UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière, Molécules, Matériaux
Spécialité : Chimie Analytique

Par
Valentin JOUBERT

Analyse isotopique positionnelle pour les sciences forensiques : Développement et utilisation de la spectrométrie RMN quantitative ^{13}C et ^{15}N

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 30 Novembre 2018

Unité de recherche : Laboratoire CEISAM UMR CNRS 6230, UFR Sciences et Techniques de l'Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière 44322 Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Myriam MALET-MARTINO	Professeur des universités, Université de Toulouse Paul Sabatier
Isabelle BILLAULT	Maître de Conférences, Université Paris Sud

Composition du Jury :

Présidente :	Myriam MALET-MARTINO	Professeur des universités, Université de Toulouse Paul Sabatier
Examinateurs :	Isabelle BILLAULT	Maître de Conférences, Université Paris Sud
	Corinne BUISSON	Responsable Analyses Spécialisées et R&D, Agence française de lutte contre le dopage (AFLD)
	Fabrice BESACIER	Chef de la division chimie, Institut National de Police Scientifique (INPS)
Dir. de thèse :	Gérald REMAUD	Professeur des universités, Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Serge AKOKA	Professeur des universités, Université de Nantes

UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière, Molécules, Matériaux
Spécialité : Chimie Analytique

Par
Valentin JOUBERT

Analyse isotopique positionnelle pour les sciences forensiques : Développement et utilisation de la spectrométrie RMN quantitative ^{13}C et ^{15}N

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 30 Novembre 2018

Unité de recherche : Laboratoire CEISAM UMR CNRS 6230, UFR Sciences et Techniques de l'Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière 44322 Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Myriam MALET-MARTINO	Professeur des universités, Université de Toulouse Paul Sabatier
Isabelle BILLAULT	Maître de Conférences, Université Paris Sud

Composition du Jury :

Présidente :	Myriam MALET-MARTINO	Professeur des universités, Université de Toulouse Paul Sabatier
Examinateurs :	Isabelle BILLAULT	Maître de Conférences, Université Paris Sud
	Corinne BUISSON	Responsable Analyses Spécialisées et R&D, Agence française de lutte contre le dopage (AFLD)
	Fabrice BESACIER	Chef de la division chimie, Institut National de Police Scientifique (INPS)
Dir. de thèse :	Gérald REMAUD	Professeur des universités, Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Serge AKOKA	Professeur des universités, Université de Nantes

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de **l'équipe EBSI** (Elucidation de Biosynthèses et Spectrométries Isotopiques) du laboratoire **CEISAM** (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation). Je souhaiterais remercier Monsieur Bruno Bujoli et Monsieur Jean-Michel Bouler de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je tiens dans un premier temps à remercier tout particulièrement Monsieur Gérald Remaud pour sa confiance, son encadrement et ses discussions enrichissantes tout au long de ma thèse.

Je remercie également Monsieur Serge Akoka pour avoir codirigé cette thèse et pour avoir partagé son savoir et ses conseils en méthodologie RMN.

Je remercie vivement Madame Myriam Malet-Martino et Madame Isabelle Billault pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Madame Corinne Buisson pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Je remercie également l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) d'avoir financé ce projet de recherche (FRIIME).

Un grand merci à Fabrice Besacier et Virginie Ladroue pour m'avoir accueilli plusieurs semaines à l'INPS de Lyon et de m'avoir partagé de précieux conseils ainsi que le savoir-faire de la police scientifique. Je remercie également Anaïs Stemmelen pour m'avoir formé sur la GC couplée à l'irm-MS à l'INPS de Lyon et pour sa disponibilité.

Un grand merci à Virginie Silvestre pour ses nombreux conseils et ma formation sur le spectromètre RMN ainsi que Benoit Charrier pour la maintenance de la plateforme RMN et la résolution des nombreuses pannes intervenues durant ces 3 années.

Merci à Anne-Marie Schiphorst pour la formation à l'irm-MS et sa disponibilité, ainsi qu'à Mathilde Grand pour le suivi de la chromatographie flash et sa bonne humeur. Je remercie également Denis Loquet pour ses analyses HPLC et ses nombreuses blagues.

Merci à mes stagiaires Mariana Mikic, Maxime Lelièvre et Matéo Trébuchet pour leur participation à ce projet avec beaucoup d'intérêt.

Un merci tout particulier à mes collègues doctorants et post-docs qui m'ont fait passer d'excellents moments au laboratoire.

Merci tout d'abord à Monsieur le docteur Tangi Jezequel, que je côtoie depuis le master, pour les nombreuses soirées passées ensemble, notamment au Corneille et au Green Sheep mais également les voyages à Amsterdam et dans les Alpes pour le ski et pour l'énorme ambiance apportée au labo. On a aussi vécu la CDM 2014 et 2018 nous voilà champion du monde et surtout docteur, enfin pour moi on me le souhaite comme dirait Paga. T'es un mec en or, alors ne change rien !

Merci également à Jérémy Marchand (Billon) et Boris Gouilleux (la Golden Gouille) le duo infernal d'EBSI pour leur formation au photo-montage, la découverte de Philippe Buty, Océane Mélody et j'en passe… ainsi que les nombreux fous rires et le soutien apporté lors des défaites

(nombreuses) du FC Nantes. Merci au petit nouveau thésard Dylan Bouillaud (Second poteauuuuu PAVAAAARRRD !!! **) qui va assurer la relève au sein de l'équipe et inculquer les bonnes valeurs du ballon rond au laboratoire.

Un grand merci à Katarzyna Romek, dite Kasia, et à Ghina El-Hajjar pour avoir partagé le bureau avec bonne humeur au quotidien. Merci aux anciens docs d'EBSI, Maxime Julien, Laetitia Rouger et Mbaye Diaw Dioum pour les bons moments passés durant cette thèse.

Un grand merci aux autres docs du première étage, Gilles-Olivier Gratien, Katy Akoumany, Guillaume Bretel, Marie Denis, Jérome Fischer et tous les autres pour l'ambiance apportée au labo mais surtout en soirée.

Je remercie également le deuxième étage (on vous oublie pas), Florian Forato, Antoine Mazel, Joanna Boucard, Cloé Azarias, Léa Gimeno, Manon Dupleichs et tous les autres pour les bons moments passés et les nombreux verres partagés.

La liste pourrait être très longue, je remercie l'ensemble du laboratoire CEISAM et les autres membres de l'équipe EBSI, Richard Robins, Patrick Giraudeau, Estelle Martineau, Bertrand Plainchont et Jonathan Farjon que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours de ces trois années de thèse et qui ont fortement contribué au succès de celle-ci.

Un très grand merci à mes 3 compères du Pitros Elite Club (PEC) Antoine, Rémi et Loïc pour les soirées FIFA et Fortnite qui m'ont permis d'évacuer le stress que la thèse peut parfois procurer. Ainsi que les 10 jours passés en Croatie durant l'été 2017 qui était de la pure folie !

Un merci tout particulier à Sarah avec qui je partage mon quotidien depuis plus de 2 ans et qui m'a toujours encouragé et qui a surtout toujours cru en moi.

Pour finir je remercie toute ma famille et surtout mes parents qui ont toujours été présent pour moi et qui ont toujours soutenu mes choix tout au long de mes études. Je remercie ma petite sœur pour les nombreuses années de coloc passées sur Nantes et les 48 changements d'appartements (au moins) ainsi que mon petit frère (juste par l'âge) pour les nombreuses victoires que j'ai pu faire sur FIFA contre lui et qui m'ont donné beaucoup de confiance durant ma thèse.

Abréviations – Notations utilisées

DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DEPT	Distortionless Enhanced Polarization Transfer
EA	Analyseur Elémentaire
f_i	Fraction molaire
F_i	Fraction molaire statistique
f_i/F_i	Fraction molaire réduite
FS-INEPT	Full-Spectrum - Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
FRIIME	Forensic Research using Isotope Intra-Molecular Experiments
GC	Chromatographie en phase Gazeuse
GC-MS	Spectrométrie de Masse couplée à une Chromatographie en phase Gazeuse
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
INPS	Institut Nationale de la Police Scientifique
Irm-^{2}H NMR	Mesure isotopique par RMN du deutérium
Irm-^{13}C NMR	Mesure isotopique par RMN du carbone-13
Irm-^{15}N NMR	Mesure isotopique par RMN de l'azote-15
Irm-EA/MS	Mesure isotopique par Spectrométrie de Masse couplée à un Analyseur Elémentaire
Irm-MS	Mesure isotopique par Spectrométrie de Masse
KIE	Effet isotopique cinétique
MDMA	3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine
nOe	Nuclear Overhauser Effect

PCA	Analyse en Composantes Principales
PLS	Régression par les moindres carrés partiels
PSIA	Analyse Isotopique Position-Spécifique
Py-GC-irm-MS	Pyrolyse couplée à la Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques
R	Rapport isotopique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SNIF-NMR^{TM}	Site-specific Natural Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance
S/B	Rapport signal sur bruit
T_1	Temps de relaxation longitudinale
TNT	2,4,6-Trinitrotoluène
x	Abondance isotopique
$\delta^{13}C_i$	Composition isotopique en carbone-13 pour le site i d'une molécule (exprimée en ‰)
$\delta^{15}N_i$	Composition isotopique en azote-15 pour le site i d'une molécule (exprimée en ‰)
$\delta^{13}C_b$	Composition isotopique globale (bulk) en carbone-13 d'une molécule (exprimée en ‰)
$\delta^{15}N_b$	Composition isotopique globale (bulk) en azote-15 d'une molécule (exprimée en ‰)

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE ---------- **1**

PARTIE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES ---------- **5**

I-1) LES SCIENCES FORENSIQUES ET LE PROFILAGE CHIMIQUE DES STUPEFIANTS ------ **6**

I-1-1) Définition générale ---------- 7

I-1-2) Les produits stupéfiants ---------- 7

I-1-2-1) Etapes de l'élaboration de l'héroïne : les constituants majeurs de l'héroïne- 8

I-1-2-2) Etapes de l'élaboration de la cocaïne : les constituants majeurs de la cocaïne9

I-1-2-3) Trafic international ---------- 11

I-1-3) Le profilage chimique des stupéfiants ---------- 12

I-1-3-1) Historique et principe du profilage chimique ---------- 12

I-1-3-2) Etape 1 : Caractérisation du produit stupéfiant ---------- 13

I-1-3-3) Etape 2 : Choix des composés cibles ---------- 14

I-1-3-4) Etape 3 : Analyse comparative des profils chimiques ---------- 16

I-1-4) Le profilage chimique des agents de coupage ---------- 17

I-1-4-1) Pourquoi des agents de coupage ? ---------- 17

I-1-4-2) Les agents de coupage utilisés dans l'héroïne et la cocaïne de rue ---------- 18

I-1-4-3) A quel moment l'ajout des agents de coupage intervient-il ? ---------- 20

I-1-4-4) Méthode analytique utilisée par les laboratoires forensiques pour le profilage chimique des agents de coupage ---------- 21

I-1-4-5) Limites des méthodes analytiques disponibles ---------- 22

I-2) TECHNIQUES ANALYTIQUES DE MESURE DES COMPOSITIONS ISOTOPIQUES TOTALES ET POSITION-SPECIFIQUES ---------- **23**

I-2-1) Isotopes : Définition et notations ---------- 24

I-2-1-1) Isotopologues et isotopomères ---------- 25

I-2-1-2) Fractionnement isotopique ---------- 26

I-2-1-3) Effets isotopiques ---------- 26

I-2-2) Détermination de la composition isotopique totale ---------- 28

I-2-2-1) L'irm-MS ---------- 28

I-2-2-2) Avantages et limites ---------- 29

I-2-3) Détermination de la composition isotopique position-spécifique ---------- 30

I-2-3-1) La fragmentation ----- 30
I-2-3-2) Pyrolyse couplée à la SMRI (Irm-Py-GC/MS) ----- 31
I-2-3-3) La RMN quantitative ----- 32
I-2-3-4) irm-^{2}H NMR : principe, applications et limites ----- 34
I-3) LA RMN MONO-IMPULSIONNELLE ISOTOPIQUE DU ^{13}C (IRM-^{13}C NMR « ONE-PULSE ») ----- 35
I-3-1) Conditions d'acquisitions pour la RMN isotopique ----- 35
I-3-1-1) Notion de justesse et précision ----- 36
I-3-1-2) Rapport S/B et précision ----- 37
I-3-1-3) Délai de répétition (TR) et angle d'impulsion α ----- 38
I-3-2) Implantation de la RMN isotopique du ^{13}C ----- 39
I-3-2-1) Qualification d'un spectromètre : découplage et offset ----- 40
I-3-2-2) Calcul des compositions isotopiques position-spécifiques ----- 44
I-3-3) Applications et limites de la RMN isotopique du ^{13}C « one-pulse » ----- 46
I-4) VERS UN GAIN DE SENSIBILITE : LES SEQUENCES RMN MULTI-IMPULSIONNELLES POUR LA RMN ISOTOPIQUE DU ^{13}C ----- 49
I-4-1) Principe du transfert de polarisation ----- 49
I-4-2) La séquence DEPT ----- 50
I-4-2-1) Principe ----- 51
I-4-2-2) Améliorations méthodologiques pour la mesure isotopique position-spécifique ----- 52
I-4-3) La séquence INEPT refocalisée ----- 53
I-4-3-1) Principe ----- 54
I-4-3-2) Améliorations méthodologiques pour la mesure isotopique position-spécifique ----- 55
I-4-4) Comparaison de la DEPT et de l'INEPT ----- 56
I-4-5) Application en RMN isotopique du ^{13}C ----- 59
I-4-5-1) Expression des résultats : notion de profilage ----- 60
I-4-5-2) Applications avec l'émergence des études « isotopomics » ----- 61
I-5) LA RMN QUANTITATIVE DU ^{15}N ----- 63
I-5-1) Généralités sur le noyau ^{15}N ----- 63
I-5-2) Conditions quantitatives ----- 64
I-5-3) Etat de l'art ----- 65

I-5-4) Vers un gain de sensibilité : Peut-on envisager d'implémenter une séquence à transfert de polarisation pour la RMN isotopique du ^{15}N ?---65

I-6) ANALYSE STATISTIQUE : EXPLOITATION DES DONNEES ---66

I-6-1) Analyse de variance univariée---66

I-6-2) Analyse multivariée---67

I-6-2-1) L'analyse en composantes principales (PCA)---67

I-6-2-2) Méthode prédictive : régression des moindres carrés partiels (PLS) ---68

I-6-3) Algorithme de comparaison---69

I-6-3-1) Méthode de mesure de distance Euclidienne et cosinus ---69

I-6-3-2) Méthode de corrélation : Coefficients de Pearson---71

I-6-3-3) Détermination de la similarité des profils chimiques ---72

BIBLIOGRAPHIES ---73

PARTIE II :DEVELOPPEMENT DE LA RMN ISOTOPIQUE DU ^{13}C UTILISANT UN TRANSFERT DE POLARISATION SUR TOUT LE SPECTRE POUR LA MESURE EN POSITION-SPECIFIQUE (FS-INEPT)---84

II-1) INTRODUCTION ---85

II-2) ARTICLE ---87

II-3) DONNEES COMPLEMENTAIRES--- 105

II-4) CONCLUSION--- 107

PARTIE III :DEVELOPPEMENT DE LA RMN ISOTOPIQUE DU ^{15}N HAUTE PRECISION UTILISANT UN TRANSFERT DE POLARISATION POUR LA MESURE POSITION-SPECIFIQUE--- --- 108

III-1) INTRODUCTION --- 109

III-2) ARTICLE --- 110

III-3) DONNEES COMPLEMENTAIRES--- 124

III-4) CONCLUSION--- 125

PARTIE IV :APPLICATION DE LA METHODE FS-INEPT DU ^{13}C POUR L'ANALYSE « ISOTOPOMICS » DES AGENTS DE COUPAGE : UNE NOUVELLE APPROCHE POUR AIDER A L'ELUCIDATION DES TRAFICS DE DROGUES ILLEGALES --- 126

IV-1) INTRODUCTION --- 127

IV-2) ARTICLE --- 128

IV-3) DONNÉES COMPLÉMENTAIRES ---------- 151

IV-4) CONCLUSION ---------- 154

PARTIE V : APPLICATION DE LA METHODE FS-INEPT DU ^{15}N SUR LE TNT--155

V-1) INTRODUCTION ---------- 156

V-2) ARTICLE ---------- 157

V-3) DONNEES COMPLEMENTAIRES ---------- 171

V-4) CONCLUSION ---------- 172

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES ---------- 173

ANNEXES---------- ---------- 176

LISTE DES FIGURES---------- 176

LISTE DES TABLEAUX ---------- 181

VALORISATION SCIENTIFIQUE ---------- 184

Introduction générale

Dans le but de combattre le crime organisé et notamment le trafic illicite de stupéfiants international, l'institut Nationale de Police Scientifique (INPS) a recours au profilage chimique sur les éléments présents en traces dans les saisies d'héroïne et de cocaïne. Ces stupéfiants sont aujourd'hui les plus consommés dans le monde et sont principalement dilués avec des agents de coupage dit « adultérant » qui permettent d'augmenter les profits ainsi que les effets de la drogue. Bien que l'INPS soit capable de démanteler des réseaux de trafiquants grâce au profilage chimique de l'héroïne et de la cocaïne il n'existe pas de méthode efficace pour utiliser ce profilage chimique sur ces agents de coupage.

Les techniques analytiques utilisant les isotopes stables tels que le ^{13}C et le ^{15}N permettent de nous renseigner sur l'origine d'une molécule. L'objectif du projet ANR FRIIME (ANR DS0 901, novembre 2015 – Mai 2019) est donc de compléter ce profilage chimique en utilisant la teneur isotopique des molécules en questions comme marqueur intrinsèque en ^{13}C et en ^{15}N. Afin d'illustrer cette nouvelle méthodologie, les agents de coupage contenus dans l'héroïne et la cocaïne seront étudiés. Dans le cas de l'héroïne ce sont les adultérants tels que le paracétamol et la caféine que l'on retrouve en grande majorité, tandis que pour la cocaïne on retrouve principalement la phénacétine, le lévamisole et la caféine. Ces différentes molécules seront étudiées afin de mettre en évidence un profil isotopique marqueur de leur origine. De nouvelles informations sur les réseaux de trafic seront ainsi obtenues.

Aujourd'hui, la méthode d'analyse isotopique la plus utilisée est la spectrométrie de masse (irm-MS). Grâce à cette technique il est possible d'identifier deux échantillons d'une même molécule en fonction de leur teneur en isotope lourd (^{13}C ou ^{15}N par exemple) et donc de leur composition isotopique. Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle n'offre que le rapport global en isotope lourd, c'est-à-dire qu'on obtiendra qu'une valeur moyennée des différents atomes de l'élément analysé. Le projet FRIIME a pour objectif le développement de méthodes analytiques par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) capables de tracer plus « intimement » l'origine de la molécule grâce à une Analyse Isotopique en Position Spécifique (PSIA). Elle permet en effet de mesurer des compositions isotopiques sur chaque position et donc d'offrir un profilage plus détaillé que l'irm-MS. Potentiellement cette technique permettrait de comparer l'empreinte isotopique des différents agents de coupage provenant de différentes saisies faites par l'INPS et ainsi remonter à l'origine et aux différents réseaux de distribution de stupéfiants.

La problématique majeure à laquelle se confronte ce projet est la suivante : « **Est-ce que notre capacité à tracer des produits impliqués dans le trafic de stupéfiants peut être significativement améliorée en utilisant les données concernant la distribution intramoléculaire isotopique 'position spécifique' en ^{13}C et ^{15}N ?** » Pour y répondre plusieurs questions techniques et scientifiques doivent être abordées :

(i) La RMN a été développée avec succès pour la détermination des teneurs position-spécifiques isotopiques ^{2}H et ^{13}C dans une molécule. L'exemple le plus récent étant l'application du ^{13}C développée par l'équipe EBSI du laboratoire CEISAM de l'université de Nantes. Du fait de l'exigence analytique de cette méthode, est-il possible de l'améliorer en termes de sensibilité tout en gardant une précision de 0,1% ?

(ii) La RMN isotopique mesurant actuellement les compositions en ^{2}H et ^{13}C : Quelles seraient les conditions méthodologiques nécessaires afin de transposer cette technique pour mesurer la composition isotopique position-spécifique en ^{15}N ?

(iii) Comment cette nouvelle méthodologie s'applique-t-elle sur des échantillons réels de produits illicites (agents de coupage) saisis et quels seraient les avantages par rapport aux outils habituels de profilage chimique au cours d'une enquête de police ?

(iv) Quels sont les apports de cette nouvelle méthode (PSIA) au travail d'enquête de l'INPS au niveau tactique et stratégique ?

La première partie de cette thèse décrit la composition et l'élaboration des produits stupéfiants majeurs tels que l'héroïne et la cocaïne en présentant comment l'INPS utilise le profilage chimique de ces stupéfiants, de la caractérisation à l'analyse complète des profils chimiques. Un nouveau concept de profilage chimique sur les produits de coupage est également évoqué. Il s'agit de voir comment intervient le coupage des produits stupéfiants et s'il existe actuellement des techniques analytiques permettant de remonter à leur origine. Les différentes méthodes de mesures des effets isotopiques totaux et position-spécifiques retrouvées dans la bibliographie sont également présentées tels que l'irm-MS permettant l'analyse de la composition isotopique globale en ^{13}C et ^{15}N avec un écart-type de précision, en routine de 0,2‰. L'utilisation de la PSIA est également réalisable pas irm-MS mais est très peu utilisée car difficilement applicable en routine. L'évolution de la RMN isotopique ^{2}H depuis sa création en 1981 par les professeurs Martin jusqu'à aujourd'hui est également décrite, en répertoriant les différentes améliorations méthodologiques apportées, les applications et les avantages/inconvénients de chaque méthode.

La dernière avancée méthodologique concernant la séquence multi-impulsionnelle « Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer » (INEPT) utilisée pour la RMN isotopique du ^{13}C (irm-^{13}C NMR) est très largement détaillée puisque cette même séquence servira de base à l'élaboration d'une nouvelle méthodologie pour le projet FRIIME et la mesure en irm-^{13}C NMR. Celle-ci permet de transférer la sensibilité du proton sur un noyau moins sensible comme le ^{13}C ou le ^{15}N. Pour conclure avec la RMN isotopique un état de l'art sur la RMN quantitative du ^{15}N est décrit en fin de partie ainsi que la faisabilité de mettre en place la PSIA par irm-^{15}N NMR. Enfin, une description des analyses statistiques communément utilisées est présentée afin de pouvoir comparer les profils isotopiques obtenus par irm-NMR et donner naissance au concept d'« isotopomics ».

Les résultats obtenus au cours de la thèse sont portés par un article soit publié soit en cours de supervision dans des journaux internationaux. Par conséquent chaque partie comprend une introduction, une conclusion et éventuellement des données complémentaires entourant l'article.

La seconde partie porte sur un article intitulé **« Full spectrum isotopic ^{13}C NMR using polarization transfer for position-specific isotope analysis »** publié dans *Analytical Chemistry* où une nouvelle méthodologie impliquant une séquence multi-impulsionnelle a été proposée pour pallier le défaut majeur de l'INEPT utilisant les couplages courtes distances entre le ^{1}H et le ^{13}C ($^{1}J_{1H\text{-}13C}$). En effet, cette technique ne donnant aucune information sur les carbones quaternaires, une autre adaptation utilisant un transfert de polarisation entre les couplages courts et longues distances ($^{1}J_{1H\text{-}13C,}$ $^{2}J_{1H\text{-}13C,}$ $^{3}J_{1H\text{-}13C}$) du ^{1}H sur le ^{13}C appelé « Full-Spectrum Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer » (FS-INEPT) a été implantée. Les améliorations apportées, les contraintes à respecter et la robustesse de cette nouvelle méthode sont très largement abordées. La preuve de concept porte sur des échantillons de caféine naturels et synthétiques ainsi que des échantillons de paracétamol commerciaux et extraits de médicaments afin de comparer les profils isotopiques et discriminer les différentes origines, entrant dans le cadre d'étude « isotopomics ».

Une troisième partie s'articule autour d'une publication intitulée « **High-precision quantitative ^{15}N NMR using optimized polarization transfer INEPT for intramolecular ^{15}N composition determination** » et a été soumise au journal *Chemical Communications*. Elle présente les conditions nécessaires pour transposer l'irm-^{13}C NMR sur le noyau ^{15}N. La nouvelle approche FS-INEPT a été adaptée afin de s'appliquer aux contraintes du noyau ^{15}N avec l'étude de la reproductibilité d'une telle méthode. Une preuve de concept de la mesure du

fractionnement isotopique en ^{15}N du 1-methylimidazole sur colonne de silice a été réalisée pour la première fois en irm-^{15}N NMR.

Une quatrième partie expose une publication intitulée « **Isotopomics analysis by irm-^{13}C NMR on cutting agents in heroin: a new approach for illicit drugs trafficking route elucidation** » et sera soumise au journal *Forensic Science International*. La méthode FS-INEPT ^{13}C développée dans la deuxième partie est appliquée sur des échantillons réels de drogues dans le cadre d'une étude forensique. Les agents de coupage majoritaires de l'héroïne tels que le paracétamol et la caféine sont analysés en irm-^{13}C NMR et irm-MS afin d'obtenir un profil isotopique marqueur de leur origine et ainsi obtenir des informations complémentaires au profilage chimique pour suivre les différentes voies du trafic de l'héroïne.

Enfin, une cinquième partie présentant un article intitulé « **Forensic application of Position-Specific Isotopic Analysis of Trinitrotoluene (TNT): A Nuclear Magnetic Resonance method to determine ^{13}C and ^{15}N isotopic profiles** » sera soumis au journal *Talanta* et présentera une application de l'irm-^{13}C NMR utilisant la séquence mono-impulsionnelle classique ainsi que de la séquence FS-INEPT ^{15}N développée dans la partie 3 afin de dresser le profil isotopique complet d'un explosif militaire, le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT). Ces informations sur le profil isotopique du TNT servira à discriminer les différents échantillons selon leur origine.

Pour une meilleure compréhension du rapport, chaque partie portant sur une publication, acceptée ou soumise à un journal international, est précédée d'une introduction et suivie de données complémentaires et d'une conclusion. De plus, j'ai fait le choix d'utiliser seulement les abréviations anglaises car c'est beaucoup plus simple de faire le lien avec la littérature et les publications constituants ce manuscrit. Les références bibliographiques sont regroupées à la fin de chaque partie.

Partie I : Rappels bibliographiques

Le but de cette partie est de présenter les outils analytiques et la méthode de profilage chimique actuellement utilisée par l'INPS pour comparer les empreintes chimiques de l'héroïne et de la cocaïne permettant d'identifier les différents réseaux de distribution, du laboratoire clandestin au dealer. Les agents de coupage seront ensuite abordés afin de montrer les limites de leur méthode vis-à-vis de ces molécules et de l'information chimique potentiellement perdue.

La plupart des études forensiques sur la composition isotopique utilisent la mesure isotopique totale pour tenter de déterminer l'origine des stupéfiants tels que l'héroïne et la cocaïne, ainsi que sur certains agents de coupage. C'est l'irm-MS qui est employée pour ce type de mesure mais l'inconvénient est qu'elle permet seulement d'obtenir la composition isotopique moyenne des atomes ^{2}H,^{13}C,^{15}N ou ^{18}O de la molécule étudiée.

Dans l'idée de pallier ce problème, la mesure isotopique position spécifique peut être un outil apportant des informations complémentaires par l'obtention des compositions isotopiques pour chaque site carboné ou azoté. D'un point de vue historique, c'est la méthode générant des fragments après dégradation chimique ou à l'aide d'un four à pyrolyse qui a permis l'obtention de la composition isotopique site-spécifique. Malheureusement cette méthode n'est valable que sur un nombre limité de composés et n'est pas toujours réalisable en routine.

Un outil innovant mesurant la composition isotopique par irm-^{13}C NMR permet d'obtenir cette composition isotopique site-spécifique de manière répétable et reproductible une fois la molécule purifiée. Cependant cette technique répond à des conditions d'acquisition très strictes afin d'obtenir une composition isotopique avec une précision adéquate de 1‰. Toutefois l'inconvénient de cette méthode réside dans la grande quantité de produit utilisée (~200 mg) avec pour certains des temps d'expériences très longs (~1 jour).

Dans le but de combler ce manque de sensibilité, des séquences multi-impulsionnelles utilisant un transfert de polarisation ont été développées afin d'utiliser une quantité plus faible de produit. Les premiers travaux ont montré que la séquence INEPT avec quelques développements méthodologiques permet d'obtenir une reproductibilité et une précision nécessaire à la mesure de la composition isotopique des sites carbonés. Cette méthode ne donne pas accès à la valeur juste de la composition isotopique et nécessite un calibrage à l'aide d'un échantillon de référence pour l'obtenir. Ce type de séquence a ainsi permis l'émergence des

études « isotopomics » dont le but est de comparer entre eux les profils isotopiques obtenus par RMN.

L'ensemble de ces méthodes utilisant la mesure de la composition isotopique site spécifique en ^{13}C seront abordées dans cette partie. De plus, afin de répondre à l'objectif d'implémenter cette analyse position spécifique en ^{15}N, un état de l'art sur la RMN quantitative de l'azote 15 sera abordé. En effet, il n'existe pas dans la littérature de méthode permettant de mesurer la composition isotopique site spécifique par irm-^{15}N NMR. Une sous-partie fera état des verrous méthodologiques à lever pour obtenir un outil capable de réaliser ce type de mesure.

Enfin, une dernière partie évoquera les analyses statistiques utilisées dans le cadre d'études isotopomics telles que les analyses statistiques multivariées comme l'Analyse en Composante Principale (PCA) et la régression des moindres carrées (PLS). Les analyses statistiques de comparaison utilisées par l'INPS sont également détaillées comme les méthodes de mesure de distance Euclidienne et Cosinus ainsi qu'une méthode de corrélation utilisant le coefficient de Pearson pour comparer le profil chimique des stupéfiants afin de définir les échantillons liés et non liés.

I-1) Les sciences forensiques et le profilage chimique des stupéfiants

Le profilage chimique des stupéfiants représente la plus grosse activité au sein de l'INPS ou l'on distingue quatre familles de stupéfiants : la cocaïne, l'héroïne, le cannabis et les amphétamines. Actuellement ce profilage permet de mettre en évidence l'existence de réseaux grâce aux preuves récoltées par l'enquête. D'un point de vue chimique il est possible de déterminer les voies de synthèse des stupéfiants mais également de pouvoir identifier les réseaux internationaux grâce à l'empreinte chimique d'un stupéfiant. Bien que fournissant l'empreinte chimique des échantillons d'héroïne et de cocaïne cette technique ne fournit pas d'information chimique sur les autres composés majoritaires mélangés à ces stupéfiants tels que les agents de coupage.

La notion de « science forensique » sera présentée ainsi que les étapes d'élaboration de l'héroïne et la cocaïne et leur distribution dans le trafic international. Le principe du profilage chimique des stupéfiants ainsi que les différentes étapes d'analyses chimiques utilisées par l'INPS seront détaillées dans cette partie. Les agents de coupage utilisés seront également

décrits afin de comprendre leurs utilisations dans le réseau de distribution des stupéfiants, ainsi que les limites analytiques rencontrées pour pouvoir utiliser un profilage chimique pour les agents de coupage similaires à celui mis en place pour les stupéfiants.

I-1-1) Définition générale

L'objectif principal des sciences forensiques est de fournir à tous les acteurs impliqués dans les investigations criminelles une démarche scientifique et des méthodes techniques dans l'étude des évidences provenant d'une activité criminelle. En d'autres termes celle-ci aide la justice à trancher sur les causes et les circonstances d'une telle activité.[1]

Cette trace qui est l'objet d'étude principal des sciences forensiques est issue d'un échange de matières qui peut être une empreinte, un signal ou un objet. Celle-ci n'est pas toujours visible à l'œil nu et contient une information essentielle sur sa source et sur l'action qui l'a produite. Elle permet ainsi, par analogie, de pouvoir relier des caractéristiques similaires entre plusieurs traces indiquant l'activité d'un auteur similaire ou non. Par exemple, dans cette thèse ce sont les compositions isotopiques site-spécifiques qui serviront de traces afin de servir d'outil d'investigation à l'INPS pour le profilage des agents de coupage issus des stupéfiants.

I-1-2) Les produits stupéfiants

Les produits stupéfiants ou médicaments psychotropes sont des substances qui agissent principalement sur le système nerveux central pouvant engendrer de nouveaux processus biochimiques et induire des phénomènes de dépendance. La plupart de ces stupéfiants sont sujets à des réglementations ou à des interdictions car ils sont susceptibles d'engendrer une dépendance physique.[2] En France, les médicaments psychotropes sont soumis à de nombreuses contraintes et suivent l'arrêté du 22 février 1990.[3]

Les produits stupéfiants les plus consommés et sujets à un grand trafic international et Européen sont respectivement le cannabis, la cocaïne, la 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA) et l'héroïne.[4] Dans le cadre de cette thèse ce sont l'héroïne et la cocaïne qui ont été choisies comme objet d'étude. Bien que l'origine géographique de l'héroïne et de la cocaïne soit connue, le trafic illicite reste très important en Europe. Il est donc nécessaire de comprendre comment

ces drogues sont élaborées avant d'introduire la notion de profilage chimique utilisée par l'INPS sur ces psychotropes.

