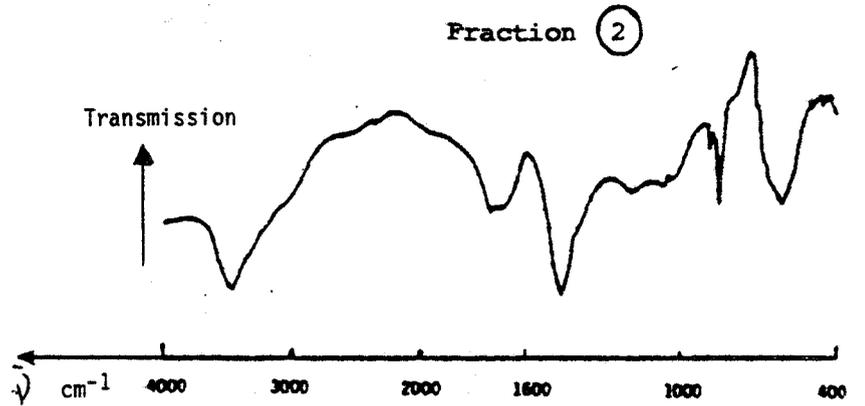
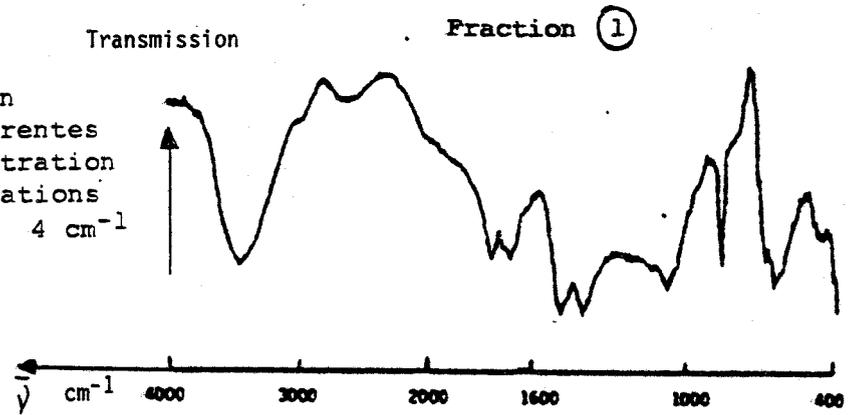
Fréquences (cm ⁻¹) et Intensité	Attributions
3420 F	ν OH, ν NH ₂
2960 m	ν d CH ₃
2920 F	ν CH ₂ , ν d CH ₃ aromatique
2850 m	ν s CH ₃ , ν s CH ₂
1770 m	ν C=O lactone
1720 F	ν C=O ester insaturé, cétone
1700 F	ν C=O salicylate
1660 f	ν C=O amide, ν C=C non conjugué
1620 m	ν C=C conjugué, δ NH amide, ν C=O quinone
1600 m	} δ NH amine vibration de cycle benzénique
1580 f	
1560 f	} δ NH amide
1530 F	
1490 m	ν C-C benzénique
1460 m	δ CH ₂ alcane, δ CH ₃
1400 f	δ CH ₂ éthylénique
1370 m	δ CH ₃
1350 F	ν C-O aliphatique ou aromatique
1250 f	ν as C-O ester benzoïque ou phtalique
1210 F	δ OH phénol et alcool tertiaire
1160 F	δ OH alcool tertiaire, vibration de squelette $\begin{matrix} & & \text{CH}_3 \\ & & / \\ & \text{C} & \\ & & \backslash \\ & & \text{CH}_3 \end{matrix}$
1150 f	} ν s C-O benzoate ou phtalate
1050 f	
1020 f	mode de cycle benzénique
860 f	δ CH aromatique hors du plan
750 m	} vibration de squelette (CH ₂) ₄ δ CH aromatique hors du plan

Tableau II_{II} : Principales vibrations infra-rouge observées et attributions proposées pour l'AHF

[Vibrations de valence (ν), de déformation dans le plan (δ), hors du plan (δ̄) - Intensité forte (F), faible (f), moyenne (m)]



Figure II₅: Spectres d'absorption
infra-rouge de différentes
fractions d'ultrafiltration
de l'AHF 64 accumulations
résolution 4 cm⁻¹



Fractions	Fréquences (cm ⁻¹) et Intensité	Attributions
①	3420 F 2916 m 2848 m 1580 F 1380 F 1200 f 1100 f	ν O-H ν C-H ν C=O ν C-O δ OH phénol ν C-O
②	3420 F 1600 F 1380 F 1020 f -960 f 840 m 770 f	ν O-H ν C=O ν C-O mode de cycle benzénique δ CH=CH trans ν C-O-C δ CH aromatique
③	3440 F 2950 f 1736 m 1660 F 1460 F 1380 F 1360 F 1050 f 840 F 630 m	ν O-H ν C-H ν C=O δ CH ₂ δ OH alcool, δ CH ₃ ν C-O alcool primaire ν C-O-C δ ester, amide
④	3460 F 1732 m 1700 m 1456 f 1020 f 846 m 600 m	ν OH, ν N-H ν C=O ester, amide δ CH ₂ OH alcool mode de cycle benzénique ν C-O-C } δ ester, amide } δ cycle benzénique

Tableau II_{III} : Principales vibrations infra-rouge observées dans les fractions d'ultrafiltration et attributions proposées

[vibration de valence (ν), de déformation dans le plan (δ), hors du plan (ν). Intensité forte (F), faible (f) moyenne (m)]



cycle, la polysubstitution ne conduisant qu'à des absorptions négligeables pour les modes de déformation des groupements CH aromatiques. Les raies situées vers 1700cm^{-1} , 1350cm^{-1} et 1150cm^{-1} dans le produit non fractionné et attribuées respectivement aux vibrations d'élongation de valence C-O et $\text{C}=\text{O}$ des esters, sont beaucoup moins intenses et n'apparaissent que sous forme d'épaulements.

Le spectre infra-rouge de la fraction $3.10^5 > \text{TM} > 5.10^4$ peut être rapproché de celui de la fraction précédente. Des analogies apparaissent en effet au niveau des raies situées vers 1000cm^{-1} , 1400cm^{-1} , 1600cm^{-1} et 3400cm^{-1} . Le degré de substitution des cycles aromatiques doit cependant y être moindre car le spectre contient des raies à 760cm^{-1} et 840cm^{-1} , attribuables à des vibrations de déformation des liaisons CH. De plus, la proportion de chaînes saturées doit être moins marquée car les vibrations d'élongation de valence CH des groupements méthylène et méthyle donnent une absorption à peine perceptible.

Les fréquences d'absorption infra-rouge de la fraction $5.10^4 > \text{TM} > 5.10^3$ sont différentes de celles des deux fractions déjà étudiées. Les raies à 1736cm^{-1} et à 1660cm^{-1} attribuables aux vibrations d'élongation de valence $\text{C}=\text{O}$ des esters, carbonyle et des amides sont bien marquées. Il en est de même pour la bande à 1460cm^{-1} qui traduit, avec la raie à 1380cm^{-1} une forte proportion de chaînes saturées dans cette fraction. La raie à 840cm^{-1} et celles situées aux environs de 640cm^{-1} - 800cm^{-1} , ne sont plus attribuables à des vibrations de déformation des liaisons CH aromatiques; on peut les attribuer respectivement à un mode d'élongation $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ d'éther ou de cycles osidiques et à des modes de déformation d'esters ou d'amides. La présence de structures osidiques est confirmée par la présence de raies à 1050cm^{-1} et à 1360cm^{-1} attribuables à des groupements fonctionnels de type alcool primaire.

Pour la fraction $5.10^3 > \text{TM}$, la raie intense et large à 3464cm^{-1} est attribuable aux vibrations d'élongation de valence OH de type alcool et acide carboxylique et NH d'amine et d'amide, ces groupements étant associés par des liaisons hydrogène. Les vibrations d'élongation de valence $\text{C}=\text{O}$ de type ester, carbonyle ou amide se retrouvent à 1700cm^{-1} et à 1732cm^{-1} . La proportion de groupements amides doit cependant être faible par suite de l'absence d'absorption attribuable à NH et

attendue entre 1620cm^{-1} et 1590cm^{-1} . La forte raie à 1456cm^{-1} est due aux vibrations de déformation des groupements méthylène et méthyle. On retrouve une raie à 846cm^{-1} et une autre, très large, vers 600cm^{-1} , attribuables respectivement, à un mode d'élongation de valence $\text{-}\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}\text{-}\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}\text{-}$ d'éther et à des modes de déformation d'esters. La présence d'une raie à 1020cm^{-1} révèle l'existence de cycles aromatiques, pour lesquels le mode d'élongation $\text{C}=\text{C}$ attendu à 1500cm^{-1} doit certainement contribuer à l'élargissement de la bande à 1456cm^{-1} .

En regroupant les éléments structuraux identifiés, on peut observer que:

- les cycles aromatiques polysubstitués sont essentiellement présents dans la fraction $\text{TM} > 3.10^5$ et, avec un degré de substitution moindre, dans la fraction $3.10^5 > \text{TM} > 5.10^4$
- des fonctions acides, esters, carbonyles et pour une moindre part, amides, amines et alcools sont présentes de façon significative dans les fractions de taille inférieure à 5.10^4
- les structures osidiques existent dans la composition chimique de l'acide humique FLUKA
- des chaînes saturées, comportant quelques groupements isopropyle et quelques groupements éthyléniques conjugués sont présentes dans des fractions de faible taille moléculaire.

3.1.6- Résultats de la RPE

L'étude par RPE de l'AHF révèle l'existence d'un paramagnétisme important. Cette étude a été effectuée aussi bien sur le mélange brut (acide humique FLUKA non fractionné) que sur les fractions obtenues par ultrafiltration, à la fois en phase solide (poudre) ou en solution saturée.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II_{IV}. On peut d'abord constater que seules les fractions de taille moléculaire supérieure à 5.10^4 et le produit entier donnent un signal RPE. Les caractéristiques de ce signal (largeur de raie, facteur g) sont sensiblement les mêmes pour les deux fractions de taille moléculaire supérieure à 5.10^4 et le produit entier. On n'a pu obtenir, même en phase liquide, de signaux présentant une structure hyperfine, ce qui rend difficile l'attribution rationnelle de ces signaux (figure II₆).

<u>Composé</u>	<u>Etat</u>	<u>Largeur de raie</u> pic à pic gauss	<u>g</u>
AHF	solide	5	2,0036
	solution	2	2,0037
Fraction ①	solide	6	2,0036
	solution	2,6	2,0036
Fraction ②	solide	6	2,0036
	solution	2,6	2,0036

Tableau II_{IV}: Caractéristiques RPE de l'AHF et des fractions d'ultrafiltration

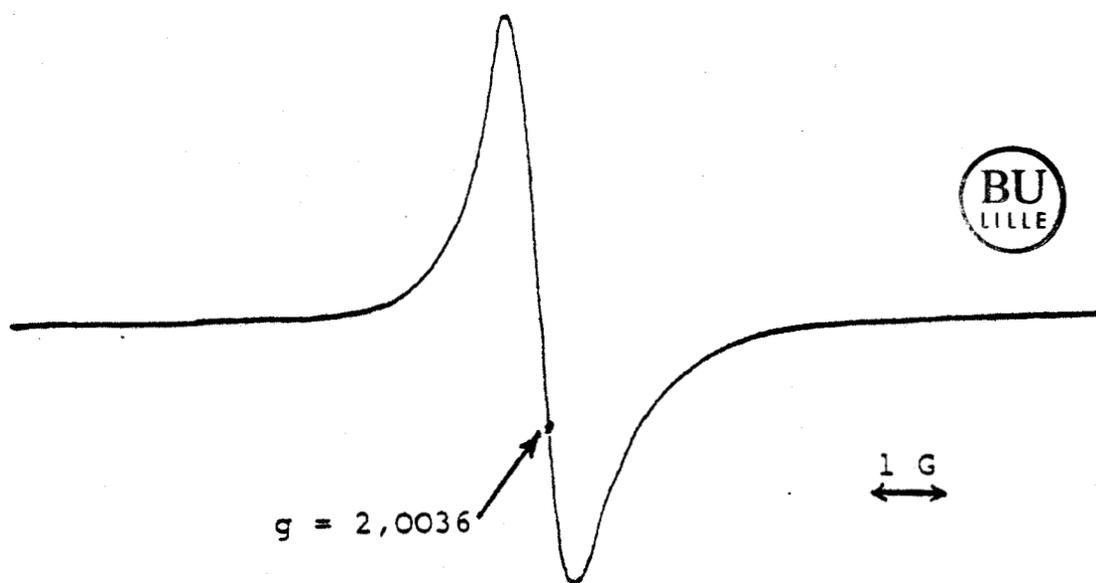
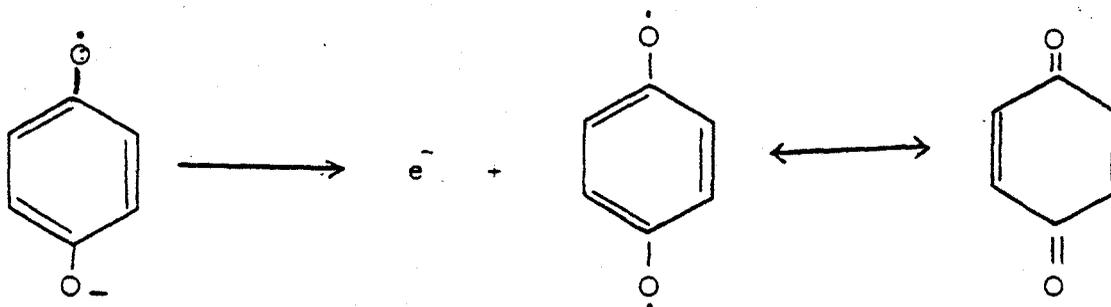


Figure II₆: Spectre RPE de l'AHF à l'état de poudre

Cependant, l'étude en spectrométrie infra-rouge a montré que dans les fractions de taille moléculaire élevée, on rencontrait surtout des cycles aromatiques polysubstitués, des fonctions phénols et des structures quinoniques. Ces observations permettent de penser, en accord avec la littérature, que le paramagnétisme observé dans les fractions de taille moléculaire élevée serait lié à la présence de radicaux anions semi-quinoniques (STEELINK et coll., 1983) ou à des radicaux phénoxy (TOLLIN et STEELINK, 1966). Ces radicaux sont généralement stables à température ambiante et ont des facteurs g voisins de 2,0040 (MÜLLER et coll., 1959). On peut donc raisonnablement attribuer l'existence du paramagnétisme à la présence de radicaux anions semi-quinoniques qui, par oxydation donnent la forme quinonique:



Au vu de l'importance des effets paramagnétiques qui rendent difficile l'acquisition d'un spectre RMN exploitable pour l'AHF, difficultés auxquelles ont été confrontés de nombreux auteurs (STEELINK et coll., 1983), nous n'avons pas approfondi cette étude.

Une proposition de schéma structural regroupant ces résultats a pu être établie (Figure II₈). Cette structure est comparable à celle établie par MURRAY et coll. (1983) à la suite d'une simulation sur ordinateur, menée dans le but de modéliser les sites potentiels de complexation. Les principales structures comportant un, deux ou trois sites voisins, en particulier de type salicylate et phthalate, se retrouvent bien dans nos résultats.

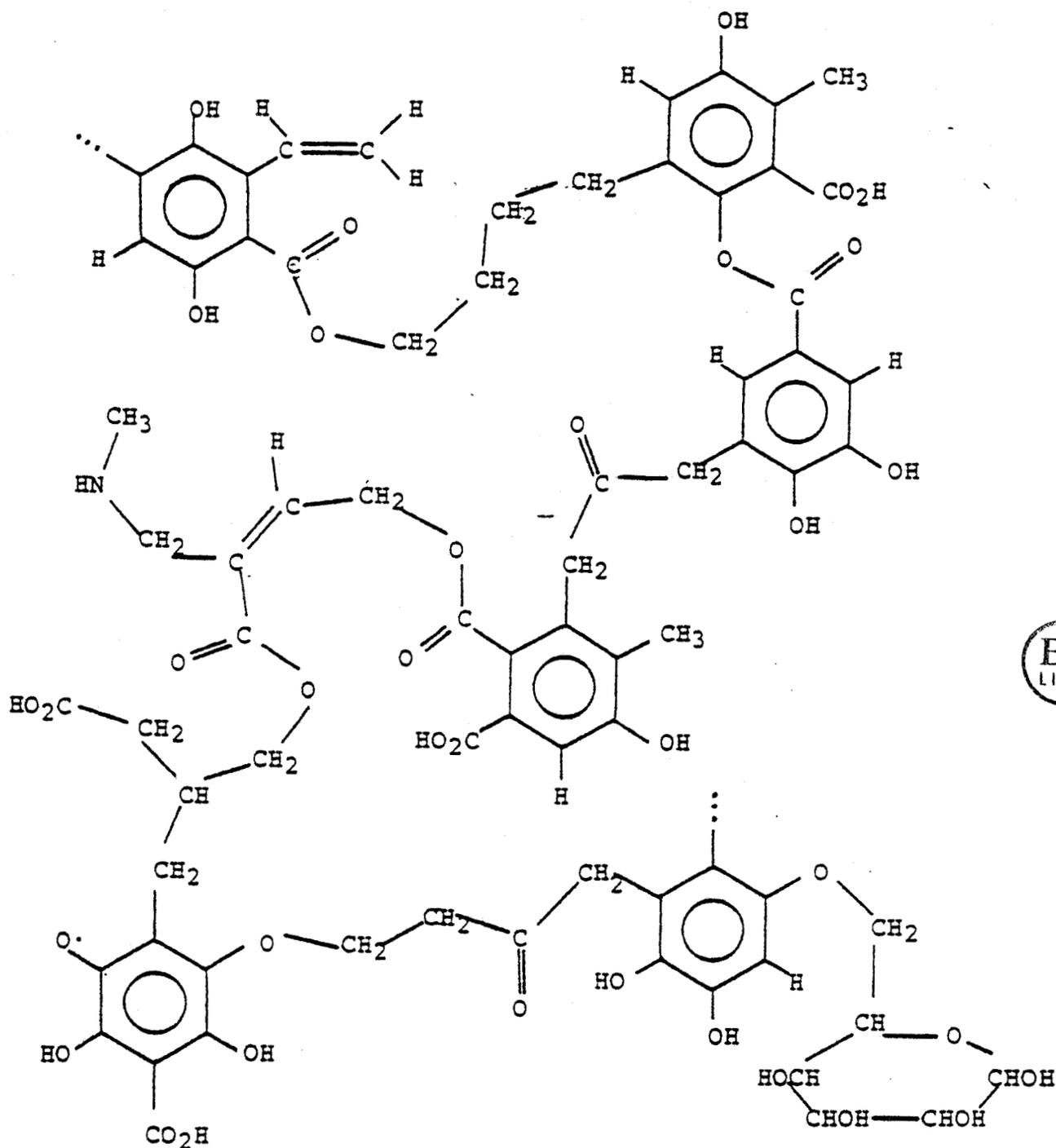


Figure II₈ : Schéma structural proposé pour l'AHF

3.2- Propriétés complexantes

L'étude structurale de l'acide humique FLUKA a révélé la présence de groupements fonctionnels phénate, benzoate, phtalate, salicylate et d'espèces radicalaires semi-quinoniques, qui sont autant de sites potentiels d'interaction avec des cations métalliques (EBENGA et coll., 1986). Dans cette partie, nous étudierons les propriétés complexantes de l'AHF vis-à-vis du cadmium en utilisant la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du cadmium-113 (RMN ^{113}Cd) ainsi que les techniques électrochimiques (PIDRA et électrode sélective).

3.2.1- Cinétique de complexation du cadmium

La courbe (figure II₉) exprimant la cinétique de complexation du cadmium, déterminée à l'aide d'une électrode sélective, montre que le cadmium n'est pas immédiatement complexé par l'AHF, mais qu'il faut attendre deux jours pour que l'équilibre entre forme libre et forme complexée du cation soit atteint. La capacité complexante est, dans ces conditions, égale à $6,78 \cdot 10^{-8}$ atg Cd.mg⁻¹ AHF.

3.2.2- Recherche par RMN ^{113}Cd de différents types de sites de complexation

Les solutions aqueuses examinées en RMN ^{113}Cd sont titrées à 1g.l^{-1} en AHF et à $2,5 \cdot 10^{-2}$ M en nitrate de cadmium. En utilisant des tubes de 10mm de diamètre, les spectres de ces solutions sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre haute résolution Bruker WP 80, à 17,774 MHz. L'eau lourde est utilisée pour le verrouillage en fréquence et les glissements chimiques observés sont exprimés par rapport à la référence sulfate de cadmium (2M). La fenêtre spectrale est de 1000 Hz, la largeur de pulse et le temps d'acquisition valent respectivement 4 μs et 4,096 s.

On peut observer (figure II₁₀) trois pics de résonance situés respectivement à +2,48, +0,9 et -22,7ppm par rapport à la référence. L'attribution du pic à 0,9ppm à l'ion Cd^{2+} libre est réalisée au vu de l'enregistrement de solutions titrées en cadmium (ELLIS, 1983).

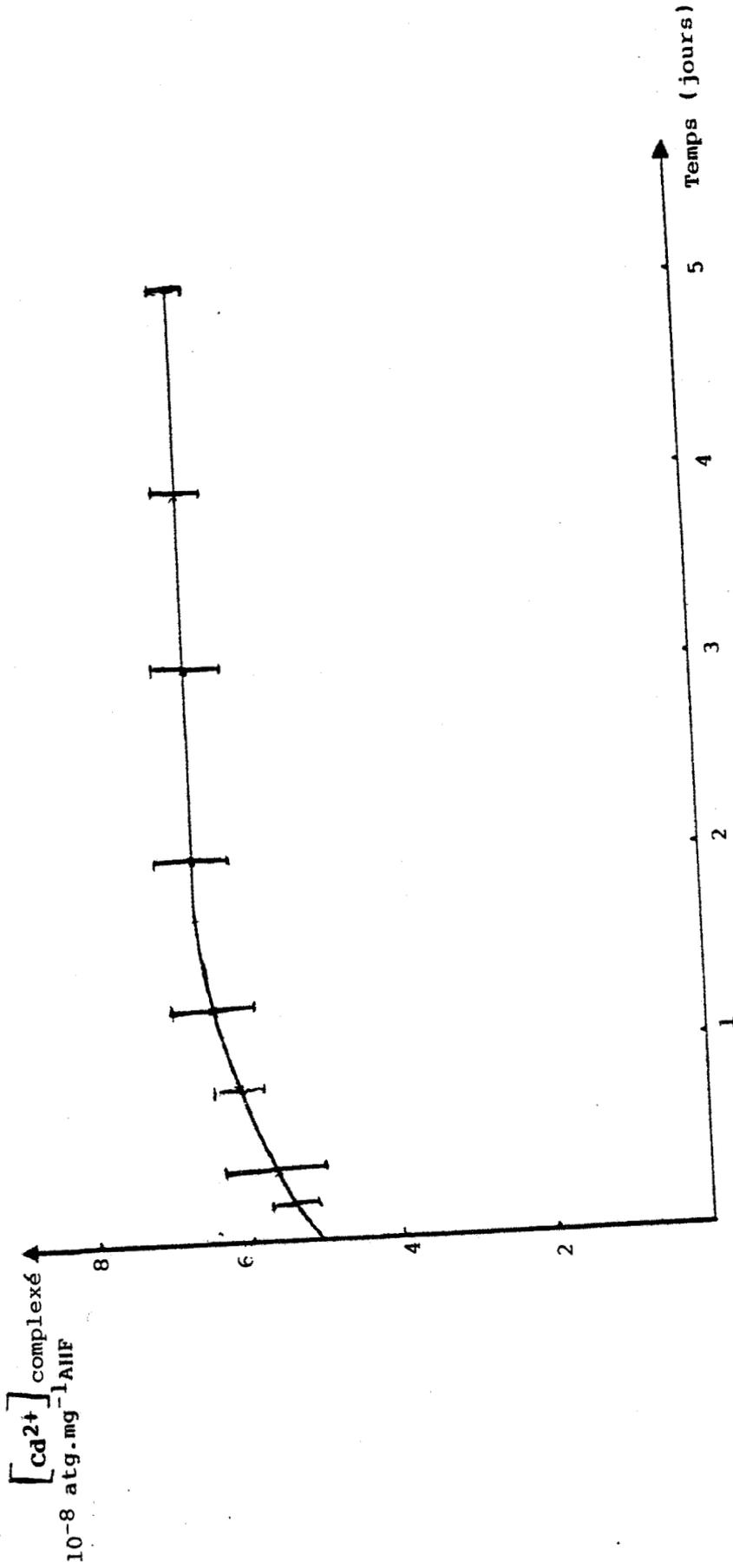


Figure 119: Cinétique de complexation du cadmium ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) par l'AIF ($15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) dans le MMS suivie à l'électrode sélective



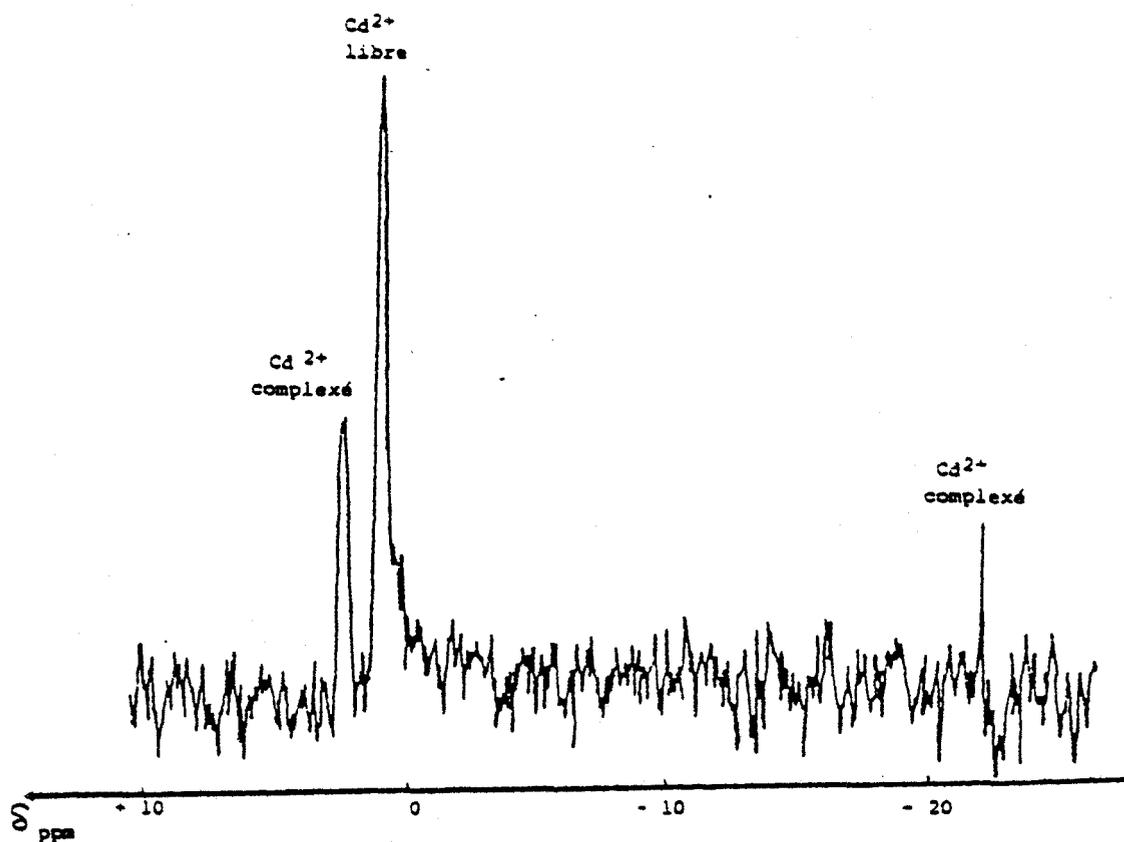


Figure 11₁₀ Spectre RMN ^{113}Cd d'une solution aqueuse titrée à $2,5 \cdot 10^{-2}$ M en cadmium et $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ en AEF

ELLIS (1983) et WANG et GILPIN (1983) ont montré que les glissements chimiques ^{113}Cd du cation complexé sont fortement dépendants des hétéroatomes présents au site de complexation. Les sites à ligands oxygénés provoquant un net accroissement d'écran électronique autour du noyau cadmium, on peut attribuer le pic observé à $-22,7\text{ppm}$ au cadmium complexé dans les sites de type benzoate, phtalate ou salicylate ou même polyfonctionnel, au sein de la structure humique et dont les atomes d'oxygène peuvent assurer la coordinence 6 du cadmium. La résonance à $+2,48\text{ppm}$ correspondant à une diminution d'écran électronique par rapport à l'ion cadmium libre, peut être attribuée au cadmium engagé dans des complexes à ligands mixtes, soit azote - oxygène, soit soufre - oxygène. La probabilité d'établissement des seconds est plus élevée que celle des premiers, au vu des résultats de l'analyse élémentaire (HULJEV et STROHAL, 1983) établissant un pourcentage de soufre de 2,4% contre environ 0,5% pour l'azote. Cependant, la variation d'écran électronique devrait dans ce cas être plus marquée, par suite de la très forte diminution d'écran sous l'effet du soufre (CARSON et coll., 1981). Il n'est malheureusement pas possible de préciser mieux les hétéroatomes responsables de ce deuxième

type de sites par suite de la structure complexe et de la haute masse molaire de l'AHF, au sein de laquelle les facteurs topologiques sont également à prendre en considération. Le signe négatif du rapport gyromagnétique de l'isotope 113 du cadmium empêche toute quantification exacte des espèces complexées. On peut cependant considérer que, dans les conditions expérimentales, l'effet Overhauser affecte dans des proportions voisines les résonances dues aux ions complexés et qu'il existe plus d'ions complexés à +2,48ppm qu'à -22,7ppm.

3.2.3- Résultats de l'étude électrochimique

Après un temps de contact de quarante huit heures entre l'AHF et différentes concentrations en cadmium, nous avons mesuré respectivement par PIDRA et électrode sélective, les concentration et activité en cadmium libre (figure II₁₁)

L'étude polarographique a permis de constater que, dès que la concentration en cadmium total devient supérieure à $7 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ AHF, la réponse en cadmium libre dans le milieu contenant l'AHF est supérieure à celle du cadmium total mesuré dans un milieu dépourvu de ligand. C'est pourquoi dans la figure précédente, nous avons limité à cette concentration le domaine d'utilisation de la PIDRA. Des perturbations du courant de diffusion dans des solutions contenant des ligands ont déjà été signalées par d'autres auteurs qui invoquent soit l'influence du pH (WAHDAT et NEEB, 1983), soit l'existence des phénomènes d'adsorption du ligand sur l'électrode de mesure, que l'on ne peut invoquer ici (Cf paragraphe 2.1.1). Une troisième cause de perturbation du courant de diffusion peut être constituée par les propriétés tensio-actives du ligand (KOZARAC et coll., 1986).

Les deux courbes relatives à la PIDRA et à l'électrode sélective (figure II₁₁) présentent cependant une partie commune lorsque la concentration totale en cadmium est inférieure à $2 \mu\text{g Cd} \cdot \text{mg}^{-1}$ AHF.

La rupture de la colinéarité observée au-delà de $2 \mu\text{g} \cdot \text{Cd} \cdot \text{mg}^{-1}$ d'AHF traduirait un désengagement du cadmium de formes électrochimiquement labiles au niveau de l'électrode de mercure. Il semble donc que, dans la gamme de concentrations étudiées, le cadmium donne lieu à au moins deux types de complexes, les sites responsables pouvant être situés soit " à coeur", soit en périphérie des structures humiques (GIESY et coll., 1977; WERSHAW et coll., 1977).

