

Application du couplage chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse isotopique de l'azote à l'analyse d'échantillons de drogues

F. Besacier^{1,2}, H. Chaudron-Thozet¹, F. Lascaux² et M. Rousseau-Tsangaris²

¹ Laboratoire de Police Scientifique de Lyon, 40 rue Marius Berliet, 69371 Lyon Cedex 08, France

² Laboratoire Marcel Mérieux, service Inbiomed, avenue Tony Garnier, BP. 7322, 69357 Lyon Cedex 07, France

Despite the high complexity of seized heroin samples, isotope ratio mass spectrometric determinations of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios provide relevant informations for the determination of their origin. This paper shows how isotopic determination of carbon and nitrogen from heroin itself and the impurities contained in the seized samples as well as the measurement of isotope effects occurring during acetylation of morphine and desacetylation of heroin are used as markers of the geographical origin of these drugs of abuse.

Introduction

La spectrométrie de masse isotopique, appliquée aux atomes d'azote (^{15}N , ^{14}N), est une technique reconnue et largement utilisée dans le domaine de la géochimie, notamment pour retracer la biosynthèse de la matière organique dans la géosphère [1]. C'est aussi un outil essentiel pour étudier l'origine et l'évolution des nitrates dans les systèmes aquifères, permettant entre autres la compréhension des processus naturels de dénitrification [2,3]. Enfin, on trouve des applications dans la détection des fraudes, avec, par exemple,

l'authentification d'origine géographique de l'ivoire d'éléphant [4,5].

Cependant, dans le domaine des drogues, l'utilisation de la spectrométrie de masse isotopique pour comparer les saisies s'est limitée jusqu'à présent aux isotopes du carbone (^{13}C , ^{12}C) [6-11], souvent en complément de techniques plus classiques comme l'analyse des impuretés [7,11].

Avant tout, l'explication est technologique. En effet, il est indispensable de se rappeler que la composition des échantillons de drogue est très complexe, du fait de la présence de nombreuses impuretés liées à la préparation ou au coupage. Par conséquent, l'analyse isotopique de tels échantillons nécessite une séparation préalable des différents constituants. Pour les isotopes du carbone, cela a été rendu possible avec l'arrivée, et surtout la maîtrise, du couplage Chromatographie Gazeuse - Combustion - Spectrométrie de Masse Isotopique (CG-C-SMI ou CG-SMI), qui permet la détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de plusieurs composants d'un même mélange [12]. Par contre, l'utilisation de ce type de couplage pour la mesure des rapports isotopiques $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ n'est apparue que très récemment [13]. Il était donc intéressant d'évaluer le potentiel de la CG-SMI de l'azote pour caractériser des échantillons de drogue, et plus particulièrement d'héroïne, sachant qu'en France cette dernière reste plus consommée que la cocaïne ou l'ecstasy.

Réactifs et standards

Les standards caféine, quinoxaline et nicotine ont été achetés chez Sigma ; la diacétylmorphine chlorhydrate chez Sanofi-Francopia. Une solution « 15MIX » contenant les trois molécules caféine, quinoxaline et nicotine est réalisée dans un mélange éthanol/chloroforme (1/1) à une concentration de 2 mg/mL. La diacétylmorphine chlorhydrate est dissoute dans de l'éthanol pour une concentration finale de 20 mg/mL.

Analyse par couplage Analyse Élémentaire - Spectrométrie de Masse Isotopique (AE-SMI)

Les standards caféine, quinoxaline, nicotine et diacétylmorphine ont été analysés individuellement par un spectromètre de masse isotopique Micromass Optima couplé à un analyseur élémentaire Carlo Erba. La molécule traverse alors successivement deux réacteurs de combustion et de réduction pour produire H_2O , N_2 et CO_2 . L'eau est ensuite captée par un piège chimique, et le CO_2 séparé du N_2 par chromatographie. Les rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ sont ainsi déterminés sur une même analyse.

La valeur du rapport isotopique est exprimée dans l'unité suivante :

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = [R_E / R_S - 1] \times 10^3.$$

Où R_E est le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de l'échantillon, R_S celui de la référence (azote atmosphérique, $R_S = 3676,5$ ppm [14]). Pour l'analyse de routine, les échantillons sont analysés en référence à une bouteille de N_2 de haute pureté (Air Products), elle-même étalonnée par rapport à l'azote atmosphérique ainsi qu'à l'aide de standards internationaux.