I-1-2-1) Etapes de l'élaboration de l'héroïne : les constituants majeurs de l'héroïne

La molécule d'héroïne est synthétisée à partir de la morphine qui est extraite du latex contenu dans le pavot somnifère (*Papaver somniferum*). Cette plante, par le biais, de ses vacuoles produit du latex riche en alcaloïdes (15-35%) qu'on appelle communément de l'opium. Les principaux alcaloïdes retrouvés dans l'opium sont la morphine et la codéine. L'héroïne a été découverte en 1898 par un chimiste Allemand, Heinrich Dresser travaillant pour l'entreprise pharmaceutique Bayer. Celle-ci est obtenue par acétylation de la morphine qui peut être isolée facilement de l'opium produit par le pavot somnifère. (Voir **Figure 1**).

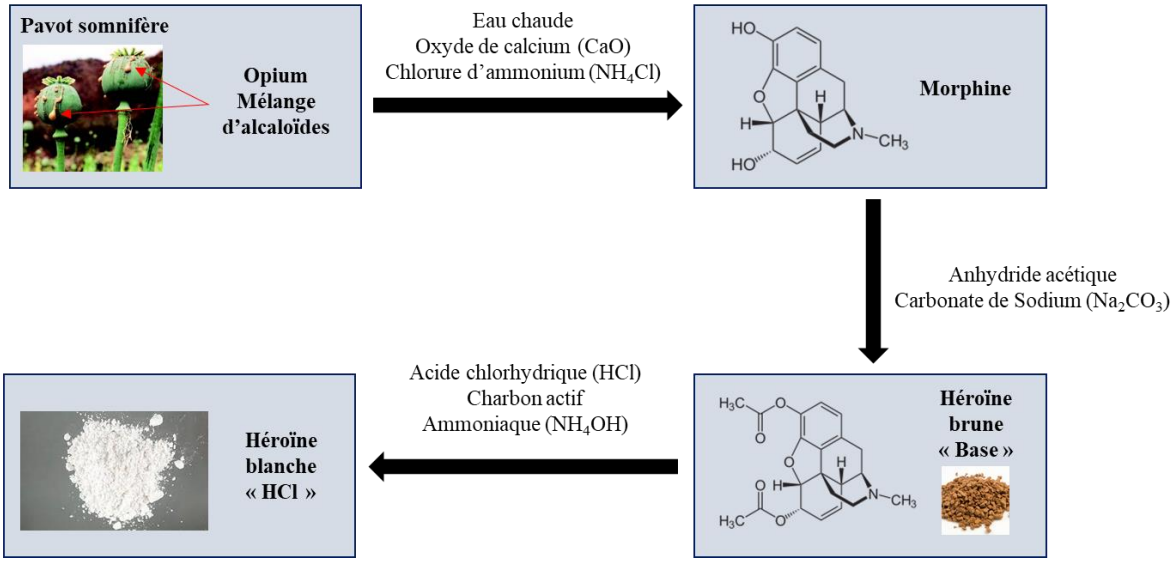


Figure 1 : Procédé de synthèse permettant d'obtenir de l'héroïne pure à partir de l'opium cultivé dans le pavot somnifère.

La culture illicite du pavot a lieu principalement dans le Croissant d'Or (Afghanistan, Iran et Pakistan), en Asie du Sud (Laos et Thaïlande) et récemment au Mexique et en Colombie. La synthèse de l'héroïne s'effectue en 4 étapes : La purification de l'opium obtenue par le pavot, l'extraction de la morphine issue de l'opium, la conversion de la morphine en héroïne brune par acétylation et la conversion de l'héroïne base en sel chlorhydrate par raffinage.

Dans un premier temps l'opium est bouilli dans de l'eau pour séparer les matières végétales du mélange d'alcaloïdes avec l'obtention d'une pâte foncée, nommée le CANDOO. Ce mélange

est ensuite dissous dans de l'eau chaude, la morphine base insoluble dans l'eau est transformée en morphinate de calcium afin de la rendre hydrosoluble. La solution est filtrée afin d'éliminer les autres alcaloïdes. Le chlorure d'ammonium permet ensuite d'obtenir un pH entre 8 et 9 afin de précipiter la morphine base qui est de couleur brune. Une dernière étape de purification à l'acétone peut être réalisée, cependant certains cultivateurs dans la région d'Asie du Sud-Ouest ne la réalisent pas, par peur d'être démantelés. L'héroïne vendue dans la rue peut donc contenir des quantités importantes d'acétyle codéine, de noscapine et de papavérine. La morphine est ensuite expédiée vers d'autres laboratoires clandestins afin d'obtenir l'héroïne brune par acétylation puis l'héroïne sous forme de chlorhydrate grâce à une solution d'acide chlorhydrique concentrée.

Du fait de la méthode de synthèse utilisée la composition chimique de l'héroïne de rue peut varier en alcaloïdes. Comme énoncé dans le paragraphe précédent il est courant de retrouver des substances naturelles co-extraites dans le pavot comme la morphine, l'acétyle codéine, la noscapine et la papavérine. Il est également possible de retrouver des molécules acétylées autres que l'héroïne, des traces résiduelles de solvants et des impuretés organiques. Enfin, des agents de coupage et des diluants sont ajoutés à n'importe quel moment de la chaine de distribution de l'héroïne. D'après les travaux de Broséus *et al.*[5] les échantillons d'héroïne saisi en Suisse entre 2006 et 2014 montrent que l'héroïne est pure à environ 10-15% quand elle est distribuée dans la rue. Les autres composés étant majoritairement des agents de coupage, ces molécules seront décrites et abordées dans la partie I-1-4).

I-1-2-2) Etapes de l'élaboration de la cocaïne : les constituants majeurs de la cocaïne

La cocaïne est cultivée à partir d'un arbuste, le cocaïer (*Erythroxylum coca*). Cette plante trouve son origine en Amérique du Sud et est toujours utilisée par les indigènes de la Cordillère des Andes au Pérou et en Bolivie. Cette plante fût utilisée dans un premier temps en infusion pour résister à la fatigue et surtout à l'altitude. Aujourd'hui, c'est la Colombie qui est le principal producteur des feuilles de coca avec ¾ de la production mondiale suivi par le Pérou et la Bolivie.[6] C'est au milieu du XIX^{ème} siècle que le premier chimiste (Friedrich Gaedcke) réussi à isoler la molécule de cocaïne issue du coca. Ce puissant psychotrope stimule le système nerveux central et sa consommation est très addictive. En général, une feuille de coca contient 1% d'alcaloïdes représentés à 80% par la molécule de cocaïne. L'élaboration de la cocaïne

s'effectue en 3 étapes : La pâte de coca est extraite des feuilles de cocaïer, purification de cette pâte en cocaïne base et conversion de la cocaïne en sel chlorohydrate.[7] (**Figure 2**)

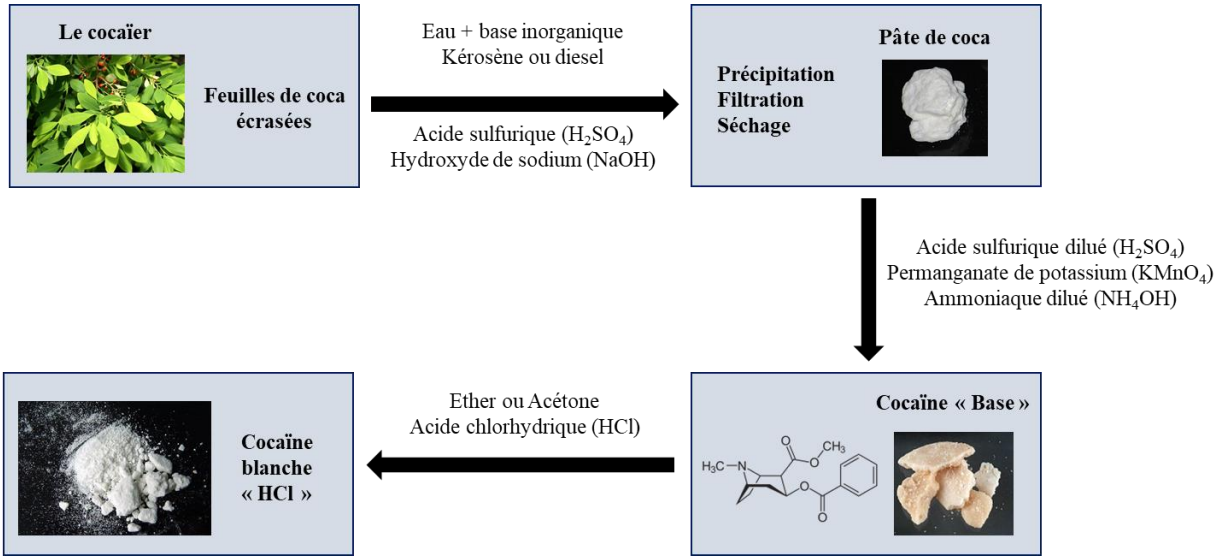


Figure 2 : Procédé de synthèse permettant d'obtenir de la cocaïne sous forme de sel chlorhydrate à partir des feuilles de coca issues du cocaïer.

La première étape consiste à écraser les feuilles de coca dans un peu d'eau avec une base inorganique. Du kérosène ou du gasoil est ajouté pour extraire la cocaïne de la feuille de coca. Après traitement à l'acide sulfurique et par un excès de soude la cocaïne précipite sous la forme d'une gomme jaunâtre dit pâte de coca. Celle-ci est ensuite filtrée puis séchée afin d'obtenir cette pâte contenant 30-80% de cocaïne, des impuretés inorganiques et d'autres alcaloïdes. Cette dernière étant impure n'est pas vendable et est donc purifiée en utilisant une solution diluée d'acide sulfurique puis par un ajout de permanganate de potassium qui agit sur les alcaloïdes oxydables. Le précipité qui se forme est ensuite récupéré. La solution acide est traitée avec de l'ammoniaque afin de transformer la cocaïne en base par précipitation. Enfin, la cocaïne base est dissoute dans de l'éther, afin d'éliminer les impuretés. Une solution d'acétone et d'acide chlorhydrique concentré permet ensuite d'obtenir la cocaïne sous forme de sel hydrochloré.

Cette cocaïne contient des impuretés issues des différentes étapes d'extractions qui sont présentes en traces. Lors des saisies de cocaïne en Suisse[5] entre 2006 et 2014 une pureté de 30-40% a été retrouvée. En effet, la cocaïne de rue est coupée majoritairement par des agents de coupage tels que la phénacétine, le lévamisole ainsi que la caféine. Ces molécules seront décrites dans la partie I-1-4).

I-1-2-3) Trafic international

Comme énoncé dans la partie I-1-2-1), l'héroïne est l'opiacé le plus répandu sur le marché des drogues et elle existe sous deux formes. L'héroïne brune sous forme de « base » est la plus courante et est produite quasi essentiellement en Afghanistan. L'héroïne blanche sous forme chlorhydrate, plus rare, provient exclusivement d'Asie du Sud Est. D'après le rapport Européen des drogues[8] l'héroïne saisie en Europe provient exclusivement d'Afghanistan ou de pays voisins comme l'Iran et le Pakistan par 4 voies d'acheminements. Les deux principales voies étant la « route des Balkans » qui passe par la Turquie puis les Balkans (Albanie, Bosnie, Croatie, etc.) pour aller vers l'Europe centrale. Il y a également la « Route du Sud » provenant d'Iran ou de Pakistan, transitant directement par avion ou par bateau ou en passant par l'Afrique Occidentale. Les autres voies telles que « la route du Nord » ou par le Sud du Caucase constituent des voies d'acheminements moins importantes. Les principales saisies d'héroïne en Europe s'effectuent en Turquie qui contient la voie principale d'entrée de l'héroïne en Europe suivie par l'Espagne et le Royaume-Uni avec une pureté variant entre 15 et 30 %. La Colombie produit également de l'héroïne qui transite exclusivement par les Etats-Unis d'après le World Drug Report.[9]

Comme indiqué dans la partie I-1-2-2), la cocaïne est disponible sous 2 formes dont la plus courante est la cocaïne sous forme de poudre (forme chlorhydrate, HCl). D'après le rapport européen des drogues[8] les pays principaux de destinations sont l'Espagne, Le Portugal, la Belgique, Les Pays-Bas, La France et l'Italie qui totalisent 84% des 61,6 tonnes saisies en 2014. La cocaïne transite via des vols commerciaux ou fret aérien et par la mer via des cargaisons importantes passées en contrebande sur des yachts privés et dans des conteneurs maritimes. D'après le World Drug Report[9] l'exportation de cocaïne vers les Etats-Unis se fait en utilisant des sous-marins, des bateaux ou par voie aérienne avec de petits avions allant de Colombie en Amérique centrale (Mexique) ou par des courriers humains empruntant les avions de ligne. En effet, la cocaïne saisie aux Etats-Unis provient à 95% de la Colombie. Il existe également le crack à fumer qui est la forme « base » de la cocaïne. Celle-ci est produite exclusivement en Colombie, Pérou et Bolivie.

I-1-3) Le profilage chimique des stupéfiants

Comme énoncé dans la partie précédente l'extraction de l'héroïne et de la cocaïne nécessite des quantités importantes de composés inorganiques et organiques pour obtenir la molécule la plus pure possible. Cependant, les différents solvants et composés laissent des traces résiduelles qui peuvent donner des informations précieuses sur l'origine. En effet, selon la quantité et la nature des composés utilisés pour l'extraction des stupéfiants le profil chimique obtenu est susceptible de varier et de pouvoir être distingué entres différentes héroïnes et/ou cocaïnes.

Les différentes étapes du profilage chimique des stupéfiants sont : l'identification des différents composés stupéfiants, la quantification des composés cibles et la comparaison des profils chimiques obtenus. Ils seront exposées dans cette partie. Cette partie permettra de comprendre comment un produit stupéfiant saisi par la police scientifique est analysé pour en tirer des informations sur son origine. Elle exposera également les limites de cette méthode.

I-1-3-1) Historique et principe du profilage chimique

Le « profilage » consiste à extraire des composantes nommées « profils » issues des produits stupéfiants saisies par la police. Lors de la comparaison de différents profils chimiques toutes les caractéristiques doivent être utilisées, c'est-à-dire macroscopique (texture, couleur, logo etc.) et chimique (composés majeurs, mineurs et traces résiduelles) ainsi que d'autres composés servant de produits de coupage (adultérants et diluants). Tous ces éléments décrits serviront à la police afin d'établir un profil spécifique pour chaque stupéfiant saisi.

Lors d'une saisie de stupéfiants, la police récolte les renseignements traditionnels (lieu de saisie, quantité, suspect etc.). Le profilage est un outil qui vient en appui de ces informations et qui est crucial pour relier ou non les différentes saisies d'héroïne et de cocaïne entre elles. Pour cela, une méthodologie analytique en 3 étapes est réalisée sur chaque saisie de stupéfiants qui sont sujets à des analyses. La première étape consiste à déterminer toutes les composantes physiques ou chimiques du produit stupéfiant (Etape 1). La deuxième étape consiste à déterminer les composés cibles qui serviront pour comparer les différents profils chimiques (Etape 2). Enfin, la dernière étape consiste à comparer ces différentes composantes entre plusieurs produits stupéfiants saisis tout en suivant le même mode opératoire afin d'alimenter une banque de données (Etape 3). On compare les profils chimiques des différents stupéfiants comme des

empreintes digitales. Ces différentes étapes du profilage chimique sont résumées sur la **Figure 3** ci-dessous.

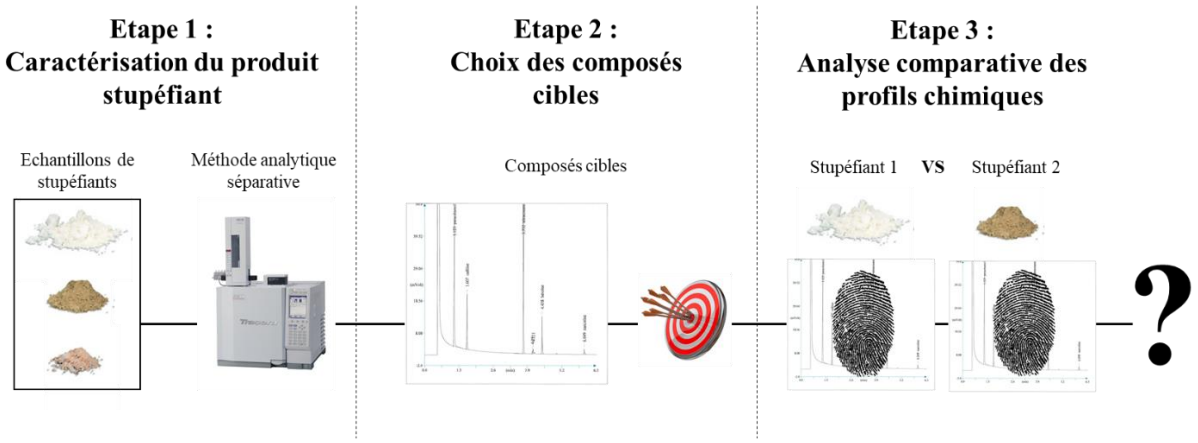


Figure 3 : Représentation des 3 étapes clés dans le profilage chimique effectué par la police scientifique.

La dernière étape consiste donc à comparer les caractéristiques physico-chimiques entre différentes saisies issues d'affaires de police différentes afin de produire du renseignement forensique en complément des renseignements fournis par l'enquête policière.[10] L'information chimique peut être cruciale dans l'enquête. En effet, il est possible qu'un produit stupéfiant saisi ne présente pas les mêmes caractéristiques physiques alors qu'une similarité sur le profil chimique est observée, et inversement. Les 3 étapes composant le profilage chimique énoncé dans cette partie et la partie I-1-3) sont détaillées dans les parties suivantes.

I-1-3-2) Etape 1 : Caractérisation du produit stupéfiant

Lors de la caractérisation d'un produit stupéfiant il est nécessaire d'utiliser une technique analytique séparative afin d'identifier le produit illicite (concentration) et le profil chimique du stupéfiant. La méthode utilisée consiste dans la plupart des cas à utiliser une technique de chromatographie en phases gazeuses (GC) utilisant des colonnes capillaires ou en phases liquides (LC) en phase inverse, avec une méthode de détection UV ou d'évaporation à diffusion de lumière (DEDL).[11] Un autre technique de caractérisation utilisant la RMN peut également permettre l'identification des molécules.[12]

L'évolution constante des méthodes analytiques séparatives a permis d'établir un profil chimique de différentes matrices dans un but de comparaisons. Dans la littérature, les travaux de Strömberg et al.[13–14] sont les premiers à évoquer des liens chimiques et leurs significations. D'autres travaux apportent également une contribution dans l'élaboration de liens chimiques

entres plusieurs échantillons ainsi qu'une tentative d'harmonisation du profilage chimique de l'héroïne dans différents laboratoires.[15–18] C'est la GC qui a permis pour la première fois de séparer les différents composés de l'héroïne[19] et qui est aujourd'hui une méthode de choix dans la comparaison de profils chimiques. Plus récemment, le couplage GC avec un spectromètre de masse (GC-MS) lui est préféré car celui-ci permet d'obtenir des informations supplémentaires sur les composés qui co-éluent. Cependant, l'analyse de composés non volatils et très polaires nécessite une étape de dérivation avant son analyse en GC. Pour pallier ce problème des analyses en HPLC semblent plus appropriées pour analyser ce type de composés.[20]

I-1-3-3) Etape 2 : Choix des composés cibles

Comme indiqué dans la partie I-1-3-1), un échantillon stupéfiant est un mélange complexe de molécules. Selon la méthode et la nature du matériel de départ utilisé, le processus de fabrication est différent et augmente ainsi le nombre potentiel d'informations d'ordre forensique. Si on prend l'exemple de la cocaïne et de l'héroïne qui sont des molécules d'origine naturelle, le profil chimique du composé sera influencé par les conditions de cultures du producteur (région, sol, climat, méthode de culture). Le processus de production de ces 2 stupéfiants influencera également le profil chimique. Des paramètres tels que les voies de synthèses, la purification, la nature des produits chimiques utilisés, etc. peuvent interférer avec le profil chimique du stupéfiant selon les producteurs. Chacun de ces paramètres aura une influence sur le produit final, avec la formation de produits dérivés issus des impuretés de production. Le conditionnement du produit stupéfiant (humidité, luminosité, température) avant son exportation est également susceptible de modifier le profil chimique obtenu. De plus, des adultérants utilisés comme des agents de coupage sont ajoutés et vont également modifier sa composition chimique. Il apparait donc que selon l'histoire du composé stupéfiant (héroïne, cocaïne) et la méthode analytique choisie (GC, HPLC), un profil chimique propre à chaque lot sera obtenu.

Il existe 5 classes de composés provenant de sources différentes qui peuvent apporter une information analytique :

- **Les composés naturels** issus des feuilles de coca ou du pavot somnifère qui se retrouvent dans le produit final.
- **Les produits dérivés** qui proviennent des différentes étapes de laboratoire (solvants, réactifs, etc).

- **Les agents de coupage** ajoutés par action volontaire dans la chaîne de distribution.
- **Les artefacts** issus de la procédure analytique.
- **Les contaminations** involontaires.

Selon l'information que l'INPS souhaite tirer du profilage chimique il est possible de déterminer des liens spécifiques entre les différents stupéfiants, de construire un réseau de distribution selon la redondance d'un profil chimique, d'identifier l'origine géographique d'un stupéfiant ainsi que les produits chimiques utilisés.

Pour remplir un de ces objectifs, le profilage chimique peut donc se baser sur les **composés naturels** qui sont issus de la plante, des **agents de coupages** tels que des adultérants ou diluants.[21] On retrouve dans la littérature des travaux sur **les produits dérivés** tels que les solvants employés lors de l'élaboration du stupéfiant[22,23] ainsi que les composés inorganiques.[24] En plus du profilage chimique, certains laboratoires sont capables de déterminer l'origine géographique du stupéfiant en utilisant l'abondance isotopique globale en ^{13}C qui fournit une information complémentaire.[25]

L'information forensique obtenue par ce profilage chimique est ensuite classée en 3 catégories qui sont :

- **Le soutien politique qui** concerne la détermination de l'origine géographique d'un échantillon ainsi que la comparaison de profils provenant de différents composés afin d'identifier les réseaux de distribution et les lieux de productions.
- **L'information d'ordre tactique et stratégique « Drug intelligence »** qui vient en appui de l'enquête policière, les liens établis entre les différents profils chimiques peuvent être utilisés pour orienter l'enquête en établissant des connexions non suspectées entre plusieurs groupes ou individus criminels.
- **L'élément preuve** doit permettre au procureur ou policier d'établir un lien spécifique entre deux produits stupéfiants. Cependant, même s'il existe un lien chimique entre des composés saisis sur différentes personnes, celles-ci n'ont pas forcément de lien relationnel. Le but est de démontrer que les composés en question possèdent une histoire commune.[10] Dans le cas du profilage de l'héroïne il est nécessaire de combiner les analyses sur les alcaloïdes issus du pavot,[26] des solvants utilisés lors des extractions,[27] ainsi que l'analyse isotopique.[28] Celles-ci doivent permettre de mettre en évidence une histoire commune de leur origine géographique du réseau de distribution en passant par le procédé de synthèse.

Il est cependant indispensable d'associer les informations forensiques avec les données provenant de l'enquête, comme le lieu de saisie. La combinaison de ces 2 sources permet d'avoir une meilleure connaissance sur le trafic de stupéfiant.[29]

I-1-3-4) Etape 3 : Analyse comparative des profils chimiques

La dernière étape du profilage chimique effectuée par l'INPS est de comparer les différents profils enregistrés dans une base de données. Le but est de prouver ou non l'existence de liens chimiques entre plusieurs spécimens saisis dans des affaires policières différentes. Afin d'évaluer cette similarité le recours à une banque de données de profils chimiques est requis. Plusieurs paramètres rentrent en compte pour avoir les outils nécessaires à la comparaison.

- La caractérisation d'un stupéfiant donne lieu à un profil chimique obtenu par une méthode analytique. Ces informations physico-chimiques doivent être compilées dans une base de données propre au laboratoire.
- Les données doivent être normalisées pour pouvoir être utilisées statistiquement.
- Utiliser un outil statistique doit permettre de comparer les différents profils et définir les liens potentiels entre les échantillons.
- Déterminer le pouvoir discriminatoire de la méthode statistique afin d'évaluer le profilage.

Cette base de donnée se construit par l'ajout continu de profils des stupéfiants analysés dans différentes affaires policières. Cet ajout constant permet d'établir en permanence cette banque de données tout en augmentant la probabilité d'avoir des profils similaires entre les différentes affaires. En général, les comparaisons se font au sein d'un même laboratoire forensique car il est difficile de compiler des données provenant de laboratoires différents.

Les outils statistiques utilisés pour la comparaison de profils se fondent sur des calculs statistiques utilisant des algorithmes de comparaisons[30,31] permettant de dire si un profil est chimiquement lié ou non. D'autres études statistiques telles que les analyses supervisées et non supervisées utilisant des modèles mathématiques plus ou moins complexes permettent également de définir des liens entre plusieurs profils de stupéfiants.[32] Toutes ces techniques statistiques seront très largement détaillées dans la partie I-6) en exposant le principe et les avantages de chacune de ces méthodes.

I-1-4) Le profilage chimique des agents de coupage

La quasi-totalité du profilage chimique effectué par les laboratoires de police scientifique se focalise donc sur le stupéfiant en étudiant sa composition chimique qui peut varier selon sa méthode d'extraction, des solvants organiques, des composés inorganiques et des agents de coupage utilisées pour son élaboration. Ce profilage est très efficace pour relier les profils chimiques d'affaires différentes. Cependant, les agents de coupage qui sont les composés majoritaires dans l'héroïne et la cocaïne sont très peu étudiés et ne sont pas systématiquement analysés par les laboratoires d'analyse forensique.[33] Leur identification n'est pas simple à cause de l'étendue des agents de coupage utilisés (produits pharmaceutiques, sucres etc.), c'est pourquoi ces laboratoires se focalisent seulement sur le stupéfiant et ses produits dérivés. De ce fait, très peu d'informations sont disponibles sur les agents de coupage dans la littérature étant donné qu'ils sont peu étudiés.

Dans cette partie nous nous intéresserons aux agents de coupage utilisés dans l'héroïne et la cocaïne en décrivant les molécules ajoutées, leur rôle dans le produit stupéfiant et à quel moment cet ajout intervient dans la chaine de distribution du stupéfiant. Enfin, nous verrons que quelques laboratoires forensiques commencent à s'intéresser à ces molécules avec diverses méthodes analytiques pour les analyser.

I-1-4-1) Pourquoi des agents de coupage ?

L'ajout d'agent de coupage dans le produit stupéfiant utilise deux classes de molécule qui ont des rôles très différents dans le produit final. En effet, on trouve dans un premier temps des produits **diluants** qui sont des molécules pharmacologiquement inactives et très faciles à se procurer (carbonates, sucres etc.) par les trafiquants et/ou producteur. Dans un dernier temps des produits **adultérants,** quant à eux, pharmacologiquement actifs et plus ou moins faciles à se procurer.[34] Ces molécules sont ajoutées dans le but principal d'augmenter les profits par les vendeurs. Cependant, d'autres raisons expliquent également cet ajout **d'adultérants.** [35]

- **La volonté d'augmenter et/ou de mimer les effets de la substance psychoactive :** le but étant d'améliorer la qualité du stupéfiant ou de masquer la faible quantité de molécule psychoactive par l'ajout d'adultérants possédant des propriétés chimiques similaires. La partie I-1-4-2) décrit les molécules couramment retrouvées dans l'héroïne et la cocaïne de rue.

- **La volonté de faciliter l'administration de la substance psychoactive :** en effet, dans le cas de l'héroïne certains adultérants permettent de favoriser la diffusion du produit stupéfiant à plus faible température et ainsi faciliter le fumage de celle-ci.[36]

Ces 2 hypothèses montrent que l'ajout des agents de coupage ne se fait pas de manière hasardeuse par les trafiquants mais de façon très stratégique.[37]

I-1-4-2) Les agents de coupage utilisés dans l'héroïne et la cocaïne de rue

Les propriétés chimiques des adultérants retrouvés dans l'héroïne et la cocaïne de rue sont décrits dans cette partie.

Cas de l'héroïne de rue

Dans les années 1970, les agents de coupage principalement utilisés étaient la caféine, le lactose et le mannitol dans les stupéfiants saisis en Europe.[34] Au début des années 1980, on voit l'apparition de paracétamol et de procaïne en plus de la caféine. C'est à partir des années 1990 que l'utilisation **paracétamol-caféine** devient très largement répandue. Aujourd'hui ces deux adultérants (**Figure 4**) sont les agents de coupage les plus retrouvés dans l'héroïne de rue. En effet, plus de 90% des saisies de stupéfiants en Europe contiennent ces 2 molécules en large quantité.[5,38]

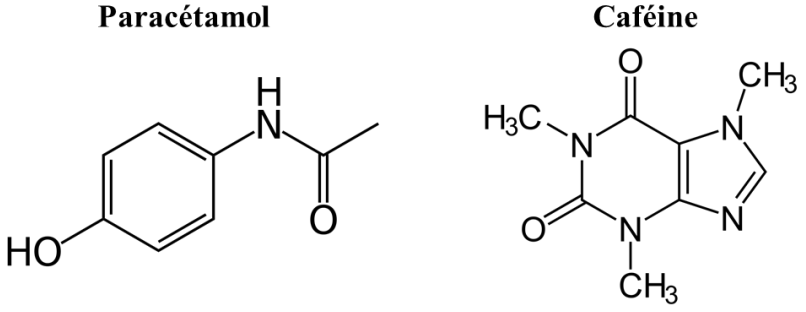


Figure 4 : Représentations des adultérants principaux retrouvés dans l'héroïne de rue : le paracétamol et la caféine

Le paracétamol est une molécule aux propriétés analgésiques et antipyrétiques (lutte contre la fièvre) permettant de traiter une douleur aigue ou chronique. Cette molécule est disponible légalement en pharmacie et est le médicament le plus vendue en France. Cependant, cette molécule peut avoir des effets indésirables pour le foie car celle-ci est dégradée par le foie en divers produits de dégradation capables de détruire les cellules du foie (Au-delà de 4 g de paracétamol par jour). **La caféine** est un alcaloïde qui agit comme stimulant du système nerveux

central et présente naturellement dans les graines de caféier, de guarana ainsi que les feuilles de yerba maté et de théier. Cette molécule de caféine est légale et est actuellement le psychotrope le plus consommé dans le monde via le café ou le thé. La surconsommation de cette substance peut engendrer des troubles physiques et mentaux comme l'insomnie, les palpitations cardiaques ou l'anxiété.

Cas de la cocaïne de rue

La molécule de lidocaïne et les sucres étaient les 2 principaux agents de coupage retrouvés dans la cocaïne au début des années 1970.[34] Au début des années 1990, la lidocaïne disparait au profit de la caféine et de la phénacétine.[39] La molécule de lévamisole fait son apparition dans les années 2000 sur les continents Européen et Américain.[40] Aujourd'hui les trois adultérants principaux (**Figure 5**) retrouvés dans la cocaïne de rue sont la phénacétine, le lévamisole et la caféine.[34,41]

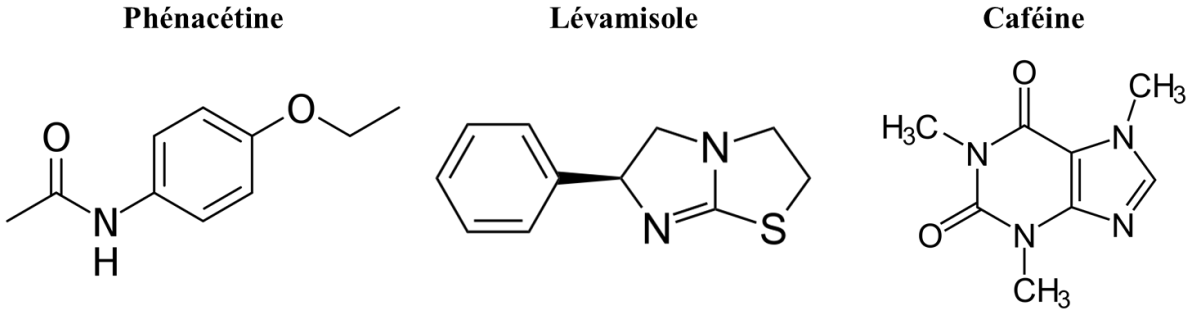


Figure 5 : Représentations chimiques des adultérants principaux retrouvés dans la cocaïne de rue : la phénacétine, le lévamisole et la caféine.

La phénacétine est un analgésique possédant des propriétés proches du paracétamol qui agit sur les zones sensorielles de la moelle épinière. Depuis 1983, ce médicament a été retiré du marché car ce produit est responsable de cas de cancers du rein. **Le lévamisole** est un produit chimique utilisé par les vétérinaires pour traiter les vers intestinaux chez les animaux. Il est également prescrit chez l'humain pour traiter les polyarthrites chroniques (inflammations des articulations). Cependant ce produit peut procurer de graves effets secondaires comme l'apparition de nécroses sur la peau.[42]

L'ajout de ces adultérants dans l'héroïne et la cocaïne de rue n'est donc pas anodin et permet d'accroitre la dépendance chez le consommateur. L'effet combiné de ces agents de coupage et le taux de concentration retrouvé dans l'héroïne et la cocaïne montre que les effets toxiques restent moins importants que ceux du stupéfiant en lui-même.[43] L'ajout de ces 2 adultérants se traduit donc par la volonté de faire du profit et non d'intoxiquer le consommateur.[34]

I-1-4-3) A quel moment l'ajout des agents de coupage intervient-il ?