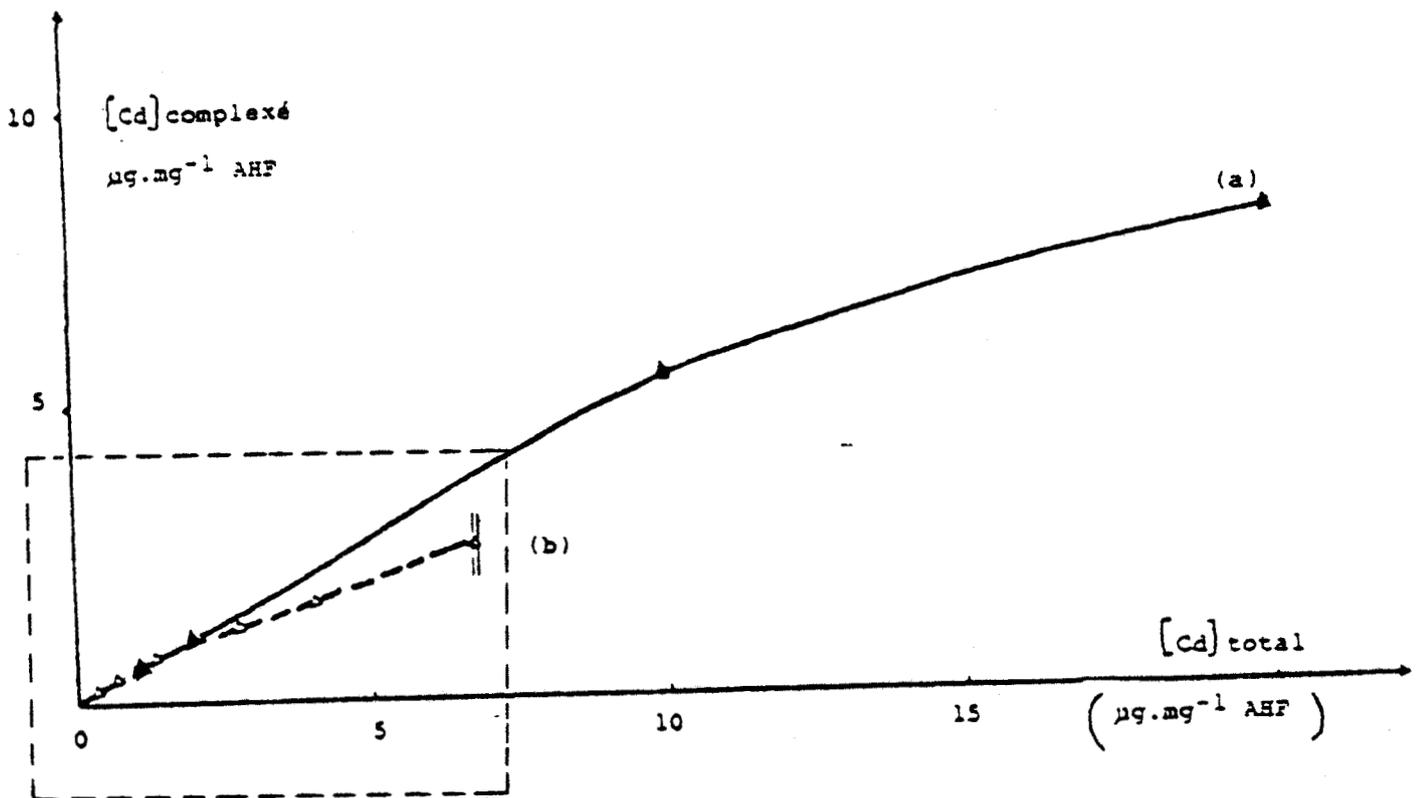
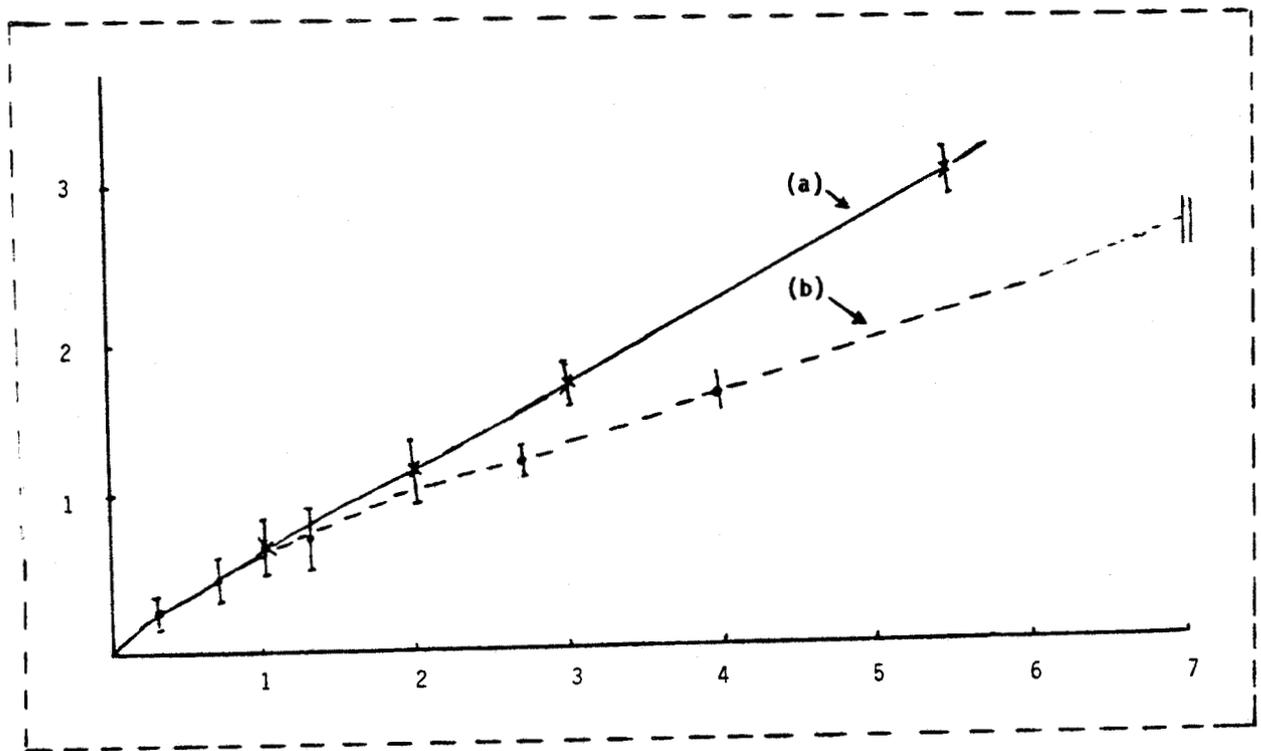


Figure 1110 : Evolution de la concentration en cadmium complexé en fonction du cadmium total

- (a) mesures potentiométriques (ESI)
- (b) mesures polarographiques (PIDRA)
- || limites d'utilisation de la PIDRA

3.2.4- Détermination des paramètres complexants par la formulation de SCATCHARD

Les concentrations en cadmium libre retenues pour déterminer les paramètres complexants (constante conditionnelle de stabilité et nombre de sites) sont celles qui permettent un tracé continu de la courbe $[Cd]_{\text{complexé}} = f [Cd]_{\text{total}}$ (Figure II₁₁). La méthode de SCATCHARD, qui présente l'avantage par rapport à toutes les autres de tenir compte de l'existence de plusieurs types de sites de complexation, a été appliquée à la détermination des différentes constantes de stabilité correspondantes. La transformation en coordonnées de SCATCHARD est donnée dans le tableau II_V.

Le tracé de la courbe $\frac{\bar{v}}{[Cd]} = f(\bar{v})$ permet la détermination des paramètres complexants par la méthode des asymptotes (figure II₁₃). Par cette méthode, deux types de site de complexation apparaissent avec $n_1 = 1$ et $n_2 = 10$. Leurs constantes conditionnelles de stabilité respectives sont $K'_1 = 2,55 \cdot 10^7 M^{-1}$ et $K_2 = 3 \cdot 10^5 M^{-1}$. Ces résultats ont été confortés par le second procédé donnant $n_1 = 1$, $n_2 = 10$ avec $K'_1 = 2 \cdot 10^7 M^{-1}$ et $K_2 = 8,5 \cdot 10^5 M^{-1}$, cette dernière valeur fournissant un ordre de grandeur (figure II₁₂) (POMMERY et coll., 1987).

Il est intéressant de rapprocher le nombre total de sites de la capacité complexante déterminée par ailleurs. Celle-ci est de $6,78 \cdot 10^{-8}$ atg Cd.mg⁻¹AHF, valeur compatible avec n_1+n_2 égal à 11. Par ailleurs, les constantes de stabilité obtenues sont nettement supérieures aux valeurs publiées (de l'ordre de $10^5 M^{-1}$ par BHAT et WEBER (1982a) dans le cas d'acide fulvique, et par ALBERTS et GIESY (1983) pour des composés organiques, tous deux extraits du milieu naturel.

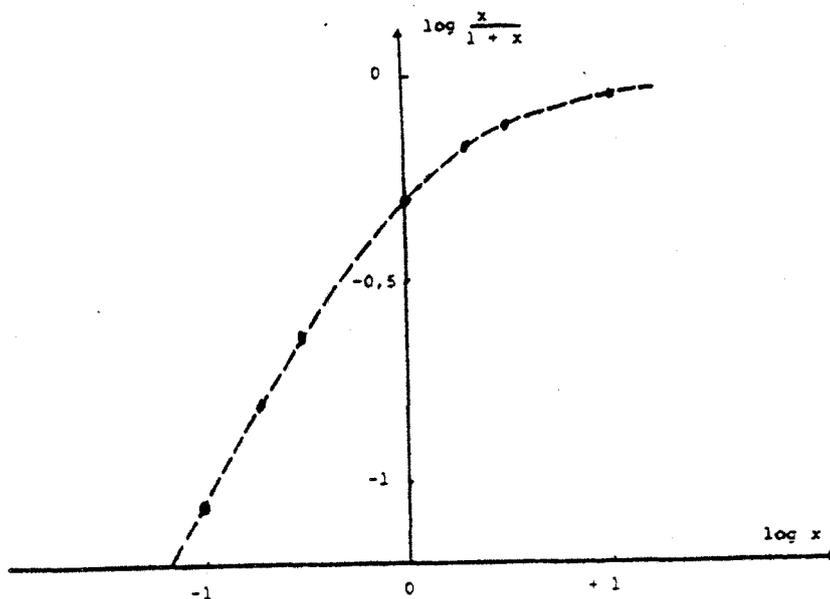


Figure II₁₂: Ajustement graphique avec $\log \frac{x}{1+x} = f(\log x)$ des coordonnées de Scatchard

	5	10	15	20	40	50	100	500	1000
$[Cd]$ total ($\mu g.l^{-1}$)									
$[Cd]$ total $\cdot (10^{-7} \text{ at.g.l}^{-1})$	0,445	0,889	1,334	1,779	3,558	4,448	8,896	44,484	88,968
$[Cd]$ libre $\cdot (10^{-7} \text{ at.g.l}^{-1})$	0,071	0,258	0,427	0,889	1,921	1,618	3,949	20,240	53,167
$[Cd]$ lié $\cdot (10^{-7} \text{ at.g.l}^{-1})$	0,373	0,631	0,907	0,890	1,637	2,830	4,947	24,244	35,801
$\bar{y} = \frac{[Cd] \text{ lié}}{[AHF]}$	0,249	0,421	0,605	0,593	1,091	0,566	0,989	4,848	7,160
$\frac{\bar{y}}{[Cd] \text{ libre}} \cdot (10^6 \text{ M}^{-1})$	35,002	16,322	15,572	6,667	5,679	3,497	2,505	2,395	1,347

Tableau.IV: Différentes valeurs des concentrations en cadmium libre transformées en coordonnées de Scatchard



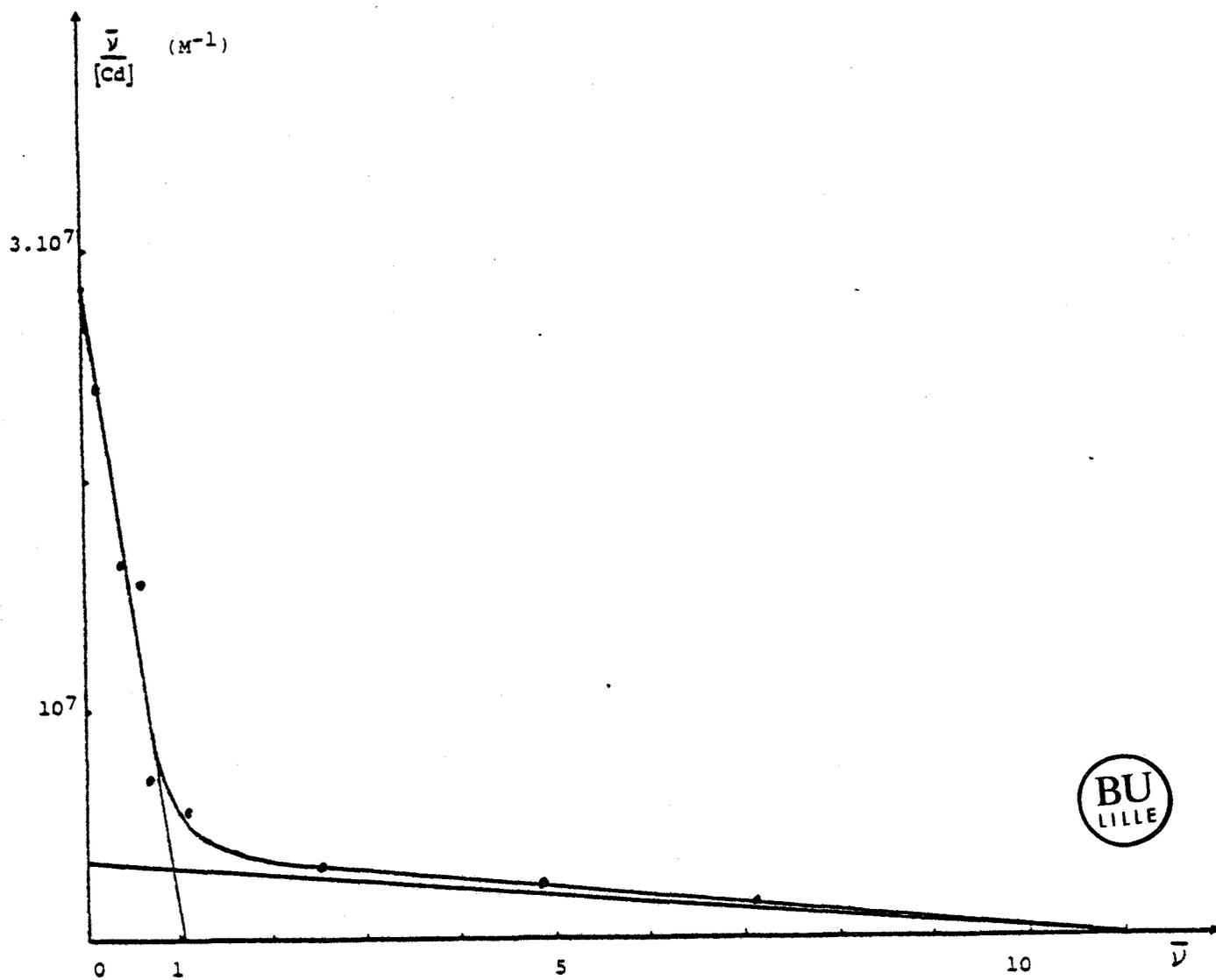


Figure II₁₃ : Représentation graphique de Scatchard pour l'interaction ion cadmium-AHF : méthode des asymptotes

3.3- DISCUSSION

Ce travail a permis de justifier l'intérêt de la démarche analytique définie par les résultats obtenus. La complémentarité des méthodes d'investigation structurale et d'analyse électrochimique a :

- caractérisé les interactions entre le cadmium et l'AHF
- établi la faible représentativité de ce matériel de référence.

En ce qui concerne les interactions cadmium-AHF, la proportionnalité entre l'intensité du courant de diffusion et la concentration en métal libre est affectée par la présence de ce type de ligand. De plus, au-delà de 2 ug Cd.mg^{-1} AHF, il s'établit des formes complexes instables vis-à-vis de l'analyse par PIDRA. Néanmoins, aux faibles concentrations, cette technique fournit des valeurs plus précises que l'électrode sélective. L'association de ces deux techniques a révélé l'existence de complexes de stabilités différentes. Une approche de la nature des sites d'interaction par RMN ^{113}Cd a mis en évidence l'existence d'au moins deux types de complexes, ce qui conforte l'hypothèse précédente.

La détermination des constantes conditionnelles de stabilité a été menée par la méthode de SCATCHARD qui, malgré les controverses, s'est révélée être une méthode de choix pour l'étude de complexants pouvant présenter plusieurs types de sites d'interaction. Le traitement graphique reste bien adapté dans le cas où les constantes conditionnelles de stabilité sont élevées; ainsi, deux types de sites ont pu être mis en évidence, susceptibles de complexer respectivement 1 et 10 ions cadmium par molécule d'acide humique, avec les constantes de stabilité correspondantes de l'ordre de 10^7 et 10^5 M^{-1} .

Malheureusement, la structure complexe des AHF gêne considérablement toute approche précise des sites d'interaction et il est nécessaire, pour une étude plus approfondie, de maîtriser les éléments structuraux constitutifs. De plus, leur masse molaire élevée doit être à l'origine de phénomènes de complexation relativement forts, non rencontrés dans les matériaux naturels en milieu aquatique et se produisant au coeur des structures "agrégatives" résultant d'un auto-assemblage supramacromoléculaire. Les valeurs élevées des constantes de stabilité mesurées ne permettent plus de prendre les AHF pour les études de modélisation. Leur manque de représentativité nous a conduit à proposer un modèle mieux adapté pour lequel le procédé de synthèse sera progressivement établi.

CHAPITRE III

**PREMIER ESSAI DE MODELISATION :
SYNTHESE A PARTIR DE L'HYDROQUINONE**

La mauvaise représentativité de l'acide humique Fluka a été démontrée à la fois sur le plan structural et sur celui des propriétés complexantes. Une autre étude également menée au laboratoire (URIEN, 1986) a récemment révélé que ce matériel a un comportement notablement différent de celui des matériaux humiques naturels vis-à-vis des traitements oxydants de l'eau. En particulier, il manifeste à l'occasion de l'étape de chloration, une activité génotoxique beaucoup plus faible que celle obtenue à partir de matériaux humiques naturels.

La nécessité d'élaborer un modèle humique original nous a donc amené à définir un procédé de synthèse en respectant les impératifs structuraux des substances humiques naturelles.

1- PROCEDE DE SYNTHESE

1.1- Choix de la molécule de départ

Les substances humiques naturelles présentent une structure macromoléculaire très complexe, constituée de divers éléments structuraux aliphatiques ou aromatiques et comportent de nombreux groupements phénoliques et carboxyliques. Dans la synthèse d'un modèle humique, il apparaît donc nécessaire d'utiliser un composé présentant ces groupements fonctionnels, et susceptible de conduire, par polyrecombinaison, à un produit macromoléculaire.

Nous avons donc retenu l'hydroquinone comme molécule de départ pour la synthèse d'un modèle humique, en prenant en compte les travaux de CORNEC et BRUSSET (1950) qui avaient montré que des molécules aromatiques, susceptibles de prendre une forme quinonique, donnent par oxydation un composé macromoléculaire.

1.2- Choix du milieu réactionnel oxydant

La polycondensation de la molécule d'hydroquinone étant réalisable par oxydation, il convient d'utiliser un réactif ayant un pouvoir oxydant élevé. Nous avons retenu l'ion persulfate $S_2O_8^{2-}$ de potentiel normal $E^\circ = +2,05V$. CORNEC et BRUSSET (1950) ont en effet montré que par rapport à d'autres réactifs oxydants tels que l'air, l'hypochlorite de

sodium et l'eau oxygénée, le persulfate en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}) et en milieu basique, conduit à la formation rapide et en quantité relativement importante, de produit de polycondensation.

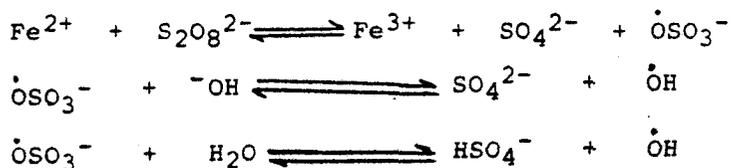
1.3- Déroulement de la synthèse du modèle humique hydroquinone (MHH)

La synthèse du modèle humique est effectuée dans un volume de 250ml d'une solution basique à $\text{pH} = 12$ (NaOH 2N). Le pH de cette solution est maintenu constant afin d'éviter, après introduction des réactifs, toute fluctuation préjudiciable à la reproductibilité du produit de synthèse, par suite de la formation de dérivés quinhydroniques insolubles. On y introduit successivement au temps:

- $t = 0$: $2,73 \cdot 10^{-2}$ mole d'hydroquinone
- $t = 1$ minute: $6,5 \cdot 10^{-4}$ mole de sulfate ferreux
- $t = 4$ minutes: $1,05 \cdot 10^{-2}$ mole persulfate de sodium.

On obtient une solution brunâtre qui est laissée à l'obscurité pendant quatre jours et à 20°C , pour favoriser l'évolution de la polycondensation. Cette solution est ensuite filtrée.

Une proposition du mécanisme d'initiation de la réaction a été formulée par CHAWLA et FESSENDEN (1975), STEEKEN et coll. (1977), en étudiant les réactions d'oxydation de quelques composés aromatiques par l'ion radical sulfate ($\cdot\text{OSO}_3^-$). Ces auteurs ont montré qu'en milieu aqueux et basique, il peut s'établir une compétition entre les radicaux ion sulfate ($\dot{\text{O}}\text{SO}_3^-$) et hydroxyle ($\dot{\text{O}}\text{H}$). En effet, ce dernier peut être généré dans le milieu réactionnel suivant les équations:



La dernière équation expliquerait l'acidification du milieu réactionnel observée pendant l'oxydation, ce qui entraînerait la formation de quinhydrone lorsque le pH devient très acide. C'est pourquoi il a été nécessaire de maintenir un milieu fortement basique pendant la synthèse.

1.4- Isolement de la forme moléculaire

La forme moléculaire du modèle humique est obtenue après avoir éliminé par dialyse, des ions sodium.

A cet effet, la solution brunâtre (250ml) est placée à l'intérieur d'une membrane de dialyse (point de coupure 5000) en forme de "boudin" que l'on plonge dans cinq litres d'eau déminéralisée, sous agitation pendant 48 heures. La fin de la dialyse est indiquée par la constance du pH de l'eau (pH = 7) et de la solution contenue dans le "boudin" (pH = 3,5). La forme moléculaire définitive est obtenue par passage au travers d'une colonne contenant une résine Amberlite IR-120H. Cette élimination est contrôlée au moyen de la spectrophotométrie d'émission.

Après lyophilisation, le résidu brunâtre obtenu est de l'ordre de 400mg.

2- CARACTERISATION DU MODELE HUMIQUE-HYDROQUINONE (MHH).

Les techniques spectrométriques et électrochimiques expérimentées précédemment sur l'acide humique FLUKA (AHF), sont reprises dans l'étude de la structure et des propriétés complexantes du modèle humique-hydroquinone (MHH).

2.1- Etude structurale

2.1.1- Taille moléculaire

Par ultrafiltration du MHH, différentes tailles moléculaires ont pu être séparées. La masse de chaque fraction, obtenue par pesée, a permis d'évaluer leurs proportions massiques qui sont regroupées dans le tableau III_I.

TAILLE MOLECULAIRE (TM)

PROPORTION MASSIQUE

①	TM > 3.10 ⁵	38 %
②	3.10 ⁵ > TM > 5.10 ⁴	60 %
③	5.10 ⁴ > TM > 5.10 ³	1 %
④	5.10 ³ > TM	0,68 %

Tableau III₁: Taille moléculaire et répartition des différentes fractions d'ultrafiltration du MHH

La répartition des proportions massiques montre que le MHH est essentiellement constitué d'éléments structuraux de masse molaire élevée, comme l'AHF avec cependant une masse molaire moyenne légèrement inférieure. La comparaison demeure toutefois difficile à établir compte tenu du fait que la dialyse a pu laisser s'échapper une proportion non négligeable de petites molécules.

2.1.2- Etude par spectrophotométrie UV

Les spectres UV du modèle humique et de l'hydroquinone dont il est issu, sont présentés sur la figure III₁. L'hydroquinone présente quatre bandes d'absorption attribuables aux transitions électroniques suivantes:

- 196nm: $\pi \longrightarrow \pi^*$ et $n \longrightarrow \sigma^*$ (noyaux aromatiques et divers groupements hydroxyle,

- 220nm }
 - 243nm } $\pi \longrightarrow \pi^*$ (noyaux aromatiques)
 - 285nm }

Au contraire, celui du MHH ne présente aucune bande d'absorption caractéristique et ressemble à ceux obtenus d'une façon générale pour des substances humiques naturelles (GHOSH et SCHNITZER, 1979 ; VISSER, 1984), et tend à prouver qu'il s'est produit une polycondensation.

L'utilisation de la spectrophotométrie UV a permis d'apprécier la répartition des groupements hydroxyle et des cycles aromatiques des

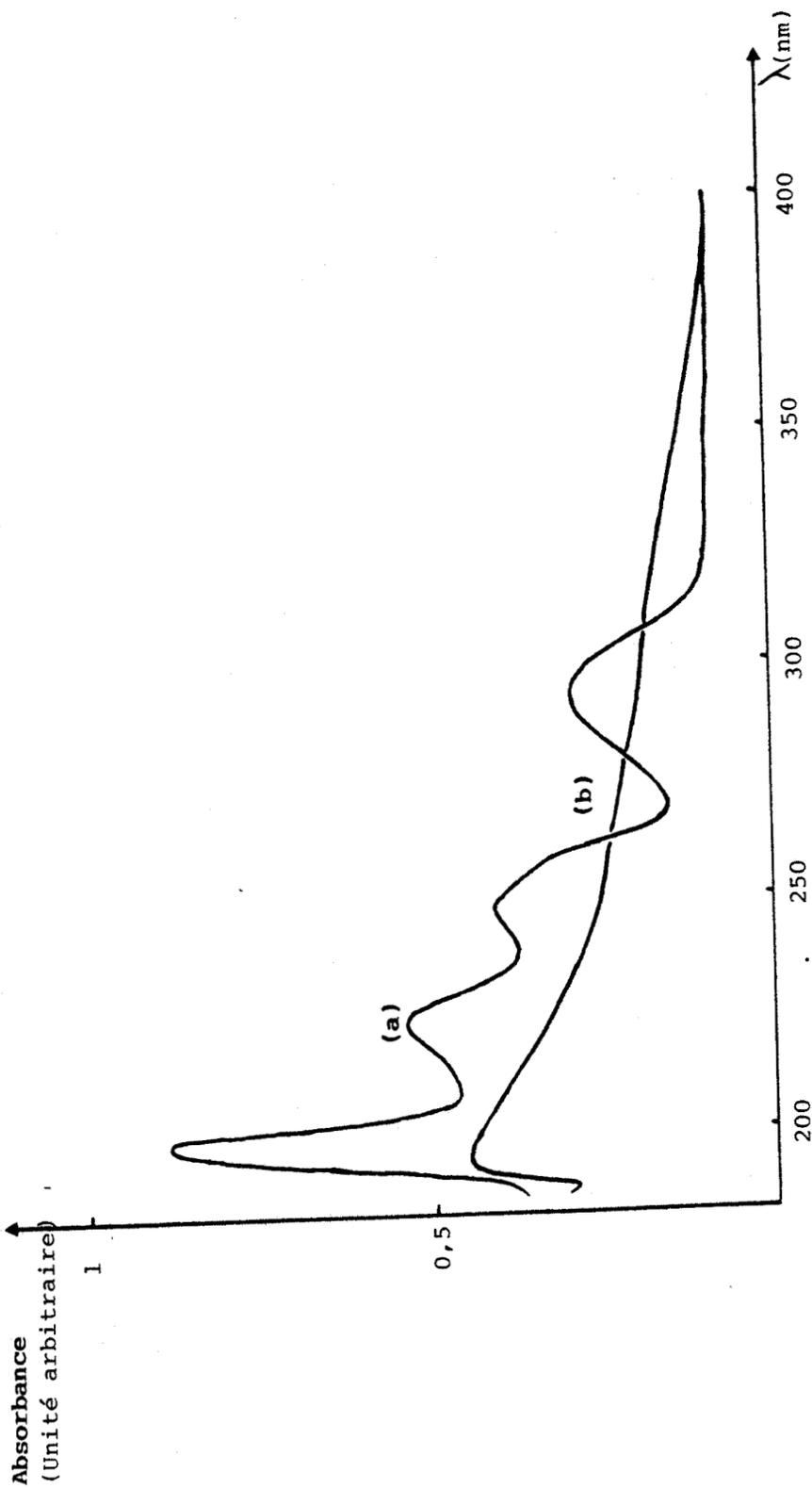


Figure IIIj: Spectres d'absorption UV (20 mg.l^{-1}) de l'hydroquinone (a) et du MHH (b) dans le MMS
vitesse d'enregistrement : 5 nm.s^{-1}
fentes : 1 nm
sensibilité : 2A



différentes fractions d'ultrafiltration et modulée selon l'importance pondérale (tableau III_{II}).

	TENEUR DE DIVERS GROUPEMENTS OH	TENEUR DES CYCLES AROMATIQUES	Rapport $\frac{OH}{\text{Cyclohexane}}$
MHH non fractionné	100	100	
① $TM > 3 \cdot 10^5$	14,23 (0,37)	20,54 (0,54)	0,68
② $3 \cdot 10^5 > TM > 5 \cdot 10^4$	47,44 (0,79)	66,21 (1,10)	0,72
③ $5 \cdot 10^4 > TM > 5 \cdot 10^3$	8,39 (8,39)	3,80 (3,80)	2,20
④ $5 \cdot 10^3 > TM$	29,93 (44,01)	9,43 (13,86)	3,17

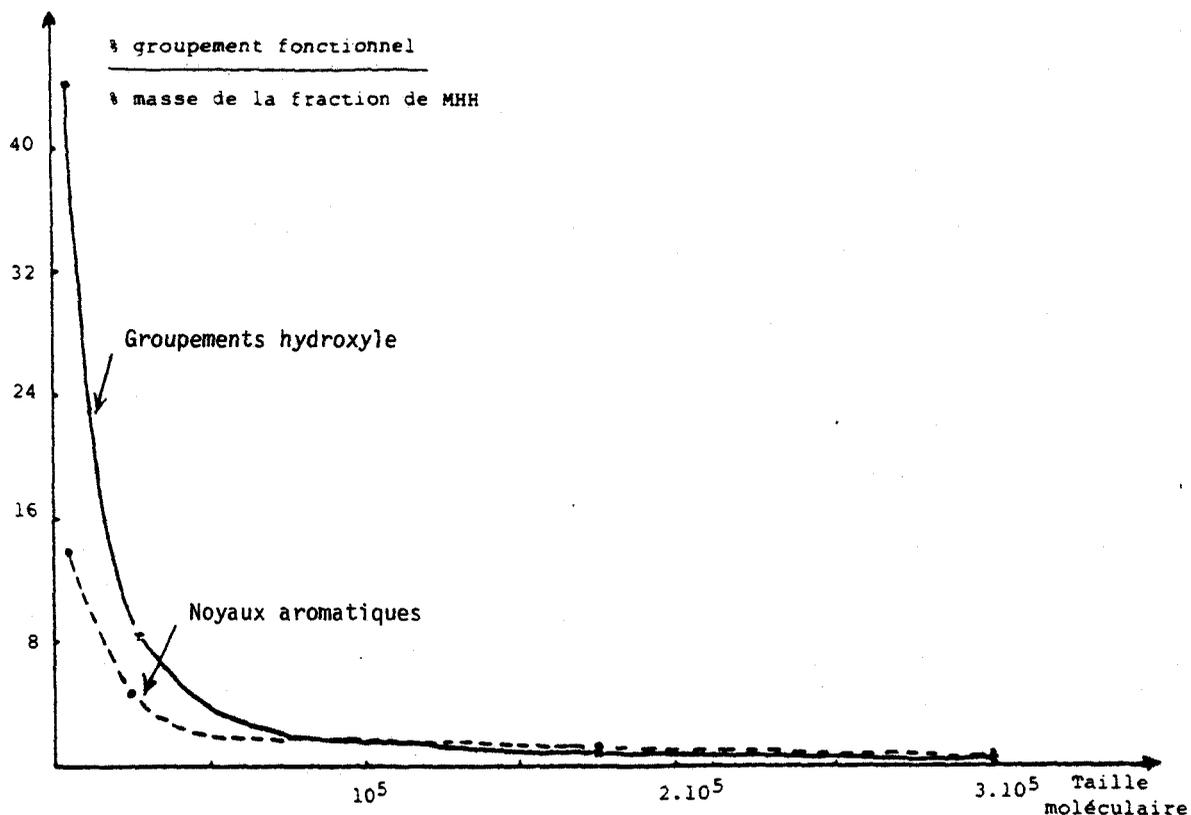
Tableau III_{II} Répartition (%) des groupements hydroxyle et aromatiques dans les différentes fractions d'ultrafiltration du MHH

La représentation graphique (figure ci-après) de l'évolution du rapport pourcentage en groupement fonctionnel/pourcentage en masse de chaque fraction en fonction de la taille moléculaire montre :

- que seule la fraction ④ présente un caractère aromatique et hydroxylé très important
- une continuité de décroissance de ce rapport.

Le comportement particulier de la fraction ④ est certainement attribuable à la perte de matière qu'occasionne l'étape de dialyse. Compte-tenu de cette observation, le MHH semble constituer un matériel humique relativement homogène, contrairement à l'AHF pour lequel on pouvait noter une nette discontinuité pour la fraction ③.

Si l'on s'intéresse maintenant au nombre de groupements hydroxyle par unité de cycle aromatique, on en observe une diminution progressive quand la taille moléculaire croît.



La variation des coefficients d'extinction molaire avec la structure et, en particulier, avec le degré de polymérisation doit limiter la fiabilité de ces valeurs. Cependant, apparaît nettement la tendance d'un engagement progressif des groupements hydroxyle au fur et à mesure de l'édification du MHH.

2.1.3- Etude par pHmétrie



L'étude pHmétrique est réalisée sur une solution de $100\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de MHH obtenue à partir d'une solution mère de $1\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ en MHH dissous dans la soude $0,1\text{N}$. Le dosage est effectué par de l'acide chlorhydrique $0,5\text{N}$. On obtient une courbe (figure III₂) qui présente un seul point d'inflexion, ce qui indique l'existence d'un seul type de groupement fonctionnel distinguable en pHmétrie. Le $\text{pK}_a = 9,9$ obtenu peut être attribué aux groupements de type hydroxyle phénolique.

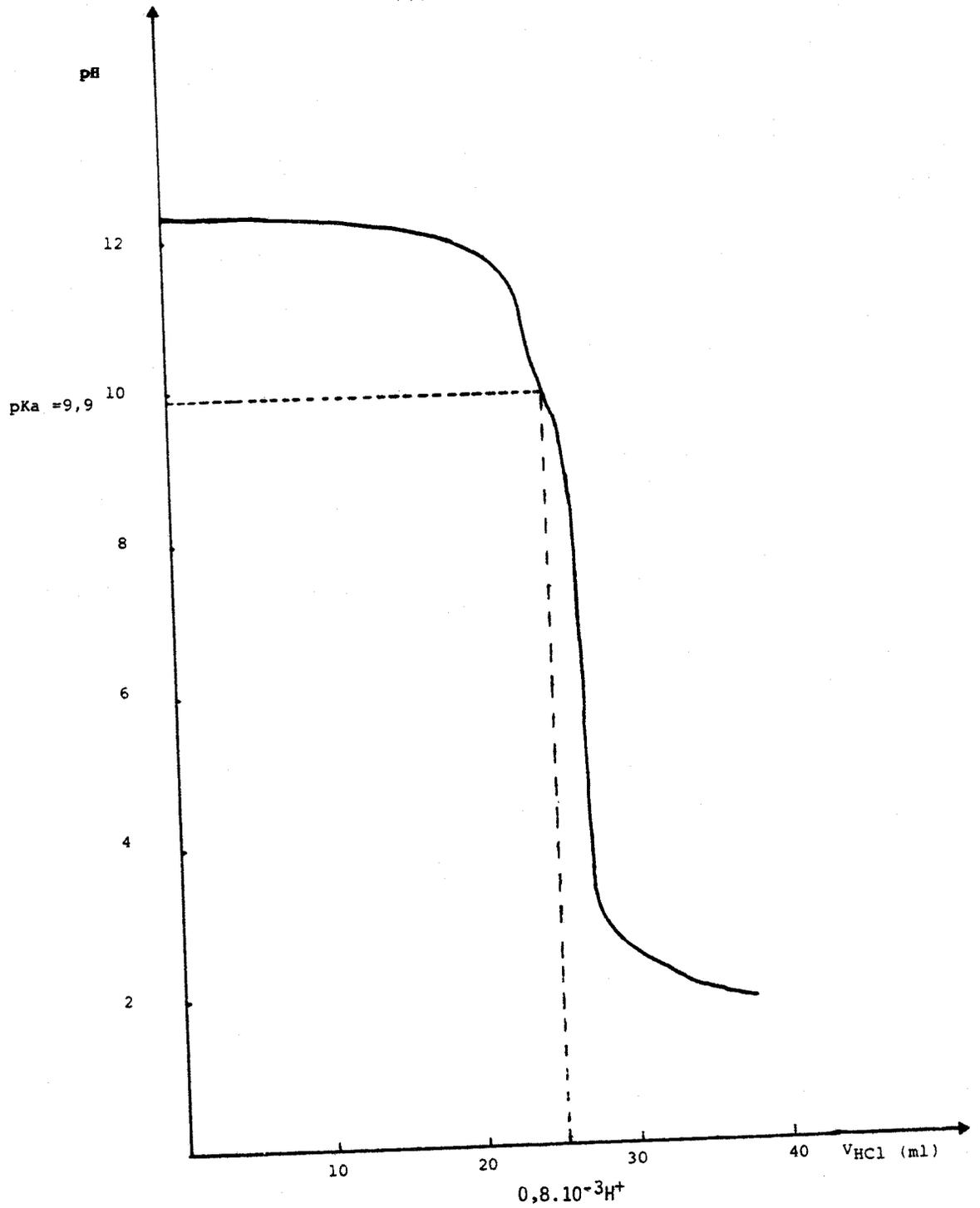


Figure II₂ : Courbe de dosage pHmétrique du MHH ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)
dissous dans la soude (0,1 N)



2.1.4- Etude par spectrométrie infra-rouge

2.1.4.1- Etude du modèle humique-hydroquinone (MHH)

L'attribution des absorptions observées (figure III₃b) aux vibrations de différents groupements fonctionnels est effectuée (tableau III_{III}) suivant des études précédemment réalisées sur des molécules organiques phénoliques par HIDALGO et OTERO (1960) et GREEN (1961). Contrairement au spectre de l'hydroquinone (figure III₃a), celui du MHH est faiblement résolu et confirme la formation d'un produit résultant d'une polycondensation.