Analyse par couplage Chromatographie Gazeuse - Spectrométrie de Masse Isotopique (CG-SMI)

Les échantillons d'héroïne fournis par le Laboratoire de Police Scientifique de Lyon sont dissous dans du chloroforme pour obtenir une concentration en caféine ou en diacétylmorphine équivalente à celle des standards.

Le système utilisé est une modification de celui déjà décrit pour l'analyse isotopique du carbone des échantillons d'héroïne [10-11]. Il consiste en un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 series II couplé avec un spectromètre de masse isotopique Micromass Optima. L'interface est composée d'un four de combustion chauffé à 840°C contenant des granules d'oxyde de cuivre, d'un four de réduction chauffé à 500°C contenant des granules de cuivre, et d'un piège à $\text{H}_2\text{O}/\text{CO}_2$ à la température de l'azote liquide (Fig. 1). La séparation des différents constituants des échantillons est réalisée avec une colonne capillaire DB-1 (J&W Scientific), de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et $0,25\ \mu\text{m}$ d'épaisseur de film. Les conditions chromatographiques étaient les suivantes : injection en mode splitless, pression en tête de colonne fixée à 100 kPa, température de l'injecteur à 260°C , température de l'interface

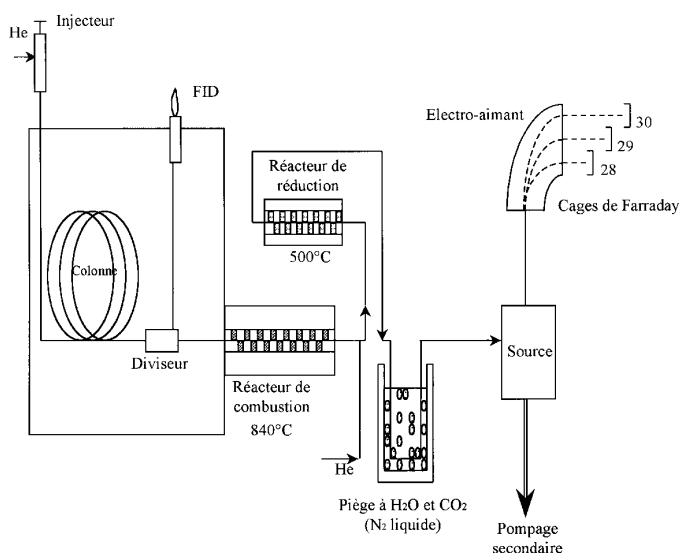


Figure 1. Schéma du couplage CG-SMI pour la détermination du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Isotopic analysis

entre le chromatographe et le four de combustion à 300 °C. La programmation de four du chromatographe était la suivante : pour la solution 15MIX, 50 °C pendant 1 min, 35 °C/min jusqu'à 120 °C, 10 °C/min jusqu'à 240 °C, puis 30 °C/min jusqu'à 290 °C avec un plateau de 5 min ; pour l'analyse de la caféine dans les échantillons d'héroïne, 110 °C pendant 1 min, 30 °C/min jusqu'à 290 °C, avec un plateau de 15 min ; pour l'analyse de la diacétylmorphine dans les échantillons d'héroïne, 180 °C pendant 1 min, 30 °C/min jusqu'à 290 °C, avec un plateau de 12 min.

Le pic de solvant est orienté vers le détecteur à ionisation de flamme au moyen d'une vanne « heart-split » ouverte au moment de l'injection. Cette vanne est ensuite fermée quelques minutes avant élution du pic de la molécule d'intérêt pour permettre son orientation vers l'interface du CG-SMI. La mesure du rapport isotopique ¹⁵N/¹⁴N est accomplie par comparaison au gaz de référence injecté au départ et à la fin de l'analyse, c'est-à-dire quand la vanne « heart split » est en position ouverte.

Résultats et discussion

Les valeurs de rapport isotopique des standards, obtenues par couplage CG-SMI sont en adéquation avec celles obtenues par couplage AE-SMI, avec des écarts entre les deux techniques inférieurs à 0,5 ‰ (Tab. I). Ces résultats démontrent l'absence de fractionnement isotopique pendant l'analyse par CG-SMI, condition *sine qua non* à l'utilisation du couplage. La figure 2 présente un chromatogramme obtenu par CG-SMI pour le standard diacétylmorphine.