Des études dans le temps ont montré que l'ajout d'agents de coupage détectés dans la cocaïne et l'héroïne l'était probablement durant la production du produit stupéfiant ou au début de la chaîne de distribution, avant importation ou après exportation. Il est fréquent, lors de saisies policières, de retrouver des agents de coupage purs en plus de l'héroïne ou de la cocaïne. Ceci montre que la quantité d'agents de coupage n'est pas assez importante pour pouvoir couper tous les lots de cocaïne et d'héroïne durant la production de ces stupéfiants.[40]

Des études sur l'héroïne ont montré que son adultération avait lieu juste avant son exportation ou juste après son importation dans son pays de destination.[37,44,45] Depuis plusieurs années, on estime que le paracétamol utilisé comme adultérant est du paracétamol illicite auquel est ajouté un colorant de couleur marron et qui ne provient pas des entreprises pharmaceutiques.[46] Dans beaucoup de pays européens, des saisies de plusieurs kilos du mélange paracétamol-caféine ressemblant à l'héroïne base montrent que ce mélange est utilisé pour couper l'héroïne.[5,38] Etant donné que le paracétamol et la caféine sont des adultérants systématiquement retrouvés dans l'héroïne ceci suggère que ce mélange est ajouté durant la production de celle-ci ou durant sa distribution.[47]

Concernant la cocaïne, les adultérants détectés dans les stupéfiants saisis dans les aéroports suggèrent que le lévamisole est ajouté dans le pays de production contrairement à la phénacétine qui est ajouté après son importation en Europe. La caféine quant à elle est ajoutée soit avant son exportation ou après son importation dans le pays de destination.[48] La saisie de phénacétine pure pour adultérer la cocaïne est fréquente dans le pays de destination.[5]

Depuis que l'adultération a lieu au niveau de la chaine de production ou avant son exportation, l'origine du produit stupéfiant peut être un bon indicateur sur la présence et la composition des agents de coupage.[37] A l'inverse la présence de certains adultérants donne des informations sur les réseaux de distribution utilisés par les trafiquants.[49] En effet, à la fin des années 1980 la caféine était absente de l'héroïne dans les spécimens saisis en Turquie.[50] Le lévamisole peut également être un marqueur pour traquer les réseaux de distribution de la cocaïne car il est détecté au niveau de la frontière Colombienne.[51]

La variété d'adultérants repérée dans l'héroïne et la cocaïne diffère selon le pays. Ceci montre que le type et la composition des agents de coupage présents dans ces stupéfiants pourrait permettre de remonter à l'origine géographique et de mettre en évidence les différents réseaux de distribution. En effet, la cocaïne montre une grande diversité d'adultérants utilisés, il serait

donc intéressant de combiner le profilage chimique effectué sur les stupéfiants avec la composition des adultérants afin de pouvoir mettre en évidence un lien entre l'origine de la cocaïne et sa composition en agent de coupage.[29]

I-1-4-4) Méthode analytique utilisée par les laboratoires forensiques pour le profilage chimique des agents de coupage

Les laboratoires forensiques ont implémenté différentes méthodes analytiques afin d'étudier la composition chimique et l'identification des agents de coupage présents dans l'héroïne et la cocaïne. Les méthodes chromatographiques sont les plus utilisées, avec l'usage de solvants comme le méthanol et le chloroforme afin d'extraire les adultérants du stupéfiant. La séparation de ces composés se fait par GC-MS, HPLC-MS et HPLC utilisant un détecteur UV comme le rapporte la littérature.[5,38,52] Ces approches permettent seulement de détecter le type d'adultérants retrouvés dans les saisies policières. La fréquence de certains types d'adultérants est rarement mentionnée, ce qui est préjudiciable pour pouvoir étudier les réseaux de distributions impliqués.

Des études sur l'héroïne, montrent que des concentrations moyennes similaires en paracétamol et caféine ont été trouvées dans différents pays.[38,47,53] Il est estimé en moyenne que le paracétamol est plus concentré que la caféine avec un taux variant de 1,2 à 2,2 fois la concentration en caféine. Ces résultats montrent une homogénéité dans les agents de coupage utilisés pour l'héroïne en Europe, notamment avec la présence systématique de caféine et de paracétamol. Contrairement à la cocaïne, qui montre une plus grande hétérogénéité sur la fréquence et la concentration des agents de coupage retrouvés dans les saisies policières.[38,54]

Une autre méthode, l'irm-MS, mesurant le rapport isotopique en $^{2}H/^{1}H$, $^{13}C/^{12}C$ et $^{15}N/^{14}N$ a été mise en place afin de pouvoir tracer et relier différentes sources de phénacétine retrouvée dans la cocaïne.[55] Cette technique (détaillée dans le paragraphe I-2-2-1) s'intéresse à la mesure d'un isotope stable en abondance naturelle d'une molécule afin d'en étudier son origine. Les résultats ont montré que la méthode pouvait être seulement utilisée pour indiquer si la phénacétine provient du même lot et donc de la même source. Cependant, cette appareillage est encore très peu utilisé par les laboratoires forensiques dans le cadre du profilage chimique des agents de coupage.

I-1-4-5) Limites des méthodes analytiques disponibles

A part s'intéresser au type d'adultérants utilisés dans la cocaïne et l'héroïne il y a très peu de méthodes répertoriées dans la littérature qui s'intéressent à la concentration et à la fréquence des agents de coupage retrouvés dans ces différents stupéfiants. De plus, l'analyse des agents de coupage n'est pas systématique par les laboratoires forensiques et donc l'information chimique obtenue sur ces molécules reste limitée. Une méthode utilisant l'analyse isotopique par irm-MS permet de tracer l'origine de la molécule et de distinguer une origine commune sur la phénacétine utilisée pour couper la cocaïne. Cette méthode reste néanmoins limitée car elle s'intéresse au rapport isotopique global de la molécule, soit une seule variable disponible. De plus, les variations du rapport isotopique en ^{13}C et ^{15}N sont très proches (moins de 1%) dans le cas de la phénacétine. Il est donc difficile de discriminer avec certitude les différentes sources de cette molécule, qui peuvent avoir un rapport isotopique global très proche mais provenir d'un lot différent.

Contrairement au profilage chimique des agents de coupage, celui des stupéfiants est utilisé en routine par tous les laboratoires forensiques lors de saisies de stupéfiants. Cette méthode montre son efficacité pour établir « l'empreinte digitale » d'un stupéfiant afin de la comparer à une autre saisie et établir les différents réseaux de distribution. Néanmoins, avoir une technique complémentaire étudiant les agents de coupage serait un atout pour la police scientifique notamment lors de la saisie de mélange paracétamol-caféine ou de phénacétine pure. Nous allons voir dans la prochaine partie que les techniques analytiques mesurant les effets isotopiques totaux et position-spécifiques peuvent être des outils complémentaires pouvant dresser « l'empreinte digitale » d'une molécule afin de pouvoir retracer son origine.

I-2) Techniques analytiques de mesure des compositions isotopiques totales et position-spécifiques

Plusieurs méthodes analytiques permettent la détermination de compositions isotopiques. Il existe des techniques mesurant les compositions isotopiques totales, renseignant sur la composition isotopique globale d'une molécule. D'autres permettent quant à elles de déterminer les compositions isotopiques position-spécifiques de manière partielle ou complète.

La seule méthode isotopique utilisée jusqu'à présent pour le profilage des agents de coupage est la Spectrométrie de Masse de rapport isotopique (irm-MS). Celle-ci rentre dans la catégorie des méthodes mesurant la composition isotopique totale d'une molécule. L'inconvénient de cette technique c'est qu'elle ne donne que la composition isotopique moyenne d'une molécule.

Dans le cadre du profilage des agents de coupage, la mesure position-spécifique pourrait être un outil supplémentaire afin d'établir un profil isotopique pour chaque échantillon. Historiquement, les premières mesures position-spécifiques ont été réalisées par fragmentation chimique ou biochimique suivi d'analyse irm-MS sur chaque fragment d'une molécule. La fragmentation étant réalisée par pyrolyse, mais celles-ci sont très peu répandues en routine du fait de la limitation de cette méthode pour les petites molécules.

La méthode utilisant la RMN ^{2}H isotopique (SNIF-NMR™) créée dans les années 1980 par les professeurs Martin[56] est une alternative pour mesurer les effets isotopiques position-spécifiques et a déjà montré son efficacité sur un large panel de composés. Ensuite et plus récemment la RMN a été appliquée au carbone-13. Son évolution est prometteuse car elle s'appuie sur des développements récents à la fois instrumentale et méthodologique.

Les différentes notations sur les isotopes stables seront décrites dans cette section. L'ensemble des techniques isotopiques mesurant les compositions isotopiques totales et position-spécifiques seront également décrites.

I-2-1) Isotopes : Définition et notations

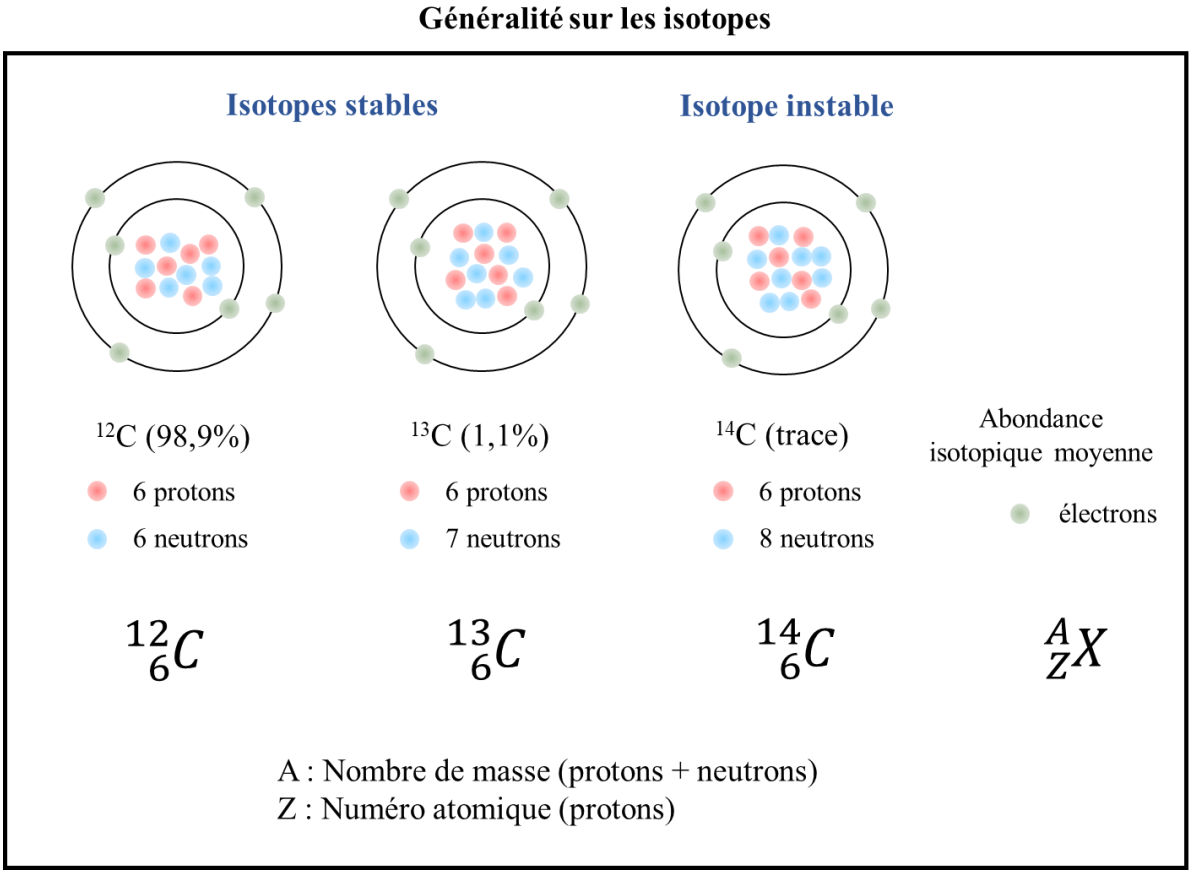


Figure 6 : Définition et généralité sur les isotopes. Cas des différents isotopes du carbone

Les généralités sur les isotopes sont décrites ci-dessus (**Figure 6**), avec l'exemple de l'atome de carbone. Il est important de distinguer deux types d'isotopes que sont les isotopes radioactifs (instables) et les isotopes stables. Ceux qui sont radioactifs émettent un rayonnement de particules notées α, β et γ. Dans le cadre de ces travaux, seuls les isotopes stables en abondance naturelle ont été étudiés.

Le comportement chimique d'un atome est déterminé par sa structure électronique et peut différer selon sa masse. Les isotopes lourds (ex : ^{13}C) ont tendance à réagir plus lentement que les isotopes légers (ex : ^{12}C) d'un même élément. Cette différence de masse peut induire, lors de réactions chimiques, une légère variation de son abondance isotopique par rapport à sa valeur initiale.

Des paramètres spécifiques décrivent ces variations.[57] Le rapport isotopique R (Equation (1)) représente le rapport molaire entre l'isotope lourd et l'isotope léger d'un élément E. (Noté ${}^{h}E$ et ${}^{l}E$ respectivement)

$$R\,({}^{h}E/\,{}^{l}E) = \frac{N({}^{h}E)}{N({}^{l}E)} \qquad (1)$$

L'abondance isotopique x (Equation (2)) représente la fraction molaire de l'élément le plus lourd :

$$x\,({}^{h}E/\,{}^{j}E) = \frac{N({}^{h}E)}{\sum_{1}^{k} N({}^{j}E)} \qquad (2)$$

Dans le cas du carbone 13 l'abondance isotopique x serait calculée de la manière suivante :

$$x\,({}^{13}C) = \frac{N({}^{13}C)}{N({}^{12}C)+N({}^{13}C)}$$

Cependant les variations observées des deux premiers paramètres sont très petites, la composition isotopique δ (Equation (3)) exprimée en ‰ (pour mille) est donc utilisée pour étudier les variations entre un analyte et la référence internationale standard (std). Pour le ^{13}C, la référence internationale est le Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) avec $R_{V\text{-}PDB}$ = 0,0112372.

$$\delta\,{}^{h}E_{std} = \left(\frac{R({}^{h}E/\,{}^{l}E)}{R({}^{h}E/\,{}^{l}E)_{std}} - 1\right) \times 1000 \qquad (3)$$

L'échantillon standard utilisé est riche en ^{13}C, le rapport isotopique $R({}^{13}C/{}^{12}C)$ est donc très souvent plus élevé que celui de l'analyte. Il est donc fréquent de retrouver des valeurs $\delta({}^{13}C)$ négatives dans les produits organiques naturels.

I-2-1-1) Isotopologues et isotopomères

Deux molécules possédant la même formule chimique peuvent différer selon leur composition isotopique (**Figure 7**), c'est la notion **d'isotopologues**. Deux molécules possédant un nombre identique d'isotopes lourds d'un même élément au sein de leur structure à différentes positions sont nommées **isotopomères**.

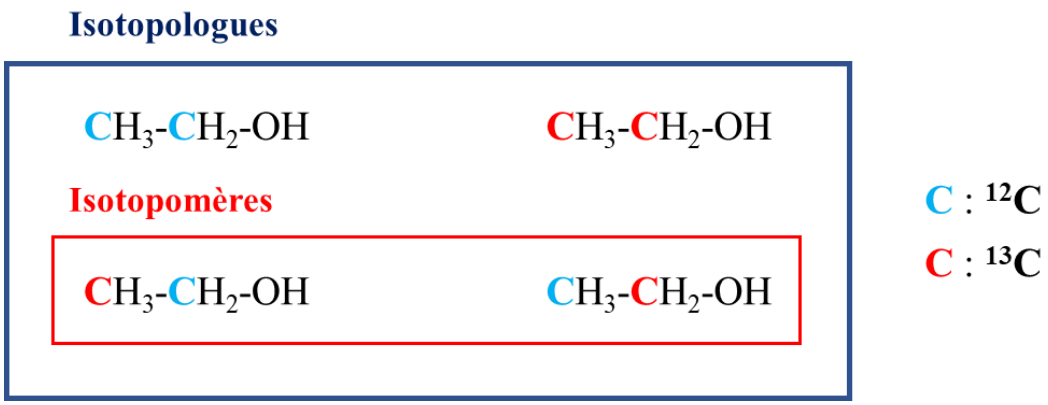


Figure 7 : Différence entre un isotopologue et un isotopomère. Exemple avec la molécule d'éthanol. Les isotopologues diffèrent uniquement selon leur composition en isotope tandis que les isotopomères ont le même nombre d'isotopes lourds qui diffèrent par leur position dans la molécule.

I-2-1-2) Fractionnement isotopique

Le fractionnement isotopique est la modification de la composition isotopique durant une transformation, comme une réaction chimique (différence entre l'état initial et l'état final). Cependant si la conversion du substrat en produit final est complète, il n'y a pas de fractionnement observé. Si cette conversion est incomplète le facteur de fractionnement α pour deux états A et B est défini par l'équation 4 :

$$\alpha_{A-B} = \frac{R_A}{R_B} \qquad (4)$$

Si α < 1, l'état *B* de la molécule est alors enrichi en isotope lourd (effet isotopique normal) et inversement (effet isotopique inverse). Par la présence d'isotopologues, une réaction incomplète favorisera donc une espèce isotopique plutôt qu'une autre, induisant une modification isotopique par apport au substrat. Pour des raisons pratiques, le fractionnement isotopique est exprimé comme le facteur d'enrichissement ε exprimé en ‰ (Equation 5) :

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1000 \qquad (5)$$

I-2-1-3) Effets isotopiques

La différence des abondances isotopiques dans les molécules naturelles organiques est dû aux propriétés physico-chimiques d'un isotope léger par apport à son isotope lourd. Les effets

isotopiques deviennent donc visibles lorsqu'ils vont produire un fractionnement, de nature physique ou chimique.

On parle **d'effet isotopique physique** lorsque la différence de masse entre deux isotopes d'un même élément affecte ses propriétés physiques. Par exemple, dans le cas du deutérium qui possède une masse double par apport à l'atome d'hydrogène, cela induira une vitesse différente et donc un fractionnement isotopique. On rencontre ces phénomènes d'effets isotopiques physiques lors de purification ou durant une séparation. La centrifugation qui se base sur la masse des composés en suspension, est le phénomène de fractionnement le plus souvent rencontré.

On **parle d'effet isotopique cinétique** au cours d'une réaction chimique ou biochimique lorsque le fractionnement isotopique est dû à l'influence des isotopologues sur la vitesse de réaction. Il y a deux facteurs qui peuvent contribuer : le premier étant la mobilité plus importante des isotopes légers par apport aux isotopes lourds, le deuxième étant la force des liaisons chimiques (plus importante avec les atomes lourds qu'avec les atomes légers). Par exemple, la probabilité de rompre une liaison possédant l'isotope ^{12}C est plus grande qu'une même liaison contenant le ^{13}C. Une réaction qui impliquerait une rupture de liaison de type X-C aura donc très probablement un produit final appauvri en ^{13}C. L'effet isotopique cinétique (KIE) peut être calculé en fonction des constantes de vitesse des isotopologues légers ($k^{12}C$) et lourds ($k^{13}C$)[58] comme le décrit l'équation 6 :

$$KIE = \frac{k^{12}C}{k^{13}C} \qquad (6)$$

Il existe également des **effets isotopiques thermodynamiques** liés à la différence d'énergie libre entre plusieurs isotopologues. Les espèces plus lourdes possèdent une énergie libre inférieure rendant le système plus stable. La constante d'équilibre étant plus faible explique leur grande inertie à réagir et à se concentrer dans les phases condensées. Par exemple, le ^{18}O provenant de l'eau à tendance à s'accumuler dans les molécules de CO_2 de l'atmosphère. Ce type d'effet thermodynamique explique les différences dans le fractionnement isotopique entre eaux marines, eaux de surface et nuages qui se forment par évaporation de l'eau.

I-2-2) Détermination de la composition isotopique totale

La détermination de la composition isotopique totale s'est aujourd'hui étendue à un large panel d'applications comme les sciences forensiques, environnementales, l'archéologie et l'agroalimentaire.[59] Parmi les techniques mesurant la composition isotopique totale il y a la Spectrométrie de Masse par torche à plasma (ICP-MS)[60] et la Spectroscopie Infrarouge de rapports isotopiques (IRIS)[61,62] qui sont des techniques peu communes. C'est la Spectrométrie de Masse de rapports isotopique (irm-MS) qui est la technique la plus utilisée depuis le début des années 1980 pour déterminer la composition isotopique globale d'une molécule.[63]

I-2-2-1) L'irm-MS

Les premiers travaux sur le développement de l'irm-MS ont eu lieu à la fin des années 1930 avec les travaux de Nier[64] puis des avancées méthodologiques ont été réalisées dans les années 50 et 60.[65] C'est seulement à partir des années 1970 que cet outil[66,67] fut optimisé avant de connaitre un plein essor dans les années 1980.[63]

L'irm-MS est actuellement la technique la plus utilisée pour la détermination de la composition isotopique d'atomes stables.[68,69] Cet appareillage rend accessible la mesure du ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O et du ^{34}S présent dans la structure de la molécule à analyser. L'analyse isotopiques des éléments comme le Cl et le Br est également accessible comme le décrit les travaux de Cincinelli et al.[70]

Le principe de l'irm-MS est basé sur l'oxydation de la molécule par combustion dans un four d'oxydation à 1000 °C (contenant du cuivre et de l'oxyde de chrome). Les gaz formés (CO_2, N_xO_y, H_2, SO_2 etc.) sont ensuite transmis dans un deuxième four à 600 °C (contenant du cuivre réduit) afin de subir une réaction de réduction. Les différents gaz (CO_2, N_2, H_2O) passent ensuite dans un piège à eau puis par une colonne de type GC afin d'être séparés et analysés un par un. Pour mesurer la composition isotopique du ^{13}C c'est le CO_2 gaz qui permettra de la déterminer tandis que pour la composition isotopique ^{15}N c'est le N_2 gaz qui servira. Ensuite, le gaz étudié est introduit dans la source du spectromètre et ionisé par impact électronique ($CO_2^{+\cdot}$ par exemple). Les différents isotopomères formés sont séparés par un champ magnétique puis collectés dans des coupes de Faraday réglées pour capter les ions de masse-sur-charge (m/z) spécifiques (soit 44, 45 et 46 dans le cas du CO_2).

Le calcul du rapport isotopique *R* (Equation 1) est ainsi obtenu grâce à l'application d'une correction pour s'affranchir des différents isotopes de l'oxygène (^{17}O et ^{18}O).[71,72] La

composition isotopique totale $\delta^{13}C_{bulk}$ est ensuite calculée à l'aide de l'équation 3. Toujours dans le cas du ^{13}C, la référence internationale utilisée pour la comparaison est le Vienna-PeeDee Belemnite (V-PDB). Comme indiqué dans la partie I-2-1) la référence internationale étant riche en ^{13}C, les compositions isotopiques totales calculées seront dans la plupart des cas négatives.

Couplage de l'irm-MS :

Ce type d'appareillage peut supporter plusieurs configurations comme le couplage à un Analyseur Elémentaire (**irm-EA/MS**) qui permet d'analyser un échantillon pur sous forme solide ou liquide, conditionné dans des capsules en étain ou en argent selon la nature de l'échantillon.

Le couplage de l'irm-MS avec des systèmes chromatographiques tels que la GC (**irm-GC/MS**) ou l'HPLC (**irm-LC/MS**) en fonction de la volatilité des composés et de leur stabilité thermique est possible et nécessaire pour les composés organiques en mélange et est couramment utilisé par l'INPS pour les stupéfiants saisis tels que l'héroïne et la cocaïne. En effet, ce type de couplage permet de séparer les molécules en amont afin de mesurer en routine la composition isotopique globale de chaque molécule composant ce mélange. De plus, des procédures de dérivatisation sont réalisées lors de la préparation des échantillons pour obtenir des composés volatils et thermiquement stables à haute température pour être analysable par irm-GC/MS.

I-2-2-2) Avantages et limites

Les avantages de cette technique sont nombreux. En effet, cette méthode permet en routine de mesurer des compositions isotopiques totales avec une précision de 0,2‰ tout en utilisant une quantité très faible d'échantillon (1 mg). Pour la configuration irm-EA/MS, la pureté d'un échantillon doit être en général supérieure à 95% selon la nature de l'impureté afin que la composition isotopique totale mesurée ne soit pas biaisée par un mélange de molécules.

Cependant, cette technique ne permet que de déterminer la composition isotopique totale $\delta^{13}C_{bulk}$ de la molécule. Dans le cas de la mesure en ^{13}C, l'intégralité de cet élément est converti en CO_2 sans tenir compte de la position de chacun des carbones présents dans la molécule d'intérêt. Comme indiqué dans la partie I-1-4-5), la perte d'information engendrée est problématique lorsqu'on veut comparer le profil isotopique d'une molécule sur plusieurs échantillons. Utiliser une méthode capable de mesurer le profil isotopique sur chaque site carboné ou azoté pourrait aider à mieux discriminer les différentes origines des échantillons et

potentiellement mieux expliquer les profils observés. C'est pourquoi dans le cadre du projet FRIIME, nous avons utilisé l'Analyse Isotopique Position-Spécifique (PSIA) pour tracer l'origine des différents agents de coupage.

I-2-3) Détermination de la composition isotopique position-spécifique

L'utilisation d'outils déterminant la composition isotopique position-spécifique a déjà été implémentée dans les sciences forensiques.[73] Dans le but de comparer le profil isotopique des différents agents de coupage il serait, probablement, plus intéressant de connaitre la composition isotopique site-spécifique de la molécule afin d'obtenir une comparaison plus fine des différences/similitudes de chaque échantillon. De plus, si la composition isotopique totale est similaire entre deux échantillons a-t-on la garantie qu'ils proviennent du même lot ? Il serait possible à priori d'observer la même composition isotopique totale mais différente sur chaque site de la molécule. L'utilisation de la PSIA peut donc s'avérer indispensable. Plusieurs méthodes analytiques ont été proposées dans le but de déterminer la composition isotopique position-spécifique d'une molécule et sont détaillées dans cette partie.

I-2-3-1) La fragmentation

Les premiers travaux sur la PSIA remontent au début des années 1960 avec les travaux de Ableson *et al.*[74] Ils ont pu démontrer qu'au sein des composés d'origine naturelle, les groupements carboxyles (-COOH) des acides aminés sont plus riches en ^{13}C que sur les autres sites carbonés de la molécule. Par la suite, Hayes *et al.* ont étudié des molécules tels que l'acide acétique,[75] l'acétoïne[76] et certains acides gras[77] et ont montré une répartition différente des isotopes lourds au sein de ces molécules. La composition isotopique des petites molécules telles que l'acétone et l'isopropanol est encore étudiée à l'aide de cette technique.[78]

Dans les années 1990, d'autres travaux ont permis d'utiliser cette technique sur des molécules de taille plus importante comme la caféine[79] et le glucose.[80] Dans le cadre de la dégradation chimique du glucose, celui-ci est dérivé en glucose-phényl triazole puis dégradé périodiquement en phenyl triazole aldéhyde contenant les carbones C1 + C2 + C3 du glucose, en acide formique contenant les carbones C4 + C5 ainsi qu'en formaldéhyde contenant le carbone C6.

Cependant, cette méthode présente quelques inconvénients. En effet, lors de la fragmentation d'une molécule le rendement doit être quantitatif, sinon un biais sur les valeurs sera mesuré à cause d'un éventuel fractionnement isotopique. La perte éventuelle de produit de dégradation peut également entrainer une modification de la composition chimique de l'échantillon, notamment sur des grosses molécules.

Dans le but de pallier ces inconvénients, une méthode utilisant un couplage *in situ* avec un système chromatographique et l'irm-MS a été développée.

I-2-3-2) Pyrolyse couplée à la SMRI (Irm-Py-GC/MS)

La première référence dans la littérature d'un tel couplage date des travaux de Corso et Brenna[81] en 1997 et a permis de fragmenter le methyl palmitate en methyl esters de longueurs variables qui ont été séparés par GC avant d'être analysés par l'irm-MS. Cette méthode permet ainsi de déterminer la composition isotopique site-spécifique sur chaque site carboné de la molécule. La dégradation thermique via un four à pyrolyse coupe les liaisons chimiques grâce à l'énergie thermique élevée. Ce four est en quartz afin de résister aux grandes températures requises pour les analyses.

Cette méthode fut étendue sur l'étude de petites molécules tels que l'acide acétique[82] et l'éthanol[83] et permet de relier l'origine des vinaigres[84] en réalisation la PSIA de l'acide acétique qu'ils contiennent. Il est possible d'ajouter un système GC avant la pyrolyse des composés afin de les séparer en amont de l'analyse, c'est le cas pour l'éthanol contenu dans le vin, ce qui permet de s'affranchir d'une étape de purification.

Il existe aussi de nombreuses limites sur cette méthode. La création de radicaux durant la pyrolyse peut créer des réactions secondaires non représentatives de la matrice initiale. Il n'est pas toujours possible de fragmenter la molécule pour chaque site carboné, comme dans le cas du Méthyl tert-butyl éther (MTBE) qui possède trois carbones mais ne peut être fragmenté que partiellement (en méthanol et isobutène).[85] De plus, il n'est pas non plus possible d'utiliser cette technique sur des grosses molécules telle que la vanilline.[86]

I-2-3-3) La RMN quantitative

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique d'analyse étudiant les noyaux de spin nucléaire non nul (^{1}H, ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P etc.) sous l'effet d'un champ magnétique. Lorsque ces noyaux sont soumis à un champ radiofréquence, appliqué sous la forme d'impulsions, les noyaux absorbent cette énergie puis la restitue lors de la relaxation.

Un noyau atomique est assimilé à une sphère chargée. La rotation de ces charges (protons et neutrons) confère un moment magnétique $\vec{\mu}$ au noyau atomique considéré. Cependant, les isotopes composés d'un nombre pair de neutrons et de protons ont un nombre quantique de spin nul et ne possède donc pas de spin nucléaire. Le ^{12}C abondant à 98,9% ne possède donc pas de spin nucléaire contrairement au ^{13}C qui lui est peu abondant à 1,1%.

Sous l'effet d'un champ magnétique $\overrightarrow{B_0}$, tous les moments magnétiques $\vec{\mu}$ vont subir un mouvement de précession autour de l'axe $\overrightarrow{B_0}$, appelé communément précession de Larmor. Chaque moment magnétique possède sa vitesse de précession propre et la somme vectorielle de ces moments est représentée par l'aimantation $\vec{M}$. En se plaçant dans un référentiel, dit du laboratoire (axes : x, y, z) le vecteur aimantation $\vec{M}$ peut être représenté selon l'axe $\overrightarrow{B_0}$. (**Figure 8**)

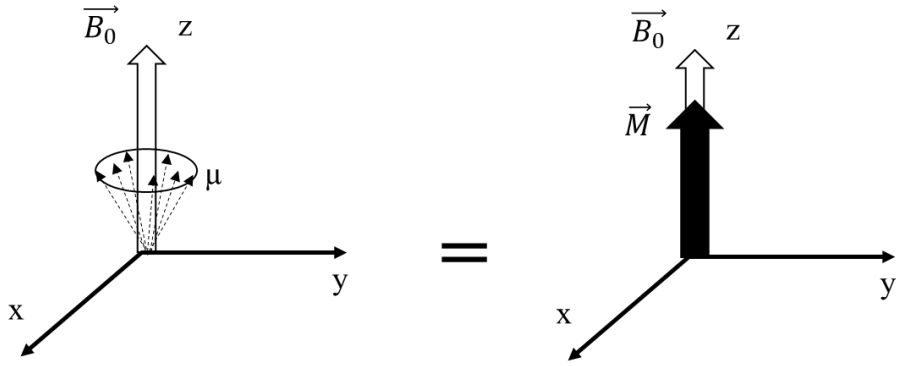


Figure 8 : Equilibre initial du système soumis au champ $\overrightarrow{B_0}$ avant l'utilisation d'une impulsion RF.

Grâce à une impulsion radiofréquence (RF) et un champ $\overrightarrow{B_1}$, perpendiculaire à $\overrightarrow{B_0}$, l'aimantation $\vec{M}$ va être basculée perpendiculairement au champ $\overrightarrow{B_0}$. (**Figure 9)**

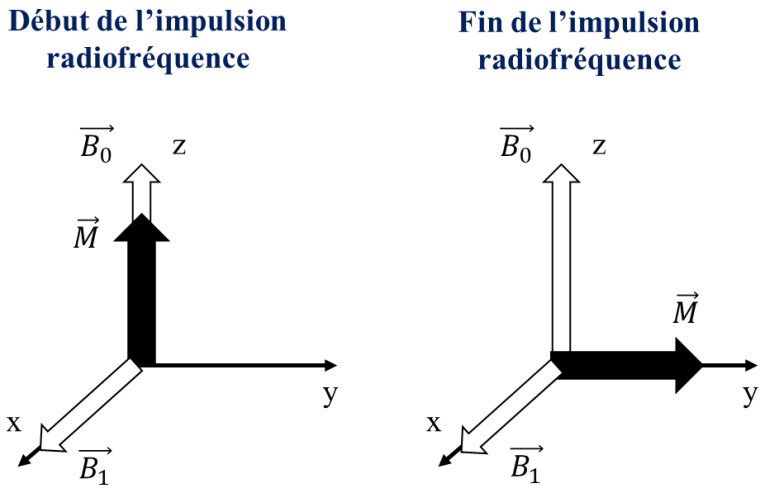


Figure 9 : Application de l'impulsion RF : apparition du champ B_1 qui bascule l'aimantation dans le plan transversal.