Le spectre du MHH présente trois régions de forte absorption.

Région 3800cm⁻¹ - 2400cm⁻¹

On observe dans cette région, une très large bande d'absorption avec des maxima à 3440cm⁻¹ et 3160cm⁻¹, attribuables aux vibrations des groupements de type hydroxyle phénolique, et un épaulement à 3040cm⁻¹ qui peut être attribué aux groupements de type CH aromatique.

Région 1800cm⁻¹ - 900cm⁻¹

Cette région est caractérisée par une forte et large absorption avec un maximum à 1110cm⁻¹ et des épaulements à 1130cm⁻¹ et 1170cm⁻¹, correspondant aux vibrations d'élongation de valence des groupements $\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{O}$ phénoliques et aux vibrations de déformation des groupements OH phénoliques. Une moyenne et large absorption à 1620cm⁻¹ et une autre, de faible intensité à 1510cm⁻¹, révèlent la présence de groupements $\text{C}=\text{C}$ de type aromatique. A 1400cm⁻¹, on observe une forte absorption attribuable aux groupements $\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{O}$ de type phénol. Contrairement à l'acide humique FLUKA, le MHH ne présente pas d'absorption entre 1650cm⁻¹ et 1750cm⁻¹ caractéristique des groupements de type $\text{C}=\text{O}$ (carboxyle ou carbonyle). Ceci confirme l'absence de tels groupements dans la structure du MHH.

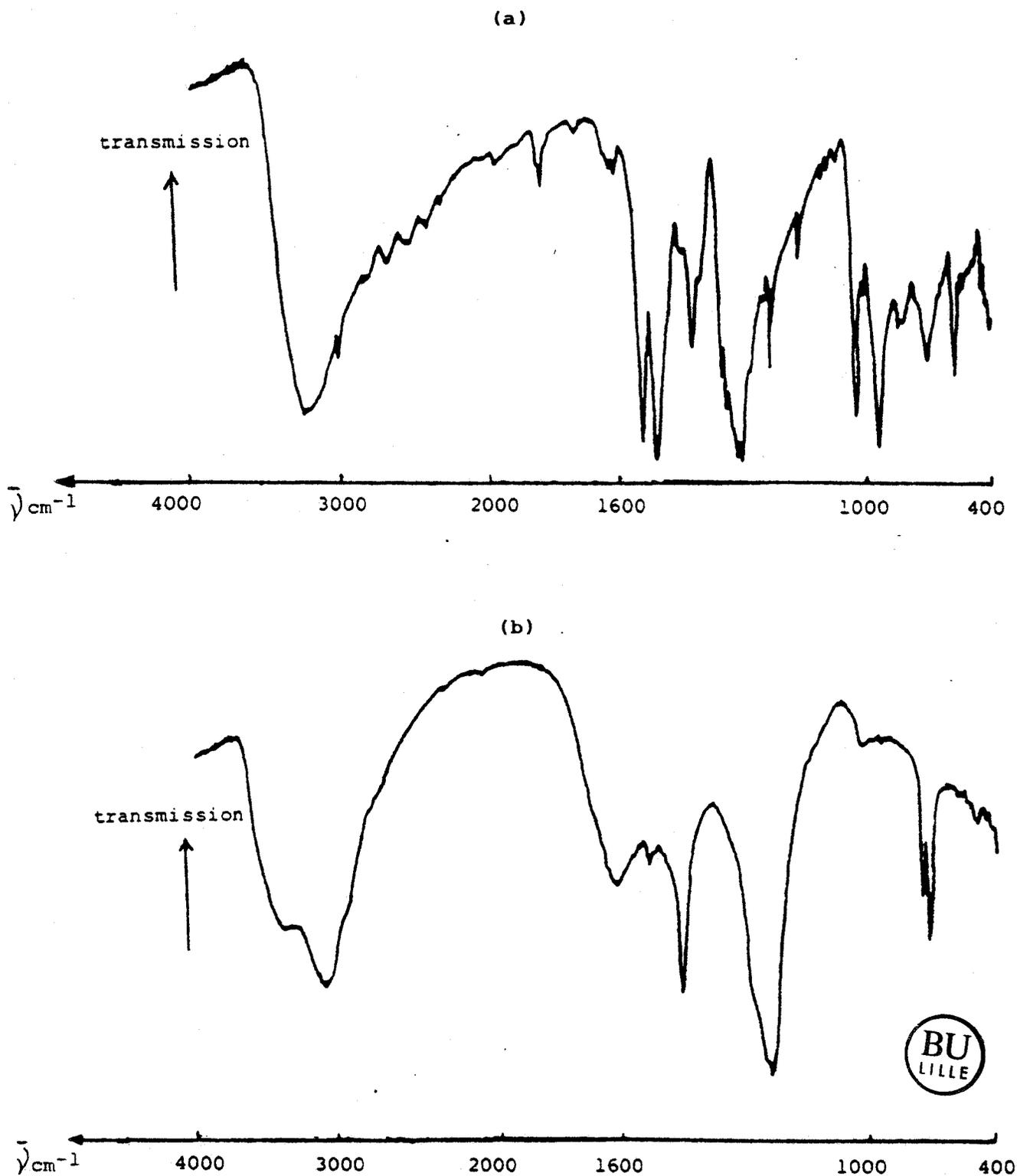


Figure III₃: Spectres d'absorption infra-rouge de l'hydroquinone (a) et du MHH (b)

[nombre d'accumulations: 1 pour l'hydroquinone
64 pour MHH
résolution = 4cm⁻¹]

HYDROQUINONE		M H H	
FREQUENCES (cm ⁻¹) ET INTENSITES DES RAIES	ATTRIBUTIONS	FREQUENCES (cm ⁻¹) ET INTENSITES DES RAIES	ATTRIBUTIONS
3 264 F	∇ OH (phénolique) ∇ CH (aromatique)	3 420 m.1	∇ OH (phénolique) ∇ CH (aromatique)
3 024 m		3 160 f.1	
1 632 f	∇ C=C (noyau aromatique)	3 040 f.1 (épaulement)	∇ C=C (noyau aromatique)
1 612 f		1 620 m.1	
1 520 F		1 510 m	
1 472 F		1 400 m	
1 354 m		∂ OH (phénolique)	
1 332 (épaulement)	∇ C-O (phénolique)		
1 260 m		∂ CH (aromatique)	∇ C-O (phénolique)
1 238 m			
1 208 F	∂ CH (aromatique)	1 160 (épaulement)	∂ CH (aromatique)
1 188 F		1 130 (épaulement)	
1 160	∂ CH (aromatique)	1 110 F.1	∇ C-O (phénolique)
1 116			
1 098	∇ CH (aromatique)		∂ cycle aromatique
1 008			
940	∇ CH (aromatique)		∂ cycle aromatique
920			
892	∂ cycle aromatique	640	∂ cycle aromatique
824			
807	∇ CH (aromatique)	618	∂ cycle aromatique
760			
685	∂ cycle aromatique		
606	∂ cycle aromatique		
520	∂ cycle aromatique		

Tableau III_{III}: Principales fréquences de vibrations infra-rouge observées pour l'hydroquinone et le MHH, et attributions proposées.

Vibrations de valence (∇), de déformation dans le plan (∂) hors du plan (∇). Intensité forte (F), faible (f), moyenne (m) bande large (l).



Région 900cm⁻¹ - 500cm⁻¹

Deux absorptions seulement, fines et d'intensité moyenne, situées l'une à 640cm⁻¹ et l'autre à 620cm⁻¹, occupent cette région. Elles correspondent aux vibrations de déformation respectivement dans et hors du plan du noyau aromatique.

Comme le spectre du MHH présente essentiellement de larges bandes qui sont des enveloppes de raies fines d'absorption, il est apparu important d'étudier les spectres de ses différentes fractions afin d'obtenir de plus amples renseignements sur sa structure.

2.1.4.2- Etude des différentes fractions (figure III₄)

Le tableau III_{IV} rassemble les fréquences observées sur les différentes fractions et les attributions aux principaux groupements fonctionnels observés.

Le spectre de la fraction ① présente une allure générale identique à celle du produit entier. On observe néanmoins, dans le domaine 3800cm⁻¹ - 2400cm⁻¹, que les deux bandes d'absorption qui s'y trouvent (3420cm⁻¹ et 3180cm⁻¹), deviennent d'égale intensité. L'intensité de la raie située à 1110cm⁻¹ (vibrations d'élongation de C-O , de déformation de OH et de CH) devient plus importante par rapport à celle des bandes situées à 3180cm⁻¹ et 3420cm⁻¹ relatives aux groupements OH.

La fraction ② donne un spectre identique à celui du produit entier. La dissymétrie constatée pour le produit entier dans l'absorption des bandes situées entre 3800cm⁻¹ et 2400cm⁻¹ réapparaît dans le spectre de cette fraction. L'analogie structurale de cette dernière avec le produit entier a été déjà observée dans les résultats d'ultrafiltration où cette fraction était représentative du point de vue masse molaire. Les résultats spectrophotométriques ont montré aussi que cette fraction présentait d'importantes absorptions relatives aux différents groupements fonctionnels observés, ce qui s'explique par l'importance de sa masse molaire et qui la rapproche de la structure du produit entier.

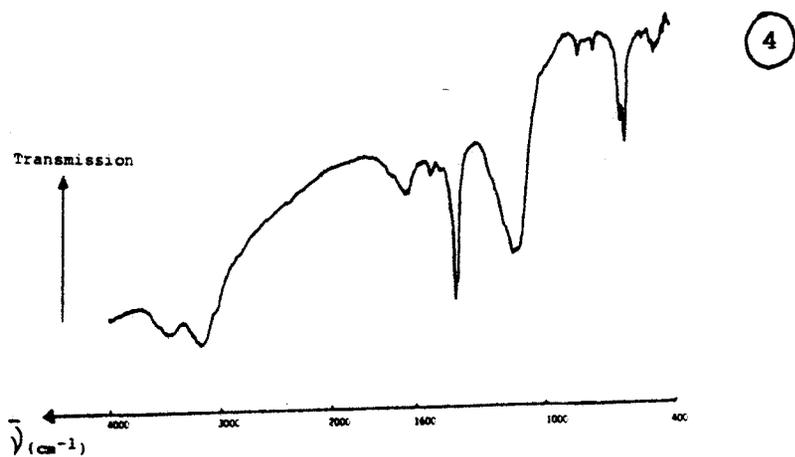
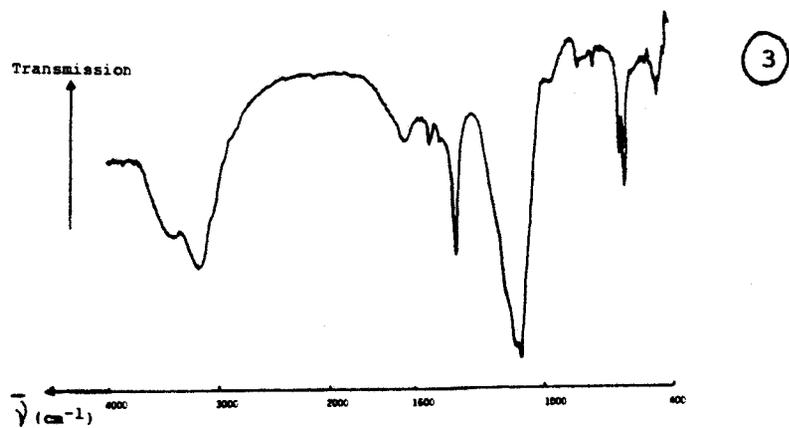
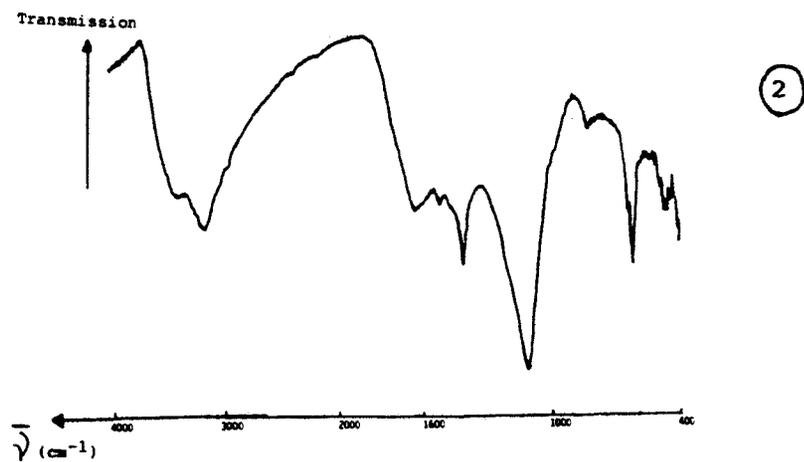
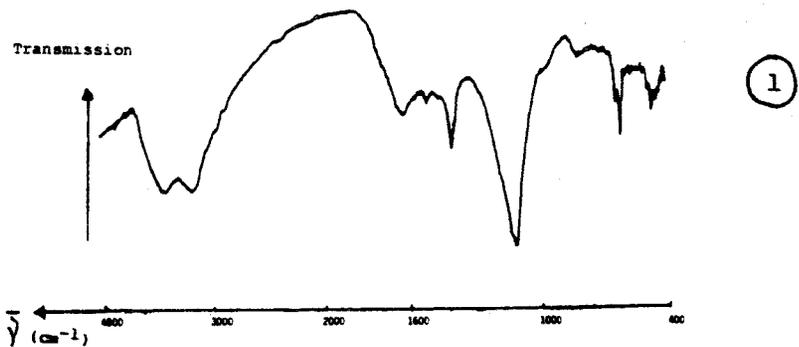


Figure III₄ : Spectres d'absorption infra-rouge des différentes fractions d'ultrafiltration du MHH

- ① $TM > 3 \cdot 10^5$
- ② $3 \cdot 10^5 > TM > 5 \cdot 10^4$
- ③ $5 \cdot 10^4 > TM > 5 \cdot 10^3$
- ④ $5 \cdot 10^3 > TM$

FRACTIONS	FREQUENCES (cm ⁻¹) ET INTENSITES	ATTRIBUTIONS
①	3 420 m.l 3 180 m.l 3 000 (épaulement) 1 630 m.l 1 508 f 1 400 m 1 388 (épaulement) 1 160 (épaulement) 1 130 (épaulement) 1 110 F.l 638 m 618 m	ν OH (phénolique) ν CH (aromatique) ν C = C (noyau aromatique) ν C-O (phénolique) δ CH (aromatique) ; δ OH (phénolique) γ cycle aromatique δ cycle aromatique
②	3 400 F.l 3 160 F.l 3 000 (épaulement) 1 620 m.l 1 504 f 1 400 m 1 382 (épaulement) 1 160 (épaulement) 1 127 (épaulement) 1 104 F.l 640 m 618 m	ν OH (phénolique) ν CH (aromatique) ν C = C (noyau aromatique) ν C-O (phénolique) δ CH (aromatique) ; δ OH phénolique γ cycle aromatique δ cycle aromatique
③	3 400 m.l 3 160 m.F.l 3 000 (épaulement) 1 630 m 1 512 m 1 400 m 1 160 (épaulement) 1 126 (épaulement) 1 100 F.l 638 m 618 m	ν OH (phénolique) ν CH (aromatique) ν C = C (noyau aromatique) ν C-O (phénolique) δ CH (aromatique) γ cycle aromatique δ cycle aromatique
④	3 440 m.l 3 140 m.l 3 030 (épaulement) 1620 m 1516 f 1400 F 1130 F 1110 F 838 f 760 f 640 m 618 m	ν OH (phénolique) ν C=C (noyau aromatique) ν C-O (phénolique) δ CH (aromatique) ; δ OH (phénolique) γ CH (aromatique) γ cycle aromatique δ cycle aromatique

Tableau III_{IV} : Principales fréquences des vibrations observées pour les différentes fractions d'ultrafiltration du MHH et attributions proposées

Vibration de valence (ν), de déformation dans le plan (δ), hors du plan (γ). Intensité forte (F), faible (f), moyenne (m), bande large (l)



La fraction (3) présente les absorptions à 1400cm^{-1} (attribuables aux groupements de type $\text{C}-\text{O}$ et OH) et à 1100cm^{-1} (groupements $\text{C}-\text{O}$), d'intensité importante par rapport à celle des bandes situées à 3160cm^{-1} et 3400cm^{-1} (CH et OH aromatiques). On observe aussi que l'intensité relative de la raie située à 1400cm^{-1} augmente et tend à égaler celle de la raie située à 1100cm^{-1} . A 758cm^{-1} et 830cm^{-1} on remarque une apparition d'absorptions d'intensité relativement faible, correspondant aux vibrations des groupements CH hors du plan des cycles aromatiques substitués en position 1,4.

Dans la fraction (4), les intensités des raies à 1400cm^{-1} et à 1100cm^{-1} , deviennent encore beaucoup plus importantes que celles des bandes situées à 3160cm^{-1} . On observe en plus une inversion d'intensité entre la raie située à 1400cm^{-1} et celle à 1100cm^{-1} . Cette inversion d'intensité est à rapprocher aux résultats spectrophotométriques où la fraction (4) présentait des proportions importantes en groupements hydroxyle et en cycles aromatiques. L'apparition des raies à 830cm^{-1} et à 758cm^{-1} est beaucoup plus nette. Ceci est le reflet d'un désengagement de structures aromatiques dont les protons devaient participer à des assemblages supramoléculaires, en particulier par liaisons hydrogène.

2.1.5- Etude par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton ($\text{RMN } ^1\text{H}$).

Contrairement à l'AHF, le MHH ne manifeste pas de paramagnétisme. L'absence de cette propriété vérifiée par spectrométrie de résonance paramagnétique (RPE) a permis d'obtenir, dans des conditions relativement faciles, le spectre RMN du proton du MHH réalisé dans de l'eau deutériée (D_2O) à 60mg.l^{-1} (figure III₅). On observe un seul pic intense à $6,9\text{ppm}$, attribuable à des protons aromatiques et reflétant le caractère de symétrie marquée que doit présenter l'environnement électronique de ces noyaux.

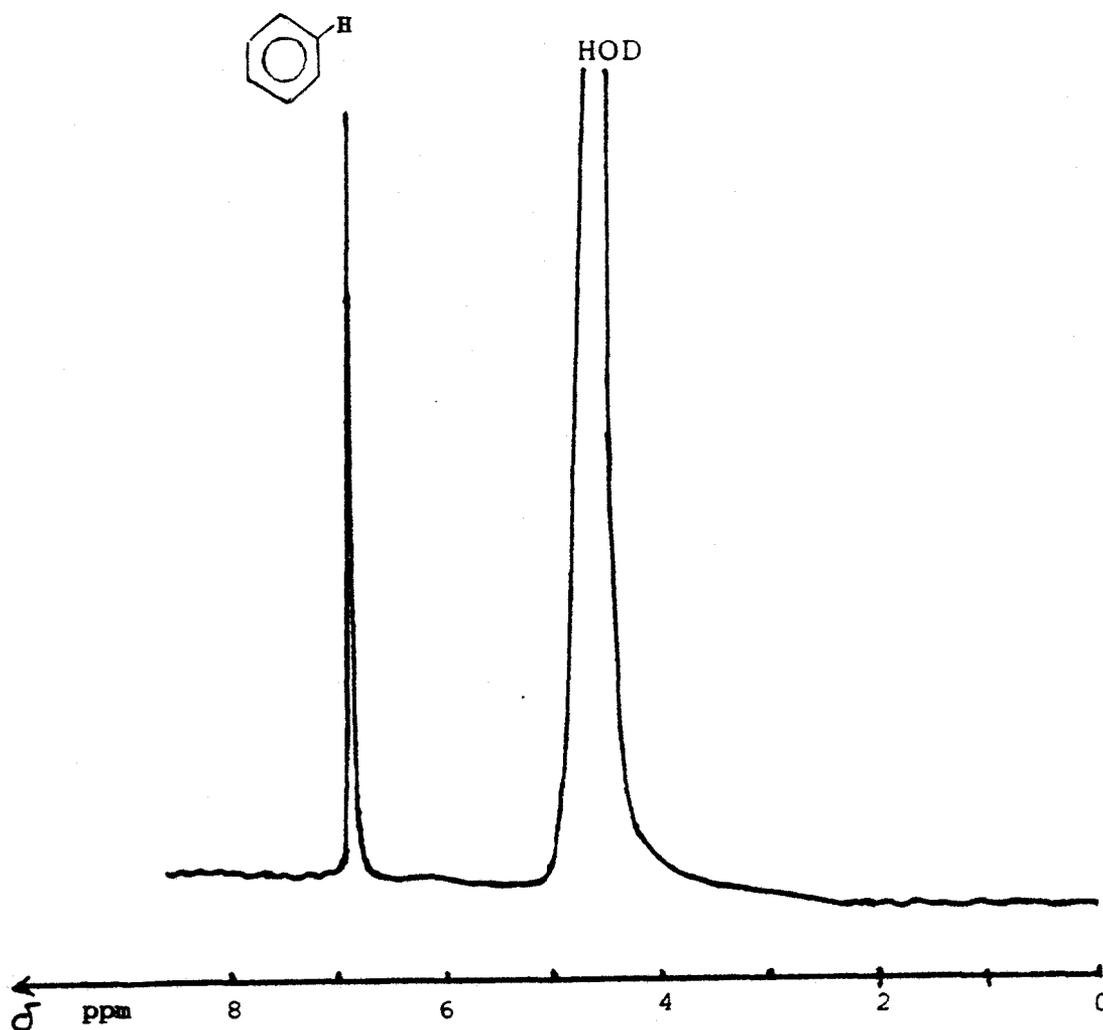
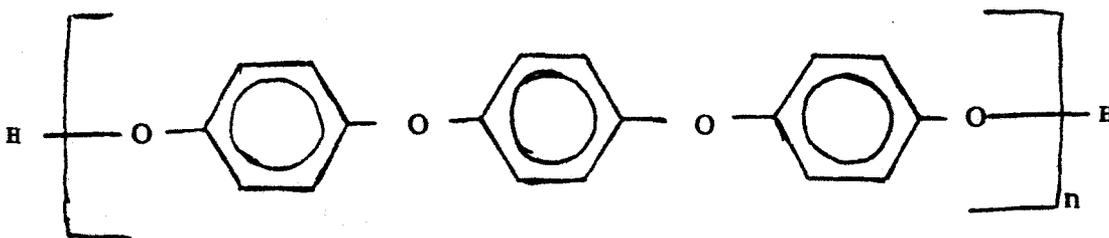


Figure III₅ : Spectre RMN ¹H du MHH (60 mg.l⁻¹) dans D₂O

Si la spectrophotométrie UV nous renseigne sur l'aspect quantitatif des groupements fonctionnels du MHH, la spectrométrie infra-rouge confirme qualitativement leur existence dans sa structure chimique. Les résultats donnés par la spectrométrie RMN ¹H, en plus de ceux obtenus par les autres méthodes spectroscopiques et potentiométriques, nous conduisent à penser que le motif essentiel de la structure chimique doit être du type suivant:



2.2- Propriétés complexantes

L'étude structurale du MHH a montré les limites de ce modèle par rapport aux objectifs fixés, tels que l'absence de groupements fonctionnels de type carboxyle et le caractère par trop répétitif du motif structural de base.

Néanmoins, si ce MHH n'est pas satisfaisant du point de vue structural, l'étude de ses propriétés complexantes doit nous permettre d'apprécier la participation aux phénomènes de complexation, des cycles aromatiques et des groupements hydroxyle. De plus, le rôle de la conformation structurale résultant d'une association agrégative, peut être précisé au moyen du MHH. Contrairement à l'AHF, pour lequel nous avons déterminé les constantes de complexation vis-à-vis du cadmium, et en raison de l'intérêt limité que présente le MHH, l'étude des propriétés complexantes de ce "modèle" ne comportera que, d'une part, la détermination de la cinétique de complexation de ce métal et, d'autre part, l'évaluation des capacités complexantes du MHH et de ses différentes fractions d'ultrafiltration.

Cinétique de complexation et capacité complexante (figure III₆)

L'étude cinétique a été menée par électrode sélective. La complexation s'effectue plus rapidement que pour l'AHF et l'équilibre entre la forme libre et la forme complexée est atteint en moins de 24 heures

La valeur moyenne de la capacité complexante est de $3,65 \cdot 10^{-9}$ atg Cd.mg⁻¹ MHH, à l'équilibre. Elle est inférieure à celle de l'AHF ($6,78 \cdot 10^{-8}$ atg Cd.mg⁻¹ AHF) et des substances humiques d'origine aquatique qui présentent des valeurs allant de $1,7 \cdot 10^{-7}$ à $2,8 \cdot 10^{-7}$ atg.Cd.mg⁻¹ substances humiques (NEUBECKER et ALLEN, 1983).

Dans les différentes fractions, l'état d'équilibre de complexation du cadmium est très rapidement atteint pour des fractions ③ et ④ de faible taille moléculaire, tandis que celui des fractions ① et ② de taille moléculaire élevée, s'effectue progressivement. Il n'est atteint qu'au bout de trois jours de contact pour la fraction ①. Les caractéristiques cinétiques de cette fraction semblent donc être dépendantes de ses interactions avec les autres et l'ultrafiltration a éliminé ces interactions.

Pour chacun des temps de contact étudiés, la somme des quantités de cadmium complexées par les différentes fractions du MHH est légèrement supérieure à la quantité de cadmium complexée par le produit entier. Là encore, le rôle spécifique de l'ultrafiltration est de rendre accessible au cadmium certains sites potentiels à la complexation.

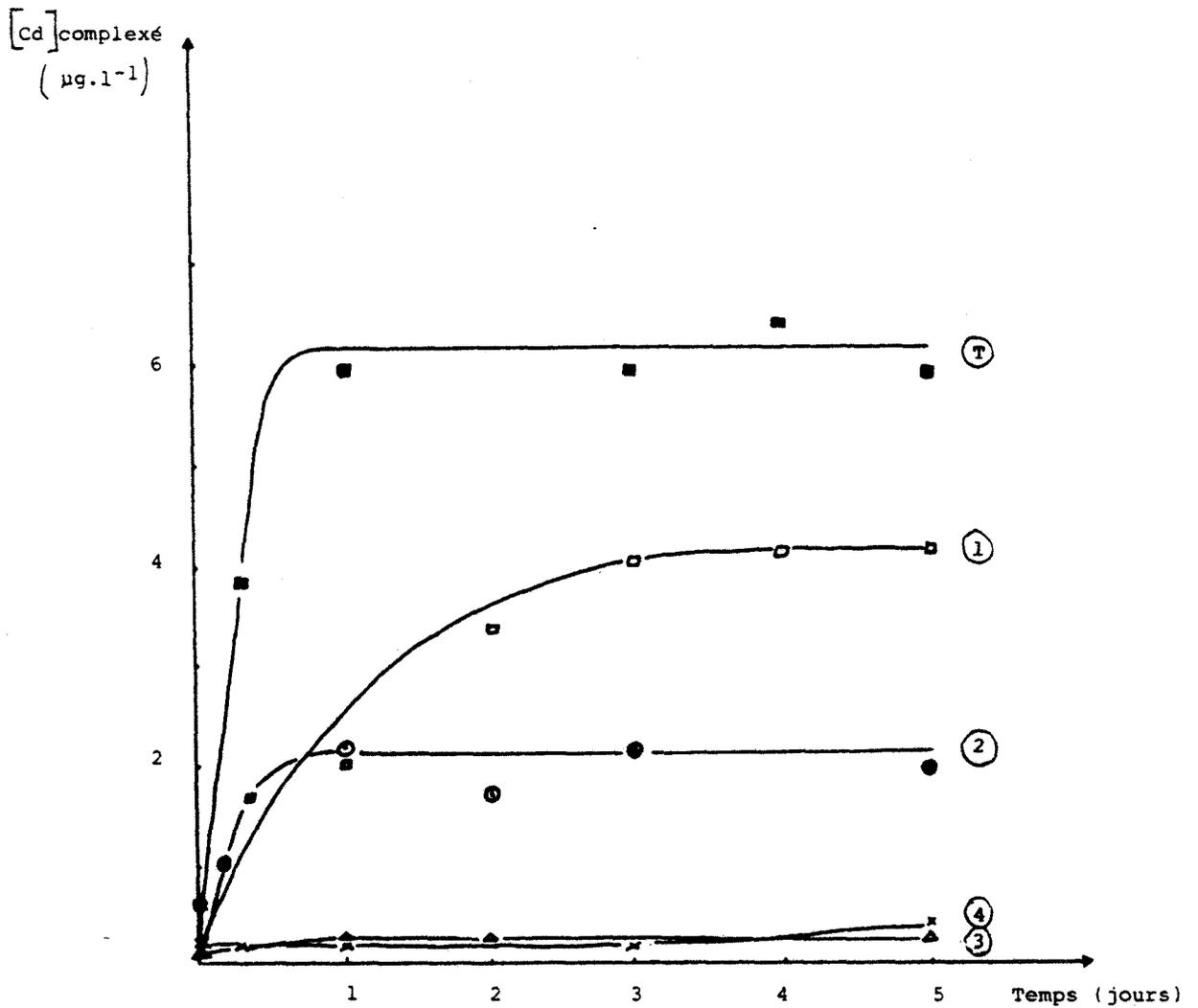
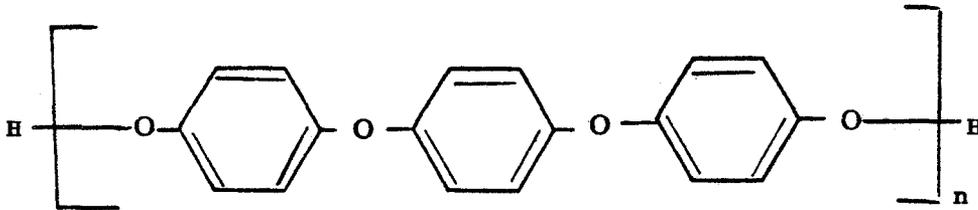


Figure III₆ Cinétique de complexation du cadmium par le MHH et ses différentes fractions

2.3- Conclusion

L'étude du MHH nous a permis d'obtenir de nombreux renseignements:

- le MHH présente une structure essentiellement répétitive du motif structural de base



très peu représentative de la structure des substances humiques naturelles,

- la complexation des métaux par les substances humiques peut être liée à la conformation structurale de ces dernières

- le MHH ne présente pas de groupements carboxyle et carbonyle qui constituent pourtant deux des principaux groupements fonctionnels des acides fulviques d'origine aquatique.

Comme nous pouvons le constater, le MHH n'est pas suffisamment représentatif des substances humiques naturelles, tant sur le plan structural que sur celui des propriétés complexantes. Ces conclusions nous ont amené à proposer une autre molécule d'acide phénolique pour synthétiser un modèle humique plus proche des substances humiques naturelles retrouvées en milieu aquatique.

CHAPITRE IV

PRESENTATION D'UN MODELE HUMIQUE ORIGINAL

OBTENU A PARTIR DE L'ACIDE GENTISIQUE

Les insuffisances observées sur le modèle humique-hydroquinone (MHH), tant sur le plan structural qu'au niveau de ses propriétés complexantes, ont conduit à reconsidérer la synthèse chimique d'un modèle humique. La molécule d'hydroquinone, précédemment utilisée comme molécule initiale, est ici remplacée par celle d'acide gentisique ou acide dihydroxy- 2,5 benzoïque.

Cette molécule, constituée de groupements fonctionnels constamment rencontrés dans la structure des substances humiques naturelles (SCHNITZER et GUPTA, 1965; CARIATI et coll., 1983), présente en plus un double avantage lors de l'oxydation par le persulfate en milieu basique:

- la possibilité de donner une forme quinonique, grâce aux groupements hydroxyle situés en para
- la présence d'un groupement carboxyle qui peut donner une orientation supplémentaire à la polycondensation, par rapport à celle rencontrée dans le cas du MHH.

De plus, on peut s'attendre à retrouver le groupement carboxyle dans la structure du produit de synthèse et, par conséquent, des sites de type salicylate ou phtalate généralement observés dans la structure des substances humiques naturelles. Nous traiterons donc successivement de la synthèse et de l'isolement du MHG suivis de l'étude de sa structure et de ses propriétés complexantes.

1- MODE OPERATOIRE POUR LA SYNTHÈSE DU MODÈLE HUMIQUE-GENTISIQUE (MHG)

1.1- Milieu réactionnel et déroulement de synthèse

Comme précédemment, l'ensemble $Fe^{2+}/S_2O_8^{2-}$ est utilisé comme réactif oxydant. Mais, dans le cas présent, la solution d'hydroxyde de sodium 2N est d'abord portée à 80°C avant l'introduction successive aux temps:

- 0: $2,73 \cdot 10^{-2}$ mole d'acide gentisique
- 1 minute: $6,5 \cdot 10^{-4}$ mole de sulfate ferreux
- 4 minutes: $1,05 \cdot 10^{-2}$ mole de persulfate de sodium
- 14 minutes: $7 \cdot 10^{-3}$ mole de ditertiobutyl-3,5 hydroxy-4 toluène (BHT).

Le chauffage préalable du milieu réactionnel permet d'accélérer la vitesse des réactions d'oxydation de l'acide gentisique et de polycondensation des produits formés. Le volume du mélange réactionnel est maintenu constant à l'aide d'un système réfrigérant à reflux. Le BHT, composé anti-oxydant, d'ailleurs identifié dans la structure des substances humiques naturelles extraites des sédiments de rivière (NAGASE et coll., 1984), est utilisé afin de limiter la propagation de la polycondensation et de réduire la taille moléculaire du produit de synthèse.

Cinq minutes après l'introduction du BHT dans le mélange réactionnel, ce dernier est refroidi à 25°C en plongeant le réacteur dans un bain de glace puis filtré.

1.2- Isolement de la forme moléculaire

Le pH du milieu réactionnel est amené à 9 à l'aide d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique afin de respecter les conditions de pH de la membrane d'ultrafiltration. Cette filtration sur membrane Amicon YC05 de point de coupure 500 permet l'élimination de l'essentiel des ions Na^+ , SO_4^{2-} , Cl^- par lavage à l'eau déminéralisée. Le terme du lavage a été apprécié par l'élimination complète dans l'ultrafiltrat, de l'acide gentisique en excès (contrôle effectué en UV sur la bande caractéristique à 320nm).

La purification du MHG est poursuivie par percolation sur une colonne contenant une résine Amberlite échangeuse des cations de type IR-120H. Ceci permet l'élimination des ions sodium en interaction avec les groupements basiques du MHG, contrôlée par spectrophotométrie d'émission à 589nm. Par lyophilisation, on obtient le MHG sous forme pulvérulente, et de masse égale à 280,5mg.