Authentification d'origine de l'héroïne

Les résultats obtenus par CG-SMI pour la diacétylmorphine contenue dans les échantillons d'héroïne sont rassemblés dans le tableau II et représentés sur la figure 3. Deux types d'échantillons ont été analysés, ceux dont l'héroïne est sous forme base (B), avec des couleurs allant du beige clair au marron, et ceux dont l'héroïne est sous forme chlorhydrate (H), avec des couleurs allant du blanc au jaune pâle.

Ces échantillons ont été analysés en triplicats et les écart types mesurés sont inférieurs à 0,5 ‰. Tout d'abord, on

Tableau I. Comparaison des valeurs de rapport isotopique des standards mesurées par AE-SMI et CG-SMI

Molécule	%N	$\delta^{15}N_{\text{‰}}$ AE-SMI	$\delta^{15}N_{\text{‰}}$ CG-SMI	Différence
Caféine	28,85	-0,55	-0,98	0,43
Quinoxaline	21,53	-2,85	-3,06	0,21
Nicotine	17,27	-5,01	-4,61	-0,40
Diacétylmorphine	3,79	-2,25	-2,74	0,49

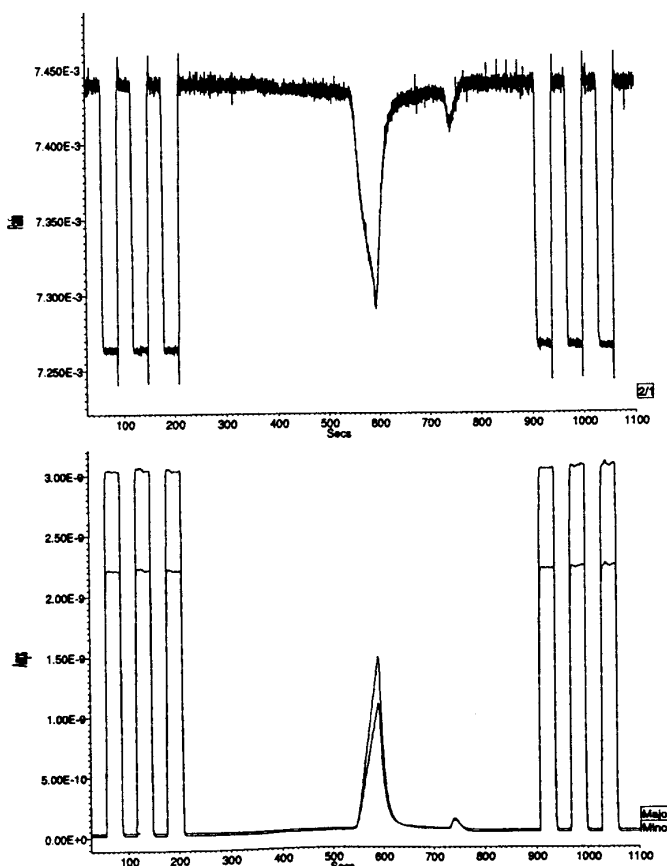


Figure 2. Analyse du standard diacétylmorphine par CG-SMI de l'azote. En bas, ionogrammes des masses 28 (major) et 29 (minor) ; en haut, tracé du rapport 29/28.

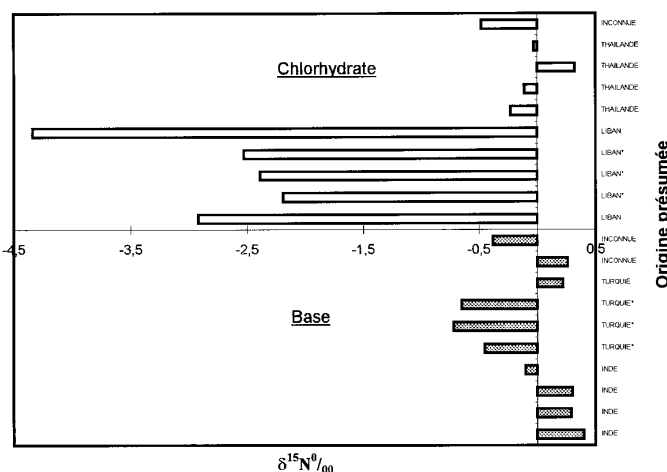


Figure 3. Valeurs du rapport isotopique ¹⁵N/¹⁴N des diacétylmorphines par CG-SMI.