La puissance et la durée des impulsions RF peuvent être calibrées pour obtenir l'angle désiré de bascule. Une fois cette impulsion effectuée, le champ $\overrightarrow{B_1}$ est interrompu, ce qui a pour effet de faire revenir le système à l'équilibre, c'est-à-dire le long de $\overrightarrow{B_0}$. Ce phénomène de retour à l'équilibre est appelé relaxation.

Lors d'une expérience RMN, les signaux S obtenus sont proportionnels aux nombres de noyaux N résonnant à une fréquence donnée (si la relaxation de l'atome étudié est complète). Celui-ci est dépendant du nombre de moles d'une molécule (Equation 7)

$$S = k \times N \qquad (7)$$

k représente les facteurs à prendre en compte pouvant affecter le rapport de proportionnalité entre le nombre de noyaux entrant en résonance et l'intensité du pic observé (conditions de mesures, état du spectromètre, température de la sonde etc.). La partie I-3-1) détaille les conditions d'acquisition à prendre en compte pour se placer dans les conditions quantitatives.

La technique utilisant la RMN dans des conditions quantitatives a déjà montré son efficacité pour mesurer la composition isotopique site-spécifique de manière répétable et reproductible sur un large panel d'applications.[87] C'est donc dans cette optique que nous avons utilisé cet appareillage afin d'établir un profil chimique isotopique pour chaque site des molécules étudiées durant cette thèse.

I-2-3-4) irm-^{2}H NMR : principe, applications et limites

La mesure isotopique par RMN a été initialement développée pour le noyau ^{2}H. Cette méthode fût instaurée sous le nom de SNIF-NMR^{TM} (Site-Specific Natural Fractionation) par les professeurs Martin au début des années 1980.[56]

Cette technique est basée sur la détermination des aires en conditions quantitatives qui sont directement proportionnelles à l'isotope considéré. Le tétraméthyle urée est utilisé comme référence interne avec un rapport (D/H) connu. L'abondance isotopique du deutérium étant très faible on considère que $x_i = R_i = \left(\frac{D}{H}\right)_i$. Ceci permet ensuite par comparaison des aires de déterminer le rapport (D/H) de chaque site i de la molécule selon l'équation 8

$$\left(\frac{D}{H}\right)_i = \left(\frac{D}{H}\right)_{ref} \times \frac{S_i}{S_{ref}} \times \frac{P_i}{P_{ref}} \times \frac{C_{ref}}{C} \qquad (8)$$

$\left(\frac{D}{H}\right)_i$ et $\left(\frac{D}{H}\right)_{ref}$ le rapport isotopique du site i de la molécule d'intérêt et de la référence.

S_i et S_{ref} représentent la surface du signal i de la molécule d'intérêt et de la référence.

P_i et P_{ref} représente le nombre de protons équivalents associés au site i de la molécule d'intérêt et de la référence.

C et C_{ref} représentent la concentration molaire de la molécule d'intérêt et de la référence.

Aujourd'hui, cette technique est largement utilisée pour l'analyse de l'authenticité du vin, les spiritueux, le miel, le sucre et le vinaigre dont le but est de contrôler l'origine des différentes molécules présentes dans ces matrices.[87] Pour définir l'authenticité du vin c'est la molécule d'éthanol qui est étudiée afin de détecter l'ajout de sucres.[88] C'est la seule méthode permettant de contrôler l'authenticité des vins et elle fût officiellement adoptée par l'Organisation Internationale du Vin et de la Vigne en 1990.[89] C'est également la méthode de détection officielle de l'ajout de sucre dans le jus de fruit et le sirop d'érable.[90,91] Elle permet également de contrôler la qualité de certains molécules aromatiques tels que la vanilline[92] ou de certains huiles essentielles.[93]

Malgré l'efficacité de cette méthode, celle-ci présente quatre limites majeures : (i) la faible sensibilité du ^{2}H, (ii) la faible gamme de déplacement chimique conduisant à des recouvrements de signaux sur le spectre ^{2}H, (iii) la faible dynamique moléculaire du ^{2}H dû à la relaxation quadripolaire et (iv) les potentiels échanges avec le solvant utilisé. De ce fait, cette technique

est limitée aux petites molécules (< 300 g/mol). C'est pourquoi, depuis une dizaine d'années, une nouvelle méthode de mesure des rapports isotopiques site-spécifiques fût réalisée sur le ^{13}C.

I-3) La RMN mono-impulsionnelle isotopique du ^{13}C (irm-^{13}C NMR « one-pulse »)

La détermination des rapports isotopiques site-spécifiques ^{13}C par RMN[94] est une technique très récente car elle demande une précision adéquate sur la détermination des surfaces. En effet, la gamme de déviation isotopique ^{2}H est de 500‰ impliquant une précision de 1% sur les mesures tandis que la gamme de déviation isotopique ^{13}C est de l'ordre de 50‰. Il apparait donc indispensable d'avoir une précision de 1‰ pour pouvoir observer les variations isotopiques entre différents échantillons en ^{13}C.

Le développement de l'irm-^{13}C NMR peut s'appuyer sur l'avantage d'avoir une grande gamme de déplacement chimique (250 ppm) induisant une probabilité faible de recouvrement de signaux rendant cet outil puissant afin d'obtenir la composition isotopique position-spécifique de nombreuses molécules organiques.

Au cours du développement de cette technique, Singleton et *al.* ont démontré la possibilité de mesurer les effets isotopiques site-spécifiques relatifs en étudiant les fractionnement isotopiques issus de la réaction de Diels-Alder.[95] Cependant cette méthode ne fournit pas le profil isotopique ^{13}C intramoléculaire complet de la molécule. De plus les conditions expérimentales utilisées par ces auteurs ne permettent pas d'obtenir une répétabilité ou une justesse de l'ordre de quelques pour milles.

I-3-1) Conditions d'acquisitions pour la RMN isotopique

Lors de la transposition de l'irm-^{2}H NMR en irm-^{13}C NMR celle-ci a nécessité la prise en compte de quatre paramètres déterminants pour la justesse et la précision : (i) La stabilité du spectromètre RMN, (ii) le rapport signal sur bruit (S/B), (iii) le couple temps de répétition / l'angle d'impulsion (TR/α) et (iv) les conditions de découplages proton.

I-3-1-1) Notion de justesse et précision

Avant d'introduire les différentes conditions d'acquisition à respecter pour la RMN isotopique il est important d'introduire la notion de justesse et précision qui seront des termes utilisés dans cette partie. Pour définir le terme de précision (fidélité) il est possible de l'évaluer en utilisant les termes de répétabilité et reproductibilité.

La **répétabilité** d'une mesure définit l'écart type sur une même analyse qui est répétée n fois dans des conditions strictement identiques et dans un cours laps de temps. La **reproductibilité** représente l'écart type de la mesure reproduite n fois dans des conditions strictement identiques mais en changeant d'opérateur, d'instrument ou d'échantillon dans un intervalle de temps plus ou moins long.

Dans le cas d'une expérience RMN, la répétabilité est évaluée sur une série de mesures consécutives (généralement 5) dans des conditions identiques et sur le même tube. La reproductibilité intra-laboratoire est établie en effectuant cette même analyse sur un échantillon préparé plusieurs fois sur un long intervalle de temps. Dans les 2 cas, un écart type est calculé sur les n résultats et permet d'exprimer la **précision** de la méthode.

La **justesse** s'exprime généralement en terme de biais et représente l'écart entre la valeur moyenne obtenue sur une large série de résultats et une valeur de référence acceptée.[96] Ce paramètre est important quand il s'agit de faire une inter-comparaison ou lors de l'implémentation d'une nouvelle méthode analytique.

L'exactitude représente le degré de concordance entre le résultat obtenu et la « valeur vraie » de celle-ci. C'est la combinaison de la justesse et de la fidélité d'une méthode analytique. Les différents termes métrologiques énoncés dans cette partie sont représentés sur la **Figure 10**.

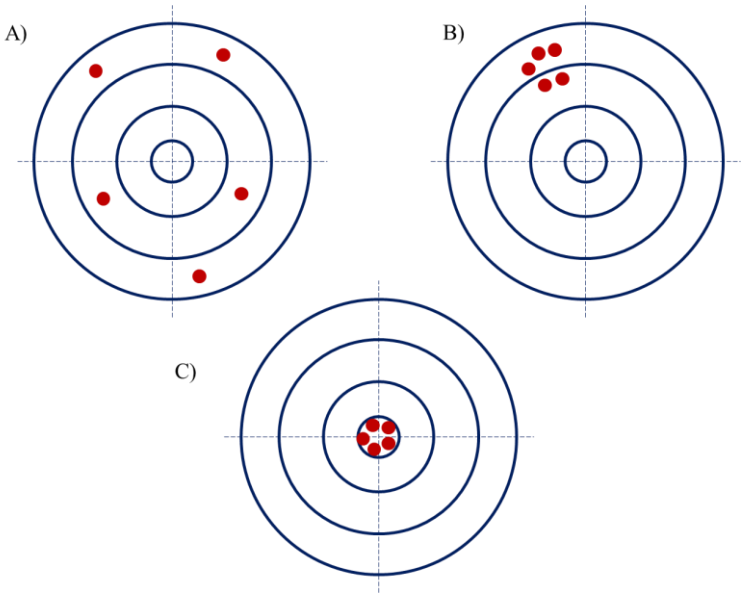


Figure 10 : Représentation schématique des différents termes métrologiques avec en : A) la représentation de la justesse d'une méthode avec une mauvaise précision, B) la représentation de la précision d'une méthode avec une mauvaise justesse et C) représente le résultat exact provenant d'une méthode juste et précise.

La **robustesse** est la capacité d'une méthode analytique à obtenir le même résultat lorsque certains paramètres de l'analyse sont modifiés. Il est difficile en pratique de maitriser rigoureusement certains paramètres tels que la température, l'expérimentateur, l'appareillage, etc. Lors d'une expérience RMN, la robustesse est déterminée en calculant les écarts-types sur n résultats lorsqu'un ou deux paramètres sont variés volontairement. Pour utiliser une méthode analytique en routine il est nécessaire de déterminer les paramètres qui peuvent faire varier les résultats et la relation qui peut les lier.

I-3-1-2) Rapport S/B et précision

Pour la RMN, le rapport signal sur bruit (S/B) limite le niveau de précision sur la quantification.[97] Ce rapport S/B est relié à l'erreur relative minimale $\frac{\Delta S}{S}$ de la surface du pic S par l'équation 8 :

$$\frac{\Delta S}{S} \geq \frac{1}{2\times(S/B)} \qquad (8)$$

Le rapport gyromagnétique du ^{13}C est 4 fois inférieur à celui du ^{1}H, son abondance naturelle est également faible (1,1%) et nécessite une importante accumulation du signal afin d'optimiser le rapport (S/B). Le bruit s'accumule de manière aléatoire tandis que le signal le fait de façon

cohérente au fur et à mesure du nombre de scans utilisés. Dans le cadre d'une mesure isotopique par RMN la précision recherchée est de 1‰ et nécessite un (S/B) égal à 500 au minimum.[98]

I-3-1-3) Délai de répétition (TR) et angle d'impulsion α

Deux autres paramètres pouvant influencer la précision et la justesse des mesures sont à prendre en compte pour que l'expérience RMN soit quantitative, il s'agit du délai de répétition (TR) qui correspond au délai entre deux scans et de l'angle α de l'impulsion radiofréquence. (**Figure 11**)

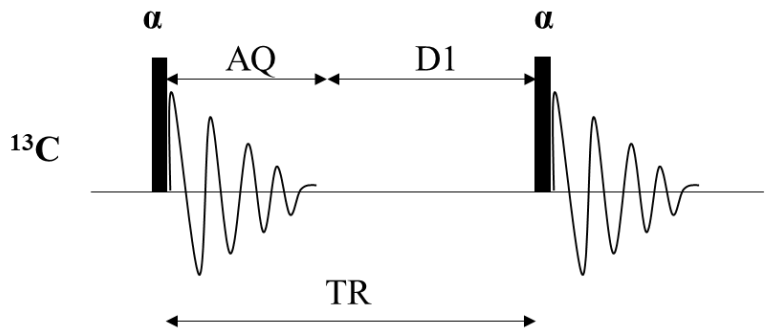


Figure 11 : Représentation d'une séquence RMN impulsionnelle classique en ^{13}C. α : angle de l'impulsion RF, AQ : Temps d'acquisition, TR : Temps de répétition et D1 : délai de relaxation.

Afin d'obtenir un rapport (S/B) maximal l'angle de basculement de l'aimantation α doit être optimal. Il a été démontré que l'angle d'impulsion à utiliser pour réaliser des mesures quantitatives doit être un angle de 90°.[99] Ces impulsions de 90° seront donc appliquées successivement pour obtenir des mesures quantitatives avec la précision requise.

Une fois l'impulsion effectuée avec l'angle requis (90°) le système d'aimantation a besoin d'un certain temps afin de pouvoir revenir à l'équilibre c'est-à-dire le long de $\overrightarrow{B_0}$. Ce délai est gouverné par le temps de relaxation longitudinale, noté T_1.

Le temps de relaxation longitudinale est variable et dépend des noyaux étudiés en fonction de leur environnement chimique. Le temps de répétition TR doit être suffisamment long pour permettre le retour de l'aimantation à l'équilibre de chaque noyau entre deux scans successifs. Dans le cas où le TR est trop court pour permettre un retour total à l'équilibre, l'aimantation atteint une valeur d'équilibre I_{eq} exprimée par l'équation 9 :

$$I_{eq} = \frac{\left(1 - e^{-TR/T_1}\right) \times I_0}{1-(e^{-TR/T_1} \times \cos\alpha)} \qquad (9)$$

Avec I_0 valeur initiale de l'aimantation et α l'angle d'impulsion utilisé.

Il en résulte une erreur relative due au phénomène de saturation partielle et l'aire mesurée à la fin de l'expérience ne sera plus uniquement proportionnelle au nombre de noyaux résonnants et donc non quantitative. L'erreur maximale commise (Er) dépend du noyau ayant le plus long temps de relaxation T_1 et peut être calculée par l'équation 10 :

$$Er = \frac{e^{-TR/T_1} \times (1-\cos\alpha)}{1-(e^{-TR/T_1} \times \cos\alpha)} \text{ ; pour } \alpha = 90° \text{ , } Er = e^{-TR/T_1} \qquad (10)$$

Il est ainsi possible d'estimer l'erreur commise en fonction du temps de répétition utilisé pour une valeur de T_1 donné. (**Tableau I**)[100]

Tableau I : Influence du temps de répétition en fonction de la justesse de la mesure RMN

TR/T_1	Er
3	5%
5	1%
7	1‰

Pour une justesse de 1‰, le temps de répétition doit par conséquent être égal ou supérieur à 7 fois le T_1 maximal de la molécule considérée afin de minimiser l'erreur commise. En pratique, c'est un délai de 10 fois le T_1 maximal de la molécule qui est choisi afin d'éliminer totalement l'Effet Overhauser Nucléaire (nOe) qui pourrait apparaître, voir partie I-3-2-1).

L'inconvénient majeur de cette technique réside donc dans le temps d'expérience dû au T_1 maximal long en ^{13}C (> 10 s) et au TR utilisé. C'est pourquoi un complexe paramagnétique a été employé afin de réduire le T_1 de la molécule. L'agent de relaxation employé est le tris-acétylacétonate de chrome III ($Cr(Acac)_3$).[101] La concentration de ce complexe est déterminée pour obtenir des durées d'expériences acceptables.

I-3-2) Implantation de la RMN isotopique du ^{13}C

Tous les paramètres évoqués dans la partie précédente ont été pris en compte pour l'implémentation de l'irm-^{13}C NMR. Sans cela, l'exactitude visée de 1‰ ne serait pas possible car les conditions quantitatives ne seraient pas respectées. De plus, d'autres paramètres

spécifiques à la séquence « one-pulse » utilisée pour l'irm-^{13}C NMR tel que le découplage et les effets d'offset doivent être optimisés pour rendre la séquence le plus robuste possible.

Cette partie présente dans un premier temps la séquence irm-^{13}C NMR « one pulse » et ses améliorations la rendant viable pour l'analyse isotopique en ^{13}C. Dans un second temps le traitement des spectres pour obtenir les compositions isotopiques position-spécifiques en ^{13}C sera évoqué.

I-3-2-1) Qualification d'un spectromètre : découplage et offset

Lors de l'acquisition en ^{13}C, la présence d'un couplage scalaire entre un noyau ^{1}H et ^{13}C va entraîner, après transformation de Fourrier, un massif sous forme de multiplets. Le signal obtenu sera éclaté sur le spectre dû à l'interaction des spins des différents noyaux considérés à travers la liaison chimique. Pour s'affranchir de ces interactions il est nécessaire d'effectuer un découplage qui permettra d'obtenir un spectre ^{13}C sous forme de singulets. En effet, il est plus aisé de réaliser l'intégration de singulet lors de la quantification du signal RMN qu'avec des multiplets. De plus, l'intensité observée avec des singulet est beaucoup plus importante, ce qui permet d'avoir un meilleur S/B et une meilleure précision sur la mesure. (**Figure 12**)

Comme évoqué dans la partie I-3-1-3), il existe un inconvénient majeur du découplage qui est dû à la présence de l'Effet Overhauser Nucléaire (nOe) qui va induire une variation de la surface des pics. Lorsqu'un couplage dipolaire existe entre deux noyaux proches dans l'espace, un transfert de polarisation s'établit lorsqu'un des deux noyau est irradié. Par exemple dans le cas d'une acquisition en ^{13}C découplé ^{1}H, un transfert de polarisation du ^{1}H au ^{13}C va se mettre en place lors du découplage. L'amplification du signal d'un carbone quaternaire ou d'un CH_2 ne sera pas la même, ce dernier pourra être amplifié jusqu'à 2 fois tandis que le carbone quaternaire ne le sera quasiment pas.

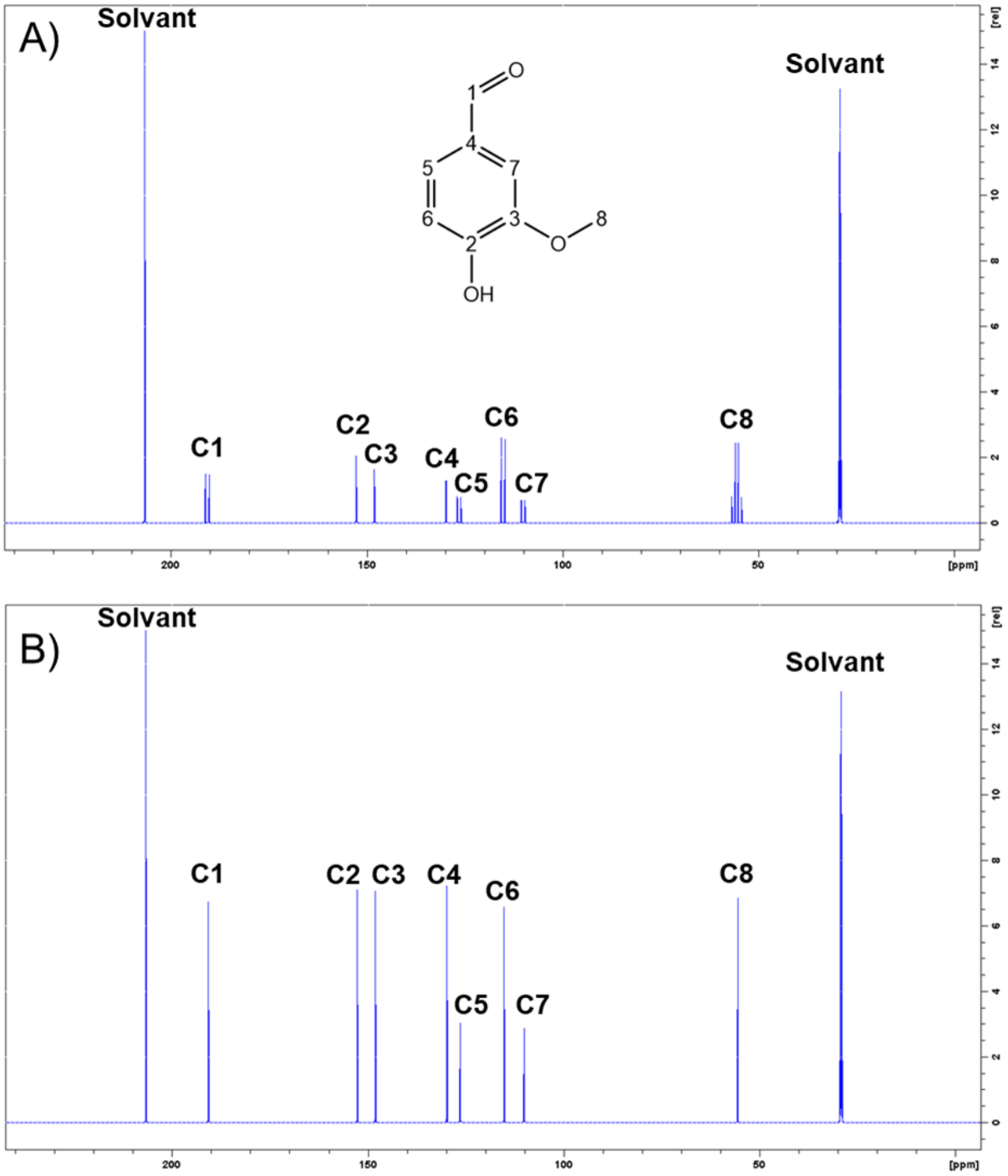


Figure 12 : Spectre ^{13}C de la vanilline A) sans découplage et B) avec découplage ^{1}H.

Il apparaît indispensable de supprimer ce nOe afin d'avoir une mesure quantitative, c'est-à-dire proportionnelle uniquement au nombre de noyaux qui résonnent à une fréquence donnée. Pour cela, le découplage ^{1}H est réalisé uniquement durant le temps d'acquisition (AQ) et pendant une courte durée (AQ = 1s). Lorsque ce découplage est stoppé durant le temps de répétition, le nOe va disparaitre. Un délai correspondant à $10 \times T_{1max}$ du composé analysé est utilisé afin de

s'assurer de la disparition totale du nOe entre chaque scan. Ce type de séquence est nommé découplage en créneaux inverses ou « inverse-gated decoupling ». (**Figure 13**)

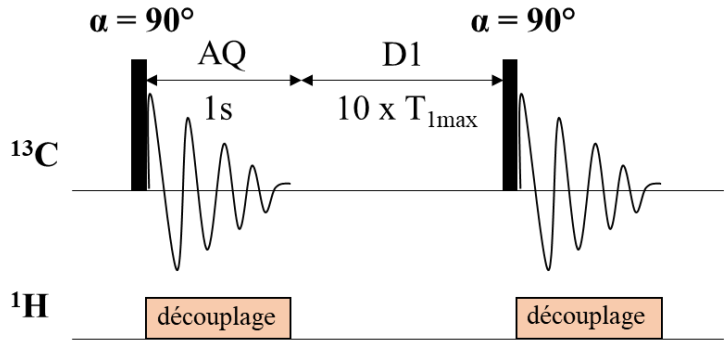


Figure 13 : Séquence mono-impulsionnelle ^{13}C utilisant un découplage ^{1}H en créneau inverse afin de minimiser l'influence du nOe. Le temps de répétition (TR) est égale à D1 + AQ.

Concernant le découplage, l'objectif est d'observer le spectre haute résolution d'un spin S pendant que la démultiplication des raies due au couplage avec un autre noyau I est supprimée. Il est nécessaire que l'écart en fréquence observé entre les raies d'un même spin S soit réduit à une valeur tellement faible qu'il ne soit plus résolu et par conséquent plus observable sur le spectre. Dans l'exemple choisi, les spins du noyau ^{1}H doivent être continuellement inversés durant l'observation des spins du ^{13}C afin de supprimer l'influence du couplage et observer des singulets. La vitesse de l'inversion des spins ^{1}H doit être rapide par apport à $1/J_{1H\text{-}13C}$, il est donc plus aisé de découpler en présence d'une petite constante de couplage.

Dans le cas d'une expérience irm-^{13}C NMR « one-pulse », le découplage doit être homogène et efficace sur une large gamme de déplacement chimique. C'est pourquoi des impulsions de types adiabatiques ont été utilisées pour compenser les inhomogénéités de champ et les effets d'off-résonnance.[102,103] En effet, les ^{1}H ayant des déplacements chimiques éloignés de la fréquence d'impulsion peuvent ne pas être correctement découplés. Le découplage par impulsions adiabatiques est l'élément majeur qui s'affranchit de ce problème et permet la répétabilité des mesures avec la précision souhaitée.

Lors du développement de cette séquence, il est apparu que les conditions du découplage ^{1}H jouaient un rôle important sur la surface des pics obtenues. C'est pourquoi, il a été choisi d'évaluer la précision et la justesse de la séquence irm-^{13}C NMR « one-pulse » utilisant un découplage ^{1}H adiabatique en faisant varier l'offset de découplage en balayant l'intégralité de la gamme ^{1}H. Pour mesurer cette efficacité du découplage une molécule bi-marquée en ^{13}C comme l'éthanol et l'acide acétique a été utilisée. Ces 2 molécules sont complémentaires, l'éthanol permet d'apprécier l'efficacité du découplage en présence d'un couplage ^{1}H-^{1}H

homonucléaire tandis que l'acide acétique, qui possède une gamme de déplacement chimique 4 fois plus grande que l'éthanol, permet d'évaluer l'efficacité du découplage sur une large gamme ^{13}C.

Le signal RMN de chaque ^{13}C de la molécule bi-marquée à 100% donne un doublet représentatif du couplage ^{13}C-^{13}C de la molécule. Ces 2 doublets provenant du même isotopologue, leurs aires respectives doivent être strictement égales, avec un ratio entre ces 2 massifs égal à 1 et par conséquent Δ (‰) = 0. Cette variation relative Δ (‰) est la différence d'aire entre les 2 signaux de l'éthanol (équation 11) et est représentative de la précision de l'irm-^{13}C NMR « one-pulse » permettant ainsi de qualifier le spectromètre pour la mesure isotopique :

$$\Delta\ (‰) = \left(\frac{f_{CH2}}{0{,}5} - 1\right) \times 1000 \qquad (11)$$

f_{CH2}, est la fraction molaire du site CH_2 de la molécule d'éthanol expérimentalement déterminée à partir de la surface des doublets. Théoriquement cette valeur de f_{CH2} doit être identique à 0,5 puisque les deux doublets CH_2 et CH_3 sont uniquement les produits de l'isotopomère bi-marqué. Par conséquent Δ (‰) = 0 dans le cadre d'une mesure exacte (précise et juste).

Les travaux de Tenailleau *et al.* en 2007,[103] ont permis d'évaluer différents types de découplage adiabatique sur de l'éthanol et de l'acide acétique bi-marquée en ^{13}C tout en faisant varier la fréquence de découplage. (**Figure 14**)

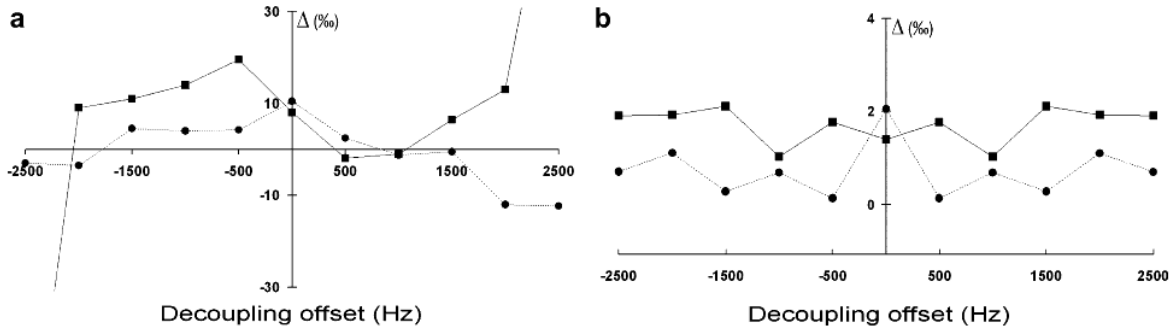


Figure 14 : Variation des intensités relatives (Δ) en fonction de l'offset de découplage ^{1}H de deux échantillons bi-marqués : l'acide acétique (-●-) et de l'éthanol (-■-). Les expériences de découplages ont été réalisées avec une séquence WALTZ-16 (a) ou une séquence utilisant des impulsions cos/OIA[103] (b).

Il a été démontré que l'utilisation d'impulsions adiabatiques de type Cos/OIA permettait d'obtenir la précision requise de 1‰. Le paramètre Δ représente l'erreur exprimée en ‰ qui est

un excellent indicateur de la précision avec la molécule d'éthanol. C'est ce type d'impulsions qui a ensuite été utilisée dans diverses applications répertoriées dans la partie I-3-3).

Les travaux de Bayle *et al.* en 2014,[104] ont démontré que la précision et la justesse d'un spectromètre RMN pouvaient être évaluées sur divers molécules organiques avec une gamme de déplacement chimique en ^{13}C différente. Concernant la justesse d'un spectromètre RMN, l'acide acétique est un bon indicateur puisqu'elle possède une fonction carboxylique avec un grand déplacement chimique (180 ppm). Si l'erreur relative Δ (‰) est proche de 0 ceci indique que le spectromètre RMN fournit les valeurs « vraies » de la composition isotopique. Dans le cas contraire, la filiation isotopique d'une molécule n'est pas possible directement et nécessite un calibrage. Cependant, la comparaison relative d'un profil isotopique reste possible sur un même spectromètre RMN si le critère de précision de 1‰ est respecté.

I-3-2-2) Calcul des compositions isotopiques position-spécifiques

Une particularité de l'irm-^{13}C NMR par apport à l'irm-^{2}H NMR est la présence de pics satellites dus au couplage ^{13}C avec le ^{13}C voisin. Celui-ci doit être pris en compte sinon une erreur moyenne de 1,1% sera induite, soit 11‰ sur la composition isotopique. La surface du pic du carbone en position i étudié doit être corrigée par un facteur compensant cette perte d'intensité due au couplage ^{13}C-^{13}C selon l'équation 12 :

$$S_i = S(1 + u \times 0{,}011) \qquad (12)$$

S_i étant la surface correcte du pic en position i, S la surface du pic mesurée en position i, u le nombre de carbones directement liés au carbone considéré en position i et 0,011 représente l'abondance relative naturelle du ^{13}C. Ce calcul suppose une résolution suffisamment correcte entre le pic d'intérêt et les pics satellites (**Figure 15**).

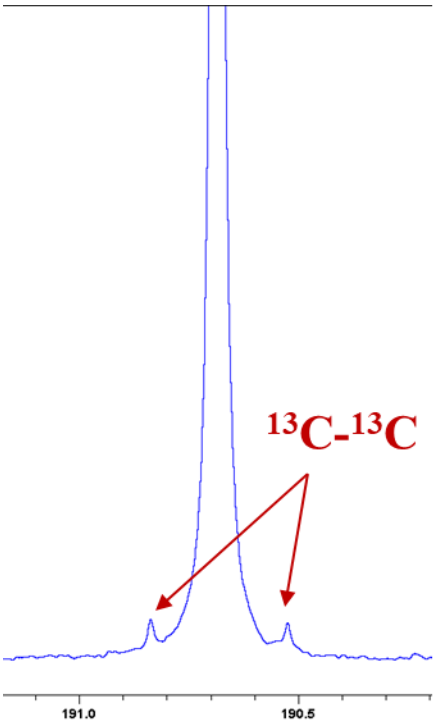


Figure 15 : Spectre RMN ^{13}C découplé ^{1}H acquis avec la séquence « one-pulse ». Présence d'un doublet dû au couplage ^{13}C-^{13}C induit par un isotopologue de la molécule.

Deux stratégies peuvent être considérées pour calculer l'abondance isotopique (x_i) position-spécifique de la surface du pic S_i.

La première consiste à calculer la fraction molaire f_i pour chaque position selon l'équation 13 :

$$f_i = \frac{S_i}{\sum_n S_i} \qquad (13)$$

Pour ensuite déterminer l'abondance isotopique ^{13}C en position i (x_i) selon l'équation 14 :

$$x_i = x_b \times \frac{f_i}{F_i} \qquad (14)$$

Ici, x_b représente l'abondance isotopique globale déterminée par irm-MS et F_i la fraction molaire statistique du carbone considérée en position i. Cette approche requiert que les mesures irm-MS soient viables et que chaque signal obtenu en irm-^{13}C NMR puisse être intégré. Les résultats peuvent ensuite être exprimés en composition isotopique δ selon l'équation 3.

La deuxième stratégie consiste à utiliser une référence interne en irm-^{13}C NMR comme pour la méthode irm-^{2}H NMR. Cependant, celle-ci ne sera pas utilisée dans la suite des travaux de thèse car elle est difficile à mettre en place en routine et fait encore l'objet de développements méthodologiques dans le cadre d'une autre thèse.[105,106]

I-3-3) Applications et limites de la RMN isotopique du ^{13}C « one-pulse »

La méthodologie utilisant l'irm-^{13}C NMR « one-pulse » décrit dans les sections précédentes a conduit à une étude inter-laboratoire montrant que cette technique peut être utilisée comme méthode de routine.[107] L'implémentation de l'irm-^{13}C NMR a ouvert la voie pour de nouvelles applications dans un large spectre de domaines qui n'étaient pas accessibles en utilisant l'irm-^{2}H NMR, compte tenu des problèmes de sensibilité et de résolution spectrale. Cette partie illustre les applications potentielles de l'irm-^{13}C NMR utilisant la séquence « one-pulse ».