2- CARACTERISTIQUES STRUCTURALES

2.1- Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire du MHG est effectuée par le service d'analyse du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) à Lyon. Elle donne les résultats présentés dans le tableau IV_I. Si, comparativement aux données bibliographiques concernant les acides fulviques naturels, les teneurs en carbone (45,49 + 3,0 %) et en oxygène (47,34 + 3,5 %) sont conformes, celle en hydrogène est légèrement inférieure (3,65 + 0,5 %) tandis que celle en soufre apparaît nettement supérieure (3,75 + 1,0 %), se rapprochant de la valeur publiée par MALCOLM et Mc CARTHY (1986). On observe la présence de fer (0,08 + 0,02 %), que l'on peut rapprocher du modèle humique de KLEINHEMPEL (1970) engageant cet élément dans des sites de complexation.

Le rapport des teneurs O/C de 1,041 + 0,1 % fournit un argument supplémentaire en faveur d'une modélisation des acides fulviques. En effet, bien que MALCOM et Mc CARTHY (1986) ne donnent que 0,655, WEBER et WILSON (1977), FRIMMEL et GEYWITCH (1983) l'établissent entre 1 et 1,1.

La teneur en soufre, qui est en général très variable suivant les origines des substances humiques, le moment et le mode de leur extraction, n'est jamais retenue comme critère fiable de leur classification. Cependant, BLONDEAU (1986) et KALINOWSKI (1987), en fractionnant des substances humiques et en les soumettant à l'analyse élémentaire, ont toujours retrouvé des concentrations en soufre plus élevées dans les fractions fulviques que dans les fractions humiques. Sans présumer du rôle joué par le soufre dans l'édification de ces matériaux, il est à penser que cet élément doit constituer un traceur dans la chronologie des étapes d'élaboration.

2.2- Détermination de la taille moléculaire

Par ultrafiltration, différentes tailles moléculaires des fractions du MHG sont obtenues. Leurs proportions en masse sont présentées dans le tableau IV_{II} qui montre l'importance considérable de molécules relativement petites comprises dans la structure macromoléculaire du MHG (44,9%).

Le calcul de la taille moléculaire moyenne, effectué en tenant

Elément chimique	WEBER and WILSON (1977)		FRIMMEL and GEYWITCH (1983)		MALCOLM and Mc CARTHY (1986)		MHG
	AH	AF	AH	AF	AH	AF	
	C %	57,0 \pm 4,0	46,0 \pm 5,0	50-60	40-50	54,99	
H %	4,4 \pm 1,0	4,0 \pm 0,4	4-6	4-6	4,84	5,24	3,65 \pm 0,5
O %	37,1 \pm 5,2	48,6 \pm 4,5	30-35	44-50	33,64	36,08	47,34 \pm 3,5
N %	2,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3	4-6	1-3	2,24	1,42	-
S %	-	-	0-2	0-2	1,51	2	3,75 \pm 1,0
P %	-	-	-	-	0,06	0,34	-
Fe %	-	-	-	-	-	-	0,08 \pm 0,02
O/C	0,65	1,06	0,58 - 0,60	1,00 - 1,10	0,61	0,65	1,04 \pm 0,1

Tableau IV_I : Composition élémentaire du MHG et de substances humiques aquatiques naturelles

Taille moléculaire (TM) des fractions du MHG	Masse des fractions (mg)	Pourcentage massique
TM > 3.10 ⁵	0	0
3.10 ⁵ > TM > 5.10 ⁴	0	0
5.10 ⁴ > TM > 5.10 ³	49,9	17,8
5.10 ³ > TM > 10 ³	35,6	12,7
10 ³ > TM > 500	68,9	24,6
500 > TM	126,1	44,9
total	280,5	100

Tableau IV_{II} : Répartition des masses et proportions respectives des fractions d'ultrafiltration du MHG



compte des pourcentages respectifs de chacune des fractions, conduit à une valeur très proche de $5 \cdot 10^3$, du même ordre de grandeur que celle des acides fulviques naturels du milieu aquatique (Cf 4.2.2 , chapitre I).

2.3- Etude par spectrophotométrie UV (figure IV₁)

Le spectre d'absorption UV de l'acide gentisique en solution dans le MMS présente trois bandes d'absorption ayant des maxima à 206nm, 225nm et 320nm, attribuables respectivement aux transitions:

- $\pi \longrightarrow \pi^*$, n $\longrightarrow \sigma^*$ du noyau aromatique et des divers groupements hydroxyle

- $\pi \longrightarrow \pi^*$ du noyau aromatique

- $\pi \longrightarrow \pi^*$, n $\longrightarrow \pi^*$ du noyau aromatique et surtout du groupement carboxylique conjugué.

Pour le MHG, un maximum situé à 206nm (transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$, n $\longrightarrow \sigma^*$) et une épaulement à 320nm (transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$, n $\longrightarrow \pi^*$) sont observés sur un continuum d'absorption qui décroît au fur et à mesure que la longueur d'onde augmente.

C'est l'aspect général des spectres UV des substances humiques, traduisant ainsi comme les études précédemment effectuées l'ont établi, à l'existence d'une multitude de chromophores qui rend indiscernable leurs absorptions spécifiques.

De plus, on peut noter d'une part, que l'absorption à 206nm de l'acide gentisique persiste dans le spectre du MHG, et d'autre part, que les groupements carboxyliques conjugués au cycle aromatique absorbant à 320nm doivent se retrouver dans la structure du MHG. Ces résultats montrent l'un des intérêts du MHG sur le plan structural, dû à sa structure polycondensée et à la persistance de certains éléments structuraux de l'acide gentisique.

2.4- Etude par pHmétrie

Comme précédemment, l'étude pHmétrique est réalisée à partir d'une solution de $100\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ en MHG dissous dans la soude 0,1N. Le dosage est effectué par de l'acide chlorhydrique 0,5N. Deux points d'inflexion sont observés (figure IV₂) indiquant l'existence de deux types de groupements fonctionnels correspondants à $\text{pK}_{a1} = 4,5$, attribuable aux groupements de type carboxylate, et à $\text{pK}_{a2} = 9,5$, attribuable aux

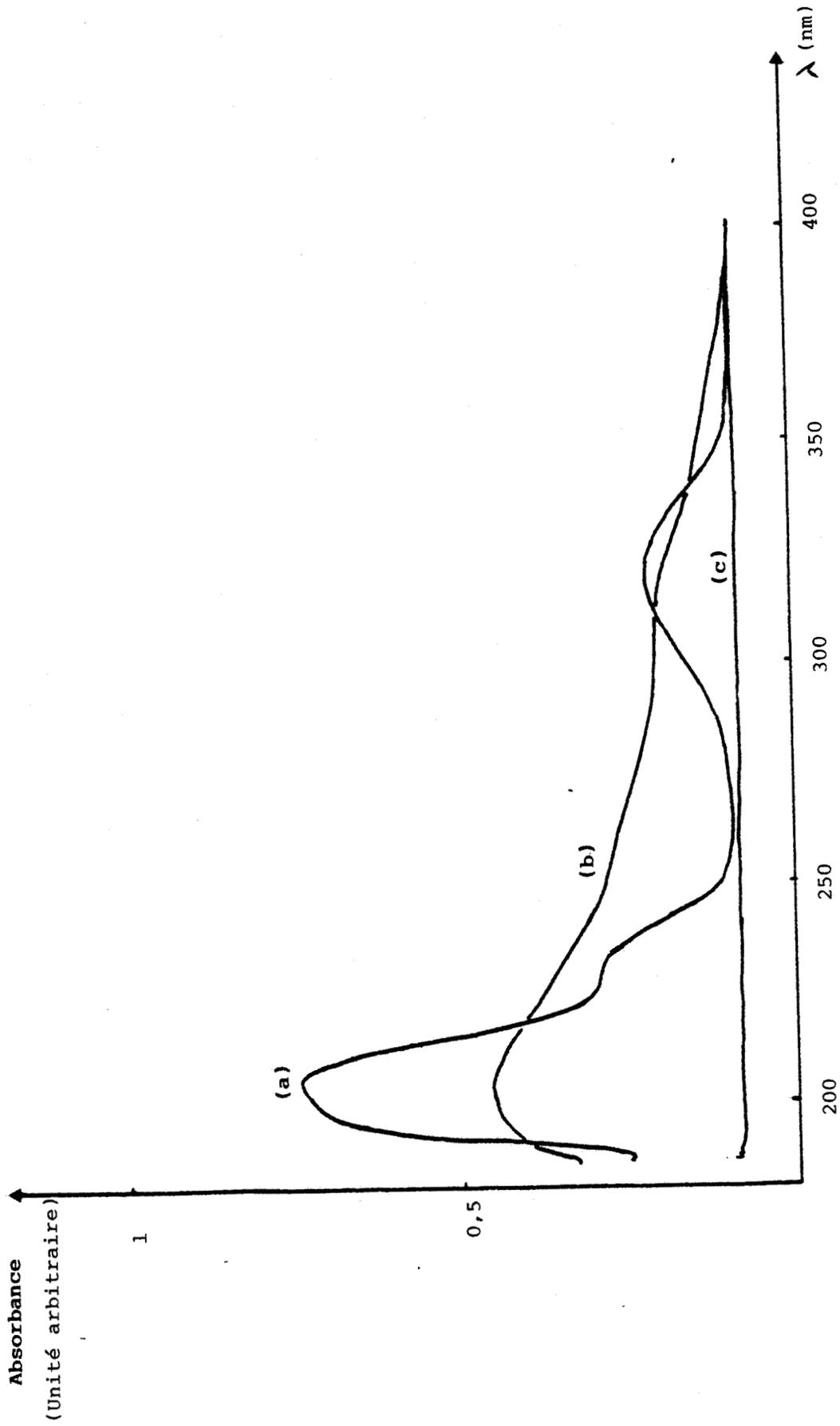


Figure IV₁ : Spectres d'absorption UV de l'acide gentisique ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ - a), du MHG ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ - b) et du MMS (c)



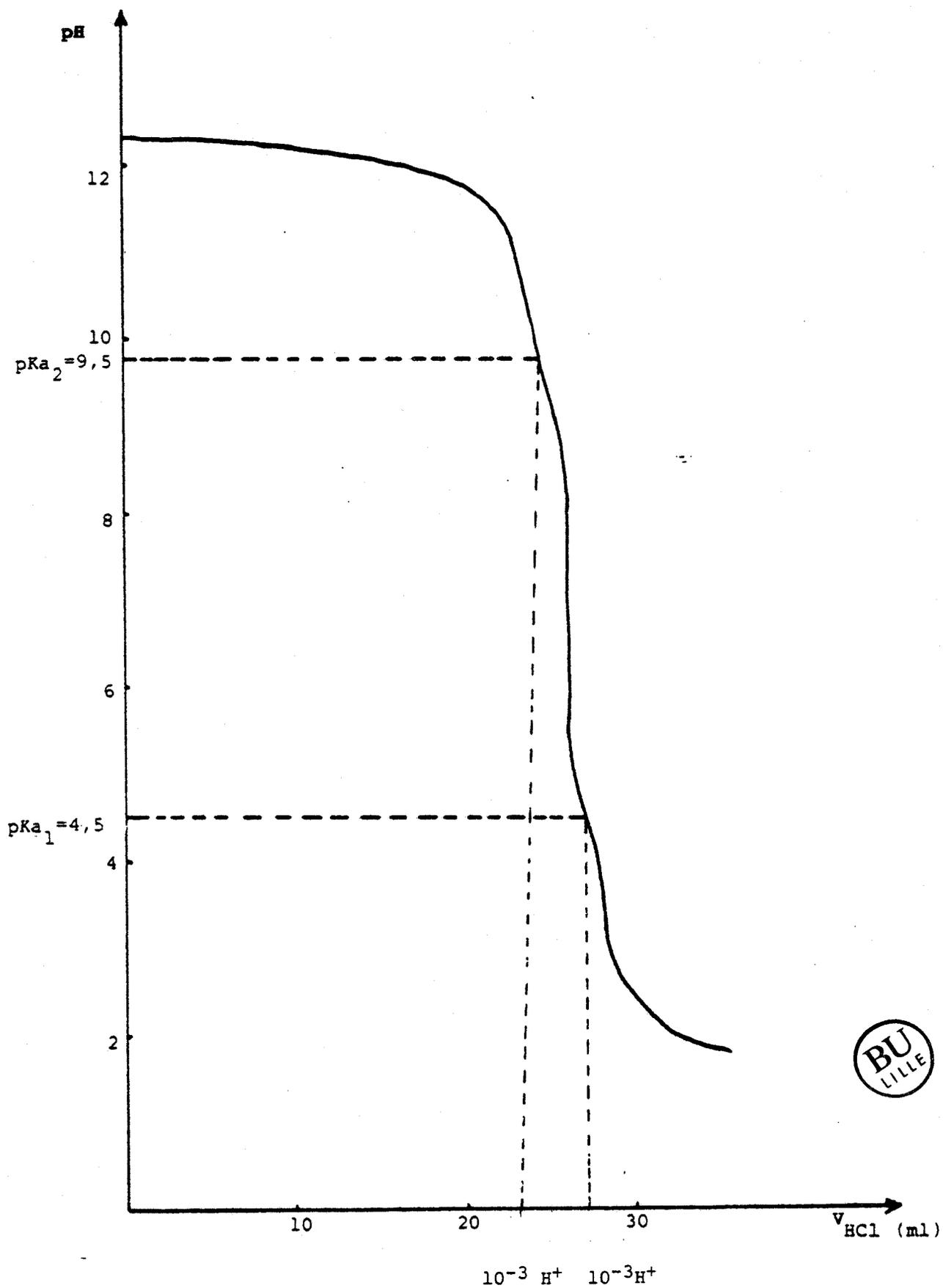


Figure IV₂ : Courbe de dosage pHmétrique du MHG (100 mg.l⁻¹) dissous dans la soude (0,1 N)

groupements de type phénate du MHG. Les fonctions carboxyliques présentent un caractère moins acide que celles mesurées pour l'AHF et sont dans la gamme de valeurs publiées par DAVIS et MOTT (1981) soit, $3,7 < pK_{a1} < 7$. Les fonctions phénol plus acides que celles de l'AHF présentent cependant une valeur de pKa située dans la gamme $9,4 < pK_{a2} < 9,7$ présentée par BORGGAARD (1974). Comme pour l'AHF, la proportion phénate/carboxylate est proche de l'unité.

2.5- Etude par spectrométrie infra-rouge

Les spectres d'absorption infra-rouge du MHG et de l'acide gentisique sont présentés dans la figure IV₃. Le tableau IV_{III} regroupe les fréquences d'absorption et les différentes attributions relatives aux divers groupements fonctionnels caractéristiques de ces deux composés. La différence fondamentale qui existe entre l'acide gentisique et le MHG est exprimée au travers de leur spectre infra-rouge:

- d'une part, par la faible résolution des bandes d'absorption du MHG. Ceci montre que le produit formé après oxydation de l'acide gentisique est de nature macromoléculaire

- d'autre part, le MHG ne présente plus que trois régions d'absorption infra-rouge contre cinq pour l'acide gentisique.

Région 3800cm⁻¹ - 2200cm⁻¹

Cette région est dominée par une absorption très large présentant des maxima à:

- 3420cm⁻¹ attribuable aux groupements carboxyliques avec un épaulement à 3280cm⁻¹ dû aux hydroxyle de type phénol ou alcool. L'élargissement de cette bande jusqu'à 3800cm⁻¹ tend à prouver l'existence de liaisons hydrogène dans les structures polymères (BAILLY, 1974)

- 2920cm⁻¹ et 2850cm⁻¹, attribuables aux vibrations d'élongation de valence ν C-H de groupements méthyle et méthylène. Ceci laisse supposer une ouverture de cycle aromatique pendant l'oxydation de l'acide gentisique. Les vibrations d'élongation de valence ν C-H aromatique qui absorbent généralement vers 3000cm⁻¹ doivent participer à l'élargissement vers les basses fréquences, de la bande relative aux vibrations O-H.

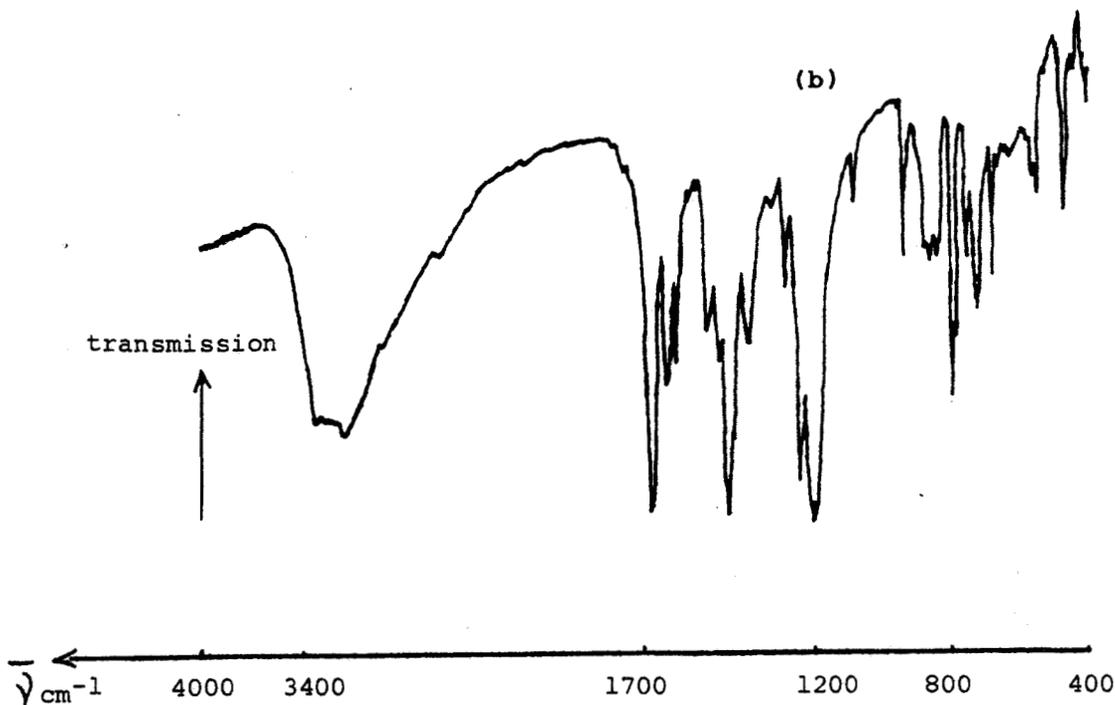
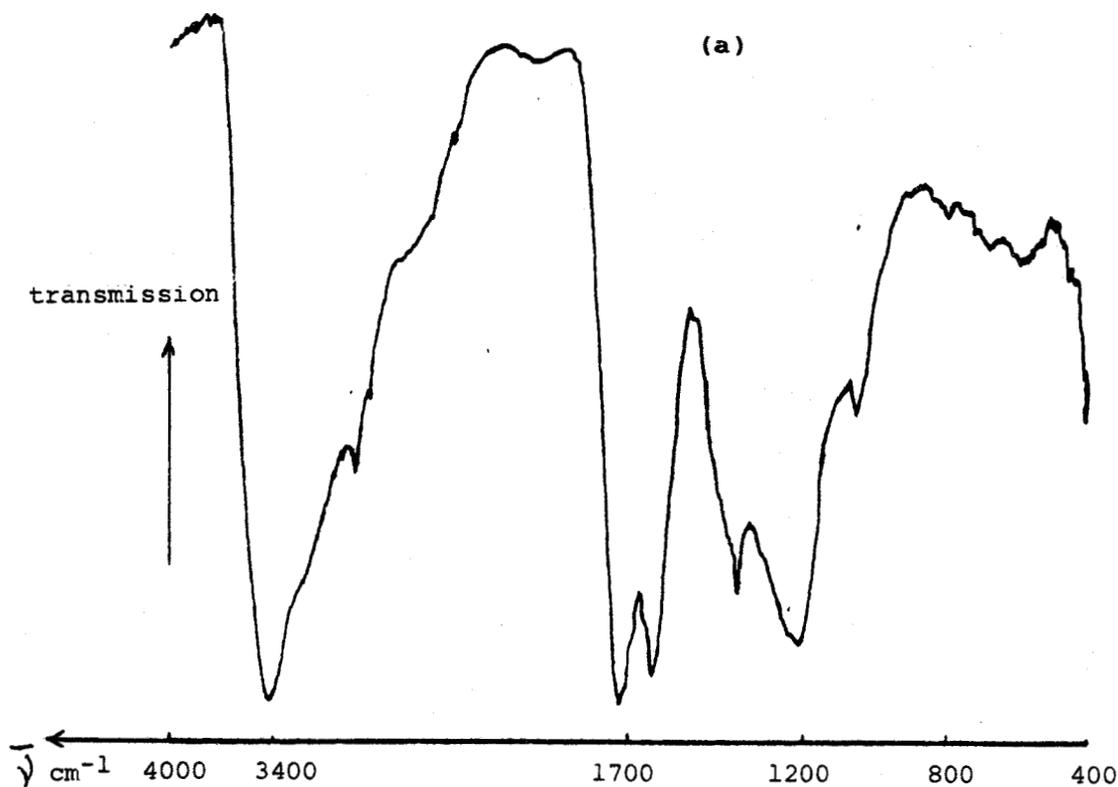


Figure IV₃ : Spectres d'absorption infra-rouge du MHG (a) et de l'acide gentisique (b)
Nombre d'accumulations: 64
Résolution: 4cm⁻¹

ACIDE GENTISIQUE		M H G	
Fréquences (cm ⁻¹) et intensité des raies	Attributions	Fréquences (cm ⁻¹) et intensité des raies	Attributions
3 320 ml 3 130 ml	} ν OH carboxyle phénol	3 420 F.1.	} ν OH carboxyle, phénol alcool
2 920 épaulement		3 280 épaulement	
1 676 F 1 628 m 1 620 m 1 600 m 1 500 m 1 472 épaulement 1 440 F	} ν CH aromatique	3 000-2 920 épaulement 2 850 épaulement	} ν CH aromatique, méthyle, méthylène aliphatique
1 388 m 1 320 t f 1 280 m 1 240 F 1 204		} ν C = O	
1 192 F 1 076 f	} ν C=C du noyau aromatique		1 620
938 m 876 m 860 m 840 m		} ν C-O phénol ou carboxyle	1 380 m.1
800 m	} δ OH phénol, carboxyle		1 220 F.1
790 760 728		} δ CH aromatique dans le plan	1 040 m
680 554 464	} δ CH aromatique hors du plan		840-500 f.1
		} δ cycle aromatique dans le plan	
	} δ cycle aromatique hors du plan		

Tableau IV_{III} : Fréquences de vibrations infra-rouge et attributions proposées pour l'acide gentisique et le MHG

Vibration d'élongation de valence (ν), de déformation dans le plan (δ), hors du plan (γ). Intensité forte (F), faible (f), très faible (tf), moyenne (m) - large bande (l)



Région 1900cm⁻¹ - 1500cm⁻¹

Cette région présente deux maxima d'absorption à :

- 1720cm⁻¹, attribuable aux vibrations d'élongation de valence des groupements C=O de type carboxyle ou carbonyle
- 1620cm⁻¹, relatif aux vibrations d'élongation de valence des atomes de carbone du noyau aromatique.

Ces raies relativement larges, pointent à des maxima déjà rencontrés dans le spectre de l'acide gentisique. Ce qui est intéressant dans cette région, c'est l'augmentation du rapport d'intensité des raies 1620cm⁻¹/1720cm⁻¹. Ceci laisse suggérer que l'oxydation de l'acide gentisique entraîne une augmentation des noyaux aromatiques, donc une polycondensation. De plus, le net élargissement de la raie 1720cm⁻¹ par rapport à celle observée pour l'acide gentisique, tend à prouver une augmentation des types de groupements carboxyliques ou esters et certainement l'apparition de groupements carbonyle. Cette augmentation peut être reliée à une ouverture des cycles aromatiques et également à une polycondensation de l'acide gentisique. L'augmentation des groupements carbonyle peut s'expliquer par la formation de dérivés cétoniques, aldéhydiques ou quinoniques qui absorbent entre 1620 et 1720cm⁻¹.

Région 1500cm⁻¹ - 900cm⁻¹

Une large bande domine cette région en présentant des maxima à :

- 1380cm⁻¹ dissymétrique, attribuable aux vibrations d'élongation de valence ν C-O de type alcool tertiaire, phénol ou carboxyle
- 1220cm⁻¹ relatif aux vibrations de déformation de valence δ OH de type alcool, phénol, carboxyle ou ester
- 1040cm⁻¹, attribuable aux vibrations de déformation des C-H de type aromatique ou alcool primaire.

L'enveloppe observée vers 1220cm⁻¹ peut également contenir les absorptions relatives à des groupements de type sulfate covalent RO--SO₂--OR, permettant de prendre en compte les résultats de l'analyse élémentaire, et surtout pouvant donner lieu à une raie à 1380cm⁻¹ compatible avec la nette dissymétrie observée dans cette région d'absorption.

Remarquons que les modes de vibrations de cycles substitués donnent une faible absorption s'étalant de 840cm^{-1} à 500cm^{-1} .

2.6- Etude par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H) et du carbone-13 (RMN ¹³C)

2.6.1- Résultats obtenus par RMN ¹H

2.6.1.1- En solution dans l'eau deutériée (D₂O)

Sur la figure IV₄ sont présentés les spectres RMN ¹H des solutions d'acide gentisique (20mg.ml^{-1}), du BHT (20mg.ml^{-1}) et du MHG (60mg.ml^{-1}) dissous dans (D₂O). Tous les enregistrements sont effectués de 0 à 9ppm, aucun composé n'ayant présenté d'absorption au-delà. Les glissements chimiques sont exprimés par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

Si le spectre du BHT (figure IV_{4a}) présente trois pics de glissement chimique à 7,14ppm, 2,43ppm et 1,61ppm attribuables respectivement aux protons de type aromatique, méthyle et tertio-butyle portés par le cycle aromatique, celui de l'acide gentisique (figure IV₄) présente des pics rassemblés entre 7,76ppm et 7,26ppm relatifs aux protons aromatiques.

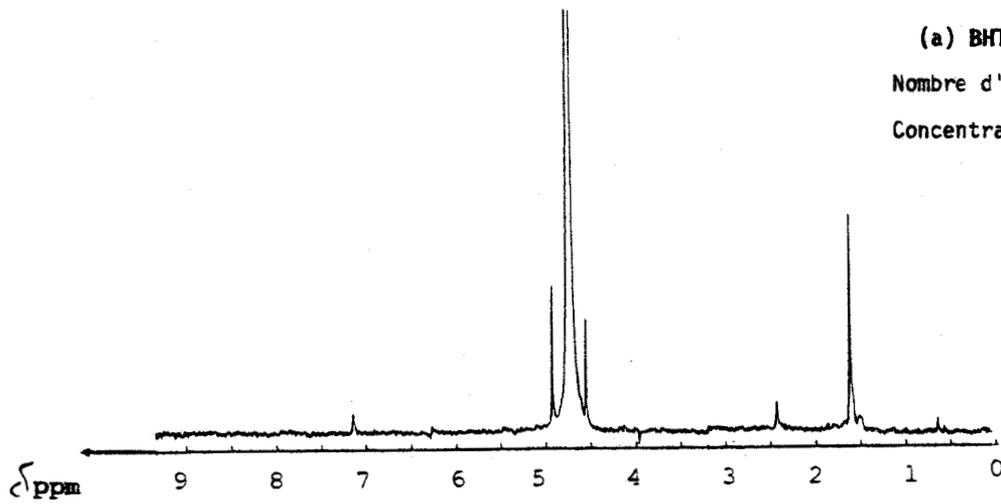
Le MHG qui présente un effet paramagnétique relativement important rendant difficile l'acquisition des données, conduit à un spectre (figure IV_{4c}) de faible résolution, constitué de trois régions de forte absorption et une plus faible. Une proposition d'attribution et une tentative d'étude quantitative sont données (figure IV₆).

Région de 0 à 2ppm

On observe des pics situés à 0,71ppm attribuables à des groupements méthyle, à 1,11ppm et 1,94ppm attribuables à des protons aliphatiques des groupements méthylène liés à une structure éthylénique. La courbe d'intégration montre que ces protons sont dans des proportions respectives de 2/8/1.

La présence d'absorption dans cette région du spectre confirme la présence de protons aliphatiques déjà observés en spectrométrie

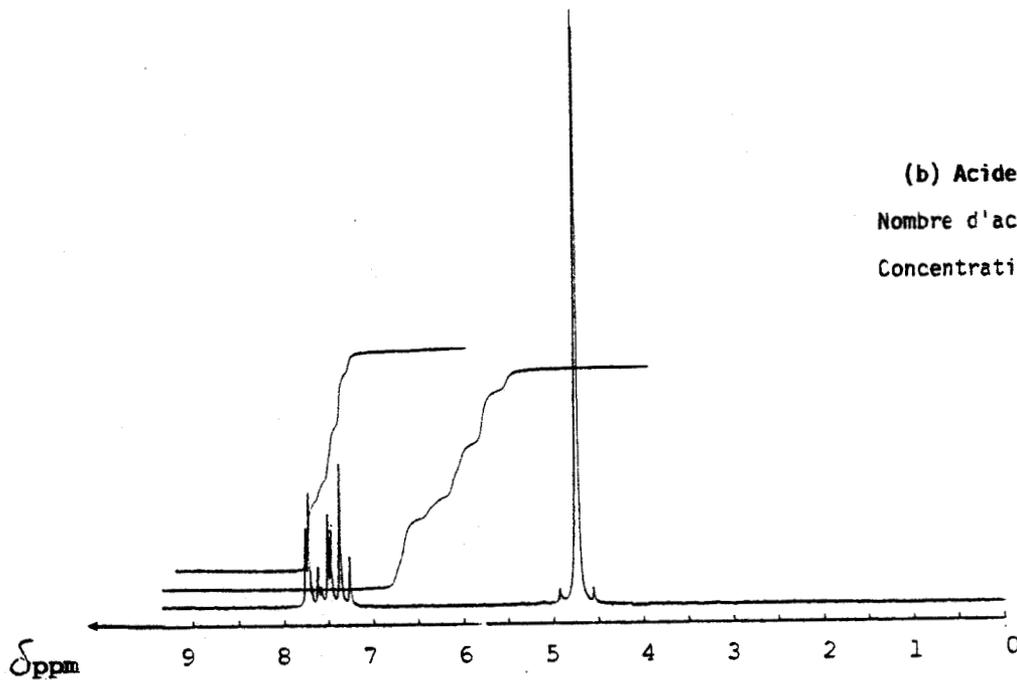
Figure IV₄ : Spectres RMN ¹H à 80MHz dans D₂O du:



(a) BHT

Nombre d'accumulations: 1

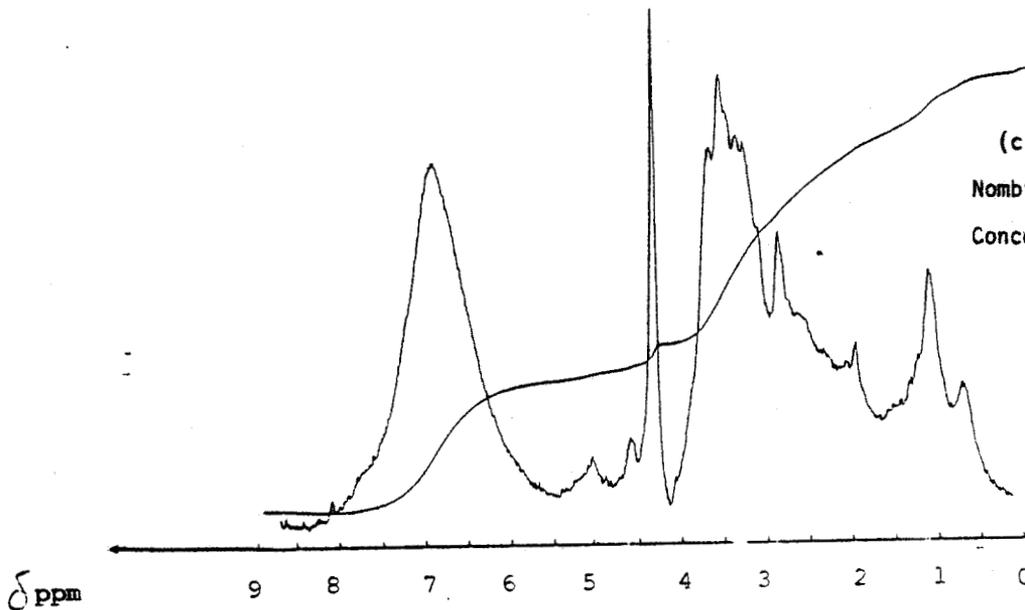
Concentration : 20mg.l⁻¹



(b) Acide gentisique

Nombre d'accumulations: 1

Concentration : 20mg.l⁻¹



(c) MHG

Nombre d'accumulations: 296

Concentration : 60mg.ml⁻¹



infra-rouge. Les pics d'absorption relatifs aux protons aliphatiques qui sont identiques à ceux présentés par les substances humiques naturelles (figure I₄ chapitre I) consolident la représentativité structurale du MHG.

Région de 2 à 4ppm

Cette région présente une intense et large absorption de faible résolution ayant des maxima à 2,86ppm, 3,27ppm, 3,35ppm, 3,54ppm et 3,75ppm. Une attribution globale peut cependant être réalisée pour cette région où sont généralement rencontrés les pics de résonance relatifs aux protons méthyle et méthylène liés à des hétéroatomes tel l'oxygène, à des groupements de type carbonyle, carboxyle ou à des noyaux aromatiques. Il existe dans la structure du MHG, 44,4% de ces types de protons par rapport à l'ensemble des protons détectés, soit plus du double des protons aliphatiques précédemment observés.

Région 4 à 6ppm

On observe deux absorptions ne correspondant qu'à 3,6% de l'ensemble, à 5,06ppm et à 4,59ppm attribuables respectivement à des protons éthyléniques conjugués ou non. La courbe d'intégration tend à montrer que les premiers sont en proportion double des seconds.

Région de 6 à 8ppm

Cette région est caractérisée par une intense et large absorption de très faible résolution et qui présente un maximum à 6,90ppm, attribuable à des groupements C-H de type aromatique. La courbe d'intégration montre que la proportion de ces protons par rapport à l'ensemble est d'environ 1/3. Cette gamme de glissement chimique (6 - 8ppm) est compatible avec les caractéristiques d'écran électronique présenté par les protons aromatiques de la structure gentisique (figure IV₄b).

Remarquons que dans le spectre du BHT, le pic le plus intense est dû aux dix huit protons de type tertibutyle. Son absorption à 1,61ppm n'est pas détectée de façon significative dans le spectre du MHG.

L'analyse des spectres réalisée dans D₂O fournit donc de précieux renseignements quant aux types structuraux rencontrés:

- elle montre la persistance de structure comparable à celle de l'acide gentisique

- de plus, elle met en évidence l'ouverture des cycles aromatiques par formation de groupements éthyléniques, conjugués ou non, de groupements aliphatiques essentiellement méthyléniques engagés ou non dans des liaisons avec soit l'oxygène, soit C=O (groupements carbonyle) et soit encore des cycles aromatiques. Cependant, afin de tenter de mettre en évidence d'autres groupements fonctionnels, nous avons procédé à l'enregistrement des spectres du MHG et de l'acide gentisique dans le diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO-d₆). Il n'a pas été procédé à l'enregistrement du spectre du BHT dans le DMSO-d₆ au vu des résultats précédents.