peut noter que les échantillons issus d'une même affaire (marqués avec une astérisque dans le Tab. II et la Fig. 3), et donc ayant une forte probabilité d'être identiques, ont des valeurs de rapport isotopique non significativement différentes (test de Student, $\alpha = 5\%$). Cela confirme la puissance de l'analyse isotopique pour déterminer les échantillons issus d'un même lot de fabrication. D'autre part, au regard de la distribution des valeurs en fonction des origines présumées des échantillons (Fig. 3), on peut conclure que l'analyse isotopique du ^{15}N ne permet pas, à elle seule, de déterminer l'origine géographique de toutes les héroïnes. En effet, les valeurs de rapport isotopique sont comprises dans un intervalle trop restreint de bornes $-4,34$ et $+0,40\ \delta\text{‰}$. Cela correspond avec les résultats obtenus par l'équipe du Pr. Schmidt à Freising [15]. Néanmoins, l'analyse isotopique du ^{15}N permet de distinguer les origines libanaise et thaïlandaise, et notamment d'attribuer à l'échantillon H10 une provenance de Thaïlande, en accord avec des résultats antérieurs [10].

Comparaison du coupage

Les résultats obtenus par CG-SMI pour la caféine contenue dans les échantillons d'héroïne sont rassemblés dans le

tableau II et représentés sur la figure 4. Ces échantillons ont été analysés en triplicats et les écart types mesurés sont inférieurs à $0,4\ \delta\text{‰}$.

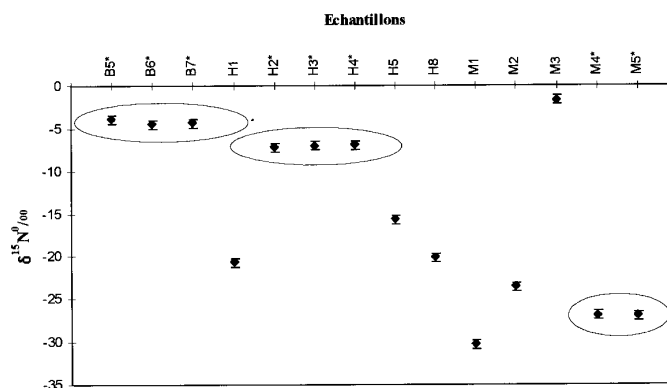


Figure 4. Valeurs du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ des caféines par CG-SMI.

Tableau II. Valeurs de rapport isotopique mesurées par CG-SMI pour les échantillons d'héroïne et de caféine. DAM : diacétylmorphine, H : héroïne chlorhydrate, B : héroïne base, M : saisies ne contenant pas de diacétylmorphine, échantillons marqués d'une astérisque « * » : issus d'une même affaire.

Échantillon	Origine présumée	% Caféine	% DAM	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ Caféine	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ DAM
B1	Inde	0	65	/	+ 0,40
B2	Inde	0	65	/	+ 0,29
B3	Inde	0	55	/	+ 0,30
B4	Inde	0	74	/	- 0,10
B5*	Turquie	5	15	- 3,89	- 0,65
B6*	Turquie	10	25	- 4,45	- 0,45
B7*	Turquie	15	20	- 4,34	- 0,72
B8	Turquie	0	46	/	+ 0,22
B9	Inconnue	0	50	/	+ 0,26
B10	Inconnue	0,5	20	/	- 0,38
H1	Liban	15	45	- 20,72	- 2,92
H2*	Liban	5	69	- 7,19	- 2,19
H3*	Liban	4,9	70	- 7,00	- 2,39
H4*	Liban	5	70	- 6,94	- 2,53
H5	Liban	20	45	- 15,68	- 4,34
H6	Thaïlande	0	70	/	- 0,23
H7	Thaïlande	0	90	/	- 0,11
H8	Thaïlande	0	90	/	+ 0,32
H9	Thaïlande	0	91	/	- 0,03
H10	Inconnue	6,3	58	- 20,14	- 0,48
M1	Inconnue	100	0	- 30,31	/
M2	Inconnue	100	0	- 23,56	/
M3	Inconnue	45	0	- 1,69	/
M4*	Hollande	51,8	0	- 26,94	/
M5*	Hollande	52,1	0	- 26,99	/

Les échantillons notés M1 à M5 correspondent à des sachets saisis chez des trafiquants, contenant de la caféine avec ou sans paracétamol. Ces sachets ne contiennent pas de produits stupéfiants, et donc leur détention n'est nullement une infraction, même si il est très probable que leur utilisation se limite au coupage des échantillons d'héroïne.