Cette méthode a été utilisée pour étudier la composition isotopique de produits de synthèses tels que les principes actifs pharmaceutiques (API). La contrefaçon de médicaments est un des marchés noirs les plus prolifiques du monde, dans ce contexte l'irm-^{13}C NMR permettrait une meilleure définition de la signature isotopique ^{13}C de l'API selon les matières premières utilisées, le type de réaction impliquée dans la violation de brevet et son origine géographique. Des premiers travaux menés par Silvestre et al.,[108] ont montré l'efficacité de la méthode irm-^{13}C NMR en appliquant la séquence « one-pulse » en discriminant l'origine de deux molécules pharmaceutiques : l'aspirine et le paracétamol. Ce résultat montre le potentiel de la méthode afin de détecter la contrefaçon et la violation de brevet dans l'industrie pharmaceutique.

Le même protocole pourrait être appliqué à n'importe quelle molécule organique mais pour certaines d'entre elles une faible solubilité ou l'existence de formes isomères empêche la mesure directe de la composition isotopique. L'analyse du glucose, du glycérol[101] et du fructose est un bon exemple car des isomères sont présents en solution. Une étape de dérivation est nécessaire afin de pouvoir étudier ces molécules. Gilbert et *al.*, ont proposé une stratégie pour réaliser la PSIA en ^{13}C sur le glucose, le fructose et le sucrose.[109,110] Une importante attention sur l'utilisation de l'irm-^{13}C NMR doit être apportée pour obtenir une précision de 1‰. En effet, ces molécules possèdent des fonctions chimiques -OH libre. La présence de traces en ^{2}H issues du solvant deutéré comme du HDO résiduel peut entrainer l'apparition de nouveaux pics et ainsi une source d'erreur sur la détermination du $\delta^{13}C_i$.[111] Par l'utilisation d'un solvant deutéré plus judicieux comme le DMSO-d_6 les auteurs ont montré que la composition en ^{13}C intramoléculaire des sucres est significativement différente selon son métabolisme photosynthétique (C_3, C_4 et CAM).[112,113] Ainsi l'irm-^{13}C NMR peut être utilisée pour déterminer l'origine de ces sucres. Une autre application originale de cette méthode consiste à étudier l'adultération de la tequila par d'autres alcools moins chers provenant de la canne à sucre ou du maïs. Une fois le lien isotopique effectué entre le sucre et l'alcool correspondant,[114]

l'irm-^{13}C NMR est capable de distinguer l'éthanol pur provenant de la tequila (l'agave, plante CAM) d'autres sources incluant l'origine C_4 des plantes (maïs et canne à sucre).

Un autre type d'application a été rapporté par Diomande et *al.*,[115] sur des xanthines naturelles tels que la caféine, la théobromine et la théophylline qui sont des molécules présentes dans le café, le thé, le guarana, le cacao et la noix de kola. L'authentification de l'origine de ces molécules est un enjeu majeur pour le consommateur afin de s'assurer de l'origine du produit en fonction du label utilisé. Le problème majeur de ces composés étant leur faible solubilité dans les solvants organiques les auteurs ont proposé une double stratégie : (i) la dérivation chimique de la théobromine et théophylline en caféine et (ii) l'utilisation d'une cryosonde en irm-^{13}C NMR afin d'augmenter la sensibilité. Différents types de caféine issus de produits commerciaux et naturels de café, de thé et de cacao après dérivation de la théobromine ont été analysés par irm-^{13}C NMR. Ils ont montré que la gamme de $\delta^{13}C_i$ était très grande pour la caféine (~60‰) entre les différents groupes. L'appauvrissement en ^{13}C des groupes méthyles est particulièrement discriminant et diffère en fonction de l'origine commerciale ou naturelle de la caféine et reflète leur incorporation étape par étape durant le procédé de biosynthèse.

L'interprétation du fractionnement isotopique durant un processus naturel est également un challenge pour l'irm-^{13}C NMR afin de caractériser les mécanismes réactionnels et distinguer différentes origines biosynthétiques.[104,116] Les travaux de Romek *et al.*,[117] ont étudié la composition isotopique ^{13}C du tramadol. Cette molécule qui est un analgésique de synthèse a été récemment retrouvée dans le bois et les écorces d'un arbre médicinal africain : *Nauclea latifolia*. Actuellement, aucune théorie ne peut expliquer le haut taux de tramadol retrouvé dans cet environnement naturel qui est totalement dépourvu d'activité humaine et de bétail qui pourrait contaminer cet arbre avec des dérivés pharmaceutiques. Les résultats obtenus en irm-^{13}C NMR, ont montré quelle serait la composition isotopique si le produit était d'origine naturelle.

Une autre application originale de la PSIA présente un grand intérêt dans l'étude du devenir des polluants dans l'environnement. Cette méthode pourrait être un outil audacieux pour déterminer la source de pollution afin de la relier à son origine ainsi que pour mieux comprendre les procédés de remédiations environnementales. Julien *et al.*,[73] ont étudié la PSIA d'un additif de carburant le Methyl *Tert*-Butyl Ether (MTBE) pour mieux comprendre comment l'irm-^{13}C NMR pourrait être utilisée pour identifier l'origine des contaminations environnementales. Il a été montré que cette méthode permet de mieux traquer l'origine de ces précurseurs d'éther. Les

mêmes auteurs[118] ont étudié le fractionnement isotopique induit par les transformations liquide-vapeur durant l'évaporation qui est le principal processus de remédiation pour les composés organiques volatils. Ce processus a été simulé et étudié en utilisant l'irm-^{13}C NMR afin de démontrer que le modèle imaginé par Craig-Gordon sur l'évaporation de l'eau est également utilisable sur les molécules organiques volatiles.[119] D'autres travaux ont permis d'observer des effets isotopiques position-spécifiques durant l'élution chromatographique avec des effets isotopiques normaux et inverses.[120]

Même si l'utilisation de l'irm-^{13}C NMR « one-pulse » en routine a ouvert la voie à un champ important d'applications pour l'analyse isotopique en position-spécifique il existe néanmoins encore quelques inconvénients inhérents à cette technique.

- **La quantité de produit :** Dans la totalité de ces applications la quantité utilisée est de plus ou moins 200 mg pour chaque molécule. Ce qui pose problème pour les molécules ayant de faible solubilité dans les solvants organiques ou disponible en faible quantité.
- **Le temps d'expérience :** Lorsqu'un compromis sur la solubilité doit être trouvé le temps d'expérience pour une mesure sur 5 spectres peut atteindre 24h.

Dans l'idée de pallier ces inconvénients d'autres séquences ont été imaginées pour améliorer la sensibilité en irm-^{13}C NMR et sont détaillées dans la partie suivante.

I-4) Vers un gain de sensibilité : Les séquences RMN multi-impulsionnelles pour la RMN isotopique du ^{13}C

L'irm-^{13}C NMR "one-pulse" a montré son fort potentiel dans les diverses applications vues dans la partie précédente, pour être utilisée comme outil de routine comme analyse isotopique position-spécifiques. Au vu de la quantité relativement importante de produit utilisé et des temps d'expériences qui peuvent être longs, cette méthode peut avoir des limites lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir une grande quantité de produit (<100mg).

Une alternative pour réduire le temps d'expérience et augmenter la sensibilité en RMN est l'utilisation de séquence multi-impulsionnelle pour la RMN isotopique du ^{13}C. Le type de séquence choisi dans ce cadre est basé sur le transfert de polarisation d'un noyau S très sensible (^{1}H) sur un noyau I moins sensible (^{13}C ou ^{15}N) en utilisant le couplage scalaire $J_{I\text{-}S}$ entre les deux noyaux. Les deux séquences les plus communément utilisées pour le transfert de polarisation sont la DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) et l'INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer).

Dans cette partie le principe du transfert de polarisation sera présenté ainsi que les apports méthodologiques de la DEPT et l'INEPT pour l'analyse isotopique position-spécifique en ^{13}C. Les notions de robustesse et précision seront abordées en comparant ces deux séquences ainsi que les applications déjà réalisées pour la RMN isotopique du ^{13}C.

I-4-1) Principe du transfert de polarisation

L'objectif de transférer la polarisation d'un noyau S sur un noyau I est d'augmenter la sensibilité de l'expérience. Comme évoqué tout au long de ce manuscrit, la précision en RMN dépend du S/B qui doit être d'au moins 500 pour obtenir une précision de 1‰. Cet impact sur la sensibilité pourrait lever un verrou majeur pour l'analyse isotopique par RMN.

Le transfert de polarisation entre deux noyaux permet d'en exciter un (^{1}H) et d'observer l'autre, ^{13}C ou ^{15}N dans notre cas. La quantité d'aimantation $\vec{M}$ présente dans le plan transversal au moment de l'acquisition dépend de trois facteurs.

- **La polarisation initiale** : elle est proportionnelle au rapport gyromagnétique du noyau excité S (γ_{exc}). Plus celui-ci sera grand, plus le gain de sensibilité sera important. Elle est également proportionnelle au coefficient de saturation partielle ($1 - e^{-TR/T_{1\,exc}}$).

- **Le moment magnétique du noyau observé** : proportionnelle au rapport gyromagnétique du noyau I observé (γ_{obs}).
- **La sensibilité de détection à la fréquence d'observation** : déterminé expérimentalement elle est proportionnelle à la racine carrée de la fréquence d'observation ($\gamma_{obs}^{\frac{1}{2}}$).

Le rapport signal sur bruit obtenu sera donc donné par l'équation 15 suivante :

$$S/B = k \times \gamma_{exc} \times \gamma_{obs}^{\frac{3}{2}} \times (1 - e^{-TR/T_{1\,exc}}) \qquad (15)$$

Selon la méthode d'acquisition choisie le S/B sera d'autant plus élevé que le rapport gyromagnétique des noyaux observés et/ou excités sera grand. Dans le cas d'une acquisition simple en carbone 13, c'est-à-dire observation directe du noyau S (^{13}C) on obtiendra :

$\gamma_{exc} = \gamma_{obs} = \gamma_{13C}$.

Acquisition simple en ^{13}C : $S/B = k \times \gamma_{13C}^{\frac{5}{2}} \times (1 - e^{-TR/T_{1\,obs}})$

Transfert de polarisation ^{1}H vers ^{13}C : $S/B = k \times \gamma_{1H} \times \gamma_{13C}^{\frac{3}{2}} \times (1 - e^{-TR/T_{1\,exc}})$

Le gain de sensibilité est au maximum égal au quotient des rapports gyromagnétiques des deux noyaux ($\gamma_S / \gamma_I = \gamma_{1H} / \gamma_{13C} = 4$). De plus, le T_1 du noyau S est dans la majorité des cas inférieur à celui de I, et l'effet nOe n'est plus à prendre en compte, ce qui réduit le temps d'expérience.

I-4-2) La séquence DEPT

La séquence DEPT est schématisé en **Figure 16**. Elle a été optimisée pour l'analyse quantitative ^{13}C par Nermin Karabulut[121,122] lors de ses travaux de thèses en 2002 à l'Université de Nantes. Le principe de cette séquence et les améliorations apportées pour la rendre compatible à l'analyse isotopique sont présentés dans cette partie.

I-4-2-1) Principe

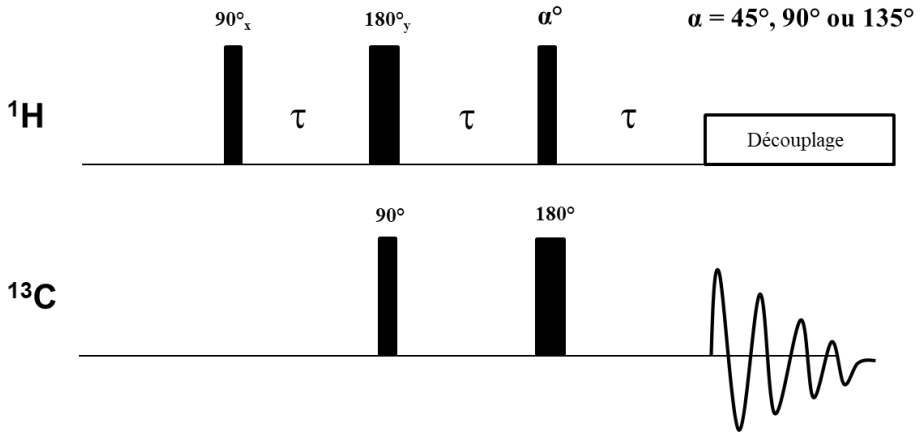


Figure 16 : Séquence DEPT multi-impulsionnelles. Elle permet d'obtenir des raies positives et/ou négatives en fonction de l'angle α utilisé sur la dernière impulsion ^{1}H. (DEPT 45, DEPT 90 ou DEPT 135).

Avec la séquence DEPT (**Figure 16**), l'aimantation des ^{1}H est basculée dans le plan transversal à l'aide de la première impulsion 90°. L'aimantation va ensuite évoluer durant un temps τ qui est proportionnel à la constante de couplage J_{CH} moyenne de la molécule. Le 90° ^{13}C bascule le système de spin dans un état multi quanta et la dernière impulsion proton le ramène dans un état simple quanta observable mais avec un transfert de polarisation. Les impulsions à 180° refocalisent l'effet des déplacements chimiques proton et ^{13}C. Le spectre est acquis à la fréquence du ^{13}C. De plus, le signal provenant de l'excitation directe en ^{13}C est supprimé par l'utilisation d'un cycle de phase.[123,124]

Selon la valeur de cet angle α, l'intensité du signal ^{13}C va varier et va dépendre également du nombre de protons qu'il porte. Un angle de 45° permettra d'observer tous les carbones portant directement des protons tandis qu'un angle de 90° permettra de voir uniquement les carbones portant un seul proton (CH). Un angle de 135° permet d'observer les CH et CH_3 avec des raies positives alors que les raies des CH_2 seront négatives. (**Figure 17**)

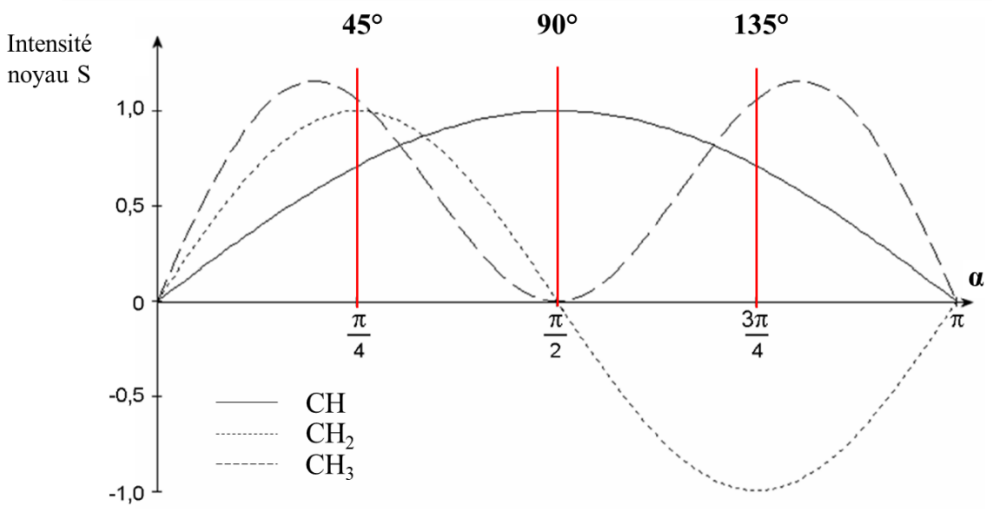


Figure 17 : Evolution en fonction de α de l'intensité recueillie avec la séquence DEPT pour les systèmes de spins CH_n. (Courbe continue n=1, pointillés n=2 et tirets n = 3).

En l'état, la séquence DEPT ne peut fournir la précision nécessaire de 1‰ pour l'analyse isotopique par RMN. En effet, divers paramètres vont affecter la répétabilité de la mesure tels que la variation du signal provenant de l'imperfection des impulsions radiofréquence (surtout pour les 180°) mais également des effets d'off-résonance. Afin de pallier ces problèmes, divers développements méthodologiques sont présentés dans la section suivante.

I-4-2-2) Améliorations méthodologiques pour la mesure isotopique position-spécifique

Contrairement à la séquence ^{13}C « one-pulse » découplée proton, l'intensité du signal détecté avec l'utilisation de la séquence DEPT va dépendre uniquement de l'aimantation longitudinale ^{1}H avant la première impulsion 90° et ne dépendra donc pas de la relaxation longitudinale ^{13}C. Cet avantage empêche l'apparition du nOe et permet de réduire le temps d'expérience puisqu'il est uniquement gouverné par la relaxation ^{1}H qui possède, en général, un temps de relaxation maximal de quelques secondes.

Les travaux de Thibaudeau et *al.*,[125] ont consisté à remplacer les impulsions de refocalisation de 180° par des impulsions composites adiabatiques (**Figure 18**). Ce type d'impulsion permet d'éliminer l'influence des imperfections des impulsions RF et les effets d'off-resonance sur l'intensité du signal ^{13}C. Les impulsions 90° et α ne sont pas modifiées par des impulsions adiabatiques. Même si ces impulsions possèdent des imperfections ceci entrainera dans le pire

des cas une légère baisse de sensibilité mais n'aura pas d'influence sur la refocalisation des déplacements chimiques.

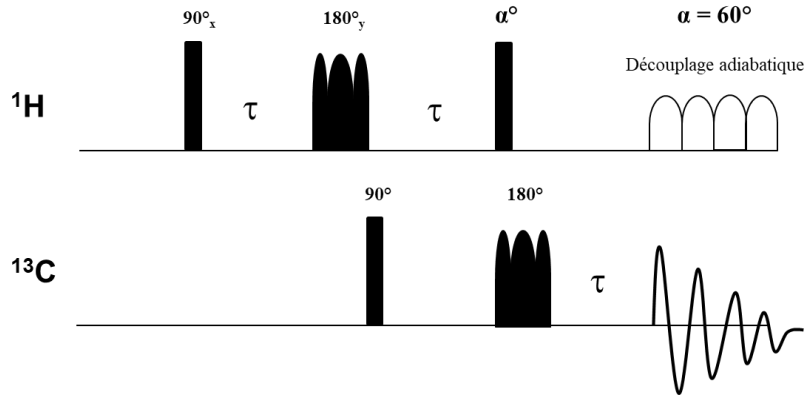


Figure 18 : Séquence DEPT dans laquelle les impulsions RF à 180° de refocalisation et de découplage sont des impulsions adiabatiques de formes cos/OIA.[125]

Comme pour la méthode irm-^{13}C NMR « one-pulse » un découplage proton adiabatique est réalisé durant l'acquisition pour les mêmes raisons évoquées dans la partie I-3-2-1). La robustesse et la précision de la séquence DEPT modifiée par des impulsions composites adiabatiques sur la mesure isotopique position spécifique seront discutées dans la partie I-4-4).

I-4-3) La séquence INEPT refocalisée

La séquence INEPT a été élaborée en 1979 par Morris et Freeman[124] dans l'idée d'augmenter le signal des noyaux peu sensibles par le biais d'un transfert de polarisation et non du nOe. En 1980, Burum et Ernst ont proposé une amélioration de la séquence INEPT permettant d'obtenir des signaux de même phase rendant possible le découplage durant l'acquisition du signal.[126] Le principe de la séquence INEPT refocalisée et les améliorations méthodologiques apportées pour la PSIA sont détaillés dans la partie suivante.

I-4-3-1) Principe

La série d'impulsions de la séquence INEPT refocalisée est représentée ci-dessous (**Figure 19**) :

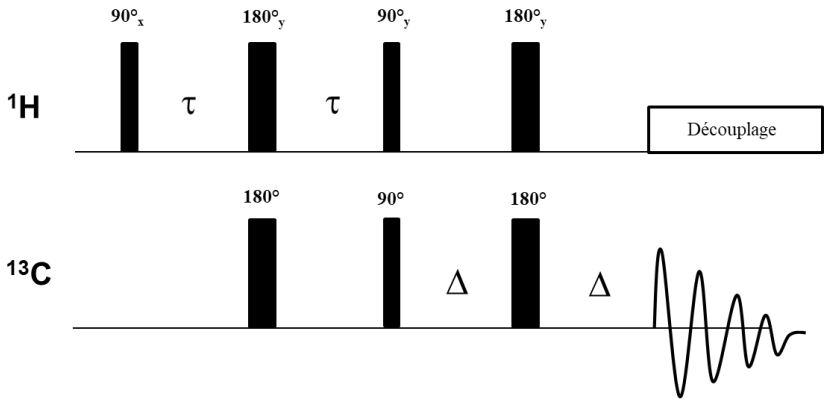


Figure 19 : Séquence INEPT-refocalisée proposée par Burum et Ernst.[126] Elle permet d'obtenir des raies positives et/ou négatives en fonction du délai Δ utilisé.

La première impulsion de 90° permet de basculer l'aimantation ^{1}H dans le plan transversal du repère tournant. Les vecteurs correspondant au spin ^{13}C et ^{1}H (dans le cas d'un système couplé ^{13}C et ^{1}H) vont précesser à des vitesses différentes durant un temps τ étant choisi tel que $\tau = 1/4J_{CH}$ et seront décalés en phase à la fin de ce temps τ. L'impulsion 180° sur ^{1}H symétrise la position des aimantations dans le plan transversal selon y. L'impulsion 180° sur ^{13}C inverse l'attribution des aimantations des deux spins ^{13}C (1^{er} écho de spin). Durant le second temps de précession libre τ les aimantations vont précesser avec la même différence de vitesse et vont revenir ainsi à leur position initiale : refocalisation. L'impulsion 90° selon y sur ^{1}H envoie les deux aimantations selon les axes z et -z pour créer la polarisation permettant d'inverser les populations correspondant à la transition ^{1}H. L'impulsion de 90° sur le ^{13}C va basculer le signal du ^{13}C dans le plan transversal du repère tournant. L'ajout des deux dernières impulsions de 180° ($2^{ème}$ écho de spin) permet de refocaliser l'aimantation du spin ^{1}H et ainsi obtenir des signaux de même phase.[126]

Selon la valeur choisie pour les délais τ et Δ, et le nombre de protons liés à chaque carbone, l'intensité des signaux va varier. Le transfert de polarisation est maximum si le premier délai τ est fixé à 1/4J avec J la constante de couplage moyenne proton carbone de la molécule. Le choix du délai Δ va permettre d'éditer les spectres (**Figure 20**) et ainsi différencier les signaux des différents types de carbones directement couplés à un proton (CH, CH_2 et CH_3).

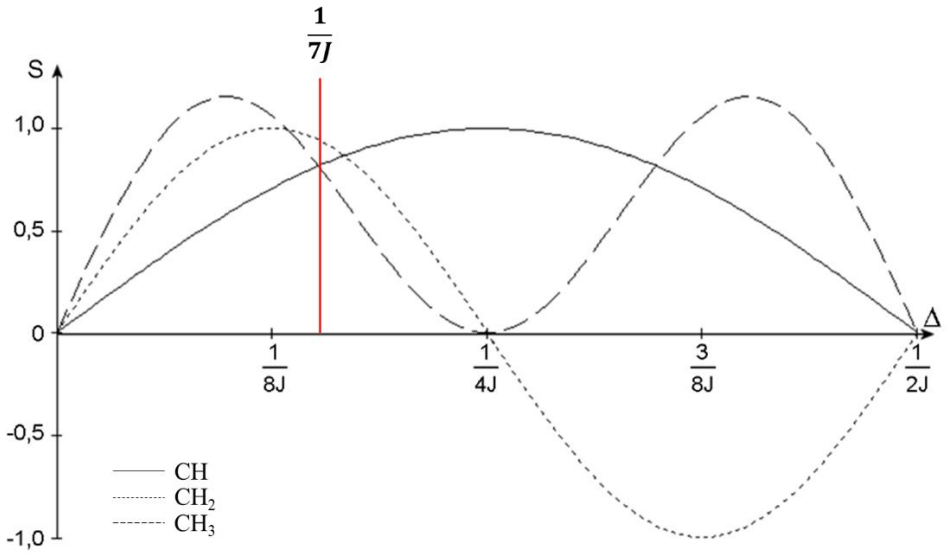


Figure 20 *:* Evolution en fonction du délai Δ de l'intensité recueillie avec la séquence INEPT-refocalisée pour les systèmes de spins CH_n. (Courbe continue n=1, pointillés n=2 et tirets n = 3).

Le délai Δ = 1/7J permet d'avoir la meilleure sensibilité pour que tous les systèmes de spins CH_n soient observés avec la même phase. Selon la valeur du Δ il sera possible d'observer un ou plusieurs types de couplages carbone-proton sur le spectre.

Comme pour la séquence DEPT, la séquence INEPT comporte beaucoup d'impulsions (7 pour l'INEPT) pouvant être affectées par les défauts des impulsions (calibrage, effets d'off-resonance). En effet, les séquences multi-impulsionnelles sont très sensibles à ce genre d'imperfection puisque les erreurs vont se propager au fur et à mesure des impulsions présentes dans la séquence. Différentes améliorations méthodologiques pour rendre la séquence INEPT refocalisée viable à la PSIA sont décrites dans la partie suivante.

I-4-3-2) Améliorations méthodologiques pour la mesure isotopique position-spécifique

Les travaux de Thibaudeau et *al.* en 2010 ont également porté sur l'amélioration de la séquence INEPT refocalisée dans le but de l'utiliser pour la PSIA. La même stratégie que pour la DEPT a été adoptée, à savoir remplacer les impulsions RF 180° par des impulsions adiabatiques. Dans le cas de l'INEPT, les impulsions d'inversion 180° ^{13}C et ^{1}H ont été remplacées par des impulsions adiabatiques simples tandis que les impulsions de refocalisation 180° ^{1}H et ^{13}C ont été remplacées par des impulsions composites adiabatiques. (**Figure 21**)

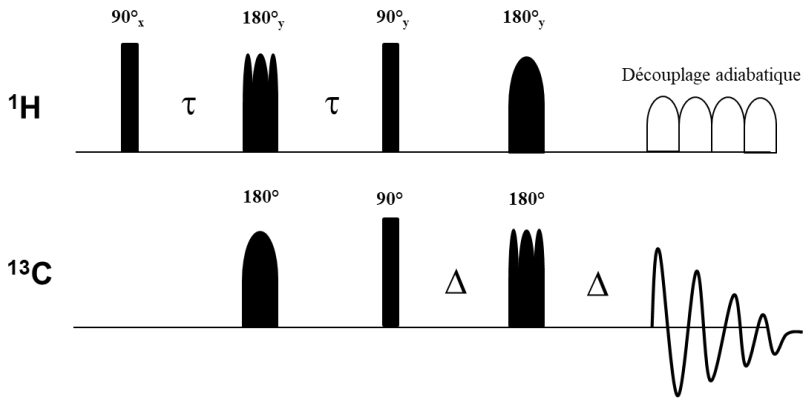


Figure 21 : Séquence INEPT-refocalisée dans laquelle les impulsions RF à 180° d'inversion, de refocalisation et de découplage sont des impulsions adiabatiques de formes cos/OIA.[125]

Dans le cas de l'INEPT et la DEPT la forme des impulsions adiabatiques est de type cosinus. Le découplage s'effectue également avec des impulsions adiabatiques, comme pour la DEPT et l'irm-^{13}C NMR « one-pulse ». L'utilisation de ce type d'impulsion va permettre de compenser les imperfections d'impulsions RF induites par l'inhomogénéité du champ RF ainsi que l'effet d'off-résonnance. La robustesse et la précision de la méthode pour la mesure isotopique sont abordées dans la partie suivante.

I-4-4) Comparaison de la DEPT et de l'INEPT

Contrairement à l'irm-^{13}C NMR « one-pulse », l'intensité des pics obtenus suite à l'utilisation de la DEPT ou de l'INEPT n'est plus gouvernée uniquement par les fractions molaires.[125] Ces nouveaux paramètres à prendre en compte qui sont détaillés dans cette partie vont affecter la robustesse et la précision de la méthode. Il est donc nécessaire comme dans le cas de l'implémentation de l'irm-^{13}C NMR « one-pulse » d'apprécier la précision et d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité intra-laboratoire de cette méthode.

Comme évoqué dans la partie I-3-2), la stabilité du spectromètre RMN doit être évaluée, notamment son appareillage comme les amplificateurs qui peuvent être plus ou moins vieux et délivrer des puissances différentes pour les impulsions RF. Ces différences peuvent conduire à une contribution différente de l'effet off-résonnance en ^{13}C et ^{1}H en fonction du spectromètre RMN utilisé. Les travaux de Thibaudeau et *al.*, ont permis d'évaluer la reproductibilité d'un spectromètre pour les séquences DEPT et INEPT refocalisées adiabatiques en faisant l'acquisition d'une série de spectres sur la molécule d'éthanol en faisant varier l'offset ^{13}C et ^{1}H afin de pouvoir couvrir une grande gamme de fréquence.

Tableau II : Effets des impulsions RF 180° ^{1}H et ^{13}C sur la précision de la détermination des aires mesurées avec les séquences DEPT et INEPT utilisant deux formes d'impulsions différentes : rectangulaire ou adiabatique.

	Impulsions RF ^{1}H	**Ecart-type (%)**
DEPT	Impulsions rectangulaire	6,4
	Impulsions adiabatique	0,3
	Impulsions RF ^{13}C	**Ecart-type (%)**
	Impulsions rectangulaire	5,9
	Impulsions adiabatique	0,6
	Impulsions RF ^{1}H	**Ecart-type (%)**
INEPT	Impulsions rectangulaire	4,7
	Impulsions adiabatique	1,1
	Impulsions RF ^{13}C	**Ecart-type (%)**
	Impulsions rectangulaire	5,1
	Impulsions adiabatique	0,2

Lors de l'implémentation des séquences DEPT et INEPT utilisant des impulsions rectangulaires classiques, la surface mesurée sur le CH_3 de l'éthanol varie en moyenne de 6 % pour la DEPT et 5 % pour l'INEPT en fonction de l'offset ^{1}H et ^{13}C choisi. (**Tableau II**) Tandis que l'incorporation d'impulsions adiabatiques ^{1}H et ^{13}C dans ces séquences permet de diminuer l'effet off-résonnance en atteignant un écart-type de 0,3 % pour la DEPT et 0,2 % pour l'INEPT. Ceci montre que l'utilisation d'impulsions adiabatiques permet quasiment de supprimer l'effet d'off-resonance en ^{13}C et est indispensable pour obtenir la meilleure précision possible dans l'idée d'effectuer la PSIA.

Afin d'obtenir une mesure isotopique fiable il est nécessaire d'avoir une répétabilité adéquate pour ce type d'analyse. Les travaux de Bussy et *al.* ont permis d'évaluer la répétabilité de la séquence sur la mesure isotopique à court terme ainsi que la reproductibilité intra-laboratoire sur le long terme sur un échantillon d'ibuprofène de référence.[127] Le gain de sensibilité obtenu sur une préparation similaire (300 mg d'ibuprofène dans 600 ul d'acétone-d_6) entre la séquence « one-pulse » et les séquences INEPT et DEPT a été évalué avec une réduction du temps d'un facteur 8. En effet, pour 5 expériences en « one-pulse » il faut une acquisition de 12 h 35 min tandis que pour l'INEPT ou la DEPT un temps d'1 h 35 min est nécessaire pour faire l'acquisition de 5 spectres avec un S/B de 500.

Le **Tableau III** montre la variation intra-échantillon sur les fractions molaires partielles mesurées sur l'échantillon d'ibuprofène avec la séquence DEPT et INEPT. On parle de fraction molaire partielle puisqu'il n'y a pas d'information sur les carbones quaternaires, seuls les

carbones couplés directement avec un proton ont été mesurés. La répétabilité à court terme a été déterminée sur une série de 5 spectres consécutifs et montre que la DEPT et l'INEPT permettent d'avoir la précision nécessaire pour la PSIA avec une précision moyenne proche de 1,5‰.

Tableau III : Variation intra-échantillon sur l'ibuprofène avec l'acquisition de 5 spectres RMN consécutifs afin d'évaluer la répétabilité à court terme.

Site	**Répétabilité à court terme (‰)**	
	DEPT	**INEPT**
10	2,0	1,4
9	1,8	0,8
8	1,9	3,1
7	1,7	1,8
6	1,5	1,2
5	1,4	0,9
4	1,4	0,8
Moyenne	1,7	1,4

Le **Tableau IV** montre la variation intra-échantillon obtenue sur 5 préparations différentes (5 spectres pour chaque) avec la même molécule d'ibuprofène de référence. La séquence INEPT permet d'avoir une précision de l'ordre de 1‰ sur une période de 3 mois tandis que la séquence DEPT a une précision de 6‰ avec une valeur maximale de 8,9‰ sur le carbone 10 entre les diverses préparations d'ibuprofène de référence. La répétabilité sur le long terme est le critère principal lorsqu'il est nécessaire de collecter beaucoup de données afin de pouvoir les comparer. Dans le cas de la DEPT, les compositions isotopiques observées ne sont pas reproductibles et montrent que la précision requise de 1‰ ne permet pas de comparer ces profils isotopiques sur une période de plusieurs mois.