2.6.1.2- En solution dans le DMSO-d₆

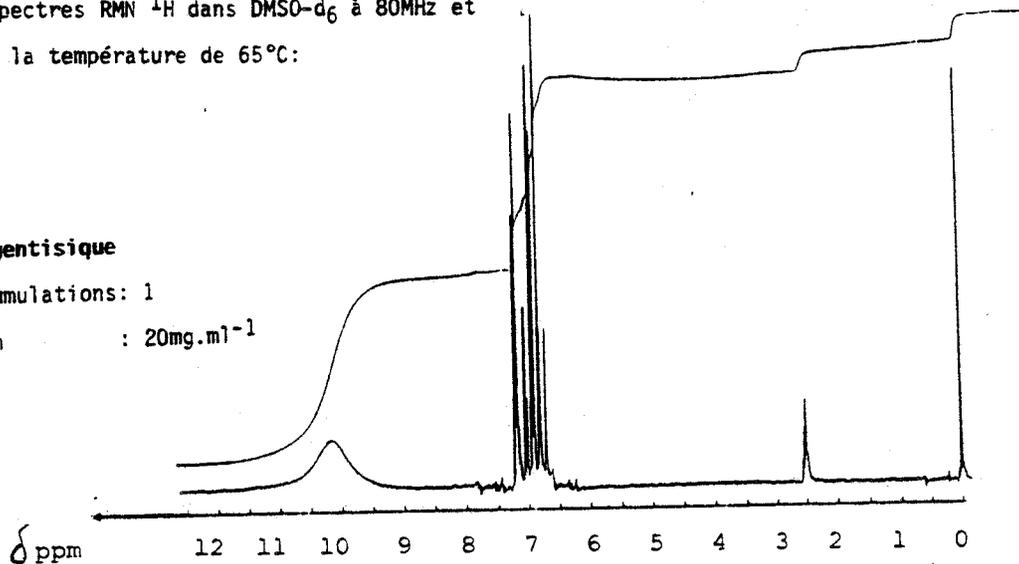
Le spectre de l'acide gentisique dissous dans le DMSO-d₆ (20mg.ml⁻¹) (figure IV_{5a}) présente en plus de l'absorption due aux CH aromatiques (région 6,6 - 7,3ppm), une raie large centrée sur 10,5ppm et attribuable aux protons phénoliques et carboxyliques. Le fait de n'observer qu'une seule résonance pour deux types de protons a déjà été observé chez deux isomères, l'acide protocatéchuïque (acide dihydroxy-3,4 benzoïque) et l'acide β-résorcylique (acide dihydroxy-2,4 benzoïque) (SADTLER, 1978). De plus cette attribution est confortée par le tracé de la courbe d'intégration qui donne une importance équivalente aux deux régions d'absorption.

Pour le MHG, un premier essai (figure IV_{5b}) a permis de détecter la présence des protons liés aux cycles aromatiques absorbant vers 7ppm, de groupements méthyle et méthylène absorbant aux environs de 1ppm, comme on peut le voir sur les expansions d'échelle. Un premier essai de quantification à l'aide de la courbe d'intégration a permis d'établir les proportions respectives suivantes 5/1/8.

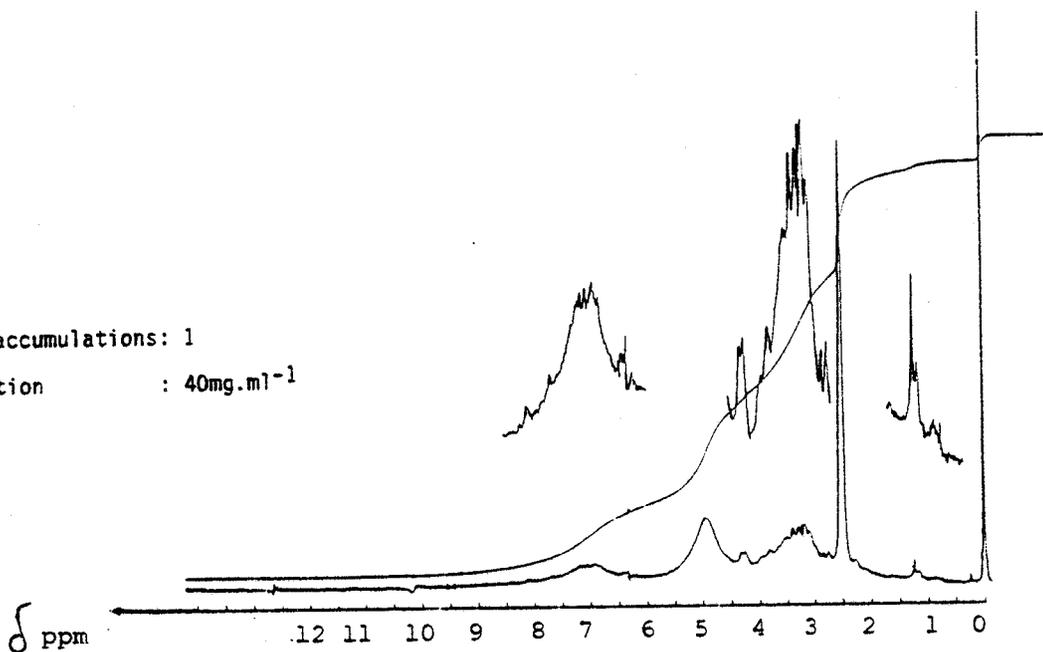
Mais, vu le faible rapport signal/bruit, une solution plus concentrée du MHG (100mg.ml⁻¹) a donné le spectre présenté sur la figure IV_{5c}. On retrouve les mêmes absorptions que précédemment. Un pic de forte absorption située à 4,5ppm correspondant à HOD, inexistant

Figure IV₅ : Spectres RMN ¹H dans DMSO-d₆ à 80MHz et à la température de 65°C:

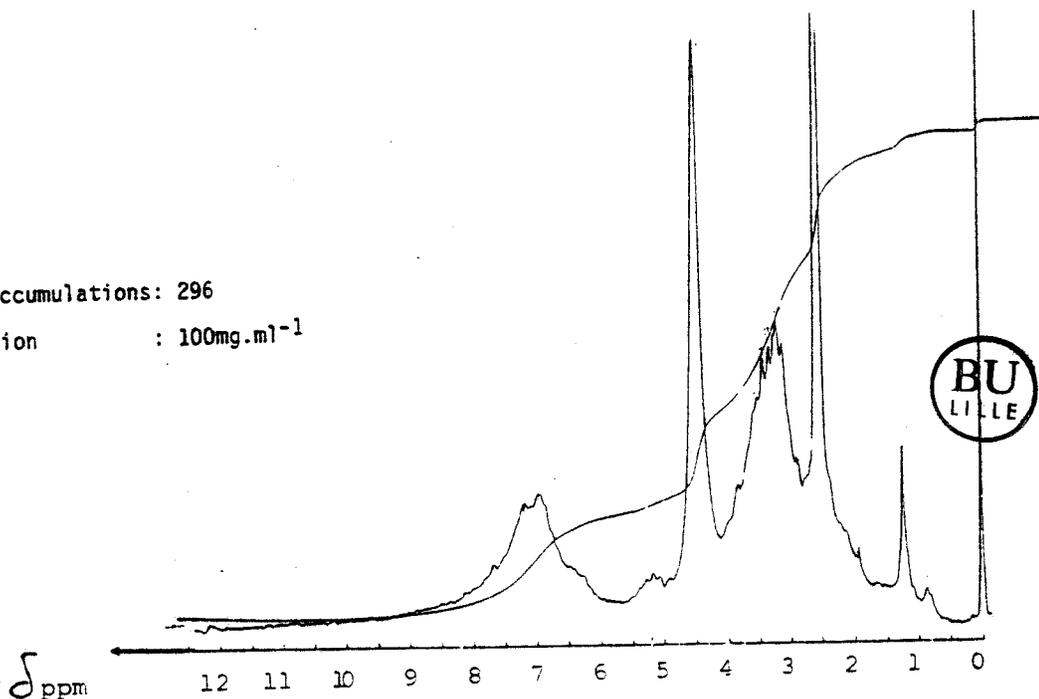
(a) Acide gentisique
Nombre d'accumulations: 1
Concentration : 20mg.ml⁻¹



(b) MHG
Nombre d'accumulations: 1
Concentration : 40mg.ml⁻¹



(c) MHG
Nombre d'accumulations: 296
Concentration : 100mg.ml⁻¹



dans le spectre de l'acide gentisique, montre que le MHG obtenu par lyophilisation contient cependant quelques traces d'eau. La largeur des pics observés confirme bien la nature polycondensée du MHG et la diversité des types structuraux.

Si l'on n'observe pas de protons de type carboxyle et hydroxyle qui apparaissent généralement dans la gamme de glissements chimiques supérieurs à 8ppm, l'absorption située entre 6,2 et 8ppm devient dissymétrique. L'étude quantitative (figure IV₆) montre qu'elle représente une proportion de 34,2% de l'ensemble des protons du MHG.

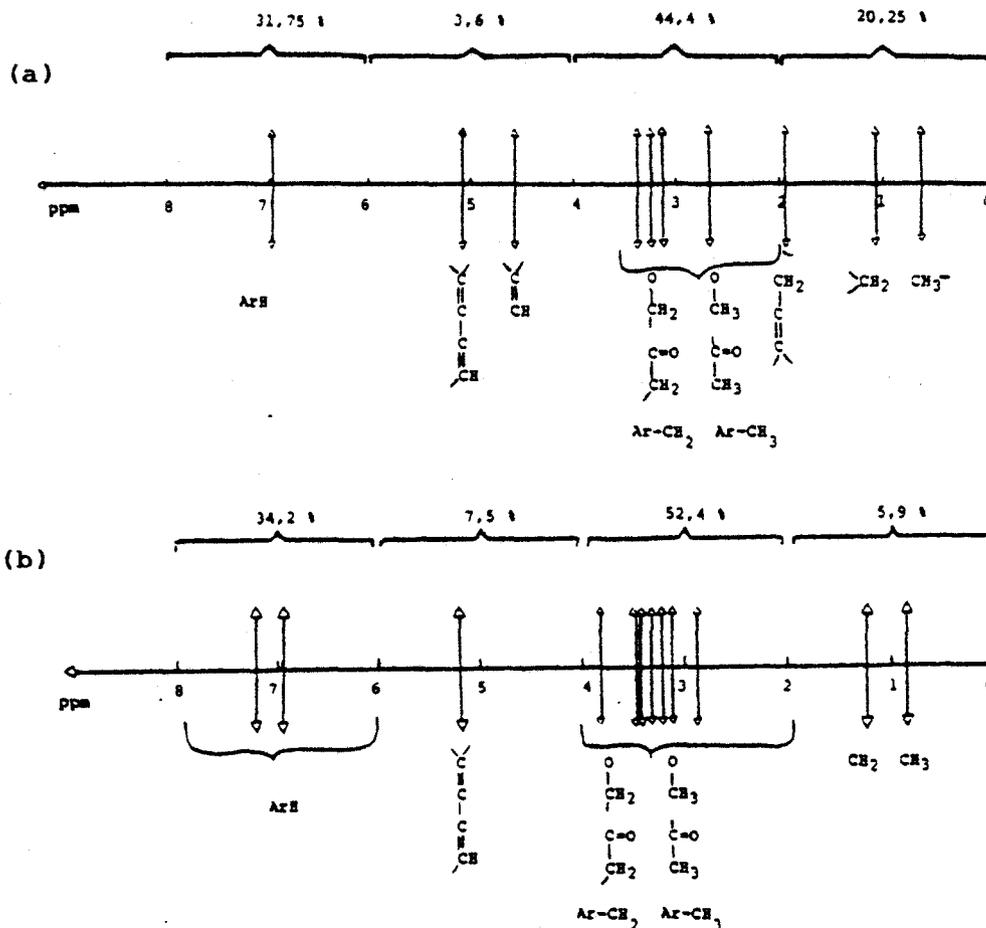
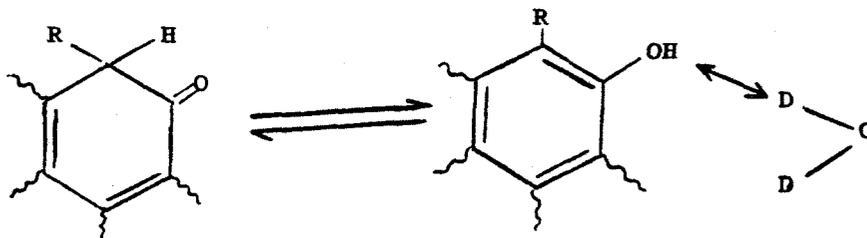


Figure IV₆ : Récapitulatif qualitatif et quantitatif des résultats de l'étude par RMN ¹H du MHG dissous dans D₂O (a) et DMSO-d₆ (b)

Le rapport entre les proportions de protons aromatiques (région 6-8ppm) et aliphatiques non échangeables (région 0-1,2ppm) est de 5,8 alors qu'il est de 1,6 pour le MHG dissous dans D₂O. Un échange céto-énolique entraînant l'absence de détection de certains protons en milieu D₂O pourrait expliquer la symétrie de la bande absorbant entre 6,2 et 8ppm. RUGGIERO et coll. (1980) ont observé cet échange protonique en étudiant par spectrométrie RMN ¹H les acides fulviques et humiques naturels. Ce résultat les a conduit à suggérer une structure cyclique assurant le tautomérisme céto-énolique dans la structure des substances humiques. Des

protons situés en d'une structure quinonique peuvent en effet expliquer cet échange:



Les valeurs des précédents rapports montrent que les protons échangeables de type quinonique participent pour 72,4% à l'absorption dans la région 6-8ppm.

La proportion relative à l'absorption des protons absorbant dans la région 2-4ppm, devient importante (52,4%) dans le DMSO-d₆ tandis qu'elle était de 44,4% dans le D₂O. Par rapport à la proportion due aux protons aliphatiques non échangeables obtenue dans chacun des milieux, on observe là encore une participation importante (75,4%) de l'absorption due aux protons échangeables.

Ce caractère échangeable est encore plus marqué pour la région 4-6ppm où, sans prendre en compte le pic dû à HOD, les rapports d'intensité relatifs aux groupements -CH₂- et CH₃- aliphatiques non échangeables sont sept fois plus importants dans le DMSO-d₆ que dans le D₂O.

Enfin, des fonctions phénoliques et carboxyliques ne sont pas détectées mêmes après 296 accumulations.

2.6.2- Résultats obtenus par RMN ¹³C

Le spectre RMN ¹³C du MHG dissous dans l'hydroxyde de sodium deutérié 0,1N, est présenté sur la figure IV₇. Ce mode de dissolution a été choisi afin d'atteindre une solution de concentration de 160mg.ml⁻¹ compatible avec la faible abondance naturelle de l'isotope 13 du carbone, l'acquisition du spectre ayant nécessité 137400 accumulations.

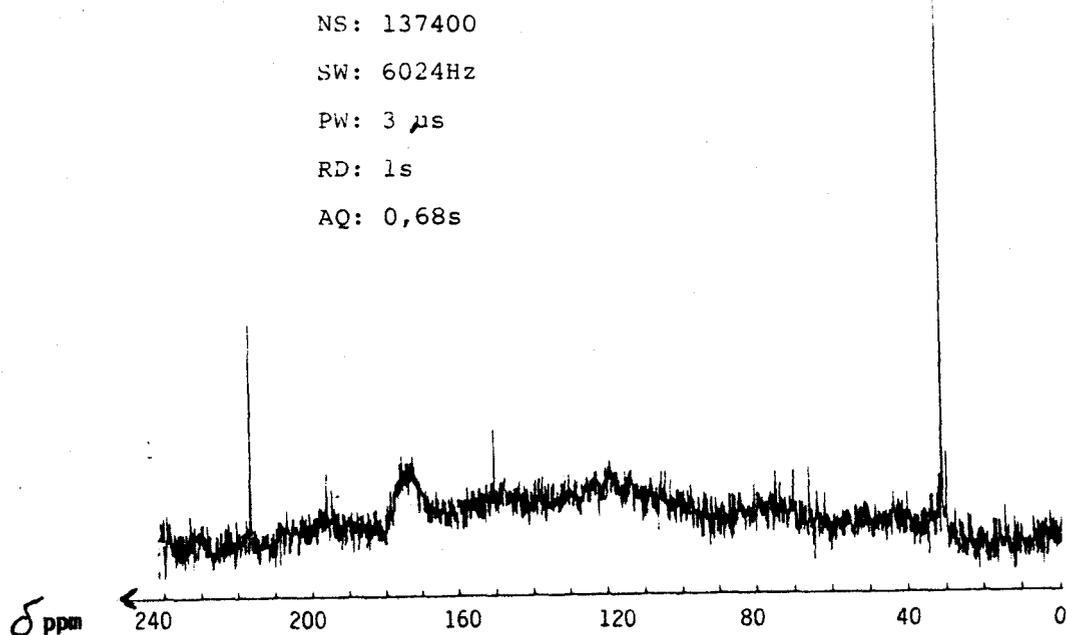


Figure IV₇ : Spectre RMN ¹³C du MHG (160mg.l⁻¹) en solution dans NaOD

Ce spectre est moyennement résolu et de faible intensité, ce qui rend difficile son exploitation complète comme l'ont déjà signalé RUGGIERO et coll., (1979) et DIXON et coll. (1981), lors de l'étude d'acides fulviques naturels.

Il peut cependant être observé des absorptions:

- 20-40ppm, présentant un pic intense à 31,18ppm caractéristique du carbone tertiosubstitué de type tertio-butyle. Ce qui prouve l'incorporation du BHT dans la structure du MHG

- 60-90ppm, ayant des pics à 66,14ppm, 70,16ppm et 74,98ppm attribuables aux groupements de type CH₂-O ou -CH-O

- 100-140ppm, avec un maximum à 120ppm, attribuable aux atomes de carbone de cycle aromatique

- 140-160ppm, avec un pic à 150,38ppm attribuable aux groupements de type phénoxy

- 160-220ppm, avec un maximum à 172ppm attribuable aux groupements de type carboxylique, et des pics à 194,42ppm, 195,85ppm et 216,36ppm attribuables aux groupements de type carbonyle conjugués ou non. De plus, la finesse de ces derniers pics tend à prouver qu'il s'agit de groupements dotés d'une certaine flexibilité.

Si en première approximation, on considère les relaxations des noyaux comme proches et étant données les conditions d'acquisition, on peut admettre que d'une part, l'absorption due aux atomes de carbone aromatique

(120ppm) est d'intensité proche de celle des atomes de carbone aliphatique, et d'autre part, que la proportion relative aux atomes de carbone de type carboxyle (172ppm) est importante. Ceci tend à conforter l'idée d'une importante ouverture de cycle aromatique lors de l'oxydation de l'acide gentisique.

Les résultats des études RMN nous montrent l'existence dans la structure du MHG d'une part, de groupements fonctionnels déjà observés dans la structure de l'acide gentisique et d'autre part, des atomes d'hydrogène et de carbone aliphatiques. Le MHG est donc proche de la structure des acides fulviques aquatiques. En effet si nous considérons:

- les rapports entre atome de carbone et hydrogène au vu des résultats de l'analyse élémentaire, soit 3,8 atomes de carbone pour 3,65 atomes d'hydrogène

- l'existence de structure $-CH_2-$, CH_3- les cycles aromatiques ne peuvent porter en moyenne qu'un proton. La polysubstitution, déjà suggérée par les résultats de spectrophotométrie UV et de spectrométrie IR, est ainsi confirmée.

Les groupements carboxyliques mis en évidence en proportion importante ne donnaient pas de résonance observable en RMN 1H . Ceci doit pouvoir s'expliquer par l'existence possible de groupements ester, que l'on peut rapprocher des $-C-O$ détectés en RMN ^{13}C et la formation de complexes de fer dont la présence est révélée par l'analyse élémentaire.

L'intégration du BHT dans la structure du MHG tend à prouver que la synthèse du modèle doit procéder au moins en partie, selon un mécanisme radicalaire.

2.7- Etude par RPE

Afin de préciser le paramagnétisme du MHG, son spectre RPE est enregistré à l'état de poudre (figure IV_g)

Il présente deux absorptions, ce qui révèle l'existence de deux types de radicaux avec des facteurs g respectifs 2,0041 et 2,0048. La difficulté d'obtenir un spectre mieux résolu rend délicate une investigation structurale approfondie. Cependant, la largeur de raie pic à pic est de 6 gauss, comparable à celle mesurée pour l'AHF. Le facteur g relativement plus grand que celui de ce dernier (2,0036), est cependant de même ordre de grandeur que celui des substances humiques naturelles (g=2,0037 à g=2,0041) (NISSENBAUM et KAPLAN, 1972) et des produits semi-quinoniques (g=2,0040) (MÜLLER et coll., 1959).

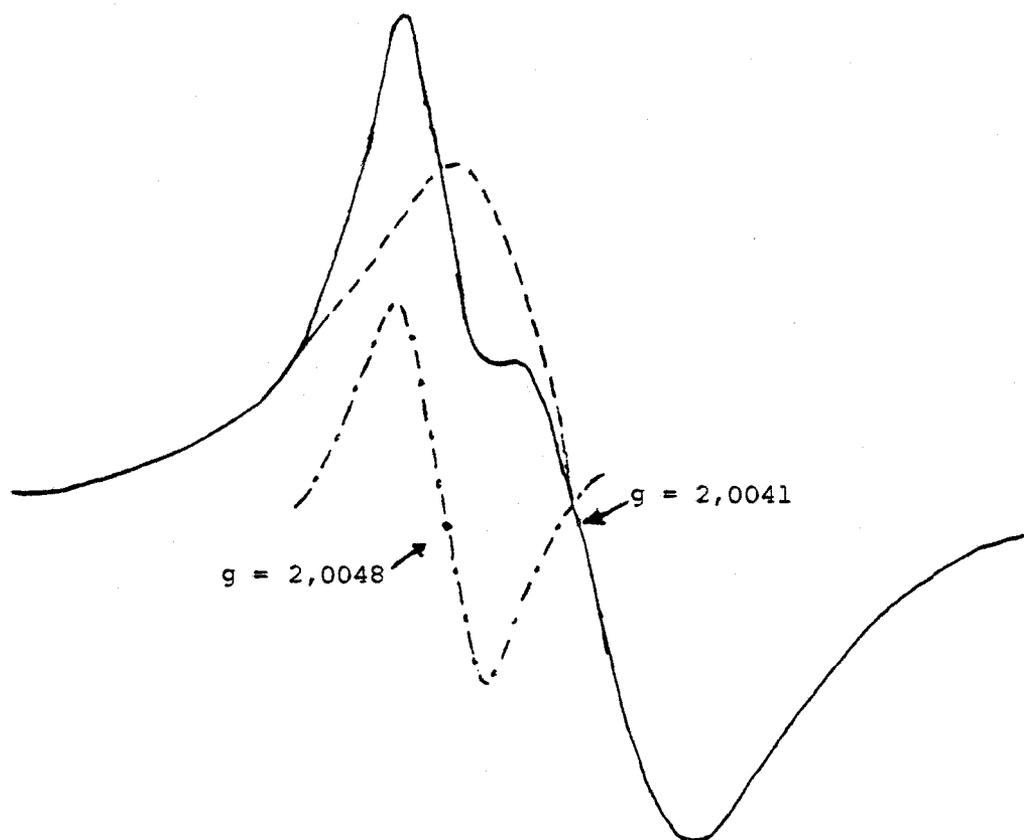


Figure IV₈ : Spectre RPE du MHG à l'état de poudre

Le suivi cinétique de l'intensité du signal RPE du MHG (figure IV₉) montre une diminution de son caractère paramagnétique. En effet, son intensité n'est que de 32,5 % de la valeur initiale au bout de deux mois, puis atteint un palier. Ceci est certainement à rapprocher des propriétés de réarrangement structural par un processus radicalaire, réarrangement qui doit certainement se produire dans les matériaux humiques en milieu naturel.

Une proposition de schéma structural regroupant les principales caractéristiques est présentée figure IV₁₀.

3- PROPOSITION DE L'ETAPE INITIALE DU MECANISME DE SYNTHESE

La réaction d'oxydation d'un dérivé phénolique par un peroxyde alcalin de type persulfate, catalysée par les ions ferreux en milieu basique, est reconnue généralement sous le nom de réaction d'oxydation de ELBS, l'ensemble ion ferreux/persulfate constituant le réactif oxydant de ELBS. Les résultats rencontrés dans la littérature relatifs à cette oxydation, montrent que cette dernière s'effectue par l'intermédiaire du radical ion sulfate ($\dot{O}SO_3^-$) et du radical hydroxyle ($\dot{O}H$). Ces deux

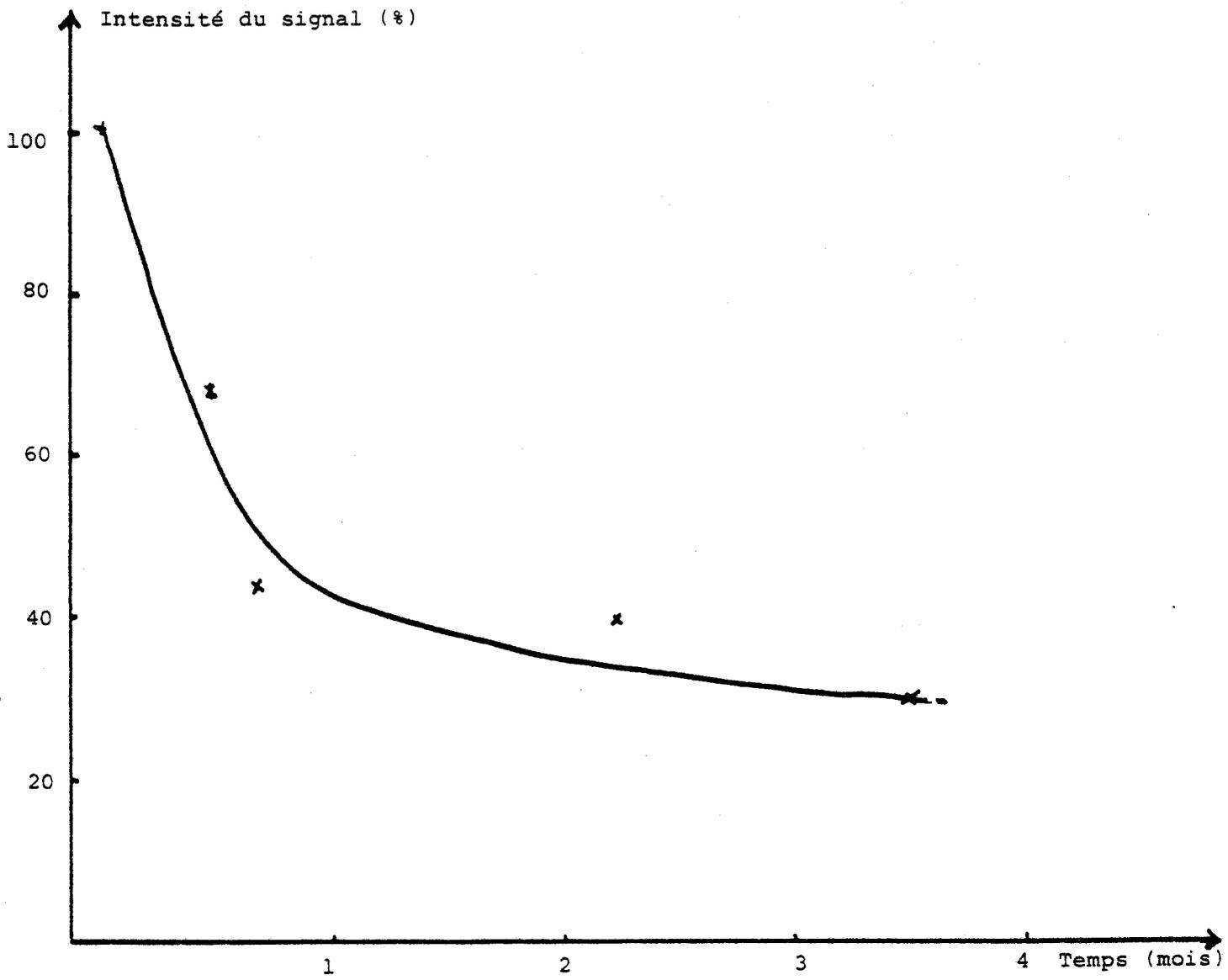


Figure IV₉ : Evolution de l'intensité du signal RPE du MHG au cours du temps



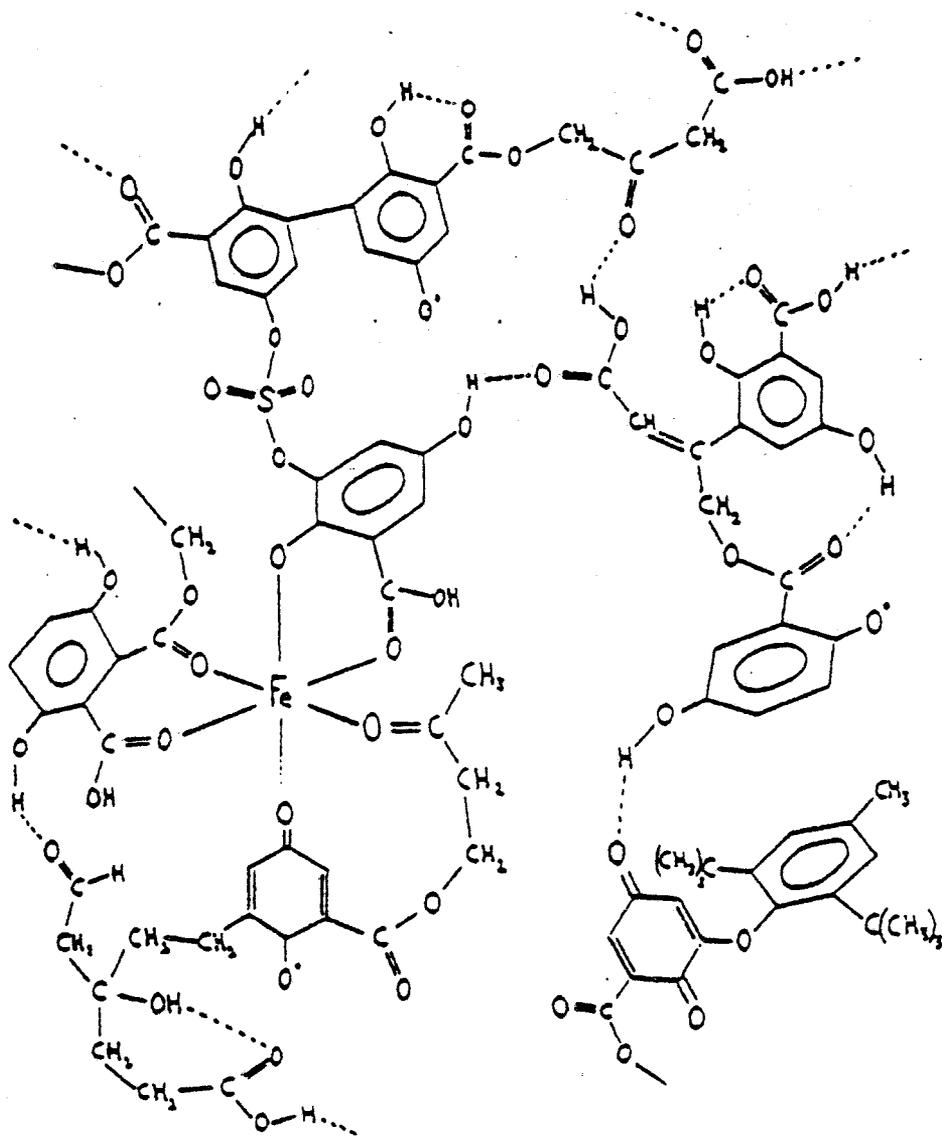


Figure IV₁₀ : Schéma structural proposé pour le MHG

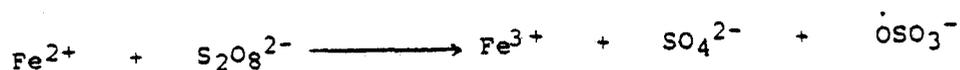


radicaux attaquent les dérivés phénoliques par deux mécanismes différents.

Dans ce travail, nous appliquerons l'oxydation par le réactif de ELBS à l'acide gentisique en proposant un mécanisme basé sur la formation des composés les probables.

3.1- Formation du radical ion sulfate (OSO⁻₃) et mécanismes d'attaque de composés organiques

En 1948, BAKER et BROWN ont étudié l'oxydation du phénol par le persulfate et ont suggéré que cette réaction est rendue possible par la formation d'un ion radical sulfate obtenu suivant l'équation:

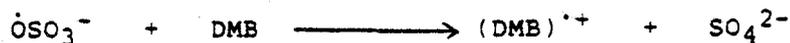
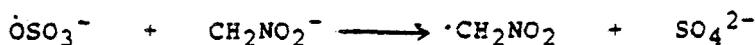


Ces auteurs postulent que l'ion radical sulfate réagit directement par fixation sur le cycle aromatique en substituant un proton situé en ortho ou en para du phénol (avec une préférence pour cette dernière position, si elle est libre), pour donner un dérivé intermédiaire hydroxyphenylsulfate. Ce dernier peut ensuite conduire à la formation de la molécule d'hydroquinone ou de catéchol.

Ce mécanisme n'est acceptable que si l'on reconnaît le caractère électrophile du radical ion sulfate.

L'attaque par fixation du radical ion sulfate sur le noyau aromatique a été confirmée par NORMAN et coll. (1970), GILBERT et coll. (1972). BENSON (1972), en effectuant une revue bibliographique sur l'oxydation des dérivés phénoliques par le réactif de ELBS, a montré que l'ion radical sulfate amorce des oxydations et polymérisations des composés organiques et la présence du soufre dans le produit final est confirmée par incorporation dans les chaînes polymères du soufre-35 émanant du persulfate marqué. Ceci confirme une fois de plus la fixation de l'ion radical sulfate sur le composé organique par oxydation au persulfate.

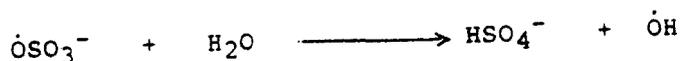
Si, précédemment, il a été montré que l'oxydation par le persulfate s'effectuait par la fixation de l'ion radical sulfate sur le composé organique, CHAWLA et FESSENDEN (1975), O'NEIL et coll., (1975), en étudiant respectivement les réactions d'oxydation du nitrométhane et des dérivés méthoxylés du benzène (DMB), ont montré que l'ion radical sulfate attaque ces composés organiques par simple transfert d'électron suivant:



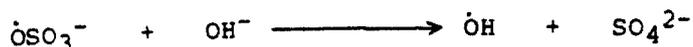
L'attaque du radical ion sulfate procède donc soit par fixation, soit par simple transfert d'électron sur un composé organique.