D'un point de vue global, les valeurs de rapport isotopique obtenues pour les échantillons sont comprises dans un intervalle de bornes -26.99 et -1.69 ‰, permettant, à la différence de la diacétylmorphine, une discrimination efficace des saisies.

La CG-SMI de l'azote peut donc fournir deux types d'information liée au coupage :

- déterminer si des échantillons d'héroïne saisis dans des lieux différents ont été coupés avec la même caféine,
- déterminer si un sachet de caféine saisi dans un lieu donné a servi à couper des héroïnes saisis autre part.

Conclusion

Le couplage Chromatographie Gazeuse - Spectrométrie de Masse Isotopique de l'azote permet donc de déterminer sur un même échantillon d'héroïne le rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de plusieurs alcaloïdes (caféine, diacétylmorphine). De plus, la possibilité de travailler sur plusieurs éléments (^{15}N , ^{13}C) fait de la CG-SMI un outil unique pour déterminer des lots de fabrication, retracer des filières de coupage, ou encore informer sur l'origine géographique des héroïnes saisis. Enfin, étant donné qu'on peut appliquer cette technique à de nombreuses autres drogues (cocaïne, dérivés d'amphétamines, etc.), on peut s'attendre à ce que leur utilisation se généralise au sein des laboratoires d'expertises judiciaires.

Références

1. Fogel, M. L.; Cifuentes, L. A. In: Organic geochemistry, principles and applications, Engel, M. H.; Macko, S. A. Eds., Plenum, New York, 1993; p 73-98.
2. Mariotti, A.; Mariotti, F.; Amarger, N.; Pizelle, G.; Ngambi, J.; Champigny, M.; Moyses, A. *Physiol. Veg.* **1980**, *18*, 163-181.
3. Mariotti, A.; Germon, J. C.; Hubert, P.; Kaiser, P.; Letolle, R.; Tardieux, A.; Tardieux, P. *Plant. Soil.* **1981**, *62*, 413-430.
4. Van Der Merwe, N. J.; Lee-Thorp, J. A.; Thackeray, J. F.; Hall-Martin, A.; Kruger, F. J.; Coetzee, H.; Bell, R. H. V.; Lindeque, M. *Nat* **1990**, *346*, 744-746.
5. Vogel, J. C.; Eglinton, B.; Auret, J. M. *Nat* **1990**, *346*, 747-749.
6. Liu, J. H.; Lin, W. F.; Fitzgerald, M. P.; Saxena, S. C.; Shieh, Y. N. *J. Forensic Sci.* **1979**, *24*, 814-816.
7. Desage, M.; Guilluy, R.; Brazier, J. L.; Chaudron, H.; Girard, J.; Cherpin, H.; Jumeau, J. *Anal. Chim. Acta.* **1991**, *247*, 249-254.
8. Mas, F.; Beemsterboer, B.; Veltkamp, A. C.; Verweij, A. M. A. *Forensic Sci. Int.* **1995**, *71*, 225-231.
9. Ihle, E.; Schmidt, H. L. *Isotopes Environ. Health Stud.* **1996**, *32*, 226-228.
10. Besacier, F.; Guilluy, R.; Brazier, J. L.; Chaudron-Thozet, H.; Girard, J.; Lamotte, A. *J. Forensic Sci.* **1997**, *42*, 429-433.
11. Besacier, F.; Chaudron-Thozet, H.; Rousseau-Tsangaris, M.; Girard, J.; Lamotte, A. *Forensic Sci. Int.* **1997**, *85*, 113-125.
12. Matthews, D. E.; Hayes, J. M. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1465-1473.
13. Macko, S. A.; Uhle, M. E.; Engel, M. H.; Andrusevich, V. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 926-929.
14. Junk, G. A.; Svec, H. J. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **1958**, *14*, 234-243.
15. Ihle, E.; Schmidt, H. L. *Isotopes Environ. Health Stud.*, in press.