Tableau IV : Variation intra-échantillon sur l'ibuprofène avec l'acquisition sur 5 préparations différentes afin d'évaluer la reproductilibité intra-laboratoire.

Site	Reproductibilité intra-laboratoire (‰)	
	DEPT	**INEPT**
10	8,9	0,8
9	8,1	0,5
8	8	1,2
7	7,5	1,3
6	4,3	0,3
5	3,4	0,2
4	3,1	0,5
Moyenne	6,2	0,7

Comme évoqué dans les parties I-4-2-2) et I-4-3-2), les 180° classiques ont été remplacés par des impulsions adiabatiques qui permettent d'obtenir les conditions nécessaires pour obtenir une précision de 1‰. Les impulsions de 90° sont également optimales et ne sont pas sujets à être une source de variation dans la précision de la mesure. Dans le cas de la DEPT, la dernière impulsion utilisant un angle α (60° dans ce cas) va faire varier les intensités du ^{13}C qui dépendent du nombre de protons couplés. Les auteurs suggèrent que cette dernière impulsion de 60° est la cause des variations observées sur le long terme, contrairement à l'INEPT qui est composé uniquement d'impulsions de 90° et 180° et qui donne une précision de 1‰. La séquence INEPT-refocalisée avec des impulsions adiabatiques est donc viable pour mesurer la PSIA d'une molécule.

I-4-5) Application en RMN isotopique du ^{13}C

L'expression des résultats sera différent de la séquence « one-pulse » puisque seuls les carbones directement couplés au proton seront mesurables. L'information isotopique sur les carbones quaternaires est ainsi perdue. Il est donc nécessaire dans un premier temps d'introduire la notion de profilage isotopique pour pouvoir comparer les différents profils isotopiques entre chaque échantillon. Dans un second temps les applications réalisées ces dernières années en RMN isotopique du ^{13}C utilisant la séquence INEPT seront présentées. Ces premières applications ont permis de rapporter dans la littérature la notion d'études « isotopomics » qui sera également évoquée dans cette partie.

I-4-5-1) Expression des résultats : notion de profilage

Avec ce type de séquence l'intensité des signaux ^{13}C va dépendre très fortement de la valeur J_{CH} de la constante de couplage, des délai Δ et τ ainsi que du nombre de protons couplés. Ceci impactera les intensités relatives observées entre les carbones qui ne seront plus gouvernés uniquement par les fractions molaires comme c'est le cas pour l'irm-^{13}C NMR « one-pulse ». Les compositions isotopiques ne sont donc plus accessibles par ce type de méthode sans calibrage. Cependant, dans le cas des applications portant sur l'authentification, comme la détection d'une fraude sur le brevet dans l'industrie pharmaceutique, les échantillons comparés consistent en la même molécule avec les mêmes constantes de couplages $^{1}J_{CH}$ et le même nombre de protons directement couplés. La contribution des impulsions de la séquence INEPT sur les intensités relatives sera donc similaire sur l'ensemble des échantillons si les conditions expérimentales sont les mêmes (concentration, température, solvant, temps de relaxation, constante de couplage).

Les contributions de chaque paramètre étant répétables pour la séquence INEPT refocalisée adiabatique il est donc possible d'utiliser les fractions molaires réduites (équation 12) f_i/F_i, même sur un nombre limité de carbones, en comparant le profil isotopique de chaque échantillon.

Dans le cas d'études d'affiliations, l'abondance isotopique x_i est requise. Pour rappel cette valeur est calculée à partir de l'abondance isotopique globale qui est déterminée par l'irm-MS ainsi que les fractions molaires f_i de tous les carbones par RMN, incluant les carbones quaternaires. Par conséquent, les molécules ayant des carbones quaternaires, la détermination de l'abondance isotopique x_i n'est pas possible avec la séquence INEPT car les fractions molaires f_i ne peuvent pas être calculées pour tous les carbones. C'est pourquoi la notion de profilage isotopique sera utilisée puisque seules les fractions molaires obtenues par la séquence INEPT refocalisée adiabatique pourront être mesurées. Cette notion de profilage isotopique est à l'origine de l'émergence des études « isotopomics » qui consiste à comparer les profils isotopiques obtenus pour chaque carbone d'une molécule entre eux afin d'identifier des marqueurs (^{13}C discriminant).

I-4-5-2) Applications avec l'émergence des études « isotopomics »

L'approche irm-^{13}C NMR INEPT a déjà été employée dans diverses applications. En 2013 les travaux de Remaud *et al.*,[128] ont permis d'appliquer la séquence INEPT sur 11 échantillons de naproxène obtenus dans des zones géographiques et produits par des groupes pharmaceutiques différents. Une analyse en composantes principales (PCA) a été utilisée afin d'observer quels carbones permettaient la discrimination de l'échantillon analysé. En utilisant l'approche irm-^{13}C « one-pulse » il n'aurait pas été possible d'étudier le naproxène puisque le temps d'acquisition serait supérieur à 24 h pour 5 spectres. La méthode irm-^{13}C NMR INEPT est également capable de discriminer 13 échantillons d'ibuprofène provenant de 5 pays différents par leur distribution en ^{13}C avec la précision nécessaire et un temps d'expérience relativement court : 1 h 25 min pour 5 spectres avec la séquence INEPT contre 12 h 35 min avec la séquence « one-pulse ».[127]

En 2015, Merchak et *al.* ont étudié le profil isotopique en ^{13}C en analysant simultanément la composition site spécifique ^{13}C ainsi que le profil métabolomique de triglycérides contenu dans l'huile d'olive provenant de 4 régions géographiques différentes.[129] Les expériences RMN ont été réalisées avec la séquence INEPT ainsi que la « one-pulse ». Les deux méthodes permettent la classification des huiles d'olives en fonction de leur origine géographique mais avec un temps d'expérience 7 fois plus court pour la séquence INEPT comparé à la « one-pulse ».

En 2018, Guyader et *al.* ont implémenté la séquence INEPT ^{13}C comme outil d'analyse en routine dans un laboratoire permettant la classification d'huiles alimentaires comme le beurre, la margarine et les graisses animales. Il a été montré que cette méthode pouvait distinguer l'origine du beurre selon l'huile végétale utilisée. Grâce à une base de donnée conséquente et des outils statistiques non-supervisés ils ont pu contrôler l'authenticité de produits commerciaux en identifiant l'origine de la plante végétale utilisée dans le produit fini.

L'irm-^{13}C NMR INEPT peut être également appliquée pour mesurer l'empreinte isotopique et utilisée comme un outil analytique dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire. Cependant il existe encore quelques inconvénients inhérents à la méthode comme le risque de recouvrement des pics même pour des petites molécules comme l'ibuprofène où deux carbones se chevauchent partiellement entrainant une perte de précision sur les pics correspondants. Dans le cas d'études isotopiques sur des molécules de plus grandes tailles cet inconvénient pourrait devenir problématique. L'utilisation de la RMN quantitative 2D pour améliorer cette résolution serait envisageable et a récemment été évaluée.

La RMN multi-dimensionnelle (nD) proposée par J. Jeener en 1971[130] et développée ensuite par Ernst et al.,[131] offre une meilleure discrimination des signaux que la RMN ^{1}D et donne une solution pour le problème de recouvrement des pics.[132] Les séquences hétéronucléaires 2D[133,134] pourraient être particulièrement intéressantes pour utiliser l'irm-^{13}C NMR. Celles-ci possèdent des caractéristiques similaires à la séquence INEPT comme le grand nombre d'impulsions qui va affecter la justesse des résultats. En effet, comme pour la séquence INEPT, un biais sur le rapport isotopique mesuré sera généré car l'intensité des signaux des systèmes CH_n dépendra de plusieurs paramètres expérimentaux et ne sera plus gouvernée uniquement par les fractions molaires.

Pour utiliser l'irm-^{13}C NMR en 2D il est nécessaire d'acquérir des expériences utilisant la corrélation ^{1}H-^{13}C avec une très haute précision (< 2‰) et avec un faible temps d'expérience (< 1 h) afin de limiter l'impact des instabilités du spectromètre. Les travaux de Martineau et al., ont montré que la séquence utilisant la corrélation ^{1}H–^{13}C Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) permettait d'obtenir la précision requise de 2‰ malgré qu'aucune impulsion adiabatique ne fut utilisée dans la séquence.[135] Ceci s'explique par le fait que cette séquence est symétrique compensant l'imperfection des impulsions découlant de l'inhomogénéité du champ RF ainsi que des effets d'off-résonance. Cette séquence HSQC est composée principalement de 2 blocks INEPT et n'inclue aucune impulsion différente de 90° et 180°. La reproductibilité intra-laboratoire sur le long terme, bien qu'elle n'est pas encore été étudiée devrait être similaire au résultat obtenu par la séquence INEPT.

Une application a vu le jour et a été exploitée avec cette méthodologie par Merchak *et al*. sur une matrice complexe de triglycérides dans le but de discriminer les huiles commerciales de différentes origines.[136] Une précision de 2‰ a été obtenue sur le spectre HSQC acquis en 22 min utilisant une cryo-sonde. Ces résultats ont montré qu'il était possible d'utiliser la séquence 2D HSQC pour effectuer l'irm-^{13}C NMR afin de classifier les échantillons d'huiles en fonction de leur origine géographique et botanique. Ces résultats ouvriront la voie à d'autres types d'applications qui peuvent être les sciences alimentaires ou pharmaceutiques.

La séquence INEPT refocalisée adiabatique pourrait également être optimisée dans le but d'observer tous les carbones, mêmes les quaternaires. En effet, il serait théoriquement possible de transférer la polarisation de tous les protons sur les carbones ayant un couplage faible ($^{2}J_{CH}$, $^{3}J_{CH}$, $^{4}J_{CH}$). Les molécules telles que le paracétamol et la caféine possèdent autant de carbones quaternaires que de carbones directement couplés avec un proton ce qui induit une perte d'information importante sur le profil isotopique avec la séquence INEPT actuellement utilisée

pour les applications présentées précédemment. Le développement de cette méthode fera l'objet de la partie II de ce manuscrit. Enfin, cette séquence peut être étendue sur un autre noyau peu sensible tel que le ^{15}N qui nécessite un transfert de polarisation du proton sur celui-ci pour pouvoir utiliser l'irm-^{15}N NMR qui est développée dans la partie suivante.

I-5) La RMN quantitative du ^{15}N

Fort de son succès, l'irm-^{13}C NMR a pu être développée de manière quantitative à l'aide des séquences « one-pulse » et INEPT pour la PSIA de molécules d'intérêt en ^{13}C.[87] La RMN permet également d'étudier un autre noyau tel que le ^{15}N qui est un élément fréquemment retrouvé dans les engrais, acides aminés, protéines, explosifs et produits pharmaceutiques.

Cette partie présente les caractéristiques du noyau ^{15}N ainsi que les conditions quantitatives nécessaires pour son analyse en abondance naturelle. Un parallèle avec le ^{13}C sera effectué afin de mieux comprendre les différences entre les deux noyaux. Enfin, un état de l'art sur la RMN quantitative du ^{15}N sera détaillé avec une dernière partie qui évoquera l'implémentation de séquence à transfert de polarisation pour envisager l'étude de la PSIA en ^{15}N.

I-5-1) Généralités sur le noyau ^{15}N

L'azote possède deux isotopes stables qui sont le ^{14}N et le ^{15}N dont l'abondance isotopique est respectivement de 99,636% et de 0,364%. Le ^{15}N est doté d'un spin non nul (I = ½) et peut donc être utilisé en RMN contrairement au ^{14}N qui possède un spin I = 1 avec un fort moment quadripolaire. Les propriétés du noyau ^{15}N pour l'analyse RMN sont présentées dans le **Tableau V** ainsi que celle du ^{1}H et ^{13}C à titre de comparaison.

Tableau V : Propriétés RMN des noyaux principaux, ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N

Noyau	Spin	Abondance naturelle (%)	γ (10^6 rad·s^{-1}·T^{-1})	Sensibilité comparé au ^{1}H
^{1}H	1/2	99,985	267,513	1,00
^{13}C	1/2	1,108	67,262	$1{,}76.10^{-4}$
^{15}N	1/2	0,364	-27,116	$3{,}85.10^{-6}$

Le rapport gyromagnétique (γ) du ^{15}N est environ 3 fois plus faible que celui du ^{13}C et environ 10 fois plus faible que celui du proton. Ce faible rapport gyromagnétique pour le ^{15}N conduit à

une sensibilité, à nombre constant de noyaux, considérablement réduite par apport à la RMN du ^{13}C et encore plus par rapport à la RMN du proton. Ce rapport est négatif pour le ^{15}N ce qui indique que son moment magnétique μ et son moment cinétique I sont opposés.

Cet aspect sur la sensibilité est aggravé par sa faible abondance naturelle qui est environ 3 fois plus faible que le ^{13}C et 270 fois plus faible que le proton. Il est donc plus difficile d'obtenir un bon rapport signal sur bruit avec ce type de noyau. Cependant sa gamme de déplacement chimique s'étend sur une gamme de 800 ppm contre 250 ppm pour le ^{13}C et 12 ppm pour le ^{1}H rendant le recouvrement de signaux moins probable que les autres noyaux.

I-5-2) Conditions quantitatives

Malgré sa faible abondance naturelle (0,36% vs 1,1% pour le ^{13}C) et sa très faible sensibilité (environ 2% du signal en ^{13}C a champ constant et en abondance naturelle) la RMN ^{15}N a été développée dans les années 1970 comme une technique spectroscopique puissante pour l'élucidation structurale.[137,138]

Un moment magnétique négatif et par conséquent un nOe négatif peut être obtenu pour le noyau ^{15}N. Comme évoqué dans la partie I-3-2-1) il est nécessaire de s'affranchir de cet effet pour le ^{15}N. Il est donc primordial d'effectuer le même découplage en créneau inverse qu'en ^{13}C. De plus, il est nécessaire d'avoir un $TR = 10 \times T_{1max}$ entre deux scans pour s'affranchir totalement du nOe. Pour le ^{15}N, les T_1 sont du même ordre de grandeur qu'en ^{13}C, c'est-à-dire environ 15 s pour les plus élevés (dans les petites molécules). Les agents paramagnétiques utilisés en ^{13}C peuvent être également utilisés en ^{15}N pour réduire les T_1 et donc le temps d'expérience.

De manière général, les mêmes conditions décrites dans la partie I-2-3-3) doivent être respectées pour obtenir des conditions quantitatives et les caractéristiques du ^{13}C sont très proches du ^{15}N en RMN ce qui va induire les mêmes conditions expérimentales pour ce dernier.

I-5-3) Etat de l'art

A notre connaissance, seulement un article dans la littérature évoque des travaux sur la RMN ^{15}N quantitative.[139] Les travaux de Levy *et al.* ont porté sur les conditions nécessaires pour être quantitatif lors de l'utilisation de la RMN ^{15}N. Pour cela, une séquence utilisant le découplage en créneaux inverses a été mise au point afin de supprimer le nOe (similaire à la séquence « one-pulse » en irm-^{13}C NMR). L'ajout d'agent paramagnétique a permis de baisser les T_1 (s) ^{15}N des différentes molécules étudiées dans l'idée de diminuer le temps d'expérience. Cependant, ces travaux n'abordent pas la question de la justesse et de la répétabilité de leur séquence.

D'autres études utilisant la séquence INEPT afin d'améliorer la sensibilité en ^{15}N ont été élaborées par Remaud *et al.* notamment sur l'utilisation des couplages longues distances ($^{n}J_{NH}$) ayant des constantes de couplage faible (1 à 12 Hz) sur la caféine et la wyosine.[140,141] D'autres travaux ont été menés sur les purines pour assigner correctement les substituants azotés de chaque molécule.[142–144]

Actuellement l'utilisation de la RMN ^{15}N se limite essentiellement à l'analyse structurale, c'est-à-dire l'élucidation structurale de molécules complexes telles que les protéines ou les alcaloïdes et souvent après enrichissement en ^{15}N.[145–147]

I-5-4) Vers un gain de sensibilité : Peut-on envisager d'implémenter une séquence à transfert de polarisation pour la RMN isotopique du ^{15}N ?

Comme pour le noyau ^{13}C, la RMN ^{15}N souffre d'un manque de sensibilité dû à sa faible abondance naturelle induisant des temps d'expérience très longs et/ou une quantité de produit utilisée importante pour obtenir un S/B de 500. Les séquences avec un transfert de polarisation du noyau sensible ^{1}H sur le noyau peu sensible ^{13}C ont permis de diminuer les quantités ainsi que le temps d'expérience RMN comme vu dans la partie I-4-5-2).

Dans l'état actuel, l'utilisation d'une séquence « one-pulse » en ^{15}N parait inenvisageable pour obtenir un S/B d'au moins 500. L'implémentation de l'INEPT pourrait être un outil de choix pour pallier en partie le manque de sensibilité rencontré avec le noyau ^{15}N. La méthodologie utilisée avec la séquence INEPT pour l'irm-^{13}C NMR paraît être une bonne base pour implémenter l'irm-^{15}N NMR. En effet, les T_1 ^{1}H étant beaucoup plus courts que ceux du ^{15}N

ceci réduira considérablement le temps d'expérience. De plus, les impulsions et le découplage adiabatique qui ont montré leur efficacité en irm-^{13}C NMR pourraient également être adaptés pour l'irm-^{15}N NMR.

La partie III de ce manuscrit abordera l'adaptation d'une séquence INEPT-refocalisée adiabatique pour la mesure position-spécifique du ^{15}N par RMN.

I-6) Analyse statistique : exploitation des données

L'application des analyses statistiques à la spectroscopie RMN ainsi qu'à la police scientifique a permis de classer les molécules d'intérêts en fonction de leur origine.[31,55,148,149]

Dans le cadre de cette thèse les analyses univariées, multivariées (supervisées et non supervisées) ainsi que les algorithmes de comparaison peuvent être employés afin de comparer les différents profils isotopiques obtenus par irm-^{13}C NMR et irm-^{15}N NMR. Celles-ci peuvent mettre en avant une empreinte isotopique unique pour chaque molécule ou bien une histoire commune qui aiderait la police scientifique dans le cadre de l'application forensique à suivre les réseaux de distributions de la cocaïne et l'héroïne par l'intermédiaire des agents de coupage. Les principes de ces différentes analyses statistiques sont décrits dans cette partie.

I-6-1) Analyse de variance univariée

L'analyse univariée (ANOVA : ANalysis Of VAriance) permet de mettre en évidence une variable qui serait à l'origine de la séparation des groupes d'échantillons selon le facteur étudié. Dans le cadre d'une analyse isotopique RMN il serait possible de mettre en évidence des sites ^{13}C ou ^{15}N qui expliqueraient la différence entre des molécules d'origine naturelle et synthétique par exemple.

Cette analyse consiste à étudier la comparaison de moyennes pour plusieurs groupes (> 2). Il s'agit de comparer la variance inter-groupe (écart des moyennes des groupes à la moyenne totale) et la variance intra-groupe (somme des fluctuations dans chaque groupe). Si le facteur de différence entre les groupes est faible alors ces 2 variances sont à peu près égales, sinon ce facteur possède un pouvoir discriminant significatif.

Cependant, l'ANOVA considère un seul facteur à la fois et ne tient pas compte des interactions pouvant être induites par les autres facteurs de la matrice ce qui impose l'utilisation d'analyses multivariées.

I-6-2) Analyse multivariée

Si la population est définie par plus de 2 variables, des méthodes de régressions multiples et d'analyses multivariées sont utilisées pour décrire cette population. Le but des analyses multivariées est de rendre l'information moins redondante. En d'autres termes de réduire la complexité des informations fournies par des variables explicatives pour expliquer les variables dites « réponses ».

Il existe plusieurs méthodes de classifications multivariées qu'il est possible de classer en analyses supervisées et non-supervisées. Les méthodes dites non-supervisées permettent d'avoir une vision globale du jeu de données de la matrice sans aucun à priori. L'appartenance des échantillons à tel ou tel groupe n'est pas connue, le but étant de retrouver une classification des échantillons à partir des descripteurs disponibles en maximisant la variance sur l'ensemble des données. L'Analyse en Composantes Principales (PCA) sera décrite dans cette partie, puisque celle-ci a été utilisée dans ces travaux de thèse.

Dans le cas contraire, en analyse supervisée, le but est d'optimiser la séparation des différents échantillons dont l'origine du groupe est connue avec un nombre réduit de variables discriminantes. Par exemple, dans le cas de la RMN isotopique ce type d'analyse peut permettre de construire un modèle prédictif permettant de dire si tel ou tel échantillon d'une molécule d'intérêt est d'origine naturel ou synthétique. Ce type de méthodes prédictives vise à construire un modèle pour prédire les valeurs des variables « réponses ». La méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS) sera détaillée dans cette partie.

I-6-2-1) L'analyse en composantes principales (PCA)

La PCA permet d'explorer les liaisons entre variables et les ressemblances entre individus. Elle est considérée comme une méthode de projection qui permet de projeter les observations depuis l'espace à p dimensions des p variables vers un espace à k dimensions ($k < p$) avec le maximum d'informations conservées sur les premières dimensions. Les variables d'origine sont

remplacées par des variables synthétiques appelées composantes principales contenant la quasi-totalité de l'information. Si l'information associée par les 2 ou 3 premières composantes principales représente un pourcentage suffisant de la variabilité totale alors ces observations pourront être représentées sur un graphique à 2 ou 3 dimensions, facilitant grandement l'interprétation.

La représentation du graphique obtenue en PCA permet de rassembler et de discriminer les échantillons selon leur variabilité et a déjà été utilisée avec succès dans le cadre de l'irm-^{13}C NMR et de la comparaison de profils isotopiques.[108,127] Les résultats obtenus peuvent ensuite servir pour d'autres traitements statistiques tels que les méthodes prédictives.[150]

I-6-2-2) Méthode prédictive : régression des moindres carrés partiels (PLS)

La régression des moindres carrés partiels ou « Partial Least Squares regression » (PLS) permet de construire un modèle prédictif quand les variables explicatives sont corrélées et nombreuses. Elle maximise la variance des prédicteurs X afin de pouvoir la corréler avec la variable à expliquer Y. La PLS cherche des composantes, appelées variables latentes, liées à X et Y servant à exprimer la régression de Y. Pour cela, un ensemble de h composantes sera créé à partir de n observations décrites par p variables avec ($h < p$).

Une application courante en chimie consiste à modéliser la relation entre les mesures spectrales (RMN) qui comprennent de nombreuses variables corrélées les unes avec les autres et les propriétés physico-chimiques de la molécule.[151] La régression PLS permet de créer des modèles de prévision et n'est pas utilisée pour éliminer les variables qui ne permettent pas d'expliquer la réponse. Pour cela c'est la PCA qui permet d'identifier les « biomarqueurs ».

Le nombre de composantes à garder pour construire ce modèle de régression est déterminé en mettant en jeu une validation croisée utilisant le paramètre Q^2 comme indicateur de la qualité du modèle prédictif.

Dans le cas de la PLS, la robustesse du modèle est évaluée en mesurant Q^2 qui s'exprime selon l'équation 16 :

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_{(-i)})^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \overline{y})^2} \qquad (16)$$

Avec y_i : valeurs obtenues à l'aide de la méthode de référence ; $\hat{y}_{(-i)}$ valeurs prédites par le modèle de régression et $\overline{y}$: moyenne des valeurs de tous les échantillons utilisés pour construire le modèle. Un $Q^2 > 0{,}5$ indique une bonne capacité prédictive du modèle.

I-6-3) Algorithme de comparaison

Comme évoquée dans la partie I-1-3-4), la finalité d'une méthode de profilage consiste en la comparaison des profils respectifs de plusieurs échantillons pour en évaluer leur similarité. Plusieurs approches ont été envisagées par la police scientifique et se fondent sur un ensemble de calculs statistiques de mesure de distances ou corrélations permettant d'évaluer si des échantillons sont chimiquement liés ou non.[24,152] Les algorithmes de comparaison utilisent le postulat suivant : des échantillons similaires possèdent une signature chimique similaire, qui peut être utilisée pour identifier ou caractériser des groupes d'échantillons similaires.

Le but de cette partie est de présenter les principales analyses statistiques utilisées par la police scientifique dans le cadre du profilage chimique des stupéfiants. Ces notions seront ensuite appliquées en RMN isotopique pour le profilage chimique des agents de coupage.

I-6-3-1) Méthode de mesure de distance Euclidienne et cosinus

La méthode de mesure de distance est une technique non-supervisée qui ne donne pas d'information sur l'éventuelle distribution des données en groupe comme c'est le cas pour la PCA. Pour l'INPS cette approche repose sur la mesure de la variabilité des profils chimiques au sein de populations de spécimens dits liés et non liés avec la fixation d'un seuil de décision.

Dans l'idée d'estimer le pouvoir discriminatoire de la méthodologie de profilage, Guéniat et Esseiva ont proposé de constituer 2 populations.[30,153] La première population regroupe les spécimens que l'on dit liés, provenant de la même source avec des profils chimiques similaires. Pour la constituer un spécimen provenant de la même saisie ou du même lot est analysé plusieurs fois. La seconde population comporte des spécimens dits non liés, provenant de sources supposées différentes pour lequel il est attendu d'avoir des profils chimiques différents.

La distance Euclidienne (**Figure 22**) permet de comparer les profils chimiques de chaque population 2 à 2 et a été utilisée par de nombreux auteurs.[154–156]

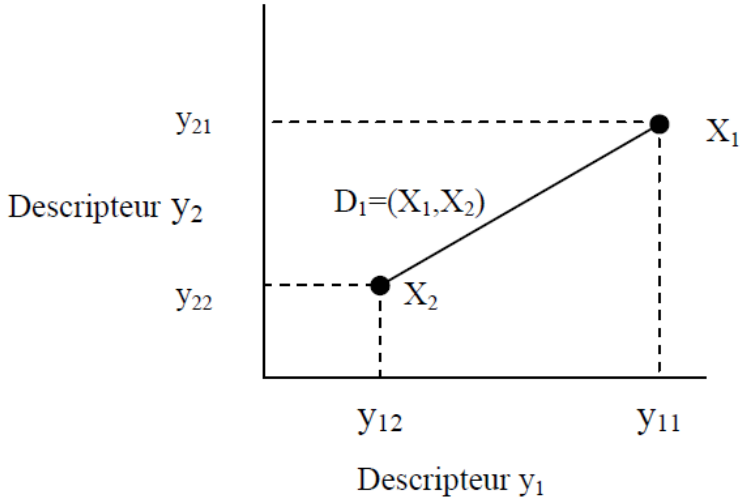


Figure 22 : Schématisation de la distance Euclidienne.

La distance Euclidienne est définie selon l'équation 17 :

$$D_1 = (X_1, X_2) = \sqrt{\sum_{j=1}^{p} (y_{1j} - y_{2j})^2} \qquad (17)$$

y_{1j} : représente l'air du pic j sur l'air du standard interne dans le chromatogramme a et y_{2j} : l'air du pic j sur l'air du standard interne dans le chromatogramme b.

C'est le type de distance le plus utilisé, il s'agit simplement d'une distance géométrique dans un espace multidimensionnel. Cette méthodologie pourrait être aisément utilisée pour la comparaison de deux spectres RMN.

Une autre méthode de mesure de similarité utilisée la similarité cosinus (mesure cosinus) et permet de calculer la similarité entre deux vecteurs à n dimensions en déterminant l'angle entre eux. (**Figure 23**)

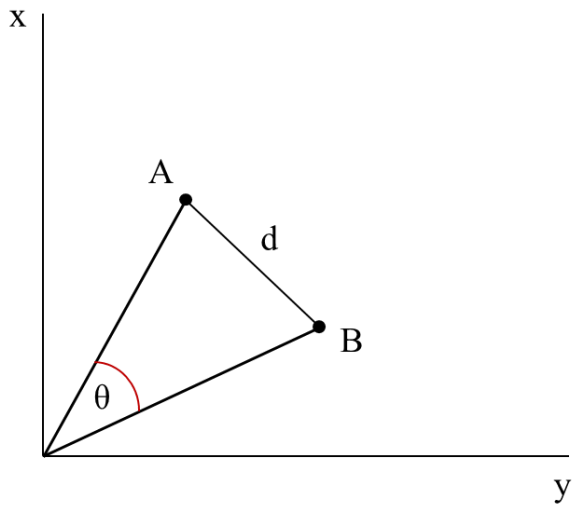


Figure 23 : Schématisation de la distance cosinus.

Soit deux vecteurs A et B, l'angle θ s'obtient par le produit scalaire et la norme des 2 vecteurs selon l'équation 18 :

$$\cos\theta = \frac{A\,.\,B}{\|A\|\,.\,\|B\|} \qquad (18)$$

La valeur $\cos\theta$ est comprise entre -1 et +1. Une valeur proche de -1 indiquera des vecteurs résolument opposés, 0 des vecteurs orthogonaux et +1 des vecteurs similaires, c'est-à-dire colinéaires. Des valeurs intermédiaires vont permettre d'identifier le degré de similarité entre deux profils chimiques.

I-6-3-2) Méthode de corrélation : Coefficients de Pearson

Sur le même principe d'étude de 2 populations d'autres méthodes de comparaison peuvent être employées comme celles se basant sur la corrélation des coefficients de Pearson.

Les coefficients de corrélation de Pearson mesurent le degré de la relation linéaire entre 2 variables X et Y et supposent une valeur située entre -1 et +1. Plus le coefficient est proche des valeurs extrêmes -1 et +1, plus la corrélation linéaire entre les variables est forte et l'expression « fortement corrélées » est alors employée. Si ce coefficient est proche de 0 alors il n'y a pas de relation entre X et Y.

Le coefficient de corrélation linéaire r de 2 variables X et Y est égal à la covariance de X et Y (moyenne du produit des écarts à la moyenne) divisée par le produit des écarts-types de X et Y selon l'équation 19 :

$$r = \frac{\sum(X-\bar{X})\times(Y-\bar{Y})}{\sqrt{\sum(X-\bar{X})^2}\times\sqrt{\sum(Y-\bar{Y})^2}} \qquad (19)$$

I-6-3-3) Détermination de la similarité des profils chimiques

Comme cela a été montré par Lociciro *et al*. quand un algorithme de comparaison est appliqué sur des profils chimiques, trois situations peuvent être considérées entre les distributions des spécimens chimiques liés et non liés.[31] (**Figure 24**)

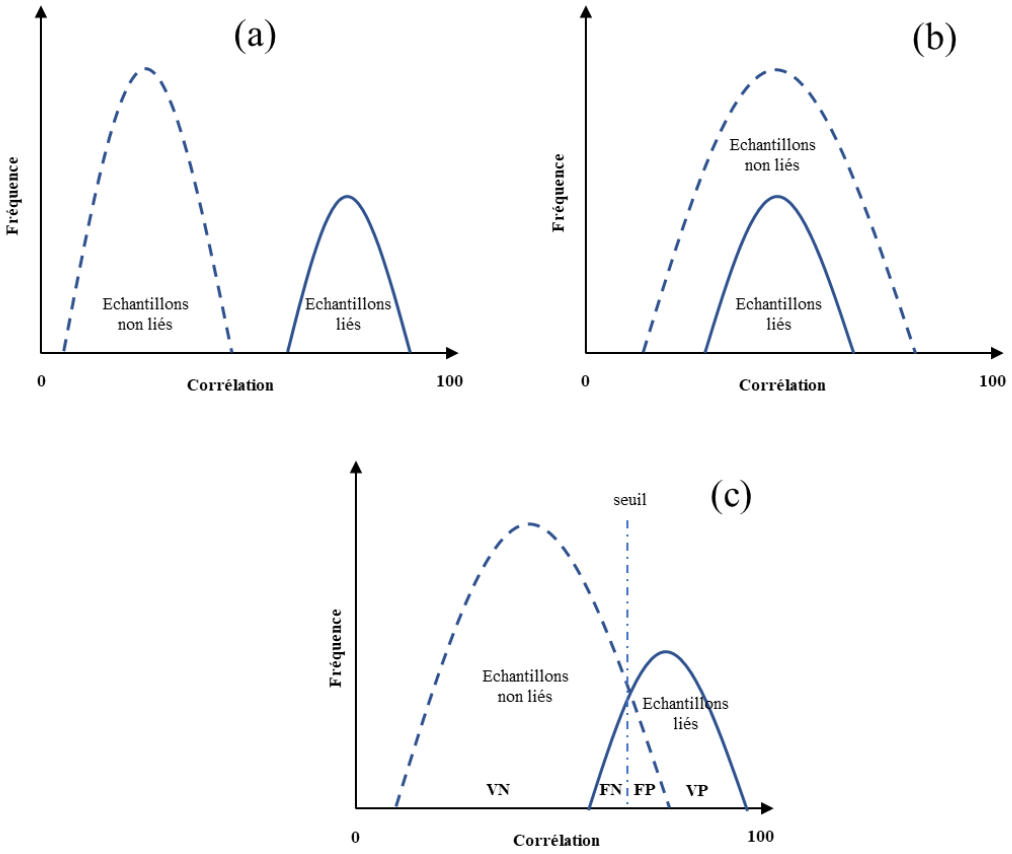


Figure 24 : Estimation de la performance de séparation des 2 types de population : échantillons liés et non liés. Trois situations possibles a), b) et c).

La situation (c) est la situation la plus fréquemment rencontrée conduisant à une superposition des échantillons liés et non liés avec un taux de vrais positifs (VP), de faux positifs (FP) qui sont dits chimiquement liés alors qu'il ne le sont pas et de faux négatifs (FN) qui sont dits chimiquement non liés alors qu'ils le sont selon la valeur de seuil de décision choisie.