3.2- Formation du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et mécanisme d'attaque de composés organiques

BAKER et BROWN (1948) ont supposé la formation du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) pendant l'oxydation au persulfate:

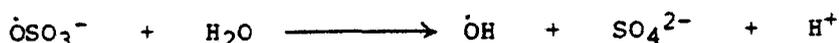


Cette possibilité a été confirmée par les études cinétiques effectuées par ZEMEL et FESSENDEN (1975) qui ont montré que, dans un milieu de $\text{pH} > 10$, le radical hydroxyle peut se former par conversion de l'ion radical sulfate selon l'équation:



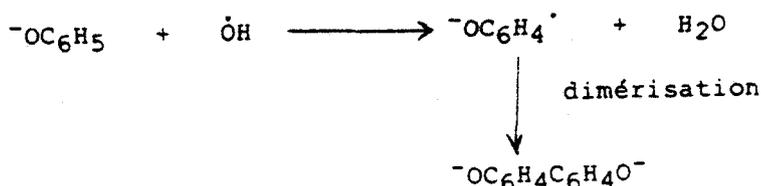
La constante de vitesse de cette réaction est de $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Aux valeurs de pH proches de la neutralité, cette conversion s'effectue selon:

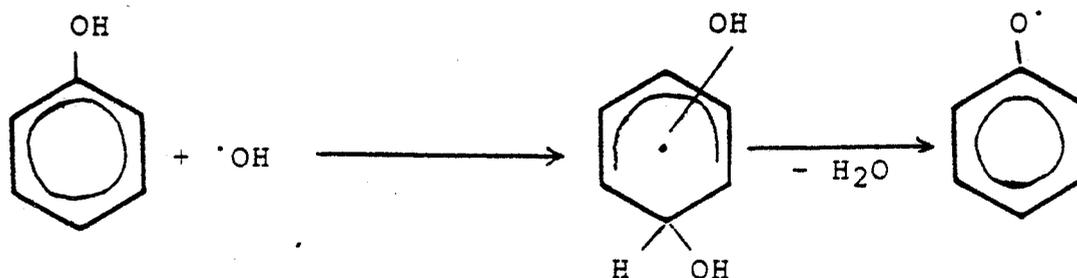


avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^3 - 10^4 \text{ s}^{-1}$. La formation de ces radicaux hydroxyle en solution basique ou neutre, a été confirmée par SRIVASTAVA et coll. (1981) par l'étude des cinétiques d'oxydation des alcools alicycliques par le persulfate, catalysée par l'ion argent.

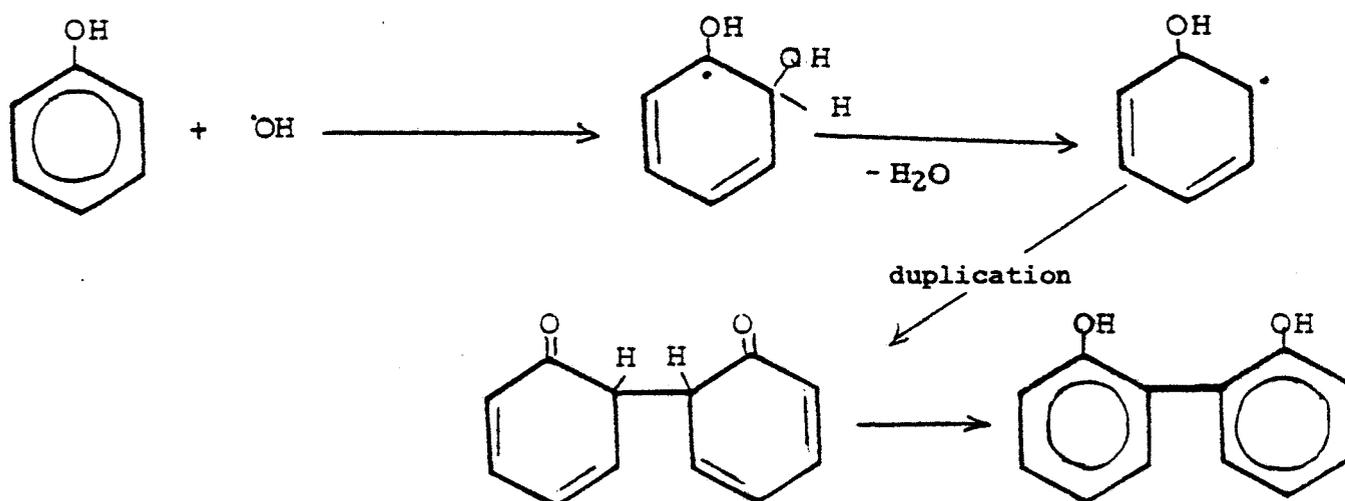
Le radical hydroxyle attaque le noyau aromatique du phénol avec élimination d'eau et formation d'un dimère de phénol



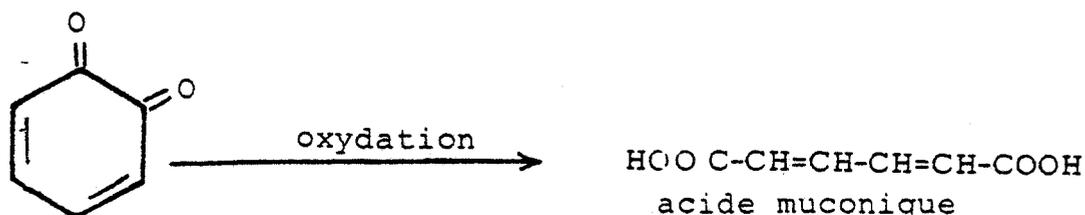
Ce mécanisme d'attaque, confirmé par NETA et FESSENDEN (1974), peut entraîner la formation d'un radical hydroxycyclohexadiényle qui, par élimination d'eau conduit au radical phénoxy



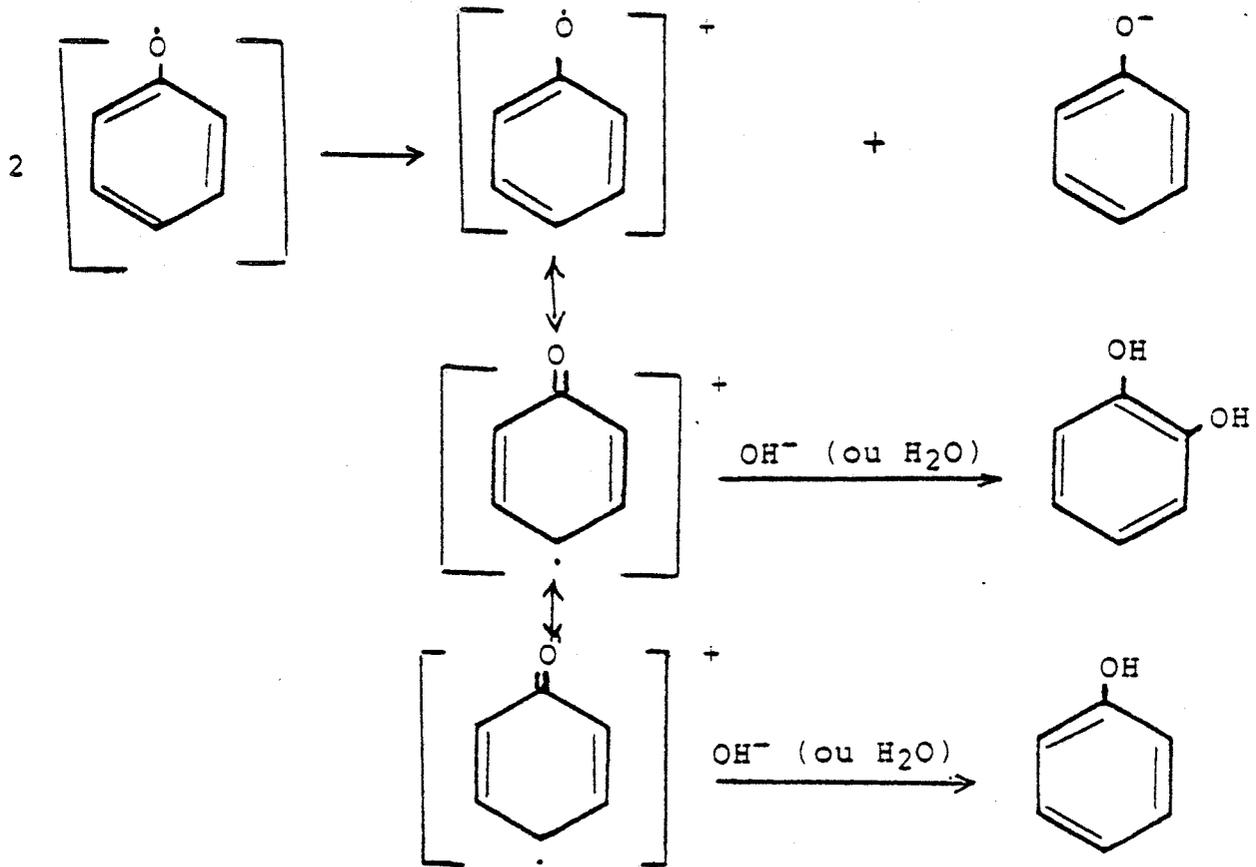
On comprend donc la formation des dimères, qui peut très bien s'expliquer par les équations:



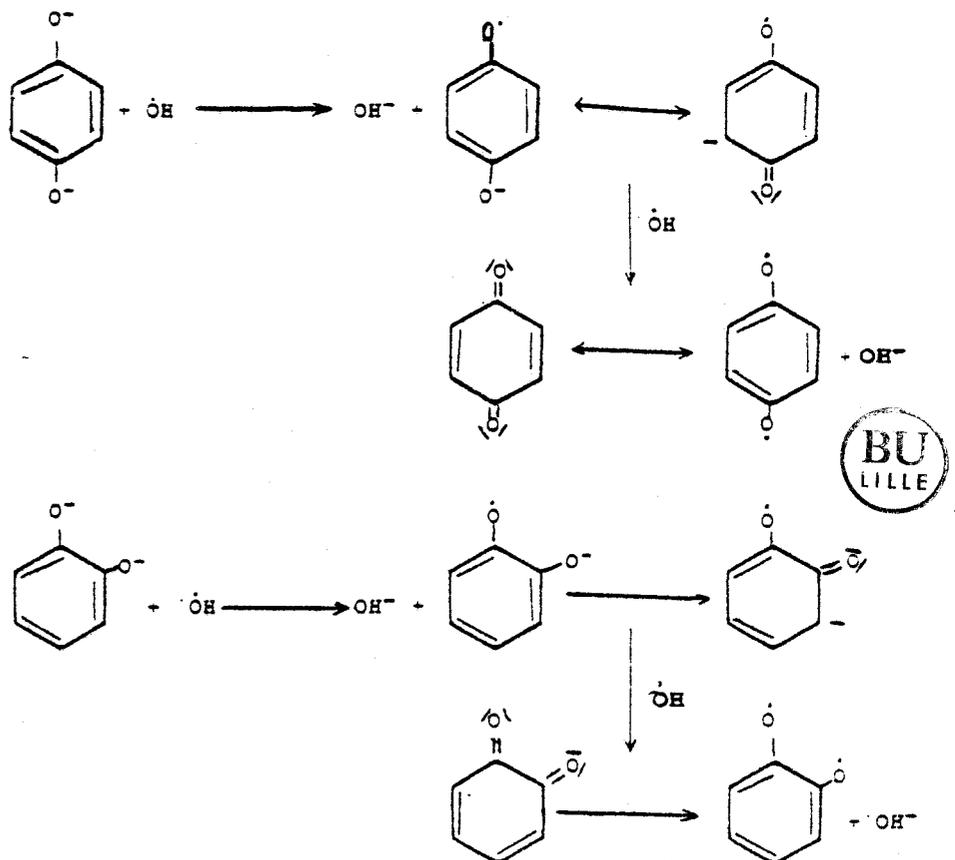
Actuellement, de nombreux travaux montrent divers produits issus de l'action du radical hydroxyle sur les composés phénoliques. BARNES et coll. (1981) en effectuant le traitement par le réactif de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, qui génère les radicaux hydroxyle) des eaux de rejet contenant du phenol, ont détecté des composés aliphatiques, en particulier l'acide muconique. Ils expliquent la formation de ces derniers par l'ouverture du cycle aromatique des quinones issues des catéchols:



La formation de dérivés quinoniques sous l'action du radical hydroxyle sur le phénol s'effectue dans un milieu à pH élevé, comme BARNES et SUGDEN (1986) l'ont montré:



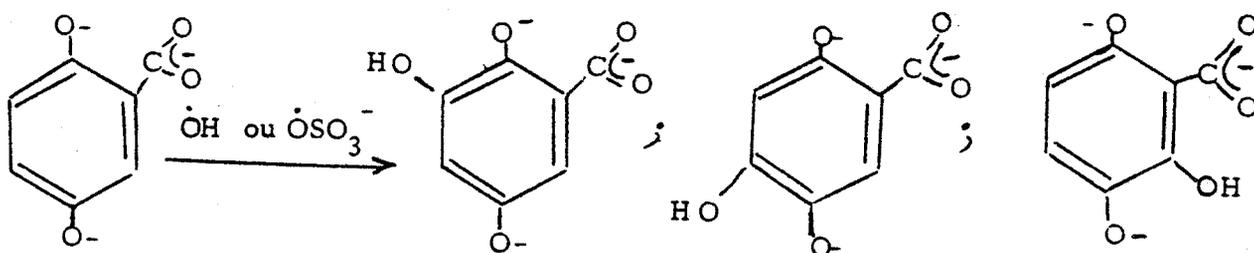
En milieu basique, on obtient des dérivés quinoniques:



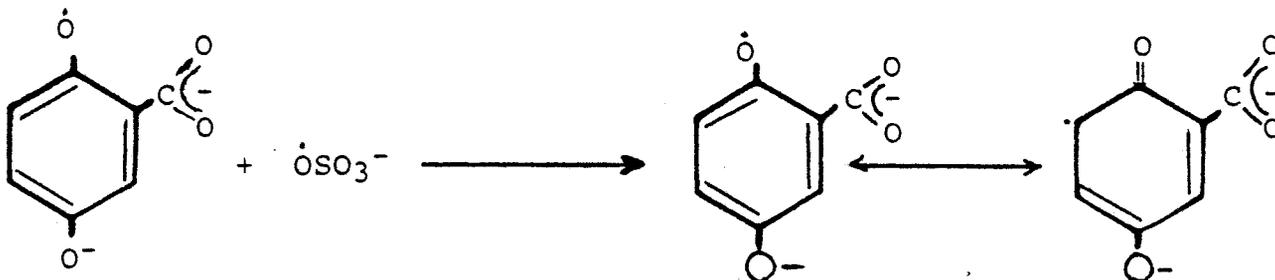
3.3- Application à l'acide gentisique

Les différents mécanismes d'oxydation des dérivés phénoliques sous l'action d'une part, de l'ion radical sulfate et d'autre part, du radical hydroxyle, appliqués à l'acide gentisique, peuvent conduire à:

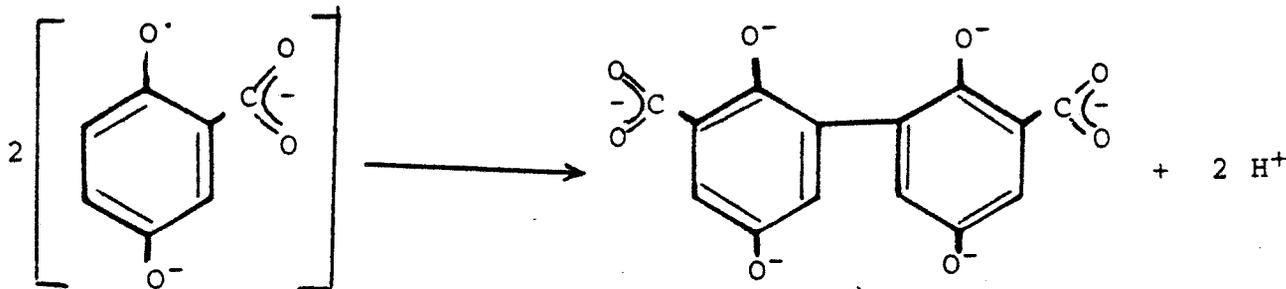
- l'hydroxylation de l'acide gentisique par action des deux radicaux



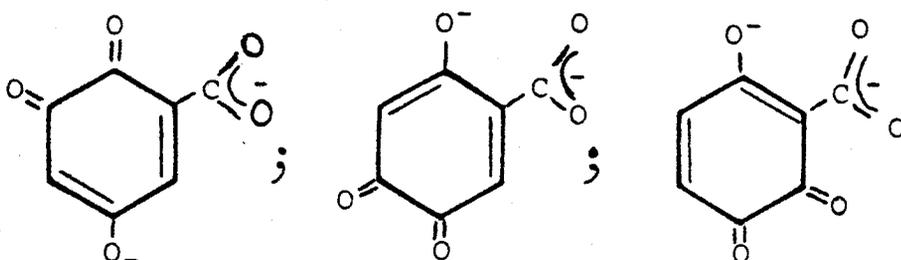
- la formation de radicaux de l'acide gentisique par transfert d'électron sous l'action de l'ion radical sulfate



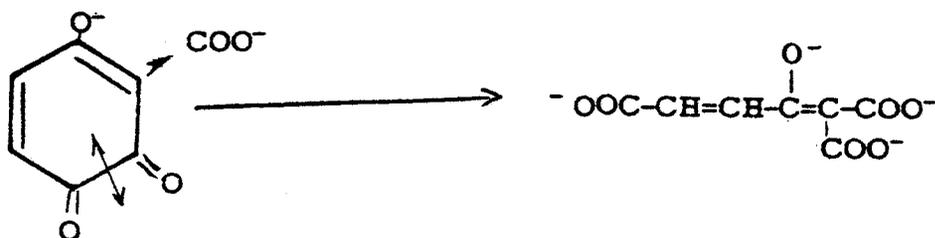
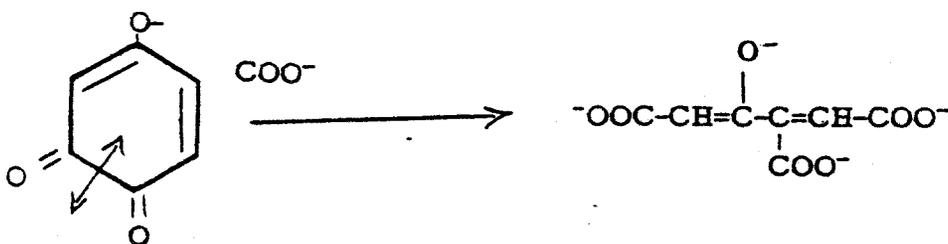
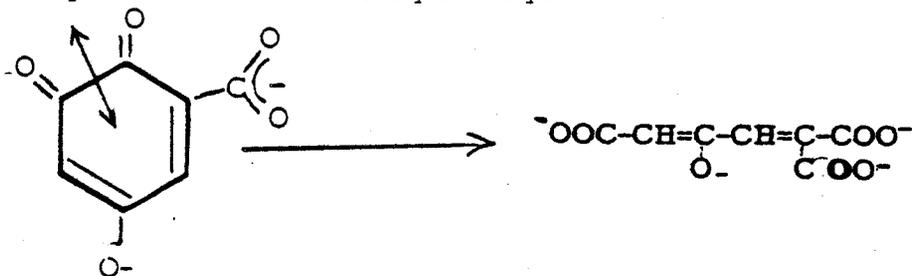
- une condensation de l'acide gentisique par couplage des radicaux ainsi formés, en dimères



- la formation de dérivés orthoquinoniques issus des composés hydroxylés de l'acide gentisique



- la formation de composés aliphatiques obtenus par ouverture de cycle de dérivés orthoquinoniques



L'oxydation de l'acide gentisique par le persulfate en milieu basique s'effectue donc par de multiples processus, qui sont cependant essentiellement de nature radicalaire. Les différents mécanismes proposés ci-dessus, nous permettent d'expliquer quelques résultats spectroscopiques observés sur la structure du MHG. En effet, l'existence d'éléments structuraux aliphatiques, mis en évidence par spectrométrie RMN ^1H et ^{13}C , s'explique par l'ouverture des cycles des dérivés orthoquinoniques issus de l'acide gentisique. La spectroscopie RPE nous a permis de révéler l'existence d'un paramagnétisme rémanent dans la structure du MHG, ce qui tend à prouver que son mécanisme de formation serait radicalaire.

Une proposition d'un mécanisme "complet", conduisant à la formation d'une structure macromoléculaire pour le MHG, serait souhaitable. Mais, comme nous pouvons le constater, la participation importante et de diverses manières de nombreux réactifs lors de l'oxydation de l'acide gentisique, impose d'une part, une investigation très approfondie sur le choix du réactif déterminant cette oxydation, et d'autre part, le suivi séquentiel

par une technique appropriée telle que la RPE, des produits intermédiaires susceptibles de se former, ce qui n'entre pas dans le cadre de ce travail.

4-PROPRIETES COMPLEXANTES

4.1- Etude cinétique

Cette étude cinétique de la complexation du cadmium par le MHG est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Cependant, on observe dans ce cas, une différence de potentiel initial d'électrode entre le milieu contenant le MHG dissous et celui ne le contenant pas.

La détermination des concentrations en cadmium libre est effectuée en tenant compte de cette variation de potentiel d'électrode, attribuée à la force ionique due au MHG. Le mode de calcul de ces concentrations sera développé paragraphe 4.2 lors de la détermination des constantes de stabilité.

La courbe présentée sur la figure IV₁₁ montre l'évolution de la complexation sur quatre jours. L'équilibre entre la forme libre et la forme complexée est atteint après le premier jour de contact, et se stabilise à une valeur moyenne de $6,94 + 0,02 \cdot 10^{-7}$ atg Cd.mg⁻¹ MHG. Cette valeur est supérieure d'un ordre de grandeur à celle obtenue pour l'AHF. Ceci laisse suggérer qu'une faible taille moléculaire des substances humiques rend plus accessibles les sites de complexation du cadmium, et que les groupements fonctionnels de type carboxylate doivent jouer un rôle important dans la complexation de ce métal.

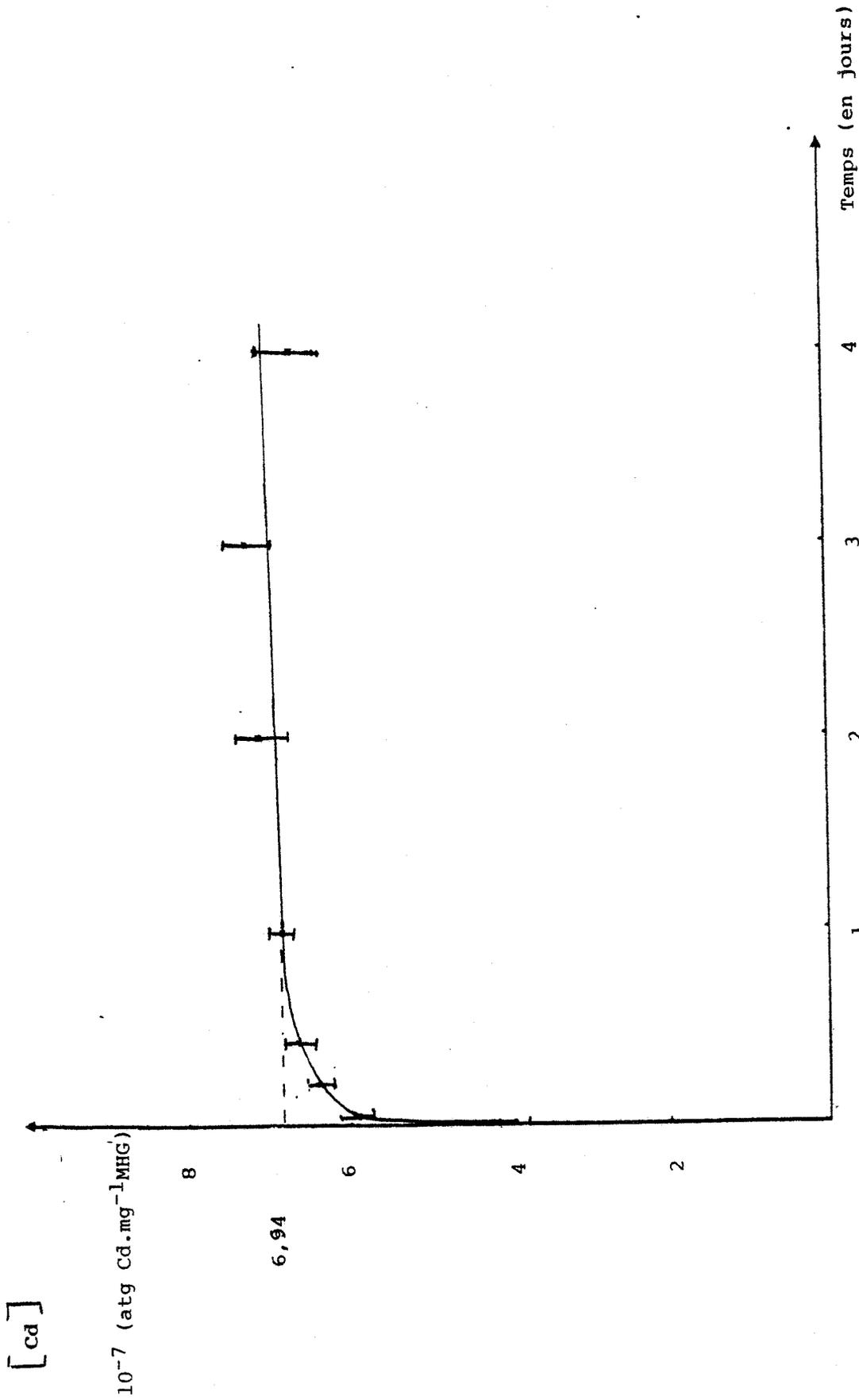


Figure IV₁₁: Cinétique de complexation du cadmium par le MHC



4.2- Etablissement des capacités complexantes et des constantes conditionnelles de stabilité

Comme dans le cas de la détermination des paramètres complexants de l'AHF, la polarographie impulsionnelle différentielle à redissolution anodique (PIDRA) est utilisée pour doser le cadmium libre dans la région de faibles concentrations tandis que l'électrode sélective, est employée pour des concentrations élevées.

Le dosage du cadmium par polarographie et par électrode sélective est effectué après deux jours de contact, délai suffisant au bout duquel l'équilibre entre la forme libre et la forme complexée du cadmium, est atteint. La technique potentiométrique d'électrode sélective a montré une variation du potentiel initial entre le milieu contenant le MHG dissous et celui ne le contenant pas (figure IV₁₂). Ce phénomène a été déjà observé par BHAT et coll. (1981) lors du dosage du cuivre par électrode sélective dans un milieu contenant les substances humiques naturelles. Le MHG présente de ce fait une propriété analogue à celle des substances humiques d'origine aquatique et terrestre.

Cette variation de potentiel initial pose indubitablement un problème sur la détermination des concentrations réelles en cadmium libre. Ceci nous a conduit à émettre les hypothèses suivantes afin de déterminer ces concentrations réelles:

- sur la figure IV₁₂, nous pouvons observer qu'au fur et à mesure que les concentrations en cadmium augmentent, il se produit un rapprochement des courbes de dosage de ce métal. Ceci peut s'expliquer par la diminution et la saturation des sites de complexation du cadmium sur le MHG

- l'écart de potentiel initial observé vers les faibles concentrations en cadmium peut être attribué à la force ionique supplémentaire due au MHG dissous

Si à la concentration la plus élevée en cadmium (10mg.l⁻¹), nous considérons que tous les sites de complexation de MHG sont saturés et que la force ionique due au complexe devient négligeable, les deux courbes (a) et (b) de dosage doivent se rejoindre.

La relation de DEBYE-HUCKEL

$$\log f_i = - 2\sqrt{I}$$

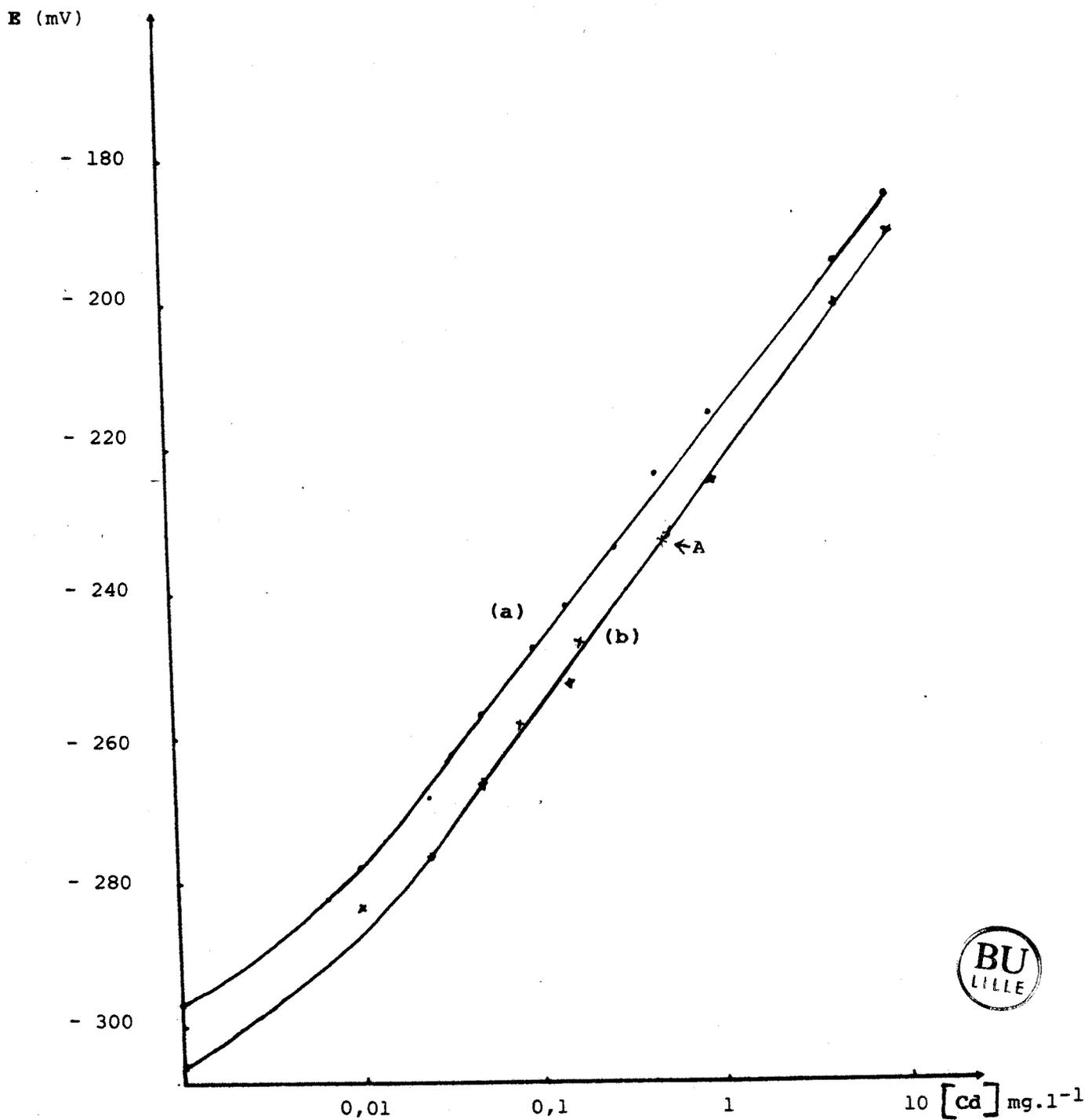


Figure IV₁₂ : Courbe de dosage potentiométrique du cadmium dans le MMS (a) et en présence du MHG ($15mg.l^{-1}$) (b).

reliant le coefficient d'activité f_i d'une espèce i à la force ionique I du milieu d'analyse, valable lorsque I est inférieure à 0,02M, est applicable ici, car notre milieu minéral de synthèse (MMS) présente une force ionique égale à 0,006M.

Nous pouvons donc calculer le coefficient d'activité de l'ion cadmium dans le MMS (milieu 1). Sa valeur nous permet de déterminer celle du coefficient d'activité de l'ion cadmium dans le milieu contenant le MHG (milieu 2), en appliquant la loi de NERSNT. En effet, lorsque le milieu d'analyse ne contient pas de MHG dissous, nous pouvons écrire:

$$E_1 = E_0 + 0,029 \log f_{Cd^{2+}}^{(1)} \left[Cd^{2+} \right]_{libre}^{(1)}$$

et, en présence du MHG

$$E_2 = E_0 + 0,029 \log f_{Cd^{2+}}^{(2)} \left[Cd^{2+} \right]_{libre}^{(2)} \quad (1)$$

La différence de potentiel est:

$$\Delta E = E_1 - E_2 = 0,029 \log \frac{f_{Cd^{2+}}^{(1)}}{f_{Cd^{2+}}^{(2)}} + 0,029 \log \frac{\left[Cd^{2+} \right]_{libre}^{(1)}}{\left[Cd^{2+} \right]_{libre}^{(2)}} \quad (2)$$

Au point de concentration la plus élevée en cadmium (égalité des concentrations en cadmium libre dans les milieux 1 et 2), le coefficient d'activité f_{Cd}^1 du cadmium présent dans le milieu 1 de force ionique I_1 , se calcule à partir de la relation:

$$\log f_{Cd}^1 = -2\sqrt{I_1} \quad (3)$$

Des équations 2 et 3, nous déduisons f_{Cd}^{2+} . Le report de cette valeur dans l'équation 1 nous permet, à partir des valeurs de E_2 , de calculer Cd^{2+} libre. Ainsi, par exemple pour le point A de la courbe (b) (figure IV₁₂) correspondant à une concentration de 0,37mg.l⁻¹ de cadmium complexé, on obtient une concentration réelle de 0,28mg.l⁻¹.

: L'ensemble des concentrations en cadmium libre est reporté (tableau IV_{IV}) avec leurs transformées en coordonnées de SCATCHARD.

Le tracé de la courbe de complexation selon la méthode de SCATCHARD $\frac{\bar{v}}{[Cd^{2+}]}$ = f (\bar{v}) figure IV₁₃) ne présente aucune intersection avec l'axe des

$[Cd^{2+}]_{totale} (\mu g \cdot l^{-1})$	60	80	100	150	200	500	750	1500	3000	5000	10000
$[Cd^{2+}]_{totale} \cdot 10^{-7} (atg \cdot l^{-1})$	5,338	7,117	8,897	13,345	17,793	44,484	66,726	133,452	266,904	444,840	889,680
$[Cd^{2+}]_{libre} \cdot 10^{-7} (atg \cdot l^{-1})$	2,088	2,917	3,839	6,200	9,018	25,000	41,615	93,000	202,000	350,890	732,100
$[Cd^{2+}]_{libre} \cdot 10^{-7} (atg \cdot l^{-1})$	3,250	4,200	5,058	7,145	8,775	19,484	25,111	40,452	64,904	93,950	157,580
$\bar{y} = \frac{[Cd^{2+}]_{libre} \cdot 10^{-3}}{[MHG]}$	32,50	42,00	50,58	71,45	87,75	194,84	251,11	404,52	649,04	939,50	1575,8
$\frac{\bar{y}}{[Cd^{2+}]_{libre}} \cdot 10^5 (M^{-1})$	1,557	1,440	1,317	1,152	0,973	0,779	0,603	0,435	0,321	0,268	0,215

Tableau IVIV : Résultats de l'étude polarographique et potentiométrique, et valeurs des coordonnées de SCATCHARD



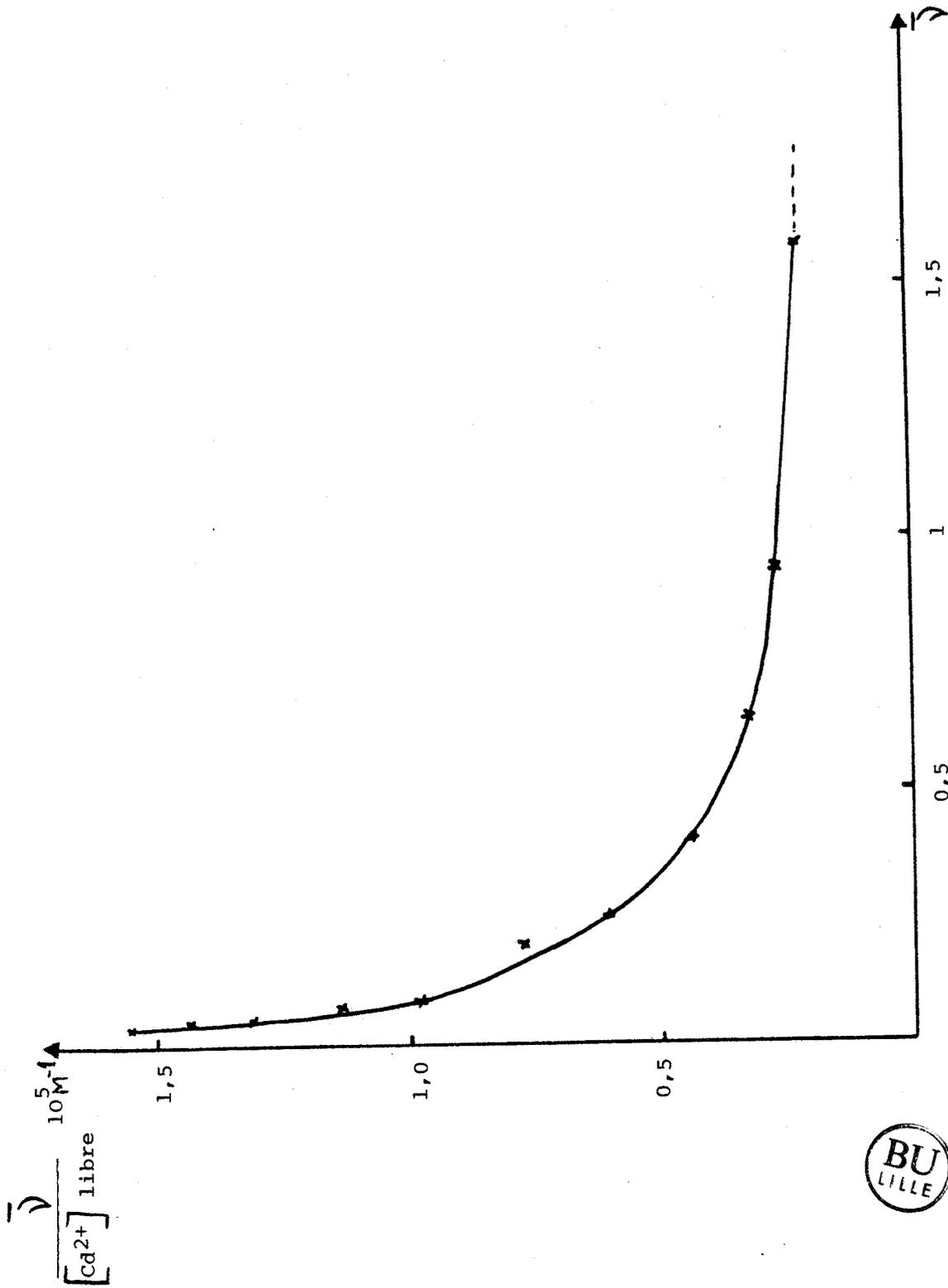


Figure IV 13 : Représentation graphique de SCATCHARD pour l'interaction Cd²⁺ - MHG



abscisses. Ceci laisse supposer l'existence d'une interaction supplémentaire à la complexation et de caractère non spécifique. Afin de différencier ces deux phénomènes, nous avons eu recours à la méthode de TAIRA et TERADA (1985) et reporté les valeurs de \bar{Y} en fonction des concentrations en cadmium libre (courbe CS+CNS, figure IV₁₄). Le tracé de la droite CNS parallèle à la deuxième partie de la courbe précédente et passant par l'origine permet de quantifier la complexation non spécifique attribuable à des phénomènes d'adsorption. Par soustraction, on détermine les valeurs de \bar{Y}_S , relatives à la complexation spécifique (courbe CS) et on évalue à $25 \cdot 10^{-7}$ atg.l⁻¹ le début de l'interaction non spécifique. Les valeurs de \bar{Y}_S , regroupées dans le tableau IV_V sont traitées par la méthode graphique précédemment détaillée (figure IV₁₅).

Deux types de sites sont mis en évidence, susceptibles de complexer respectivement 0,14 (n₁) et 0,295 (n₂) atg Cd²⁺.mole MHG⁻¹. La méthode des ajustements a permis une première détermination des constantes conditionnelles de stabilité correspondantes, soit: K'₁ = 1,45.10⁶ M⁻¹ et K'₂ = 5,8.10⁴ M⁻¹ (URIEN et coll. 1986).

Nous avons effectué un second traitement mathématique qui a consisté en un ajustement par la méthode des moindres carrés (figure IV₁₅). La modélisation de l'équation de SCATCHARD, comme l'avait montrée ROSENTHAL (1967) pour un système complexant présentant deux sites, est:

$$\frac{\bar{Y}}{[M^{2+}]} = \frac{n_1 K'_1}{1 + K'_1 [M^{2+}]} + \frac{n_2 K'_2}{1 + K'_2 [M^{2+}]}$$

L'ajustement point par point a conduit, avec un coefficient de détermination de 0,9999, aux valeurs de Y estimé reportées tableau IV_{VI}. L'itération a permis de déterminer:

$$n_1 = 0,064 \text{ pour } K'_1 = 2,244 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

$$n_2 = 0,300 \text{ pour } K'_2 = 1,994 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$$

ce qui correspond à la représentation de SCATCHARD (figure IV₁₆).

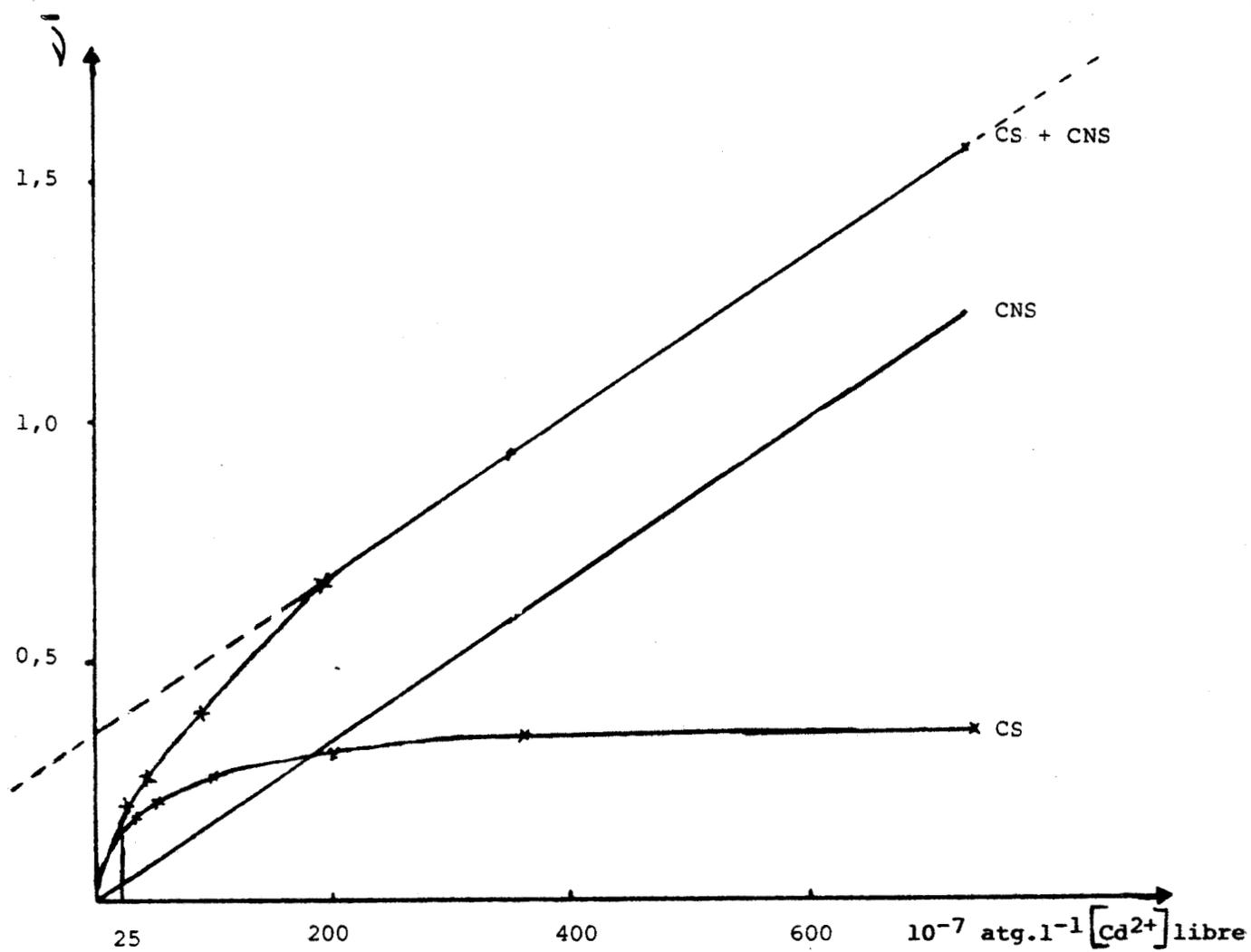


Figure IV₁₄ : Courbes de différenciation entre la complexation spécifique (CS) et l'interaction non spécifique (CNS) entre le cadmium et le MHG



$[Cd^{2+}]_{\text{totale}} (10^{-7} \text{ atg.l}^{-1})$	5,338	7,117	8,897	13,345	17,793	44,484	66,726	133,452	266,904	444,840	889,680
$\bar{\gamma}_s = \frac{[Cd^{2+}]_{\text{lié}}}{\text{MHG}} \cdot 10^{-3}$	32,500	42,000	50,575	71,430	88,390	154,000	180,000	250,000	300,000	345,000	350,000
$\bar{\gamma}_s \cdot \frac{[Cd^{2+}]_{\text{libre}}}{10^5 \cdot M^{-1}}$	1,557	1,440	1,317	1,143	0,980	0,620	0,520	0,285	0,150	0,099	0,048

Tableau IVy : Résultats de l'étude polarographique et potentiométrique et valeurs des coordonnées de SCATCHARD relatives à la complexation spécifique



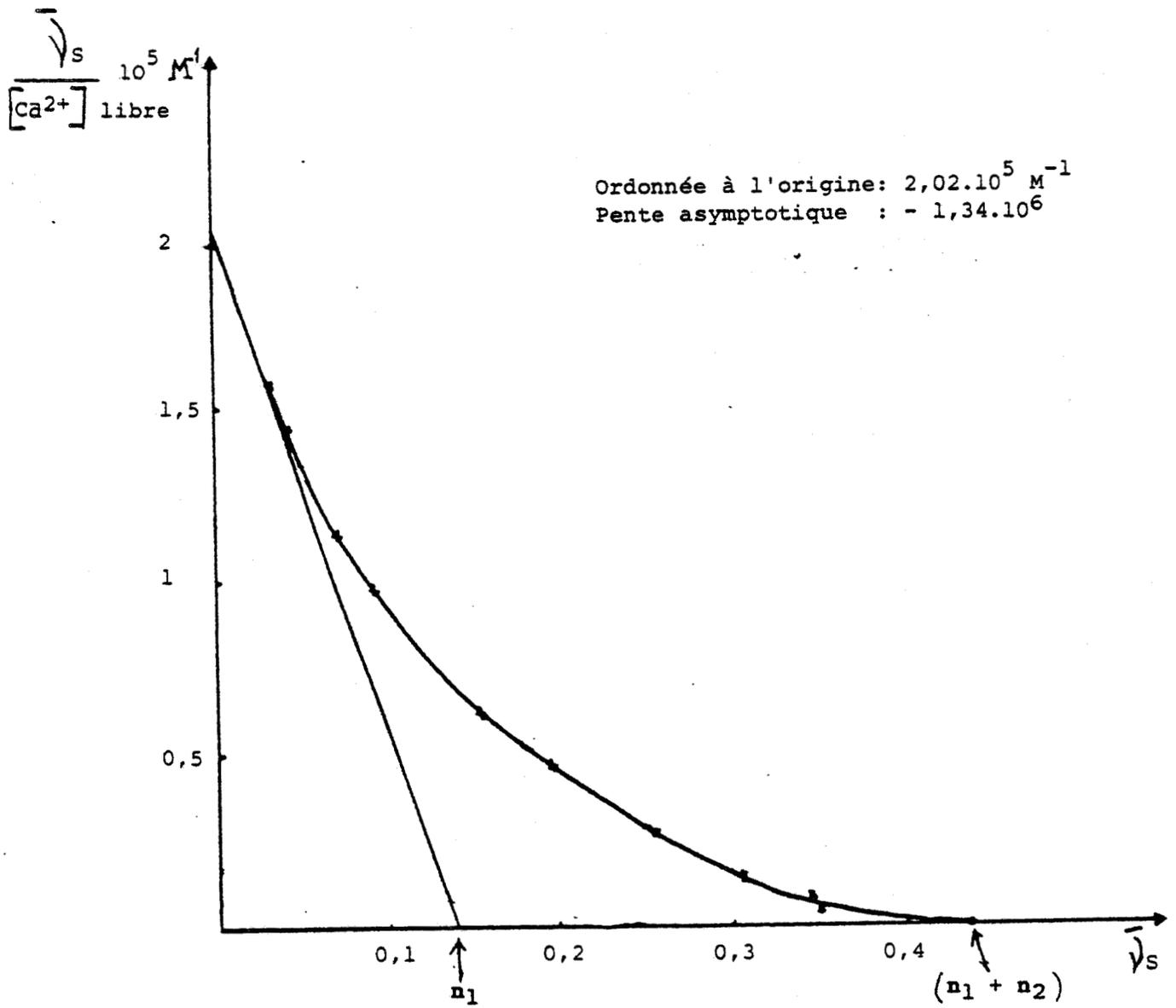


Figure IV₁₅: Méthode graphique de SCATCHARD pour la détermination des paramètres de complexation spécifique



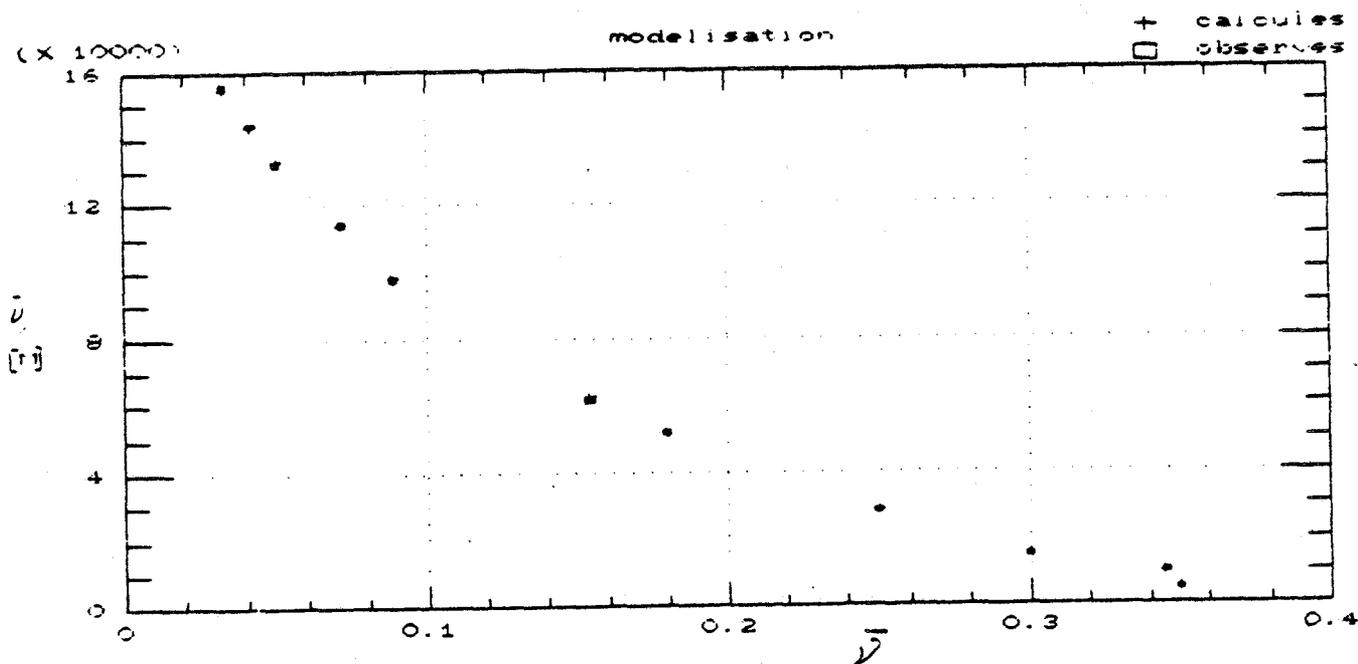


Figure IV₁₆ : Courbe de dosage complexométrique du cadmium par le MHG obtenue par la méthode mathématique des moindres carrés

Les valeurs obtenues par cette deuxième méthode sont plus fiables, surtout en ce qui concerne les caractéristiques du second type de site de complexation.

Comparaison avec l'AHF

Avec une masse molaire moyenne de $5 \cdot 10^3$, le MHG possède une densité de sites de $0,36/5 \cdot 10^3$ alors qu'avec une masse molaire moyenne de 10^5 , l'AHF présente une densité de $11/10^5$, soit environ une fois et demie celle du MHG.

La différence est plus marquée au niveau des constantes conditionnelles de stabilité, respectivement $2,55 \cdot 10^7$ et $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour l'AHF et $2,24 \cdot 10^6$ et $1,99 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour le MHG. La plus grande stabilité des complexes établis par le biais des sites de l'AHF du premier type peut être rapprochée de facteurs topologiques pouvant favoriser une chélation plus importante.

Comparaison avec les substances humiques aquatiques

Au niveau des constantes conditionnelles de stabilité, si nous comparons à celles obtenues par cette même formulation de SCATCHARD, leurs valeurs sont légèrement supérieures de celles des complexes [substances humiques aquatiques - ion cadmium] pour lesquels $K'_1 = 6,75 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ et $K'_2 = 1,35 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (ALBERTS et GIESY, 1983).

POINT	X	Y _{obs} .10 ⁵	Y _{est} .10 ⁵
1	2,088.10 ⁻⁷	1,556	1,553
2	2,917.10 ⁻⁷	1,439	1,436
3	3,839.10 ⁻⁷	1,317	1,329
4	6,25.10 ⁻⁷	1,143	1,132
5	9,018.10 ⁻⁷	0,980	0,984
6	25.10 ⁻⁷	0,616	0,617
7	3,461.10 ⁻⁶	0,520	0,518
8	8,772.10 ⁻⁶	0,285	0,287
9	2.10 ⁻⁵	0,150	0,151
10	3,508.10 ⁻⁵	0,098	0,092
11	7,32.10 ⁻⁵	0,048	0,047

Tableau IV_{VI} : Valeurs expérimentales de $x = [\text{Cd}^{2+}]$ et $y = \frac{\bar{y}}{[\text{Cd}^{2+}]}$

et leur ajustement selon la méthode des moindres-carrés



En conclusion, il se dégage de l'étude des caractéristiques structurales et des propriétés complexantes du MHG, les résultats suivants:

- ce modèle humique, contrairement à l'AHF et au MHH, a une masse moléculaire proche de celle des substances humiques naturelles, en particulier des acides fulviques d'origine aquatique,

- les résultats des analyses spectroscopiques infra-rouge, RMN ^1H et ^{13}C ont révélé l'existence des principaux groupements fonctionnels tels que les hydroxyle phénoliques, alcooliques et carboxyliques, les cycles aromatiques, rencontrés généralement dans la structure des substances humiques naturelles

- l'analyse élémentaire indique un rapport de O/C = 1 rapprochant également le MHG des acides fulviques d'origine aquatique

- la mise en évidence des groupements sulfate covalent $\text{RO--SO}_2\text{--OR}$ tend à prouver que l'ion radical sulfate participe au mécanisme de formation du MHG alors que celle des radicaux semi-quinoniques, stables en RPE, conduit à supposer un mécanisme de formation essentiellement radicalaire

- le MHG manifeste des propriétés complexantes vis-à-vis du cadmium, au niveau de type de sites, avec des constantes de stabilité et une capacité complexante proches de celles des substances humiques aquatiques.

Le MHG constitue donc un modèle plus représentatif des substances humiques aquatiques que ne l'étaient jusqu'alors les matériaux humiques existants, qu'ils soient naturels ou de synthèse.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord montré, par une étude bibliographique, que des techniques aussi performantes que:

- la polarographie, la pHmétrie et l'électrode sélective d'un ion
- les spectrométries infra-rouge, UV, RME ^1H , ^{13}C et RPE

sont largement utilisées par de nombreux auteurs, dans l'évaluation des propriétés complexantes des substances humiques vis-à-vis des métaux dissous en milieu hydrique et la caractérisation de leur structure.

Cependant on observe que:

- l'absence de vérification d'une part, de phénomène d'adsorption des substances humiques sur les électrodes et d'autre part, de la constance du pH

- la non observation du temps nécessaire pour atteindre l'équilibre entre la forme libre et complexée des métaux

- l'influence de l'origine sur la structure des substances humiques impliquent un manque de rigueur dans la définition des conditions d'évaluation des propriétés complexantes des substances humiques et de leurs caractéristiques structurales. Ceci n'a conduit jusqu'à présent qu'à une très grande variabilité dans les résultats publiés.

L'emploi des techniques spectrométriques et électrochimiques précédemment citées, à la caractérisation structurale et à l'évaluation des propriétés complexantes d'un modèle humique commercial FLUKA, nous a permis, après avoir observé rigoureusement leurs conditions d'applicabilité:

- d'identifier des groupements fonctionnels méthyle, méthylène, hydroxyle, carboxyle et amine, généralement rencontrés dans la structure des substances humiques naturelles

- d'évaluer à 10^5 la masse molaire moyenne et de déterminer des constantes conditionnelles de stabilité $K'_1 = 2.10^7 \text{ M}^{-1}$ et $K'_2 = 8,5.10^5 \text{ M}^{-1}$

- de constater un important effet paramagnétique rendant difficile l'acquisition d'un spectre RMN ^1H .

Ces résultats révèlent une représentativité "douteuse", tant sur le plan structural que sur celui des propriétés complexantes, de cet acide humique commercial FLUKA, par rapport aux substances humiques naturelles. Ce modèle pré-établi rend donc difficile la progression dans la compréhension de la structure des substances humiques et des interactions substances humiques-cation métallique dissous en milieu aqueux.

Afin de progresser dans la représentativité d'un modèle humique, nous proposons un matériel obtenu par voie de synthèse chimique. Cette dernière a été retenue de préférence à la voie de synthèse bactérienne à cause de sa facilité et la rapidité d'obtention du produit. Celle-ci procède par oxydation de dérivé phénolique en présence d'ion persulfate, en milieu alcalin. Nous l'avons appliquée à l'hydroquinone.

La caractérisation structurale et l'évaluation des propriétés complexantes du modèle humique issu de l'oxydation de l'hydroquinone, effectuées par les mêmes techniques spectrométriques et électrochimiques que précédemment, ont révélé la présence de groupements hydroxyle et de noyaux aromatiques, l'absence de groupements carboxyle, l'obtention d'un polycondensat, l'influence de la conformation structurale de ces macromolécules humiques sur leurs propriétés complexantes.

La recherche d'un modèle comportant des groupements carboxyle, donc d'éventuels sites de complexation de type salicylate et phtalate fréquemment rencontrés dans la structure des substances humiques, nous a conduit à effectuer une autre synthèse chimique à partir de l'acide dihydroxy- 2,5 benzoïque ou acide gentisique.

L'étude structurale du modèle humique issu de l'oxydation de l'acide gentisique révèle l'existence:

- de cycles aromatiques identifiés à $840 - 500\text{cm}^{-1}$, 1620cm^{-1} en spectrométrie infra-rouge, 120ppm en spectrométrie RMN ^{13}C
- de groupements phénol identifiés à 3280cm^{-1} en spectrométrie infra-rouge
- de groupements carboxyle détectés à 3420cm^{-1} et 1720cm^{-1} en spectrométrie infra-rouge et 172ppm en spectrométrie RMN ^{13}C
- de groupements méthyle, méthylène détectés à $3000 - 2920\text{cm}^{-1}$ et 2850cm^{-1} en spectrométrie infra-rouge, 31,18ppm en spectrométrie RMN ^{13}C , dans la région 0 - 2ppm en spectrométrie RMN ^1H
- de radicaux libres donnant en RPE un facteur $g = 2,0041$.

La formation d'un polycondensat est révélée par l'absence en spectrométrie UV d'une bande d'absorption caractéristique d'un chromophore spécifique et par la faible résolution des spectres infra-rouge et RMN ^1H .

La masse moléculaire moyenne de ce modèle humique est évaluée à 5.10^3 , obtenue par limitation de la polycondensation en utilisant le ditertiobutyl- 3,5 hydroxy- 4 toluène (BHT), comme piège à radicaux libres.

Les résultats de l'analyse structurale nous amènent à proposer un mécanisme d'oxydation s'effectuant par attaque du noyau aromatique de l'acide gentisique par les radicaux OSO_3^- et OH, débouchant sur une proposition de l'étape initiale de la synthèse de ce modèle.

L'évaluation des propriétés complexantes a conduit à l'obtention de constantes conditionnelles de stabilité $K'_1 = 2,244.10^6 M^{-1}$ et $K'_2 = 1,994.10^5 M^{-1}$.

Le procédé de synthèse pourrait être optimisé par le suivi en RPE du mécanisme d'élaboration de ce modèle humique. En effet, comme ce mécanisme est essentiellement radicalaire, cette technique peut permettre l'identification des radicaux stables s'établissant dans le milieu réactionnel et de préciser leur influence dans l'élaboration du modèle.

L'ensemble des résultats de l'analyse structurale et des propriétés complexantes concourt à une validation partielle de ce modèle. Un modèle "universel" de référence, prenant en compte tous les aspects des propriétés structurales et complexantes des substances humiques naturelles, est difficile à concevoir.

Le modèle humique issu de l'oxydation de l'acide gentisique a le mérite de permettre:

- une comparaison interlaboratoire des résultats obtenus suivant les mêmes techniques et relatifs aux études structurales et d'évaluation des propriétés complexantes des substances humiques naturelles

- une étude du comportement du ligand organique lors des modélisations des interactions substances humiques - métaux en milieu hydrique. Ce modèle humique peut être utilisé soit après incorporation d'acides aminés ou d'hétérocycles azotés pour compléter ses caractéristiques structurales, soit en lui adjoignant d'autres composés organiques définis, pour former des structures agrégatives.

LEXIQUE

Polarographie classique à courant continu: diffusion current (DC)

Polarographie différentielle pulsée: Differential pulse polarography (DPP)

Polarographie de redissolution anodique (PRA): anodic stripping voltammetry (ASV)

Polarographie impulsionnelle différentielle de redissolution anodique (PIDRA):
differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV)

Electrode à goutte tombante: dropping mercury electrode (DME)

Electrode à goutte pendante: hanging mercury drop electrode (HMDE)

TRAVAUX PUBLIES ET COMMUNIQUES

Ce mémoire a fait l'objet de publications et communications internationales suivantes:

EBENGA J.P., IMBENOTTE M., POMMERY J., CATTEAU J.P. et ERB F. (1986)
Structure et évolution d'un modèle d'acide humique sous l'effet de
l'ozonation. Water Res. , 9 , 969-979.

IMBENOTTE M., EBENGA J.P., POMMERY J., CATEAU J.P. et ERB F. (1986)
Modélisation de substances humiques. Séminaire substances humiques 15-16
Octobre, Rennes.

POMMERY J., EBENGA J.P., IMBENOTTE M., PALAVIT G. et ERB F. (1986) Etude de
la complexation du cadmium par un modèle d'acide humique. Water Res.
(accepté le 26 Mai 1987)

URIEN A.F., EBENGA J.P., IMBENOTTE M., POMMERY J., MARZIN D. and ERB F.
(1986) Synthetic humic acid model. Complexing ability and toxic effects.
International Conf. Chemicals in the Environment. Lisbon 1st-3rd July,
642-649.

METHODE DU DOSAGE DES TANINS ET LIGNINES

Principe

Les tanins et lignines réduisent les acides tungstophosphoriques et molybdophosphoriques avec production d'une coloration bleue servant à l'estimation de concentrations inférieures à 9 mg/l en acides tanniques et en lignines.

Seuil de détection

0,1 mg/l pour les acides tanniques et 0,3 mg/l pour les lignines.

Appareillage

Un spectrophotomètre U.V. visible ; longueur d'onde : 700 nm

Réactifs

- Réactif des tanins et lignines

Dissoudre :

100 g de tungstate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{WO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$)
20 g d'acide phosphomolybdique ($20 \text{MoO}_3, 2 \text{H}_3\text{PO}_4, 48 \text{H}_2\text{O}$)
50 ml d'acide phosphorique à 85 %
dans 750 ml d'eau distillée.

Bouillir la solution à reflux pendant 2 heures, refroidir et compléter à 1 l avec de l'eau distillée.

- Solution de carbonate de sodium

Dissoudre 200 g de Na_2CO_3 dans 1 l d'eau distillée

- Solution étalon d'acides tanniques ou de lignines à 10 mg/l

Préparée par dilution dans de l'eau déminéralisée d'une solution mère à 1 g/l.

Procédé

Ajouter 2 ml de réactif tanins lignines à 50 ml d'échantillon filtré (*).
Attendre 5 minutes.

Ajouter 10 ml de solution de carbonate de sodium et agiter vigoureusement.
Attendre 10 minutes, le développement de la coloration bleue.

Effectuer le dosage spectrophotométrique par rapport à une gamme étalon.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIKEN G.R. (1984). Evaluation of ultrafiltration for determining molecular weight of fulvic acid. Environ. Sci. Technol. , 18 , 978-981.

ALBERTS J.J., SCHINDLER J.E., NUTTER D.E. and DAVIS E. (1976). Elemental infra-red spectrophotometric and electron spin resonance investigation of non chemically isolated humic material. Geochim. Cosmochim. Acta , 40 , 369-372.

ALBERTS J.J. and GIESY J.P. (1983). Conditional stability constants of trace metals and naturally occurring humic materials: application in equilibrium models and verification with field data. Aquatic and terrestrial humic materials. Chap. 16, 333p. Ann Arbor Science.

BAILLY J.R. (1974). Spectroscopie infra-rouge de quelques acides humiques. Plant and Soil , 40 , 285-302.

BAKER W. and BROWN N.C. (1948). The Elbs persulfate oxidation of phenols , and its adaptation to the preparation of monoalkyl ethers of quinols. J. Chem. Soc. , 2303-2307.

BARNES D., O'HARA M., SAMUEL E., and WATERS D. (1981). The treatment of paint-stripping wastewaters which contain phenol and chromium. Environ. Tech. Letters , 2 , 85-94.

BARNES A.R. and SUGDEN J.K. (1986). The hydroxyl radical in aqueous media. Pharm. Acta Helv. , 61 , 8, 218-228.

BECHER G., OESTVOLD G., PAUS P. and SEIP H.M. (1983). Complexation of copper by aquatic humic matter studied by reversed-phase liquid chromatography and atomic absorption spectroscopy. Chemosphere , 12 , 9/10, 1209-1215.

BENSON D. (1972). Introduction aux mécanismes des réactions inorganiques en solution, Masson et Cie, 160-175.

BEVERIDGE A. and PICKERING W.F. (1984). Influence of surfactants on the determination of Cu, Pb and Cd by ASV. Water Res. , 18 , 9, 1119-1123.

BHAT G.A., SAAR R.A., SMART R.B. and WEBER J.H. (1981). Titration of soil-derived fulvic acid by copper (II) and free copper (II) by anodic stripping voltammetry and copper (II) selective electrode. Anal. Chem. , 53 , 14, 2275-2280.

BHAT G.A. and WEBER J.H. (1982a). Cadmium (II) binding by soil derived fulvic acid measured by anodic stripping voltammetry. Anal. Chim. Acta , 141 , 95-103.

BHAT G.A. and WEBER J.H. (1982b). Exchange of comments on evaluation of the copper anodic stripping voltammetry complexometric titration for complexing capacities and conditional stability constants. Anal. Chem. , 54 , 2116-2117.

BILINSKI H., HUSTON R. and STUMM W. (1976). Determination of the stability constants of some hydroxo and carbonato complexes of Pb(II), Cu(II), Cd(II) and Zn(II) in dilute solutions by anodic stripping voltammetry and differential pulse polarography. Anal. Chim. Acta , 84 , 157-164.

BLONDEAU R. (1986). Comparison of soil humic and fulvic acids of similar molecular weight. Org. Geochem. , 9 , 1, 47-50.

BORGGGAARD O.K. (1974). Titrimetric determination of acidity and pK values of humic acid. Acta Chem. Scand. , Series A, Phys. Inorg. Chemistry , 121-122.

BOURG A. (1979). Spéciation chimique des métaux traces dans les systèmes aquatiques. J.Fr. Hydrol. , 3 , 30, 159-164.

BOYD S.A., SOMMERS L.E., NELSON D.W. and WEST D.X. (1981). The mechanism of copper (II) binding by humic acid: an electron spin resonance study of a copper (II)-humic acid complex and some adducts with nitrogen donors. Soil Sci. Soc. Amer. J. , 45 , 745-749.

BRESNAHAN W.T., GRANT C.L. and WEBER J.H. (1978). Stability constants for the complexation of copper (II) ions with water and soil fulvic acids measured by an ion selective electrode. Anal. Chem. , 50 , 12, 1675-1679.

BREZONICK P.L., BRAUNER P.A. and STUMM W. (1976). Trace metal analysis by anodic stripping voltammetry: effect of sorption by natural and model organic compounds. Water Res. , 10 , 605-612.

BRUCHET A., ANSELME C., MARSIGNY O. and MALLEVIALLE J. (1986). THM formation potential and organic content: a new analytical approach. Séminaire International "Substances humiques"- GRUTTEE, 15-16 Nov., Rennes.

BUFFLE J. et MALLEVIALLE J. (1974). Le rôle des matières humiques envisagées comme agent d'accumulation et véhicule des substances toxiques dans les eaux. T.S.M , 6, 331-340.

BUFFLE J.A.E. (1977). Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux. T.S.M , 1, 3-10.

BUFFLE J., GRETER F.L. and HAERDI W. (1977). Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. Anal. Chem. , 49 , 2, 216-222.