La police scientifique se base sur un seuil de décision afin d'estimer la présence ou l'absence d'un lien chimique entre les stupéfiants. Si la mesure des coefficients de corrélation de Pearson est choisie pour la comparaison de profils chimiques de stupéfiants alors une valeur de seuil

devra être déterminée. Si les spécimens étudiés possèdent une corrélation égale ou supérieure à celle-ci alors un lien est confirmé entre ces derniers et cela indique que leur profil chimique est similaire. La qualité d'une méthode statistique de comparaison se juge par une minimisation des taux de faux positifs et négatifs. La meilleure méthode correspond à celle qui groupe les spécimens liés et qui sépare les spécimens non liés de la meilleure des manières.

Bibliographies

(1) Morelato, M.; Beavis, A.; Tahtouh, M.; Ribaux, O.; Kirkbride, P.; Roux, C. The Use of Forensic Case Data in Intelligence-Led Policing: The Example of Drug Profiling. *Forensic Sci. Int.* **2013**, *226* (1), 1–9.

(2) Emerson, B.; Haden, M. Public Health and the Harm Reduction Approach to Illegal Psychoactive Substances☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2018.

(3) *Arrêté Du 22 Février 1990 Fixant La Liste Des Substances Classées Comme Stupéfiants*.

(4) EMCDDA. European Drug Report 2016: Trends and Developments http://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2016 (accessed Jun 15, 2018).

(5) Broséus, J.; Gentile, N.; Bonadio Pont, F.; Garcia Gongora, J. M.; Gasté, L.; Esseiva, P. Qualitative, Quantitative and Temporal Study of Cutting Agents for Cocaine and Heroin over 9 Years. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *257*, 307–313.

(6) *Rapport Mondial Sur Les Drogues*; Nations Unies, Office contre la drogue et le crime, 2005.

(7) Casale, J. F.; Klein, R. F. Illicit Production of Cocaine. *Forensic Sci. Rev.* **1993**, *5* (2), 95–107.

(8) *Rapport Européen Sur Les Drogues*; Observatoire européen des drogues et des toxicomanies, 2017.

(9) *World Drug Report*; United Nations Office on Drugs and Crime, 2017.

(10) Esseiva, P.; Margot, P. Drug Profiling. In *Wiley Encyclopedia of Forensic Science*; American Cancer Society, 2009.

(11) Dams, R.; Benijts, T.; Lambert, W. E.; Massart, D. L.; De Leenheer, A. P. Heroin Impurity Profiling: Trends throughout a Decade of Experimenting. *Forensic Sci. Int.* **2001**, *123* (2–3), 81–88.

(12) Martino, R., Malet-Martino, M., Gilard, V., & Balayssac, S. Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *398*(1), 77-92.

(13) Strömberg, L.; Maehly, A. C. Comparative Gas Chromatographic Analysis of Narcotics: III. Phenmetrazine Hydrochloride. *J. Chromatogr. A* **1975**, *109* (1), 67–72.

(14) Strömberg, L.; Bergkvist, H.; Edirisinghe, E. A. M. K. Comparative Gas Chromatographic Analysis of Narcotics: IV. Methamphetamine Hydrochloride. *J. Chromatogr. A* **1983**, *258*, 65–72.

(15) Neumann, H. Comparison of Heroin by Capillary Gas Chromatography in Germany. *Forensic Sci. Int.* **1994**, *69* (1), 7–16.

(16) Huizer, H. Analytical Studies on Illicit Heroin. V. Efficacy of Volatilization during Heroin Smoking. *Pharm. Weekbl. Sci.* **1987**, *9* (4), 203–211.

(17) Huizer, H. A Contribution to Comparison. *Forensic Sci. Int.* **1994**, *69* (1), 17–22.

(18) Strömberg, L.; Lundberg, L.; Neumann, H.; Bobon, B.; Huizer, H.; van der Stelt, N. W. Heroin Impurity Profiling: A Harmonization Study for Retrospective Comparisons. *Forensic Sci. Int.* **2000**, *114* (2), 67–88.

(19) Brochmann-Hanssen, E.; Fontan, C. R. Gas Chromatography of Alkaloids with Polar Stationary Liquids. *J. Chromatogr. A* **1965**, *19*, 296–299.

(20) Debrus, B.; Broséus, J.; Guillarme, D.; Lebrun, P.; Hubert, P.; Veuthey, J.-L.; Esseiva, P.; Rudaz, S. Innovative Methodology to Transfer Conventional GC-MS Heroin Profiling to UHPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (8), 2719–2730.

(21) Collins, M.; Huttunen, J.; Evans, I.; Robertson, J. Illicit Drug Profiling: The Australian Experience. *Aust. J. Forensic Sci.* **2007**, *39* (1), 25–32.

(22) Dujourdy, L.; Dufey, V.; Besacier, F.; Miano, N.; Marquis, R.; Lock, E.; Aalberg, L.; Dieckmann, S.; Zrcek, F.; Bozenko, J. S. Drug Intelligence Based on Organic Impurities in Illicit MA Samples. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *177* (2), 153–161.

(23) Zacca, J. J.; Grobério, T. S.; Maldaner, A. O.; Vieira, M. L.; Braga, J. W. B. Correlation of Cocaine Hydrochloride Samples Seized in Brazil Based on Determination of Residual Solvents: An Innovative Chemometric Method for Determination of Linkage Thresholds. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (4), 2457–2464.

(24) Nic Daéid, N.; Waddell, R. J. H. The Analytical and Chemometric Procedures Used to Profile Illicit Drug Seizures. *Talanta* **2005**, *67* (2), 280–285.

(25) Ehleringer, J. R.; Cooper, D. A.; Lott, M. J.; Cook, C. S. Geo-Location of Heroin and Cocaine by Stable Isotope Ratios. *Forensic Sci. Int.* **1999**, *106* (1), 27–35.

(26) Chan, K.-W.; Tan, G.-H.; Wong, R. C. S. Gas Chromatographic Method Validation for the Analysis of Major Components in Illicit Heroin Seized in Malaysia. *Sci. Justice* **2012**, *52* (1), 9–16.

(27) Cartier, J.; Gueniat, O.; Cole, M. D. Headspace Analysis of Solvents in Cocaine and Heroin Samples. *Sci. Justice* **1997**, *37* (3), 175–181.

(28) Besacier, F.; Chaudron-Thozet, H.; Rousseau-Tsangaris, M.; Girard, J.; Lamotte, A. Comparative Chemical Analyses of Drug Samples: General Approach and Application to Heroin. *Forensic Sci. Int.* **1997**, *85* (2), 113–125.

(29) Esseiva, P.; Ioset, S.; Anglada, F.; Gasté, L.; Ribaux, O.; Margot, P.; Gallusser, A.; Biedermann, A.; Specht, Y.; Ottinger, E. Forensic Drug Intelligence: An Important Tool in Law Enforcement. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *167* (2–3), 247–254.

(30) Guéniat, O.; Esseiva, P. *Le profilage de l'héroïne et de la cocaïne: une méthodologie moderne de lutte contre le trafic illicite*; PPUR presses polytechniques, 2005.

(31) Lociciro, S.; Esseiva, P.; Hayoz, P.; Dujourdy, L.; Besacier, F.; Margot, P. Cocaine Profiling for Strategic Intelligence, a Cross-Border Project between France and Switzerland: Part II. Validation of the Statistical Methodology for the Profiling of Cocaine. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *177* (2–3), 199–206.

(32) Esseiva, P.; Anglada, F.; Dujourdy, L.; Taroni, F.; Margot, P.; Pasquier, E. D.; Dawson, M.; Roux, C.; Doble, P. Chemical Profiling and Classification of Illicit Heroin by Principal Component Analysis, Calculation of Inter Sample Correlation and Artificial Neural Networks. *Talanta* **2005**, *67* (2), 360–367.

(33) Broséus, J.; Gentile, N.; Esseiva, P. The Cutting of Cocaine and Heroin: A Critical Review. *Forensic Sci. Int.* **2016**, *262*, 73–83.

(34) Cole, C.; Jones, L.; McVeigh, J.; Kicman, A.; Syed, Q.; Bellis, M. Adulterants in Illicit Drugs: A Review of Empirical Evidence. *Drug Test. Anal.* **2011**, *3* (2), 89–96.

(35) Solimini, R.; Rotolo, M. C.; Pellegrini, M.; Minutillo, A.; Pacifici, R.; Busardò, F. P.; Zaami, S. Adulteration Practices of Psychoactive Illicit Drugs: An Updated Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2017**, *18* (7), 524–530.

(36) Huizer, H. Analytical Studies on Illicit Heroin. *Pharm. Weekbl.* **1987**, *9* (4), 203–211.

(37) Coomber, R. The Adulteration of Drugs: What Dealers Do to Illicit Drugs, and What They Think Is Done to Them. *Addict. Res.* **1997**, *5* (4), 297–306.

(38) Schneider, S.; Meys, F. Analysis of Illicit Cocaine and Heroin Samples Seized in Luxembourg from 2005-2010. *Forensic Sci. Int.* **2011**, *212* (1–3), 242–246.

(39) Fucci, N.; De Giovanni, N. Adulterants Encountered in the Illicit Cocaine Market. *Forensic Sci. Int.* **1998**, *95* (3), 247–252.

(40) Maietti, S.; Castagna, F.; Molin, L.; Ferrara, S. D.; Traldi, P. Cocaine Adulterants Used as Marker Compounds. *J. Mass Spectrom. JMS* **2009**, *44* (7), 1124–1126.

(41) Evrard, I.; Legleye, S.; Cadet-Taïrou, A. Composition, Purity and Perceived Quality of Street Cocaine in France. *Int. J. Drug Policy* **2010**, *21* (5), 399–406.

(42) Muirhead, T. T.; Eide, M. J. Toxic Effects of Levamisole in a Cocaine User. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364* (24), e52.

(43) Cole, C.; Jones, L.; McVeigh, J.; Kicman, A.; Syed, Q.; Bellis, M. *A Guide to Adulterants, Bulking Agents and Contaminants Found in Illicit Drugs*; pp 1–59.

(44) Coomber, R. Vim in the Veins–Fantasy or Fact: The Adulteration of Illicit Drugs. *Addict. Res.* **1997**, *5* (3), 195–212.

(45) Coomber, R.; Maher, L. Street-Level Drug Market Activity in Sydney's Primary Heroin Markets: Organization, Adulteration Practices, Pricing, Marketing and Violence , Street-Level Drug Market Activity in Sydney's Primary Heroin Markets: Organization, Adulteration Practices, Pricing, Marketing and Violence. *J. Drug Issues* **2006**, *36* (3), 719–753.

(46) Kaa, E. Impurities, Adulterants and Diluents of Illicit Heroin. Changes during a 12-Year Period. *Forensic Sci. Int.* **1994**, *64* (2), 171–179.

(47) Dujourdy, L.; Besacier, F. L'héroïne saisie en France. Données statistiques issues de la base nationale des laboratoires de police scientifique. */data/revues/00034509/v68i2/S0003450910000350/* **2010**.

(48) DUJOURDY, L.; BESACIER, F.; LADROUE, V. La Cocaïne Saisie En France. Exploitation Des Données Statistiques Nationales. *Actual. Chim. L* **2010**, *n°342-343*, 29–36.

(49) Furst, R. T. The Re-Engineering of Heroin: An Emerging Heroin "Cutting" Trend in New York City. *Addict. Res.* **2000**, *8* (4), 357–379.

(50) Atasoy, S.; Biçer, F.; Açikkol, M.; Bilgiç, Z. Illicit Drug Abuse in the Marmara Region of Turkey. *Forensic Sci. Int.* **1988**, *38* (1–2), 75–81.

(51) Maldaner, A. O.; Botelho, É. D.; Zacca, J. J.; Camargo, M. A.; Braga, J. W.; Grobério, T. S.; Maldaner, A. O.; Botelho, É. D.; Zacca, J. J.; Camargo, M. A.; et al. Brazilian Federal District Cocaine Chemical Profiling - Mass Balance Approach and New Adulterant Routinely Quantified (Aminopyrine). *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26* (6), 1227–1231.

(52) Botelho, É. D.; Cunha, R. B.; Campos, A. F. C.; Maldaner, A. O. Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (4), 611–618.

(53) Denooz, R.; Dubois, N.; Charlier, C. Deux ans d'analyse de saisies d'heroine en region liegeoise. *Rev. Médicale Liège* **2005**, *60* (9).

(54) Grobério, T. S.; Zacca, J. J.; Botelho, É. D.; Talhavini, M.; Braga, J. W. B. Discrimination and Quantification of Cocaine and Adulterants in Seized Drug Samples by Infrared Spectroscopy and PLSR. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *257*, 297–306.

(55) Ladroue, V.; Dujourdy, L.; Besacier, F.; Jame, P. IRMS to Study a Common Cocaine Cutting Agent: Phenacetin. *Drug Test. Anal.* **2017**, *9* (3), 479–484.

(56) Martin, G. J.; Martin, M. L. Deuterium Labelling at the Natural Abundance Level as Studied by High Field Quantitative ^{2}H NMR. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (36), 3525–3528.

(57) Coplen, T. B. Guidelines and Recommended Terms for Expression of Stable-Isotope-Ratio and Gas-Ratio Measurement Results: Guidelines and Recommended Terms for Expressing Stable Isotope Results. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (17), 2538–2560.

(58) Hook, V.; A, W. Isotope Effects in Chemistry. *Nukleonika* **2011**, *Vol. 56*, *No. 3*, 217–240.

(59) Lichtfouse, E. Compound-Specific Isotope Analysis. Application to Archaelogy, Biomedical Sciences, Biosynthesis, Environment, Extraterrestrial Chemistry, Food Science, Forensic Science, Humic Substances, Microbiology, Organic Geochemistry, Soil Science and Sport. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14* (15), 1337–1344.

(60) Santamaria-Fernandez, R.; Carter, D.; Hearn, R. Precise and Traceable 13C/ 12C Isotope Amount Ratios by Multicollector ICPMS. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (15), 5963–5969.

(61) West, A. G.; Goldsmith, G. R.; Brooks, P. D.; Dawson, T. E. Discrepancies between Isotope Ratio Infrared Spectroscopy and Isotope Ratio Mass Spectrometry for the Stable Isotope Analysis of Plant and Soil Waters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24* (14), 1948–1954.

(62) Zhao, L.; Xiao, H.; Zhou, J.; Wang, L.; Cheng, G.; Zhou, M.; Yin, L.; McCabe, M. F. Detailed Assessment of Isotope Ratio Infrared Spectroscopy and Isotope Ratio Mass Spectrometry for the Stable Isotope Analysis of Plant and Soil Waters. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **2011**, *25* (20), 3071–3082.

(63) Muccio, Z.; Jackson, G. P. Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst* **2009**, *134* (2), 213–222.

(64) Nier, A. O.; Gulbransen, E. A. Variations in the Relative Abundance of the Carbon Isotopes. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61* (3), 697–698.

(65) McKINNEY, C. R.; McCREA, J. M.; Epstein, S.; Allen, H. A.; Urey, H. C. Improvements in Mass Spectrometers for the Measurement of Small Differences in Isotope Abundance Ratios. *Rev. Sci. Instrum.* **1950**, *21* (8), 724–730.

(66) Matthews, D. E.; Hayes, J. M. Isotope-Ratio-Monitoring Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1978**, *50* (11), 1465–1473.

(67) Galimov, E. M. Isotope Organic Geochemistry. *Org. Geochem.* **2006**, *37* (10), 1200–1262.

(68) Hofstetter, T. B.; Berg, M. Assessing Transformation Processes of Organic Contaminants by Compound-Specific Stable Isotope Analysis. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (4), 618–627.

(69) Thullner, M.; Centler, F.; Richnow, H.-H.; Fischer, A. Quantification of Organic Pollutant Degradation in Contaminated Aquifers Using Compound Specific Stable Isotope Analysis – Review of Recent Developments. *Org. Geochem.* **2012**, *42* (12), 1440–1460.

(70) Cincinelli, A.; Pieri, F.; Zhang, Y.; Seed, M.; Jones, K. C. Compound Specific Isotope Analysis (CSIA) for Chlorine and Bromine: A Review of Techniques and Applications to Elucidate Environmental Sources and Processes. *Environ. Pollut.* **2012**, *169*, 112–127.

(71) Craig, H. Isotopic Standards for Carbon and Oxygen and Correction Factors for Mass-Spectrometric Analysis of Carbon Dioxide. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1957**, *12* (1), 133–149.

(72) Kaiser, J. Reformulated ^{17}O Correction of Mass Spectrometric Stable Isotope Measurements in Carbon Dioxide and a Critical Appraisal of Historic 'Absolute' Carbon and Oxygen Isotope Ratios. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2008**, *72* (5), 1312–1334.

(73) Julien, M.; Nun, P.; Höhener, P.; Parinet, J.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Enhanced Forensic Discrimination of Pollutants by Position-Specific Isotope Analysis Using Isotope Ratio Monitoring by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Talanta* **2016**, *147*, 383–389.

(74) Abelson, P. H.; Hoering, T. C. Carbon Isotope Fractionation in Formation of Amino Acids by Photosynthetic Organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1961**, *47* (5), 623–632.

(75) Meinschein, W. G.; Rinaldi, G. G. L.; Hayes, J. M.; Schoeller, D. A. Intramolecular Isotopic Order in Biologically Produced Acetic Acid. *Biol. Mass Spectrom.* **1974**, *1* (3), 172–174.

(76) Rinaldi, G.; Meinschein, W. G.; Hayes, J. M. Intramolecular Carbon Isotopic Distribution in Biologically Produced Acetoin. *Biol. Mass Spectrom.* **1974**, *1* (6), 415–417.

(77) Monson, K. D.; Hayes, J. M. Carbon Isotopic Fractionation in the Biosynthesis of Bacterial Fatty Acids. Ozonolysis of Unsaturated Fatty Acids as a Means of Determining the Intramolecular Distribution of Carbon Isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1982**, *46* (2), 139–149.

(78) Huang, D.-S.; Wu, S.-H.; Huang, C.-Y.; Lin, C.-Y. An Exploration of Intramolecular Carbon Isotopic Distributions of Commercial Acetone and Isopropanol. *Org. Geochem.* **1999**, *30* (7), 667–674.

(79) Weilacher, T.; Gleixner, G.; Schmidt, H.-L. Carbon Isotope Pattern in Purine Alkaloids a Key to Isotope Discrimination in C1 Compounds. *Phytochemistry* **1996**, *41* (4), 1073–1077.

(80) Rossmann, A.; Butzenlechner, M.; Schmidt, H.-L. Evidence for a Nonstatistical Carbon Isotope Distribution in Natural Glucose. *Plant Physiol.* **1991**, *96* (2), 609–614.

(81) Corso, T. N.; Brenna, J. T. High-Precision Position-Specific Isotope Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (4), 1049–1053.

(82) Yamada, K.; Tanaka, M.; Nakagawa, F.; Yoshida, N. On-Line Measurement of Intramolecular Carbon Isotope Distribution of Acetic Acid by Continuous-Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **2002**, *16* (11), 1059–1064.

(83) Gilbert, A.; Hattori, R.; Silvestre, V.; Wasano, N.; Akoka, S.; Hirano, S.; Yamada, K.; Yoshida, N.; Remaud, G. S. Comparison of IRMS and NMR Spectrometry for the Determination of Intramolecular ^{13}C Isotope Composition: Application to Ethanol. *Talanta* **2012**, *99*, 1035–1039.

(84) Hattori, R.; Yamada, K.; Kikuchi, M.; Hirano, S.; Yoshida, N. Intramolecular Carbon Isotope Distribution of Acetic Acid in Vinegar. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (17), 9049–9053.

(85) Gauchotte, C.; O'Sullivan, G.; Davis, S.; Kalin, R. M. Development of an Advanced On-Line Position-Specific Stable Carbon Isotope System and Application to Methyl Tert-Butyl Ether. *Rapid Commun. Mass Spectrom. 23* (19), 3183–3193.

(86) Dennis, M. J.; Wilson, P.; Kelly, S.; Parker, I. The Use of Pyrolytic Techniques to Estimate Site Specific Isotope Data of Vanillin. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1998**, *47* (1), 95–103.

(87) Jézéquel, T.; Joubert, V.; Giraudeau, P.; Remaud, G. S.; Akoka, S. The New Face of Isotopic NMR at Natural Abundance. *Magn. Reson. Chem.* **2017**, *55* (2), 77–90.

(88) Martin, G. J.; Martin, M. L. The Site-Specific Natural Isotope Fractionation-NMR Method Applied to the Study of Wines. In *Wine Analysis*; Linskens, P. D. H.-F., Jackson, P. D. J. F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 1988; pp 258–275.

(89) Office International de la Vigne et du Vin (OIV). Resolution OENO/SCMA/00/177: Détermination Du Rapport Isotopique de l'ethanol. 2001.

(90) AOAC. Official Method 995.17, Beet Sugar in Fruit Juices, SNIF-NMR. AOAC International 1996.

(91) Martin, G. J.; Koziet, J.; Rossmann, A.; Dennis, J. Site-Specific Natural Isotope Fractionation in Fruit Juices Determined by Deuterium NMR an European Inter-Laboratory Comparison Study. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *321* (2–3), 137–146.

(92) Remaud, G. S.; Martin, Y.-L.; Martin, G. G.; Martin, G. J. Detection of Sophisticated Adulterations of Natural Vanilla Flavors and Extracts: Application of the SNIF-NMR Method to Vanillin and p-Hydroxybenzaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (3), 859–866.

(93) Remaud, G.; Debon, A. A.; Martin, Y.; Martin, G. G.; Martin, G. J. Authentication of Bitter Almond Oil and Cinnamon Oil: Application of the SNIF-NMR Method to Benzaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (10), 4042–4048.

(94) Caer, V.; Trierweiler, M.; Martin, G. J.; Martin, M. L. Determination of Site-Specific Carbon Isotope Ratios at Natural Abundance by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (20), 2306–2313.

(95) Singleton, D. A.; Thomas, A. A. High-Precision Simultaneous Determination of Multiple Small Kinetic Isotope Effects at Natural Abundance. *J Am Chem SOC* **1995**, *117*, 9357–9358.

(96) ISO 5725-1:1994(en), Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-1:ed-1:v1:en (accessed Jul 7, 2018).

(97) Caytan, E.; Botosoa, E. P.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Accurate Quantitative ^{13}C NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific ^{13}C Isotope Ratio Determination. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (21), 8266–8269.

(98) R. R. Ernst,; G. Bodenhausen; A. Wokaun. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*; Oxoford University Press, New York, 1991.

(99) Gillet, S.; Delpuech, J.-J. Optimum Conditions for Nondestructive Quantitative Analysis by Carbon-13 NMR. *J. Magn. Reson.* **1980**, *38* (3), 433–445.

(100) Saito, T.; Nakaie, S.; Kinoshita, M.; Ihara, T.; Kinugasa, S.; Akira Nomura; Maeda, T. Practical Guide for Accurate Quantitative Solution State NMR Analysis. *Metrologia* **2004**, *41* (3), 213.

(101) Caytan, E.; Cherghaoui, Y.; Barril, C.; Jouitteau, C.; Rabiller, C.; Remaud, G. S. Strategy for Specific Isotope Ratio Determination by Quantitative NMR on Symmetrical Molecules: Application to Glycerol. *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, *17* (11), 1622–1624.

(102) Tenailleau, E.; Remaud, G.; Akoka, S. Quantification of the 1H-Decoupling Effects on the Accuracy of ^{13}C-NMR Measurements. *Instrum. Sci. Technol.* **2005**, *33* (4), 391–399.

(103) Tenailleau, E.; Akoka, S. Adiabatic ^{1}H Decoupling Scheme for Very Accurate Intensity Measurements in ^{13}C NMR. *J. Magn. Reson.* **2007**, *185* (1), 50–58.

(104) Bayle, K.; Gilbert, A.; Julien, M.; Yamada, K.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Yoshida, N.; Remaud, G. S. Conditions to Obtain Precise and True Measurements of the Intramolecular ^{13}C Distribution in Organic Molecules by Isotopic ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *846*, 1–7.

(105) Bayle, K.; Grand, M.; Chaintreau, A.; Robins, R. J.; Fieber, W.; Sommer, H.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Internal Referencing for ^{13}C Position-Specific Isotope Analysis Measured by NMR Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (15), 7550–7554.

(106) Jézéquel, T.; Silvestre, V.; Dinis, K.; Giraudeau, P.; Akoka, S. Optimized Slice-Selective 1H NMR Experiments Combined with Highly Accurate Quantitative ^{13}C NMR Using an Internal Reference Method. *J. Magn. Reson.* **2018**, *289*, 18–25.

(107) Chaintreau, A.; Fieber, W.; Sommer, H.; Gilbert, A.; Yamada, K.; Yoshida, N.; Pagelot, A.; Moskau, D.; Moreno, A.; Schleucher, J.; et al. Site-Specific ^{13}C Content by Quantitative Isotopic ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry: A Pilot Inter-Laboratory Study. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *788*, 108–113.

(108) Silvestre, V.; Mboula, V. M.; Jouitteau, C.; Akoka, S.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Isotopic ^{13}C NMR Spectrometry to Assess Counterfeiting of Active Pharmaceutical Ingredients: Site-Specific ^{13}C Content of Aspirin and Paracetamol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50* (3), 336–341.

(109) Gilbert, A.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Accurate Quantitative Isotopic ^{13}C NMR Spectroscopy for the Determination of the Intramolecular Distribution of ^{13}C in Glucose at Natural Abundance. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (21), 8978–8985.

(110) Gilbert, A.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Tcherkez, G.; Remaud, G. S. A ^{13}C NMR Spectrometric Method for the Determination of Intramolecular Δ13C Values in Fructose from Plant Sucrose Samples. *New Phytol.* **2011**, *191* (2), 579–588.

(111) Gilbert, A.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Impact of the Deuterium Isotope Effect on the Accuracy of ^{13}C NMR Measurements of Site-Specific Isotope Ratios at Natural Abundance in Glucose. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (5), 1979–1984.

(112) Gilbert, A.; Robins, R. J.; Remaud, G. S.; Tcherkez, G. G. B. Intramolecular ^{13}C Pattern in Hexoses from Autotrophic and Heterotrophic C3 Plant Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (44), 18204–18209.

(113) Gilbert, A.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Remaud, G. S.; Tcherkez, G. Biochemical and Physiological Determinants of Intramolecular Isotope Patterns in Sucrose from C_3, C_4 and CAM Plants Accessed by Isotopic ^{13}C NMR Spectrometry: A Viewpoint. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (4), 476–486.

(114) Gilbert, A.; Silvestre, V.; Segebarth, N.; Tcherkez, G.; Guillou, C.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Remaud, G. S. The Intramolecular ^{13}C-Distribution in Ethanol Reveals the Influence of the CO_2 -Fixation Pathway and Environmental Conditions on the Site-Specific ^{13}C Variation in Glucose. *Plant Cell Environ.* **2011**, *34* (7), 1104–1112.

(115) Diomande, D. G.; Martineau, E.; Gilbert, A.; Nun, P.; Murata, A.; Yamada, K.; Watanabe, N.; Tea, I.; Robins, R. J.; Yoshida, N.; et al. Position-Specific Isotope Analysis of Xanthines: A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Method to Determine the ^{13}C Intramolecular Composition at Natural Abundance. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (13), 6600–6606.

(116) Botosoa, E. P.; Blumenstein, C.; MacKenzie, D. A.; Silvestre, V.; Remaud, G. S.; Kwiecień, R. A.; Robins, R. J. Quantitative Isotopic ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance at Natural Abundance to Probe Enzyme Reaction Mechanisms via Site-Specific Isotope Fractionation: The Case of the Chain-Shortening Reaction for the Bioconversion of Ferulic Acid to Vanillin. *Anal. Biochem.* **2009**, *393* (2), 182–188.

(117) Romek, K. M.; Nun, P.; Remaud, G. S.; Silvestre, V.; Taïwe, G. S.; Lecerf-Schmidt, F.; Boumendjel, A.; Waard, M. D.; Robins, R. J. A Retro-Biosynthetic Approach to the Prediction of Biosynthetic Pathways from Position-Specific Isotope Analysis as Shown for Tramadol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (27), 8296–8301.

(118) Julien, M.; Parinet, J.; Nun, P.; Bayle, K.; Höhener, P.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Fractionation in Position-Specific Isotope Composition during Vaporization of Environmental Pollutants Measured with Isotope Ratio Monitoring by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Environ. Pollut.* **2015**, *205*, 299–306.

(119) Julien, M.; Nun, P.; Robins, R. J.; Remaud, G. S.; Parinet, J.; Höhener, P. Insights into Mechanistic Models for Evaporation of Organic Liquids in the Environment Obtained by Position-Specific Carbon Isotope Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (21), 12782–12788.

(120) Botosoa, E. P.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Rojas, J. M. M.; Guillou, C.; Remaud, G. S. Evidence of ^{13}C Non-Covalent Isotope Effects Obtained by Quantitative ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy at Natural Abundance during Normal Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (42), 7043–7048.

(121) Karabulut, N.; Baguet, E.; Trierweiler, M.; Akoka, S. Optimization of Experimental Conditions for Quantitative Analysis Using DEPT Sequence. *Anal. Lett.* **2002**, *34* (15), 2549–2563.

(122) Karabulut, N. *Optimisation de La Séquence DEPT Pour La RMN Quantitative*; Nantes, 2002.

(123) Doddrell, D. M.; Pegg, D. T.; Bendall, M. R. Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer. *J. Magn. Reson. 1969* **1982**, *48* (2), 323–327.

(124) Morris, G. A.; Freeman, R. Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (3), 760–762.

(125) Thibaudeau, C.; Remaud, G.; Silvestre, V.; Akoka, S. Performance Evaluation of Quantitative Adiabatic ^{13}C NMR Pulse Sequences for Site-Specific Isotopic Measurements. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5582–5590.

(126) Burum, D. P.; Ernst, R. R. Net Polarization Transfer via a J-Ordered State for Signal Enhancement of Low-Sensitivity Nuclei. *J. Magn. Reson. 1969* **1980**, *39* (1), 163–168.

(127) Bussy, U.; Thibaudeau, C.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Remaud, G. S.; Silvestre, V.; Akoka, S. Isotopic Finger-Printing of Active Pharmaceutical Ingredients by ^{13}C NMR and Polarization Transfer Techniques as a Tool to Fight against Counterfeiting. *Talanta* **2011**, *85* (4), 1909–1914.

(128) Remaud, G. S.; Bussy, U.; Lees, M.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Silvestre, V.; Akoka, S. NMR Spectrometry Isotopic Fingerprinting: A Tool for the Manufacturer for Tracking Active Pharmaceutical Ingredients from Starting Materials to Final Medicines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 464–473.

(129) Merchak, N.; Bejjani, J.; Rizk, T.; Silvestre, V.; Remaud, G. S.; Akoka, S. ^{13}C Isotopomics of Triacylglycerols Using NMR with Polarization Transfer Techniques. *Anal. Methods* **2015**, *7* (12), 4889–4891.

(130) Jeener, J. Ampere International Summer School, 1971.

(131) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. Two-dimensional Spectroscopy. Application to Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (5), 2229–2246.

(132) Giraudeau, P.; Guignard, N.; Hillion, E.; Baguet, E.; Akoka, S. Optimization of Homonuclear 2D NMR for Fast Quantitative Analysis: Application to Tropine-Nortropine Mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43* (4), 1243–1248.

(133) Bodenhausen, G.; Ruben, D. J. Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69* (1), 185–189.

(134) Schanda, P.; Kupče, Ē.; Brutscher, B. SOFAST-HMQC Experiments for Recording Two-Dimensional Deteronuclear Correlation Spectra of Proteins within a Few Seconds. *J. Biomol. NMR* **2005**, *33* (4), 199–211.

(135) Martineau, E.; Akoka, S.; Boisseau, R.; Delanoue, B.; Giraudeau, P. Fast Quantitative ^{1}H–^{13}C Two-Dimensional NMR with Very High Precision. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (9), 4777–4783.

(136) Merchak, N.; Silvestre, V.; Rouger, L.; Giraudeau, P.; Rizk, T.; Bejjani, J.; Akoka, S. Precise and Rapid Isotopomic Analysis by 1H-13C 2D NMR: Application to Triacylglycerol Matrices. *Talanta* **2016**.

(137) Jovanovic, M. V. ^{15}N Nuclear Magnetic Resonance of Some Pyrazines, 1,2,4-Triazines and Their N-Oxides. Correlation and Interrelationship of ^{15}N with ^{13}C Chemical Shifts of π-Deficient Heterocyclic Systems. *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.* **1984**, *40* (7), 637–642.

(138) Martin, G. J., Martin, M. L., & Gouesnard, J. P. (2012). ^{15}N-NMR spectroscopy (Vol. 18). Springer Science & Business Media.

(139) Levy, G. C.; Pehk, T.; Srinivasan, P. R. Quantitative ^{15}N NMR Spectroscopy. *Org. Magn. Reson.* **1980**, *14* (2), 129–132.

(140) Glemarec, C.; Remaud, G.; Chattopadhyaya, J. Distinction of ^{15}N Resonances Based on Differences in Small ^{15}N, ^{1}H Coupling Constants. An Application of ^{1}H-Decoupled INEPT Experiments. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26* (4), 307–310.