BUFFLE J., DELADOEY P. and HAERDI W. (1978). The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters. Anal. Chim. Acta , 101, 339-357.

BUFFLE J. and GRETER F.L. (1979). Interfacial electrochemical voltammetric studies of humic and fulvic substances. I. Study of the factors influencing the measurement of their complexing properties with lead. J. Electroanal. Chem. , 101, 231-251.

CARIATI F., ERRE L., MITCERA G., PANZANELLI A., GIANI G. and SIRONI A. (1983). Interaction of metal ions with humic-like models. Part.I. Synthesis, spectroscopic and structural properties of diquabis-(2,6 dihydroxy-benzoato) copper (II) and hexaaqua M (II) bis (2,6-dihydroxybenzoate) dihydrate (M= Mn, Fe, Co, Ni, Cu, and Zn). Inorg. Chim. Acta , 80, 57-65.

- CARLBERG G.E. and MARTINSEN K. (1982). Adsorption/Complexation of organic micropollutants to aquatic humus. Influence of aquatic humus with time on organic pollutants and comparison of two analytical methods for analysing organic pollutants in humus water. Sci. Total Environ. , 25, 245-254.
- CARSON G.K., DEAM P.A.W. and STILLMAN M.J. (1981). A multinuclear (proton, carbon-13, cadmium-113) nuclear magnetic resonance and magnetic circular dichroism spectroscopic study of thiolate complexes of cadmium. Inorg. Chim. Acta , 56 , 59-71.
- CHAU Y.K. and LUM-SHUE-CHAN K. (1974). Determination of labile and strongly bound metals in lake water. Water Res. , 8 , 383-388.
- CHAWLA Om P. and FESSENDEN R.W. (1975). Electron spin resonance and pulse radiolysis studies of some reactions of SO_4^- . J. Phys. Chem. , 79 , 24, 2693-2700.
- CHRISTMAN R.F. and GHASSEMI M. (1966). Chemical nature of organic color in water. J. Amer. Water Works Assoc. , 58 , 723-741.
- CISZEWSKI A. and LUKASZEWSKI Z. (1983). The influence of long-chain amine and ammonium salts on the anodic stripping voltammetry of thallium, lead, tin, cadmium and indium. Anal. Chim. Acta , 146, 51-59.
- CORNEC P. et BRUSSET H. (1950). Sur les acides humiques issus de l'hydroquinone. C. R. Acad. Sci. Paris , 230 , 1860-1862.
- CORRALES M. (1984). Etude comparée en solution diluée des complexes du cuivre, du cadmium et du plomb avec les acides humiques commerciaux et des acides fulviques de "référence". D.E.A. Science de l'eau, Poitiers.
- CROUE J.P. (1984). Contribution à l'étude de la chloration des substances humiques . D.E.A. Sciences de l'eau, Poitiers.
- DAVIS H. and MOTT C. J. B. (1981). Titrations of fulvic acid fractions I: Interactions influencing the dissociation/reprotonation equilibria. J. Soil Sci. , 32 , 3, 379-391.

DE BORGER R. et DE BACKER H. (1968). Détermination du poids moléculaire moyen des acides fulviques par cryoscopie en milieu aqueux. C. R. Acad. Paris, 266 , série D, 2052-2055.

DIXON W.T., SCHAEFER J., SEFCIK M.D., STEJSKAL E.O and MCKAY R.A. (1981). Quantitative chemical composition of materials such as humic soils, lignins, and coals by high resolution carbon-13 NMR. J. Magnetic Reson. , 45, 173-176.

EBENGA J.P., IMBENOTTE M., POMMERY J., CATTEAU J.P. and ERB F. (1986). Structure et évolution d'un modèle d'acide humique sous l'effet de l'ozonation. Water Res. , 20 , 11, 1383-1392.

ELLIS P.D. (1983). Cadmium 113 magnetic resonance spectroscopy. Science , 221 , 4616, 1141-1146.

EL MEDNAOUI H., CASTEBON A. and ASTRUC M. (1984). Comportement du cuivre à l'interface eau-sédiment marin dans le bassin d'Arcachon. Environ. Tech. Letters , 5 , 529-540.

ERNST R., ALLEN H.E. and MANCY K.H. (1975). Characterization of trace metal species and measurement of trace metal stability constants by electrochemical techniques. Water Res. , 9 , 969-979.

FAURE J., VIALLET P., et PICAT P. (1975). La chromatographie sur gel et l'ultrafiltration appliquées au fractionnement des substances organiques des sédiments et des eaux du Rhône. Cebedo-Eau , 385, 439-450.

FIGURA P. and McDUFFIE B. (1979). Use of chelex resin for determination of labile trace metal fractions in aqueous ligand media and comparison of the method with anodic stripping voltammetry. Anal. Chem. , 51 , 1, 120-125.

FIGURA P. and McDUFFIE B. (1980). Determination of labilities of soluble trace metal species in aqueous environmental samples by anodic stripping voltammetry and chelex column and batch methods. Anal. Chem. , 52 , 9, 1433-1439.

FISCHER J.C., NGANOU R et WARTEL M. (1984). Etude de la capacité complexante des eaux de l'estuaire et de la baie de Seine. Talanta , 31 , 12, 1057-1061.

FLETCHER J.E., SPECTOR A.A. and ASHBROOK J.D. (1970). Analysis of macromolecule- ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants. Biochem. , 9 , 23, 4580-4587.

FLORENCE T.M. (1977). Trace metal species in fresh waters. Water Res. , 11 , 681-687.

FRIMMEL F.H. und GEYWITZ J. (1983). Zur koordinativen binding von metallionen an gewässerhuminstoffe. Fresenius Z.Anal.Chem. , 316, 582-588.

GAMBLE D.S., SCHNITZER M. and HOFFMAN I. (1970). Cu²⁺-fulvic acid chelation equilibrium in 0,1M KCl at 25.0 °C. Can. J. Chem. , 48 , 3197-3204.

GARDINER J. (1974). The chemistry of cadmium in naturel water. I. A study of cadmium complex formation using the cadmium specific ion electrode. Water Res. , 8 , 23-30.

GHOSH K. and SCHNITZER M; (1979). UV and Visible absorption spectroscopic investigations in relation to macromoleculare characteristics of humic substances. J. Soil Sci. , 30, 735-745.

GIANNISSIS D. et MARTIN G. (1984). Enrichissement des sédiments marins en cuivre par l'intermédiaire des substances humiques. Environ. Tech. Let. , 5 , 497-504.

GIANNISSIS D. (1986). Etude des interactions des substances humiques avec les cations de métaux lourds. Thèse 3^{ème} cycle - Université RENNES I.

GIESY J.P.Jr, LEVERSE G.T. and WILLIAMS D.R. (1977). Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to simocephalus serrulatus (daphnidae) and gamusia affinis (poecilidae). Water Res. , 11 , 1013-1020.

GILBERT B.C., LAKIN J.P. and NORMAN R.O.C. (1972). Electron spin resonance studies. Part XXXIV. The use of the acid-anion from nitromethane as a spin trap for organic radicals in aqueous solution. J. Chem. Soc. , Perkin II, 1272-1279.

GREEN J.H.S. (1961). Interpreted infra-red spectra. J. Chem. Soc. , 3 , 2236-2240.

HAAS C.N. and KAPLAN B.M. (1985). Toluene-Humic acid association equilibria: isopiestic measurements. Environ. Sci. Technol. , 19 , 643-645.

HAIDER K. and SCHULTEN H.R. (1985). Pyrolysis field ionization mass spectrometry of lignins, soil humic compounds and whole soil. J. Anal. Appl. Pyroly. , 8 , 317-331.

HART B.T. (1981). Trace metal complexing capacity of natural waters: a review. Environ. Tech. Letters, 2, 95-110.

HATCHER P.G. MACIEL C.E. and DENNIS L.W. (1981). Aliphatic structure of humic acids; a clue to their origin. Org. Geochem. , 3 , 43-48.

HIDALGO A. et C. OTERO (1960). Spectres d'absorption infra-rouge du phénol et des diphénols. Spectrochimica Acta , 16 , 528-539.

HINE P.T. and BURSILL D.B. (1984). Permeation chromatography of humic acid. Problems associated with sephadex gel. Water Res. , 18 , 11, 1461-1465.

HULJEV D. and STROHAL P. (1983). Physico-chemical processus of humic acid-trace element interactions. Mar. Biol. , 73, 243-246.

JACOBSEN E. and LINDSETH H. (1976). Effect of surfactants in differential pulse polarography. Anal. Chim. Acta , 86, 123-127.

KALINOWSKI E., et BLONDEAU R. (1985). Caractéristiques des composés humiques de sédiments estuariens récents. Vie mar. , 7, 61-68.

KALINOWSKI E. (1987). Etude des composés humiques de sédiments estuariens récents. Thèse de Doctorat de l'Université (Géoscience)- Université LILLE I.

KETELSLEGERS J.M., PIRENS G., MAGHUIN-ROGISTER G., HENNENG G., FRERE J.M. (1984). The choice of erroneous models of hormone-receptor interactions: a consequence of illegitimate utilisation of Scatchard graphs. Biochem. Pharmacol. , 33 , 5, 707-710.

KHAN S.U. and SCHNITZER M. (1971). The potassium permanganate oxidation of methylated and unmethylated humic acids extracted from solonetz, solod and chernozem Ah horizons. Israel J. Chem. , 9 , 667-677.

KLEINHEMPEL D. (1970). Ein beitrag zur theorie des huminstoffzustand. Albrecht. Thaer Archiv. , 14, 3-14.

KLOTZ I.M. (1946). The application of the law of mass action to binding by proteins. Interactions with calcium. Arch. Bioch. , 9 , 109-117.

KLOTZ I.M. (1982). Numbers of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies. Science , 217, 1247-1249.

KLOTZ I.M. and HUNSTON D.L. (1971). Properties of graphical representation of multiple classes of binding sites. Biochem. , 10 , 16, 3065-3069.

KOLTHOFF I.M. and LINGANE J.J. (1952). Polarography, vol. I, Interscience Publishers, New York, London.

KONONOVA M.M. (1966). Soil organic matters. 2nd Oxford Ed. Pergamon Press London.

KOSINKIEWICZ B. (1977a). Humic-like substances of bacterial origin. I- Some aspects of the formation and nature of humic-like substances produced by pseudomonas. Acta Microbiol. Polonica , 26 , 4, 377-386.

KOSINKIEWICZ B. (1977b). Humic-like substances of bacterial origin. II- Fractionation of the bacterial humic-like substances by gel filtration on sephadex gels. Acta Microbiol. Polonica , 26 , 4, 387-392.

KOSINKIEWICZ B. (1977c). Humic-like substances of bacterial origin. III- Production of humic-like substances by pseudomonas acidovorans in media containing certain benzene derivatives. Acta Microbiol. Polonica , 26 , 4, 393-401.

KOZARAC Z., COSOVIC B. and VOJVODIC V. (1986). Effects of natural and synthetic surface active substances on the electrochemical reduction of cadmium in natural waters. Water Res. , 20 , 3, 295-300.

LANDRUM P.E., NEHART S.R., EADLE and GARDNER W.S. (1984) . Reverse-phase separation method for determining pollutant binding to Aldrich humic acid and dissolved organic carbon of natural waters. Environ. Sci. Technol. , 18 , 3, 187-192.

LIAO W., CHRISTMAN R.F., JOHNSON J.D. and MILLINGTON D.S. (1982). Structural characterization of aquatic humic material. Environ. Sci. Technol. , 16, 403-410.

LINGANE J.J. (1935). Interpretation of the polarographic waves of complex metal ions. Chem. Rev. , 29 , 1-35.

LING ONG H. and BISQUE R.E. (1968). Coagulation of humic colloids by metals ions. Soil Sci. , 106 , 3, 220-224.

MALCOLM R.L. and Mc CARTHY P. (1986). Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. Environ. Sci. Technol. , 20 , 9, 904-911.

MALLEVIALLE J. (1974). Les agents complexants naturels des eaux. Etude des propriétés physico-chimiques des matières humiques et de leur transformation par ozonation. Thèse, Université de Toulouse.

MANKA J. and REBHUN M. (1982). Organic groups and molecular weight distribution in tertiary effluents and renovated waters. Water Res. , 16 , 4, 399-403.

MAXIMOV O.B., SHVETS T.V. and EIKIV Y.N. (1977). On permanganate oxidation of humic acids. Geoderma , 19 , 63-78.

Mc KNIGHT D.M., FEDER G.L., THURMAN E.M., WERSHAW R.L. and WESTALL J.C. (1983). Complexation of copper by aquatic substances from different environments. Sci. Total Environ. , 28, 65-76.

Mc PHERSON G.A. and SUMMERS R.J. (1986). The characteristics of low and high affinity ³H-prazosin binding to membranes from renal cortex. Biochem. Pharmacol. , 35 , 515-520.

MINDERMAN G. (1979). A tentative approach to the molecular structure of humic acids: the spectral evidence for a derivative of humic acids from plant borne esters. 2- Infrared and chemical analysis. J. Agr. Sci. , 27, 153-160.

MIKITA M.A., STEELINK C. and WERSHAW R.L. (1981). Carbon-13 enriched nuclear magnetic resonance method for the determination of hydroxyl functionality in humic substances. Anal. Chem. , 53 , 1715-1717.

MÜLLER E., SCHICK A. et SCHEFFLER K. (1959). Oxygen radicals XI.4 Phenyl-2,6 di-(tert-butyl) phenoxy. Chem. Ber. , 92 , 474-482.

MURRAY K. and LINDER P.W. (1983). Fulvic acids: structure and metal binding. I- A random molecular model. J. Soil Sci. , 34, 511-523.

NAGASE H., OSE Y., SATO T. and ISHIKAWA T. (1984). Mercury methylation by compounds in humic material. Sci. Total Environ. , 32, 147-156.

NEUBECKER T.A. and ALLEN H.E. (1983). The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. Water Res. , 17 , 1-14.

NETA P. and FESSENDEN R.W. (1974). Hydroxyl radical reactions with phenols and anilines as studied by electron spin resonance. J. Phys. Chem. , 78 , 5, 523-529.

NEYROUD J.A. and SCHNITZER M. (1975). The alkaline hydrolysis of humic substances. Geoderma , 13, 171-188.

NISSENBAUM A. and KAPLAN I.R. (1972). Chemical and isotopic evidence for the in situ origin of marine humic substances. Limn. Oceanogr. , 17 , 4, 570-582.

NORBY J.G., OTTOLENGHI P., JENSEN J. (1980). Scatchard plot: common misinterpretation of binding experiments. Analyt. Biochem., 102, 318-320.

NORMAN R.O.C., STOREY P.M. and WEST P.M. (1970). Electron spin resonance studies. XXV. Reactions of the sulfate radical anion with organic compounds. J. Chem. Soc., B, 1087-1095.

O'NEIL P., STEENKEN S. and SCHULTE-FROHLINDE D. (1975). Formation of radical cations of methoxylated benzenes by reaction with OH radicals, Ti^{2+} , Ag^{2+} , and SO_4^- in aqueous solution. An optical and conductometric pulse radiolysis and in situ radiolysis electron spin resonance study. J. Phys. Chem., 79, 25, 2773-2779.

O'SHEA T.A. and MANCY K.H. (1976). Characterization of trace metal-organic interactions by anodic stripping voltammetry. Anal. Chem. , 43 , 11, 1603-1607.

PERDUE M.E. and LYTE R.C. (1983). Distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances. Environ. Sci. Technol., 17, 654-660.

POMMERY J., POMMERY N., IMBENOTTE M., LHOPITAUT, ERB F. (1982). Incidence de l'ozonation sur les capacités complexantes des matières humiques vis-à-vis de quelques métaux. Rev. Fr. Sci. de l'eau , 1 , 4, 309-317.

POMMERY J. (1985). Caractérisation, incidences physico-chimiques et répercussions écotoxicologiques de la présence des substances humiques dans l'eau. Thèse Doctorat ès-Sciences Pharmaceutiques. Université LILLE II.

POMMERY J., IMBENOTTE M. et ERB F. (1985). Relation entre toxicité et formes libres de quelques métaux traces. Environ. Pollution , série B , 9, 127-136.

POMMERY J., EBENGA J.P., IMBENOTTE M., PALAVIT G., and ERB F. (1987). Etude de la complexation du cadmium par un acide humique de référence. (Water Res. Accepté le 26 Mai 1987).

QUENTEL F., MADEC C., COURTOT-COUPEZ J. (1986). Influence of dissolved organic matter on the lead determination in seawater by anodic stripping voltammetry. Water Res. , 20 , 3, 325-333.

RAMAMOORTHY S. and KUSHNER D.J. (1975). Heavy metal binding components of river water. J. Fish. Res. Board Can. , 32, 1755-1766.

RECHNITZ G.A. and KENNY N.C. (1970). Determination of nitrilotriacetic acid (NTA) with ion-selective membrane electrodes. Anal. Letters , 3 , 10, 509-514.

REUTER J.H. and PERDUE E.M. (1977). Importance of heavy metal organic matter interactions in material waters. Geochim. Cosmochim. Acta , 41 , 325-334.

ROOCK J.J. (1977). Chlorination reactions of fulvic acids in natural waters. Environ. Sci. Technol. , 11 , 5, 478-482.

ROSENTHAL H.E. (1967). A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. Anal. Biochem., 20, 525-532

RUGGIERO P., INTERESSE F.S. and SCIACOVELLI O. (1979). ^1H and ^{13}C NMR studies on the importance of aromatic structures in fulvic and humic acids. Geochim. Cosmochim. Acta , 43 , 1771-1775.

RUGGIERO P, INTERESSE F.S., CASSIDEI L. and SCIACOVELLI O. (1980). ^1H NMR spectra of humic and fulvic acids and their peracetic oxidation products. Geochim. Cosmochim. Acta , 44 , 603-609.

RUZIC I. (1982). Thoeretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. Anal. Chim. Acta , 140, 99-113.

SAAR R.A. and WEBER J.H. (1979). Complexation of cadmium (II) with water- and soil-derived fulvic acids: effect of pH and fulvic acid concentration. Can. J. Chem. , 57 , 11, 1263-1268.

SAAR R.A. and WEBER J.H. (1980). Lead (II) complexation by fulvic acid: how it differs from fulvic acid complexation of copper (II) and cadmium (II). Geochim. et Cosmochim. Acta , 44 , 1381-1384.

SADTLER Handbook of proton NMR spectra (1978).

SCATCHARD G. (1949). The attractions of small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. , 51, 660-672.

SCATCHARD G., SCHEINBERG I.H. and ARMSTRONG Jr S.H. (1950). Physical of protein solutions. IV. The combination of human serum albumin with chloride ion. J. Amer. Chem. Soc. , 72, 535-540.

SCHNITZER M. and DESJARDINS J.G. (1962). Molecular and equivalent weights of the organic matter of a podzol. Soil Sc. Soc. Am. Proc. , 26, 362-365.

SCHNITZER M. and GUPTA (1965). Determination of acidity in soil organic matter. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. , 29 , 274-277.

SCHNITZER M. and SKINNER S.I.M. (1965). Organo-metallic interactions in soils: 4- Carboxyl and hydroxyl groups in organic matter and metal retention . Soil Sci. , 99 , 4, 278-284.

SCHNITZER M. and KHAN S.U. (1972). Humic substances in the environment. Marcel Dekker Inc., New York.

SCHNITZER M. and INES ORTIZ DE SERRA M. (1973). The chemical degradation of a humic acid. Can. J. Chem. , 51 , 1554-1566.

SCHNITZER M. and SKINNER S.I.M. (1974). The peracetic acid oxidation of humic substances. Soil Sci. , 118 , 5, 322-331.

SCHWARZENBACH G. (1950). Metal complexes with polyamines. Hev.Chim.Acta , 33, 947-962.

SHUMAN M.S. and WOODWARD Jr G.P. (1973). Chemical constants of metal complexes from a complexometric titration followed with anodic stripping voltammetry. Anal. Chem. , 45, 12, 2032-2035.

SHUMAN M.S. and WOODWARD Jr G.P. (1977). Stability constants of copper organic chelates in aquatic samples. Environ. Sci. Technol. , 11 , 8, 809-813.

SRIVASTAVA S.P., GUPTA V.K., SHARMA R.G. and SINGH B.P. (1981). Kinetics of Ag(I) catalysed oxidation of alicyclic alcohols by peroxydisulphate. Indian J. Chem. , 20A , 1221-1223.

STEEKEN S., O'NEIL P. and SCHULTE-FROHLINDE D. (1977). Formation of radical zwitterions from methoxylated benzoic acids. 1. One electron oxidation by Ti^{2+} , Ag^{2+} and SO_4^- . J. Phys. Chem. , 81 , 1, 26-30.

STEELINK C., MIKITA M.A. and THORN K.A. (1983). Magnetic resonance studies of humates and related model compounds. Aquatic and terrestrial humic materials . Sel. pap. symposium (edited by Ann Arbor Science, Michigan), pp.83-105.

STERRIT R.M. and LESTER J.N. (1984). Comparison of methods for the determination of conditionnal stability constants of heavy metal-fulvic acid complexes. Water Res. , 18 , 9, 1149-1153.

STEVENSON F.J. (1976). Divisions-3- soil microbiology and biochemistry: stability constants of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} complexes with humic acids. Soil Sci. Soc. Am. J. , 40 , 665-672.

TAIRA Z. and TERADA H. (1985). Specific and non-specific ligand binding to serum albumin. Biochem. Pharmacol. , 34 , 11, 1999-2005.

TAKAMATSU T and YOSHIDA T. (1978). Determination of stability constants of metal-humic acid complexes by potentiometric titration and ion-selective electrodes. Soil Sci. , 25 , 6, 377-386.

TANFORD C. (1961). Physical Chemistry of macromolecules, New York, N.Y., Wiley, pp526-546.

TOLLIN G. and STEELINK C. (1966). Biological polymers related to catechol; electron paramagnetic resonance and infra-red studies of melanin, tanin, lignin, humic acid and hydroxyquinones. Biochem. Biophys. Acta, 112, 2, 377-379.

TORRI G. et TORRI J. (1986). Caractérisation de substances humiques isolées à partir d'eaux de mer issues de la lagune du Brus. Vie mar. , 7, 69-73.

TUSCHALL Jr J.R. and BREZONIK P.L. (1983). Application of continuous flow ultrafiltration and competing ligand/differential spectrometry for measurement of heavy metal complexation by dissolved organic matter. Anal. Chem. Acta, 55, 47-58

URIEN A.F. (1986). Substances humiques naturelles et de synthèse: réactivité avec l'ozone, le chlore et implications toxicologiques. Thèse de 3^{ème} cycle . Université POITIERS.

URIEN A.F., EBENGA J.P., IMBENOTTE M., POMMERY J. and ERB F. (1986). Synthetic humic acid model - Complexing ability and toxicological effects. International Conf. Chemicals in the Environment, Lisbon, 642-649.

VANDENBERG C.M.G. and KRAMER R.J. (1979). Determination of complexing capacities of ligands in natural waters and conditional stability constants of the copper complexes by means of manganese dioxide. Anal. Chim. Acta , 106 , 113-120.

VISSER S.A. (1983). Comparative study on the elementary composition of fulvic and humic acids of aquatic origin and from soils and microbial substrates. Water Res. , 17 , 10, 1393-1396.

VISSER S.A. (1984). Seasonal changes in the concentration and colour of humic substances in some aquatic environments. Fresh Water Biol. , 14, 79-87.

WAHDAT F. und NEEB R. (1983). Einfluss von nitroverbindungen und von teinsiden auf die inversvoltametrische bestimmung von cadmium, blei und kupfer. Vergleich inverse differentielle pulsepolarographic und inverse chromopotentiometric (potentiometric stripping analysis). Fresenius Z. Anal. Chem. , 316, 770-773.

WANG S.M. and GILPIN R.K. (1983). Cadmium 113 and Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectrometry of cadmium-amino acid complexes. Anal. Chem. , 55 , 493-497.

WEBER J.H. and WILSON S.A. (1977). Fulvic acid-metal ion interactions in water. Water Research Center. Research report n° 14. University of New Hampshire, Darham, 45p.

WERSHAW R.L. and PINCKNEY D.J. (1973). The fractionation of humic acids from natural water systems. Jour. Research U.S. Geol. Survey , 1 , 3, 361-366.

WERSHAW R.L., PINCKNEY D.J. and BOOKER S.E. (1977). Chemical structure of humic acids. Part 1: A generalized structural model. Jour. Research U.S. Geol. Survey , 5 , 5, 565-569.

WERSHAW R.L., MIKITA M.A. and STEELINK C. (1981). Direct ¹³C NMR evidence for carbohydrate moieties in fulvic acids. Environ. Sci. Technol. , 15 , 12, 1461-1463.

WILSON S.A and WEBER J.H (1977). A comparative study of number-average dissociation-corrected molecular weights of fulvic acids isolated from water and soil. Chem. Geol. , 19, 285-293.

WILSON S.A., HUTH T.C., ARNDT R.E. and SKOGERBOE R.K. (1980). Voltammetric methods for determination of metal binding by fulvic acid. Anal. Chem. , 52 , 9, 1515-1518.

ZEMEL H. and FESSENDEN R.W. (1975). Electron spin resonance studies of phenol and pyridyl radicals in aqueous solution. J. Phys. Chem. , 79 , 14, 1419-1427.

ZUNINO H., PEIRANO P., AGUILERA M. and ESCOBAR I. (1972). Determination of maximum complexing ability of water-soluble complexants. Soil Sci. , 114 , 6, 414-416.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I

**LIMITES ACTUELLES DANS LA CONNAISSANCE DE LA STRUCTURE
ET DES PROPRIETES COMPLEXANTES DES SUBSTANCES HUMIQUES**

1. Rappels sur les différentes origines des substances humiques	5
2. Rappels sur les interactions en milieu hydrique	7
2.1. Complexation des cations métalliques	7
2.2. Autres types d'interactions	8
3. Détermination des paramètres complexants : méthodes analytiques approches théoriques couramment employées et leurs limites	9
3.1. Définition des paramètres complexants	9
3.2. Méthodes analytiques non électrochimiques	10
3.3. Méthodes électrochimiques	11
3.3.1. Méthodes polarographiques	11
3.3.1.1. Polarographie classique à courant continu	13
3.3.1.2. Polarographie différentielle pulsée	15
3.3.1.3. Polarographie impulsionnelle différentielle à redissolution anodique (PIDRA)	17
3.3.1.4. Applications de la PIDRA	18
3.3.1.4.1. Utilisation de l'intensité de courant de redissolution anodique (i) pour la détermination des concentrations en métal libre	18
3.3.1.4.2. Utilisation des concentrations en métal libre pour le calcul de la constante conditionnelle de stabilité (K')	19
3.3.1.4.3. Utilisation du potentiel de demi-vague ($E_{1/2}$) pour la détermination de la constante conditionnelle de stabilité (K')	26
3.3.1.5. Limites d'utilisation des données polarographiques	28
3.3.1.5.1. Modification de la force ionique du milieu	28
3.3.1.5.2. Existence de phénomènes d'adsorption au niveau de l'électrode	31
3.3.1.5.3. Perturbation du courant d'électrolyse	32
3.3.1.5.4. Importance du choix du potentiel de préélectrolyse	33
3.3.1.5.5. Non respect de la cinétique de formation de complexe	33
3.3.1.5.6. Variabilité des conditions et valeurs expérimentales	34
3.3.2. Méthode potentiométrique par électrode sélective d'un ion	34
3.3.2.1. Détermination des paramètres complexants	37
3.3.2.1.1. Capacité complexante et constante de stabilité pour des complexes 1:1	37
3.3.2.1.2. Constante de stabilité pour des complexes faisant intervenir un nombre moyen de sites	38
3.3.2.1.3. Constante de stabilité pour des complexes faisant intervenir des classes différentes de sites	39
3.3.2.2. Limites d'utilisation de l'électrode sélective d'un ion	40



4. Rappels sur la composition structurale des substances humiques	44
4.1. Eléments structuraux communs	44
4.2. Quelques différences structurales	45
4.2.1. Composition élémentaire des substances humiques	46
4.2.2. Taille moléculaire des substances humiques	47
4.3. Schémas structuraux existants	48
5. Essais de modélisation	53
5.1. Modélisation par le calcul	54
5.2. Modélisation par voie de synthèse	54
5.2.1. Synthèse bactérienne	54
5.2.2. Synthèse chimique	55
6. Conclusion : insuffisance de caractérisation	56

CHAPITRE II

DEFINITION D'UNE DEMARCHE ANALYTIQUE :

APPLICATION A UN MATERIEL HUMIQUE EXISTANT

1. Choix des méthodes pour la caractérisation structurale	59
1.1. Détermination de la taille moléculaire	59
1.2. Spectrophotométrie UV	60
1.3. pHmétrie	60
1.4. Spectrométrie infra-rouge	61
1.4.1. Principe de la spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier	61
1.4.2. Principe de fonctionnement de l'interféromètre de MICHELSON	62
1.4.3. Avantages présentés par l'IRTF	66
1.5. Spectrométrie de résonance paramagnétique électronique (RPE)	67
1.6. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	67
2. Méthodes électrochimiques et mathématiques retenues pour l'étude des propriétés complexantes	68
2.1. Matériel et méthodes	68
2.1.1. Conditions polarographiques	69
2.1.2. Conditions d'analyse potentiométrique	70
2.2. Etude cinétique	70
2.3. Méthodes mathématiques pour le traitement des résultats électrochimiques	70
2.3.1. Formulation de KLOTZ	71
2.3.1.1. Cas d'une molécule présentant un seul site de complexation	71
2.3.1.2. Cas d'une molécule présentant n sites de complexation de même nature	72
2.3.2. Formulation de SCATCHARD	73
2.3.2.1. Principe	73
2.3.2.2. Analyse de FLETCHER	74
2.3.2.3. Détermination des paramètres complexants : constante de stabilité et nombre de sites	77
2.3.2.3.1. Première méthode : exploitation des pentes asymptotiques et des valeurs limites de la courbe expérimentale	77
2.3.2.3.2. Deuxième méthode : ajustement de courbes	82

3. Application à l'acide humique FLUKA (AHF)	83
3.1. Caractérisation structurale	83
3.1.1. Taille moléculaire	83
3.1.2. Résultats de la spectrophotométrie UV	84
3.1.3. Résultats du dosage des tanins et lignines	86
3.1.4. Résultats de l'analyse pHmétrique	87
3.1.5. Caractéristiques infra-rouge	90
3.1.6. Résultats de la RPE	96
3.2. Propriétés complexantes	100
3.2.1. Cinétique de complexation du cadmium	100
3.2.2. Recherche par RMN ¹¹³ Cd de différents types de sites de complexation	100
3.2.3. Résultats de l'étude électrochimique	103
3.2.4. Détermination des paramètres complexants par la formulation de SCATCHARD	105
3.3. Discussion	108

CHAPITRE III

**PREMIER ESSAI DE MODELISATION : SYNTHÈSE A PARTIR
DE L'HYDROQUINONE**

1. Procédé de synthèse	110
1.1. Choix de la molécule de départ	110
1.2. Choix du milieu réactionnel oxydant	110
1.3. Déroulement de la synthèse du modèle humique hydroquinone (MHH)	111
1.4. Isolement de la forme moléculaire	112
2. Caractérisation du MHH	112
2.1. Etude structurale	112
2.1.1. Taille moléculaire	112
2.1.2. Etude par spectrophotométrie UV	113
2.1.3. Etude par pHmétrie	116
2.1.4. Etude par spectrométrie infra-rouge	118
2.1.4.1. Etude du MHH	118
2.1.4.2. Etude des différentes fractions	121
2.1.5. Etude par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H)	124
2.2. Propriétés complexantes	126
2.3. Conclusion	128



CHAPITRE IV

**PRESENTATION D'UN MODELE HUMIQUE ORIGINAL OBTENU PAR
SYNTHESE A PARTIR DE L'ACIDE GENTISIQUE**

1. Mode opératoire pour la synthèse du modèle humique gentisique (MHG)	130
1.1. Milieu réactionnel et déroulement de synthèse	130
1.2. Isolement de la forme moléculaire	131
2. Caractéristiques structurales	132
2.1. Analyse élémentaire	132
2.2. Détermination de la taille moléculaire	132
2.3. Etude par spectrophotométrie UV	134
2.4. Etude par pHmétrie	134
2.5. Etude par spectrométrie infra-rouge	137
2.6. Etude par RMN ¹ H et ¹³ C	141
2.6.1. Résultats obtenus par RMN ¹ H	141
2.6.1.1. En solution dans D ₂ O	141
2.6.1.2. En solution dans DMSO-d ₆	144
2.6.2. Résultats obtenus par RMN ¹³ C	147
2.7. Etude par RPE	149
3. Proposition de l'étape initiale du mécanisme de synthèse	150
3.1. Formation du radical ion sulfate ($\dot{O}SO_3^-$) et mécanismes d'attaque de composés organiques	153
3.2. Formation du radical hydroxyle ($\dot{O}H$) et mécanismes d'attaque de composés organiques	154
3.3. Application à l'acide gentisique	157
4. Propriétés complexantes	159
4.1. Etude cinétique	159
4.2. Etablissement des capacités complexantes et des constantes conditionnelles de stabilité	161

RESUME

Les substances humiques sont des composés macromoléculaires de structure essentiellement aromatique caractérisée par la présence de nombreux groupements hydroxyle et carboxyle. Elles sont considérées comme agent d'accumulation et véhicule de polluants minéraux dissous en milieu hydrique.

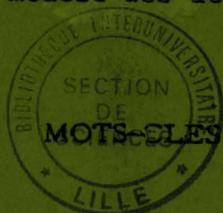
Une étude bibliographique montre que les résultats relatifs à l'évaluation des propriétés complexantes des substances humiques vis-à-vis des métaux, sont très divergents. Ceci est dû à un manque de rigueur dans l'application des moyens d'investigation analytique.

La définition d'une démarche analytique rigoureuse, basée sur l'utilisation optimisée des techniques électrochimiques et sur le traitement des données par la méthode de SCATCHARD, a été appliquée à un matériel humique existant: l'acide humique FLUKA. Cette étude a permis d'établir:

- l'insuffisance de représentativité de ce composé
- l'importance des caractéristiques structurales précisées par des techniques physico-chimiques jusqu'alors utilisées de façon dispersée
- la nécessité d'élaboration d'un modèle par synthèse chimique.

Le procédé d'ELBS, basé sur l'oxydation par l'ion persulfate, a d'abord été appliqué à l'hydroquinone. L'étude du composé obtenu a révélé l'influence de la conformation structurale sur les propriétés complexantes, mais également l'absence de groupements carboxyliques indispensables pour une bonne représentativité.

Le mode opératoire a été reconsidéré en fonction de l'importance des groupements carboxyliques et d'une polycondensation limitée. Une synthèse effectuée à partir de l'acide dihydroxy- 2,5 benzoïque a ensuite permis l'élaboration d'un modèle humique original. Son étude structurale montre l'existence de protons échangeables en RMN ^1H , de groupements méthyle et méthylène. Deux types de sites de complexation ont été mis en évidence, avec des constantes conditionnelles de stabilité d'environ 10^6 et 10^5 , rapprochant ce modèle des acides fulviques aquatiques.



Modèle humique - Structure - Infra-rouge - Résonance magnétique nucléaire - Résonance paramagnétique électronique - Complexation - Electrochimie.