(141) Glemarec, C.; Remaud, G.; Chattopadhyaya, J. ^{15}N NMR Spectra of Wyosine (Y-Nucleoside) Triacetate and Its 7-Methyl Congener. Chemical Shifts and ^{15}N,^{1}H Coupling Constants. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26* (5), 435–438.

(142) Remaud, G.; Kjellberg, J.; Bazin, H.; Johansson, N. G.; Chattopadhyaya, J. The Use of ^{15}N-NMR Spectroscopy for Assigning the Structures of Isomeric N_7- and N_9-Substituted Purines. *Tetrahedron* **1986**, *42* (18), 5073–5080.

(143) Remaud, G.; Zhou, X.-X.; Chattopadhyaya, J.; Oivanen, M.; Lönnberg, H. The Effect of Protecting Groups of the Nucleobase and the Sugar Moieties on the Acidic Hydrolysis of the Glycosidic Bond of 2′-deoxyadenosine: A Kinet. *Tetrahedron* **1987**, *43* (19), 4453–4461.

(144) Remaud, G.; Welch, C. J.; Zhou, X. X.; Chattopadhyaya, J. An Assessment of Electronic Properties of Pyrimidine and Purine Nucleosides by ^{15}N-NMR Spectroscopy. *Nucleosides Nucleotides* **1988**, *7* (2), 167–179.

(145) Martin, G. E.; Williams, A. J. Chapter One - Applications of $^{1}H–^{15}N$ Long-Range Heteronuclear Shift Correlation and ^{15}N NMR in Alkaloid Chemistry. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, G. A., Ed.; Academic Press, 2015; Vol. 84, pp 1–76.

(146) Vugmeyster, L.; Ostrovsky, D.; Fu, R. ^{15}N CSA Tensors and $^{15}N–^{1}H$ Dipolar Couplings of Protein Hydrophobic Core Residues Investigated by Static Solid-State NMR. *J. Magn. Reson.* **2015**, *259*, 225–231.

(147) Marek, R. NMR Applications, 15N. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*; Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D. W., Eds.; Academic Press: Oxford, 2017; pp 110–116.

(148) Brennan, L. NMR-Based Metabolomics: From Sample Preparation to Applications in Nutrition Research. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *83*, 42–49.

(149) Nagana Gowda, G. A.; Raftery, D. Can NMR Solve Some Significant Challenges in Metabolomics? *J. Magn. Reson.* **2015**, *260*, 144–160.

(150) Trygg, J.; Holmes, E.; Lundstedt, T. Chemometrics in Metabonomics. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (2), 469–479.

(151) Shi, T.; Zhu, M.; Chen, Y.; Yan, X.; Chen, Q.; Wu, X.; Lin, J.; Xie, M. 1H NMR Combined with Chemometrics for the Rapid Detection of Adulteration in Camellia Oils. *Food Chem.* **2018**, *242*, 308–315.

(152) Hibbert, D. B.; Blackmore, D.; Li, J.; Ebrahimi, D.; Collins, M.; Vujic, S.; Gavoyannis, P. A Probabilistic Approach to Heroin Signatures. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396* (2), 765–773.

(153) Esseiva, P.; Gaste, L.; Alvarez, D.; Anglada, F. Illicit Drug Profiling, Reflection on Statistical Comparisons. *Forensic Sci. Int.* **2011**, *207* (1), 27–34.

(154) Tanaka, K.; Ohmor, T.; Inoue, T.; Seta, S. Impurity Profiling Analysis of Illicit Methamphetamine by Capillary Gas Chromatography. *J. Forensic Sci.* **1994**, *39* (2), 500–511.

(155) Perkal, M.; Ng, Y. L.; Pearson, J. R. Impurity Profiling of Methylamphetamine in Australia and the Development of a National Drugs Database. *Forensic Sci. Int.* **1994**, *69* (1), 77–87.

(156) Janzen, K. E.; Walter, L.; Fernando, A. R. Comparison Analysis of Illicit Cocaine Samples. *J. Forensic Sci.* **1992**, *37* (2), 436–445.

Partie II : Développement de la RMN isotopique du ^{13}C utilisant un transfert de polarisation sur tout le spectre pour la mesure en position-spécifique (FS-INEPT)

II-1) Introduction

Comme évoqué dans la première partie, l'irm-^{13}C NMR utilisant la séquence INEPT refocalisée adiabatique a été un succès dans le cadre d'études « isotopomics ». Cependant, cette méthode souffre d'un manque d'information sur les carbones quaternaires car seuls les couplages courte distance ($^{1}J_{CH}$) bénéficient de ce transfert de polarisation.

Le but des premiers travaux de cette thèse est de mettre au point une méthode irm-^{13}C NMR utilisant la séquence INEPT refocalisée adiabatique en appliquant un transfert de polarisation ^{1}H vers ^{13}C sur tous les sites carbonés de la molécule d'intérêt via les couplages court et longue distance ($^{1}J_{CH}$, $^{2}J_{CH}$, $^{3}J_{CH}$, $^{4}J_{CH}$). En procédant ainsi le profil isotopique de la molécule reste complet et bénéficie en théorie d'un gain de sensibilité plus important que l'irm-^{13}C NMR « one-pulse ». La méthode envisagée porte le nom de FS-INEPT pour « Full-Spectrum – Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer ».

Dans le cadre de l'application forensique visée il est nécessaire d'utiliser une méthode avec un gain de sensibilité important puisqu'il n'est pas envisageable expérimentalement pour un grand nombre d'échantillon de purifier 200 mg d'agent de coupage contenu dans les stupéfiants. Ceci constituerait une quantité de départ en stupéfiant trop importante et nécessiterait une étape de séparation/purification conséquente. Deux molécules modèles: la caféine et le paracétamol, constitueront la preuve de concept de la méthode FS-INEPT pour la mesure position-spécifique de chaque site carboné. Ces molécules étant les agents de coupage majeurs de l'héroïne il serait en effet intéressant de pouvoir évaluer la robustesse et la précision de la méthode FS-INEPT sur ces types de molécules.

Pour pouvoir bénéficier du transfert de polarisation ^{1}H-^{13}C sur tous les sites carbonés de la molécule d'intérêt il a été nécessaire de laisser s'exprimer les couplages plus longtemps dans la séquence INEPT. En effet, les délais de refocalisation correspondant sont proportionnels à 1/J et les couplages longue distance ($^{2}J_{CH}$, $^{3}J_{CH}$, $^{4}J_{CH}$) sont beaucoup plus faibles que les couplages courte distance ($^{1}J_{CH}$) ce qui a pour conséquence d'allonger les délais pour pouvoir observer tous les signaux.

Afin d'évaluer la précision et la robustesse de la méthode FS-INEPT la répétabilité à court-terme et la reproductibilité intra-laboratoire a été mesurée sur un échantillon de référence de paracétamol et de caféine afin de montrer que cette séquence pouvait être utilisée avec une

précision d'environ 1‰ en ^{13}C. Plusieurs séries de 5 spectres sur des préparations différentes à plusieurs mois d'intervalle ont été effectuées pour montrer que la séquence était reproductible.

Par la suite, 18 échantillons de caféine d'origines différentes ont été analysés avec 11 caféines d'origine naturelle et 7 d'origine commerciale achetés chez des fournisseurs de produits chimiques. De même, 16 échantillons de paracétamol issus de médicaments achetés dans diverses pharmacies du monde entier ont pu être analysés. L'ensemble des profils isotopiques obtenus ont été traités par le biais d'un outil statistique : l'Analyse en Composantes Principales (PCA) afin de caractériser les caféines en fonction de leurs origines naturelle ou commercial ainsi que le paracétamol en fonction de son origine géographique.

La méthodologie employée (FS-INEPT), les résultats obtenus et leur interprétation ont fait l'objet d'un article intitulé **« Full Spectrum Isotopic ^{13}C NMR Using Polarization Transfer for Position-Specific Isotope Analysis ».** Cet article a été publié dans *Analytical Chemistry* en juin 2018.

II-2) Article

analytical chemistry

Article

Cite This: *Anal. Chem.* 2018, 90, 8692–8699

pubs.acs.org/ac

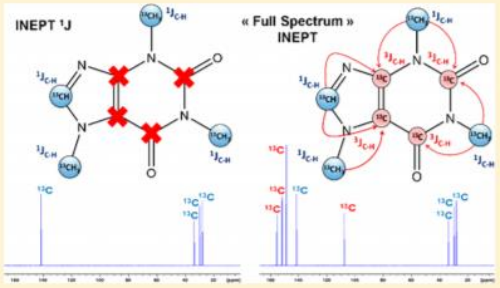
Full Spectrum Isotopic ^{13}C NMR Using Polarization Transfer for Position-Specific Isotope Analysis

Valentin Joubert,[†] Virginie Silvestre,[†] Mathilde Grand,[†] Denis Loquet,[†] Virginie Ladroue,[‡] Fabrice Besacier,[‡] Serge Akoka,[†] and Gérald S. Remaud*[,†]

[†]Elucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, CEISAM, University of Nantes-CNRS UMR6230, F-44322 Nantes, France

[‡]Laboratoire de Lyon, Institut National de Police Scientifique, 31 avenue Franklin Roosevelt, 69134 Ecully CEDEX, France

ABSTRACT: For the last ten years, quantitative isotope ratio monitoring ^{13}C NMR (irm-^{13}C NMR) has been successfully tested and proven as an efficient tool for the determination of position-specific $^{13}C/^{12}C$ ratios. Several applications in different domains have shown the interest in this technique. In the context of origin assignment, the possibility to track the distribution network of illicit drugs or cutting agents is of prime importance. However irm-^{13}C NMR still suffers from a relative lack of sensitivity limiting its dissemination among control laboratories. Improvements were proposed to reduce experiment time by using the INEPT sequence ("Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer") based on polarization transfer from highly sensitive ^{1}H to less sensitive ^{13}C.



Several applications based on the use of the one bond scalar coupling between ^{1}H and ^{13}C ($^{1}J_{CH}$) have shown the potential of this methodology in terms of short experimental duration. However, the isotopic information given by quaternary carbons was lost. The aim of this study is to extend this approach by using short- and long-range coupling ($^{1}J_{CH}$, $^{2}J_{CH}$, and $^{3}J_{CH}$) in order to have access to all $^{13}C/^{12}C$ position-specific ratios, i.e., acquisition of the full spectrum (FS-INEPT). It is shown that this innovative tool provides both sensitivity gain—thanks to the long-range polarization transfer—and appropriate repeatability. The relative isotopic profiles allowed the classification of two cutting agents, caffeine and paracetamol (acetaminophen), according to their origin, as it was previously observed with "classical" irm-^{13}C NMR but consuming much less sample and/or reducing the experimental time.

Introduction

Fraudulent misrepresentation, substitution or imitation of premium products, whether they are foodstuffs, cosmetics, perfumes or pharmaceuticals, have always been a problem for both the regulatory authorities and the concerned industries. The problematic of authentication, traceability, counterfeiting fight is also of concern for the consumers. In the forensic context, more frequently is the need to assign a probable origin to products (or human remains) of unknown sources. Most of the illicit drugs samples are imported relatively pure into a given country, and then gradually diluted along the trafficking chain by the addition of cutting agents. For police investigators, knowing the origins of the added molecules is an indication on their

distribution network. Considerable research effort and funding have been dedicated to improving the armory of techniques available to determine the given origin of a product.[1,2]
The isotopic methods are recognized as one of the main tools for traceability. Their applications benefit from the characterizing power of isotopic content which is an intrinsic marker of a probe molecule.[3,4] During (bio)chemical reactions or any processes (evaporation, sublimation, migration, etc.), systematic changes in isotope ratios can be introduced due to selectivity for or against the heavier isotope. The magnitude and direction of isotope fractionation are explained by covalent or non-covalent bond cleavage/formation steps within the synthesis. The parameter that is measured is the isotope composition expressed as δ (‰) (see **Table 1** for symbols definition). Historically, the isotopic analysis was irm-MS (isotope ratio measured by mass spectrometry, named also IRMS).

Table 1: Symbol used in this work

Symbol	Meaning
$\delta^{13}C_i$	^{13}C isotope composition of the carbon position i measured by ^{13}C NMR
x_i	Isotopic abundance of position i
fi	molar fraction for a carbon position i measured by ^{13}C NMR, area of the peak Si corresponding to the carbon position i divided by the sum of the area S_T of all the carbon positions of the molecule
Fi	statistical molar fraction for a carbon position i, molar fraction for the carbon position i in the case of homogeneous ^{13}C distribution within the molecule (for example: Fi = 1/8 for caffeine)
f_{iR}	reduced molar fraction for a carbon i: fi/Fi

This technique is based on the complete transformation (e.g. oxidation and/or reduction) of the sample molecules which permits to measure ^{2}H/^{1}H (D/H), ^{13}C/^{12}C, ^{15}N/^{14}N, ^{18}O/^{16}O and ^{34}S/^{32}S ratios with high accuracy typically 0.2‰ for ^{13}C).[5] Only average values of the content of heavy isotopes (bulk or global composition) are provided driving to a loss of information on the isotopic intramolecular distribution. Position-Specific Isotope Analysis (PSIA) gives access to the quantitation of each isotopomer and thus provides much more information for classification and/or discrimination. Among the available approaches[6–8] Nuclear Magnetic Resonance spectrometry appears as generic as it is independent of the studied molecule.

The direct access to position-specific natural isotope fractionation was opened up by ^{2}H NMR, known as the SNIF-NMR™ method.[9] Since then, a considerable amount of works has been done in several domains.[10–14] The development of the equivalent technique for $^{13}C/^{12}C$ ratios determination (isotope ratio monitoring ^{13}C NMR: irm-^{13}C NMR) has proved very challenging and it is only recently that a sufficiently robust and precise technique has been described.[15] Previously, Singleton proposed to use ^{13}C NMR for the calculation of ^{13}C isotope effect on specific sites of a molecule, however this approach was not designed for position-specific ^{13}C composition determination, *i.e.* $\delta^{13}C_i$ (see **Table 1**).[16] In the case of irm-^{13}C NMR a precision of about 1‰ is necessary for isotopic analysis at natural abundance because of the narrow range of specific isotopic compositions (less than 50‰ instead of 500‰ for deuterium).[17] Significant methodological improvements were undertaken in order to resolve the influence of nuclear Overhauser effect, long relaxation times and homogeneity of ^{1}H decoupling.[15,18–20] While several applications have been published,[21,22] irm-^{13}C NMR suffers from a relative lack of sensitivity: high precision requires large signal-to-noise ratio (SNR), implying a large amount of sample and/or a long experimental time.

An alternative to reduce the experimental time is to use multi-pulse NMR sequences based on polarization transfer from highly sensitive ^{1}H to less sensitive ^{13}C nuclei via the ^{1}J scalar coupling between ^{13}C and ^{1}H. The pulse sequences as INEPT or DEPT theoretically allow a maximum SNR enhancement in the order of $\gamma(^{1}H)/\gamma(^{13}C) \approx 4$, where γ is the magnetogyric ratio.[23] Moreover, the pulse repetition rate now depends on the longitudinal relaxation times T_1 of the proton nuclei, which are considerably shorter than those of carbon nuclei. Therefore, experiment duration can be significantly shortened by a factor 5 to 10 depending on the molecule. However, the signal intensity depends of different experimental parameters such as pulse flip angles, coupling constants, relaxation times and evolution periods. As a consequence, the observed relative intensities are not only governed by molar fraction fi and, isotopic abundance x_i (see **Table 1**) is not directly accessible by such methods. Nevertheless, these distortions are reproducible if the compared have the same relaxation times, which implies same sample preparation, same solvent, same temperature.[24] The contribution of the pulse sequence to the relative intensities is therefore the same for all samples. After an appropriate optimization it has been shown that INEPT is reproducible within a relative standard deviation of 1‰ (see **Figure 1** for the pulse sequence scheme).[25] Isotope profiles were obtained using the irm-^{13}C INEPT approach in different applications,[24,26] allowing the emergent isotopomics approach.[27]

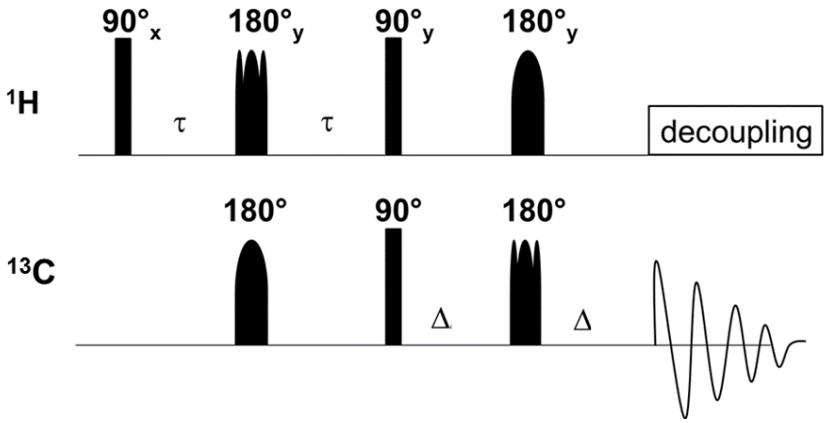


Figure 1: The ^{13}C INEPT sequence. τ is the polarization transfer delay and Δ is the refocalisation delay. 180° proton and carbon pulses of the sequence were composite adiabatic pulses for refocalisation and adiabatic for inversion, in order to minimize the influence of imperfections and off-resonance effects on the precision of the measured ^{13}C peak areas (adapted from[25]).

It is important to notice that irm-^{13}C INEPT uses –up to now- the ^{1}J scalar coupling between ^{1}H and ^{13}C directly connected, thus the isotopic information given by quaternary carbons is lost (see **Figure 2:**). In some cases this could be detrimental to achieve a full discrimination.

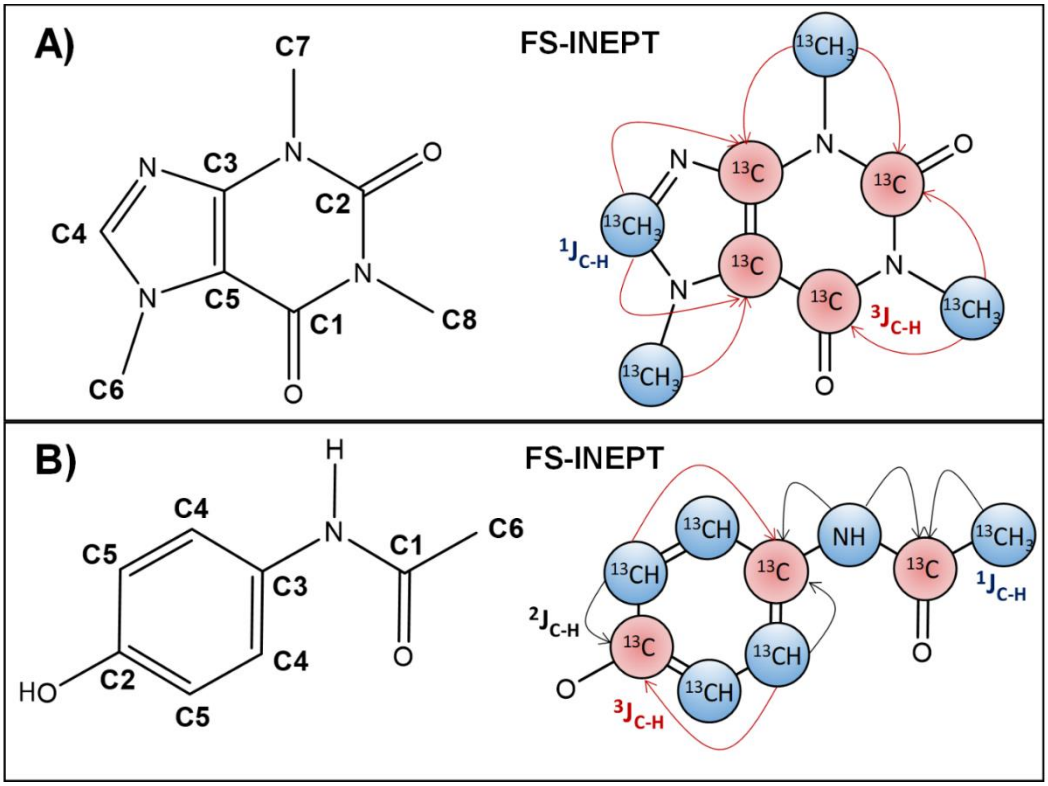


Figure 2: **A)** Caffeine molecules with carbon sites numbered in decreasing ^{13}C chemical shift and at the right carbons detected by INEPT using $^{1}J_{CH}$ (in blue) and by FS-INEPT using long range coupling between carbon and hydrogen, $^{n}J_{CH}$, in red. **B)** Paracetamol molecules with carbon sites numbered in decreasing ^{13}C chemical shift and at the right carbons detected by INEPT using $^{1}J_{CH}$ (in blue) and by FS-INEPT using long range coupling between carbon and hydrogen, $^{n}J_{CH}$, in red.

The question we want to address here is therefore: is it possible to use INEPT to have both a sensitivity gain and the observation of all carbon types within a molecule? The underlying question is then: will the resulting pulse sequence show appropriate performances for PSIA in terms of robustness and precision, *i.e.* a standard deviation around 1‰? Approaches were proposed in literature to observe quaternary carbons during an INEPT experiment. Some used the transfer of polarization for protonated carbon associated to the "classical acquisition" of the signal from quaternary carbons.[28] In that case the quaternary carbons do not benefit from the sensitivity gain, which has no interest for the present issue. Other studies used the polarization transfer via the long-range scalar coupling by adjusting the first delay in INEPT scheme (figure 1), that is 1/4J, to the $^{n}J_{CH}$ values as done for ^{29}Si.[29] This is the approach we have chosen for getting the full spectrum in irm-^{13}C INEPT (FS-INEPT). The present work aimed to delineate the experimental conditions from the sample preparation to the NMR parameters to reach the double target: (i) sensitivity gain for the full ^{13}C spectrum, while (ii) keeping a high precision in the ^{13}C isotope profiles. The resulting methodology, named irm-^{13}C FS-INEPT, has been tested on two molecules: caffeine and paracetamol (acetaminophen) (see figure 2 for structure and carbon numbering used in this work) for which previous studies have shown that discriminations of origin and/or traceability were achieved from $\delta^{13}C_i$ obtained from 'classical' irm-^{13}C NMR.[30,31] These molecules are also common as cutting agents of heroin.[32] In each molecule half of the observable carbons are quaternary, so much data are lost if not accessible. Furthermore we demonstrate the interest of this new methodology (irm-^{13}C FS-INEPT) enabling the observation of the relative intramolecular ^{13}C profile from all isotopomers by working on relatively low amount of product, *i.e.* 40 mg instead of 160 mg for caffeine and 250 mg for paracetamol with the classical irm-^{13}C NMR.

Experimental section

Chemicals and samples

Chloroform-d_1 and DMSO-d_6 were purchased from Eurisotop. Methanol, phosphorous anhydride (P_2O_5), chloroform, dichloromethane, and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich. Seven samples of caffeine were bought from different commercial sources, 11 samples of caffeine were extracted from different plants such as coffee, tea, cola nut and guarana (See **Table 2**). Eleven samples of paracetamol were extracted and purified from medicines bought from pharmacies in several countries: France, Lebanon, USA, GB, Japan, Greece, and Chile (See **Table 3**).

Table 2: Identification of the different caffeine samples by their origins.

Sample number	Origin	Geographical origin Or Supplier
1	Coffee	Caribbean
2	Coffee	Australia
3	Coffee	Kenya green robusta
4	Coffee	Niccaragua
5	Coffee	East Africa
6	Coffee	Congo
7	Coffee	Ivory Coast green Robusta
8	Black tea	Sri-Lanka
9	Green Tea	India
10	Cola nut	Ivory Coast
11	Guarana	South America
12	Commercial	TCI
13	Commercial	Sigma Aldrich - standard
14	Commercial	Acros Organics
15	Commercial	Alfa Aesar 99,7%
16	Commercial	Fluka
17	Commercial	Sigma Aldrich
18	Commercial	Alfa Aesar 99%

Purification of paracetamol

The paracetamol tablets (equivalent to 1 g of API) were first powdered, then dissolved in 20 mL of boiling ethanol and filtered under vacuum through filter paper to remove the major excipients. The resulting filtrate was evaporated to dryness using a rotary evaporator. A minimum volume of ethanol was added on the residue and recrystallized: the crystals were collected by filtration through a fritted glass funnel, dried overnight at 80 °C and further dried under vacuum over P_2O_5.

Extraction and purification of caffeine

Caffeine was extracted as published previously[31] and further purified by using flash chromatography: Puriflash® 430 Interchim chromatography with an UV detector and equipped with an automatic fraction collector. The size of the reversed-phase column was 16.8 cm × 2.1 cm, and the average particle size was 15 µm. The column was first moistened by methanol, and then conditioned by water containing 2‰ acetic acid. Then 60 mg of extracted caffeine (dissolved in 4 mL of methanol/water (50:50 vol), about 15 mg/mL) were loaded onto the column and the eluent was constituted as methanol (A) and water with 2‰ acetic acid (70:30 vol) with a flow rate of 10 mL/min. Detection wavelength was set at 254 nm. The effluent from

the column was collected into test tubes with a fraction collector set at 22 mL for each tube. Fractions corresponding to the same peak were combined, concentrated under vacuum in order to remove methanol and neutralized by NaOH 4 M. Caffeine was extracted with 3 x 40 mL of chloroform, dried with $MgSO_4$ and filtered using fritted glass funnel. Chloroform was removed under vacuum and then caffeine dried overnight at 80 °C.

It is important to notice that this purification method induces no isotopic fractionation when recovering above 95% of initial caffeine, as tested on a commercial sample.

NMR spectrometry experiments

Samples were prepared as follows: for caffeine, 40 mg were dissolved in 700 µL $CDCl_3$; for paracetamol, 40 mg were dissolved in 700 µL DMSO-d_6. For both, the solution was filtered into a 5 mm o.d. tube. Irm-^{13}C FS-INEPT experiments on caffeine and paracetamol were performed on Bruker AVANCE III 500 MHz spectrometer fitted with a CRYO ^{1}H/^{13}C ATMA grad 5 mm carefully tuned to the recording frequency of 125.76 MHz. The temperature of the probe was set at 303 K. All ^{13}C NMR spectra were recorded with modified INEPT refocusing sequence as described previously.[25] Typical acquisition parameters were as follows: ^{13}C and ^{1}H offsets were set at 90 ppm and 5.5 ppm respectively for caffeine, 100 ppm and 5.6 ppm respectively for paracetamol, 90° ^{1}H and ^{13}C high power pulse width were 10 µs and 11 µs respectively. The pulse lengths were calibrated before each experiment and the probe tuning and matching were adjusted for each sample.

For caffeine, 80 scans were accumulated with a repetition time of 41 s. τ was adjusted to 19.3 ms and Δ to 20.0 ms (see **Results and discussion** section) to reach SNR > 500 for all peaks. For paracetamol, 96 scans were accumulated with a repetition time of 21 s. τ was adjusted to 13.4 ms and Δ to 13.0 ms leading to SNR > 500 for all peaks. It should be noticed that lower amount of material could be used, it is just a matter of experimental time: a compromise between the quantity and analysis duration should be found, keeping in mind that SNR > 500 is required for the target precision. The assignment of ^{1}H and ^{13}C NMR resonances of caffeine and paracetamol was verified using HSQC experiments, and found in agreement with data from literature.

The shape of the 180° pulses is fully described in Ref. [25]. Adiabatic full passage pulses were generated using Mathcad 8 (MathSoft, Inc.). They were designed with a cosine amplitude modulation of the RF field (ω_1^{max} = 157.1 kHz and 93.89 kHz for ^{13}C and ^{1}H, respectively) and an offset independent adiabaticity[33] (OIA) by optimizing the frequency sweep ΔF (ΔF = 39 kHz

and 17 kHz for ^{13}C and ^{1}H, respectively) according to the published procedure.[34] For inversion pulses, adiabatic full passage pulses were used. For refocusing pulses, composite adiabatic pulses were used.[35] Five spectra were recorded for each measurement. The T_1 values were determined by using an inversion recovery sequence, with 10 inversion-time values ranging from 10 ms to 5 s for ^{1}H. The delay assuring the full relaxation of ^{1}H was set as $10.T_1^{max}$.

Table 3: Identification of the different paracetamol samples by origin and manufacturer/supplier.

Sample number	Manufacturer	Supplier	Country where purchased
A	Sanofi Winthrop Industrie	Sanofi Aventis	France
B	McNeil Consumer Healthcare	McNeil Consumer Healthcare	USA - Washington
C	McNeil Consumer Healthcare	McNeil Consumer Healthcare	USA - Washington
D	McNeil Consumer Healthcare	Jonhson & Johnson Consumer Inc.	USA - Washington
E	Unknown	CVS Pharmacy	USA - Massachussets
F	Bristol Myers Squibb	Bristol Myers Squibb	Greece
G	Sharon Bio-medicine LTD	Medipharm LTDA	Chile
H	Bristol Laboratories LTD	Boots Company PLC	Great Britain
I	Wrafton Laboratories LTD	Sainsbury's Supermarkets	Great britain
J	GlaxoSmithKline Ireland	GlaxoSmithKline	Lebanon
K	Unknown	Unknown	Japan
L	Sigma-Aldrich - USA	Sigma-Aldrich	France
M	Sigma-Aldrich - USA	Sigma-Aldrich	France
N	Sigma-Aldrich - USA	Sigma-Aldrich	France
O	Tokyo Chemical Industry LTD	Tokyo Chemical Industry LTD	France
P	Acros - China	Acros - China	France

NMR data processing

For each ^{13}C NMR spectrum, an exponential window function inducing a line broadening of 1.8 Hz was applied to the FID prior to Fourier transform. An automatic polynomial baseline correction was subsequently applied to the resulting spectra. Peak areas of ^{13}C peaks were determined by the curve-fitting process implemented within Perch (Perch NMR Software, University of Kuopio, Finland).

The peak areas measured in ^{13}C NMR spectra were corrected to take into account the presence of satellites peaks from ^{13}C–^{13}C isotopologues.[36] Partial reduced molar fractions f_{iR} (See table 1) were calculated for each visible site according to the following equation (1):

$$f_{iR} = \frac{S_i}{(F_i \times S_T)} \qquad (1)$$

Where S_i is the corrected peak area for position i, and S_T is the sum of the peak areas of all the measured sites. F_i is the statistical molar fraction of site i. (See **Table 1**)

Determination of the bulk $\delta^{13}C$ value of samples by irm-MS

The global value (or bulk composition) for the whole molecule, $\delta^{13}C_b$ (‰), is the deviation of the carbon isotopic ratio of the sample Rs relative to that of the international standard Vienna Pee Dee Belemnite, (V-PDB), R_{V-PDB}. It is determined by isotope ratio monitoring by mass spectrometry and calculated from: $\delta^{13}C_b = \left(\frac{Rs}{R_{V-PDB}} - 1\right) \times 1000$ where the value of R_{V-PDB} is 0.0112372.[37]

$\delta^{13}C_b$ was determined by irm-MS using an Integra2 spectrometer (Sercon Instruments, Crewe, UK) linked to a Sercon elemental analyser (EA) fitted with an autosampler (Sercon Instruments, Crewe, UK). A precise amount of each compound was weighted into tin capsules (2 x 5 mm, Thermo Fisher scientific) using a 10^{-6} g precision balance (Ohaus Discovery DV215CD) to give approx. 0.8 mg of caffeine and 0.5 mg of paracetamol. The percentage of carbon was checked by the operator by comparing this value with that usually obtained on the working reference. This gives a check in relation to the intensity of the signal of the CO_2 ions. The instrument was calibrated for $\delta^{13}C$ using the international reference materials NBS-22 ($\delta^{13}C_{PDB} = 30.03‰$), SUCROSE-C6 ($\delta^{13}C_{PDB} = 10.80‰$), and IAEA-CH-7 PEF-1 ($\delta^{13}C_{PDB} = 32.15‰$) (IAEA, Vienna, Austria) and instrumental deviation followed via a laboratory standard of glutamic acid.

Multivariate data analysis

Principal Component Analysis (PCA) is the common chemometric tool used as unsupervised exploratory analysis. PCA allows the visualization of potential groups in the data depending on the characteristics of samples. The principle of PCA is to find successive orthogonal directions that retain maximal variance among the data to reduce dimensions by preserving as much information as possible from the original matrix.[38] PCA was performed using SIMCA-P+ software, version 12.0 (Umetrics, Umeå, Sweden) through its routine applications.

Results and discussion

The pulse sequence FS-INEPT

The pulse sequence INEPT used was already modified and optimized from previous works: adiabatic and/or composite 180° for inversion and refocalisation and finally adiabatic ^{1}H decoupling.[25] When the polarization transfer is achieved via direct coupling ($^{1}J_{CH}$), the delays τ and Δ being adjusted from the median value of $^{1}J_{CH}$ are of the order of a few milliseconds, as Δ=1/4J and Δ=1/7J for observing all ^{1}H bearing carbons. Unfortunately, the range of $^{n}J_{CH}$ is very broad (including $^{1}J_{CH}$) for both caffeine and paracetamol as shown in **Table 4**. Simulations for getting optimum τ and Δ for recording all carbon signals as positive peaks showing non distorted intensities could be very tedious as they also have to take into account ^{1}H-^{1}H coupling and relaxation effect during delays and RF pulses. We rather opted for an experimental optimization keeping in mind that the shorter the delays would be the better the repeatability would be: first several trials on τ were indented to appraise its value then the refocalisation delay Δ was adjusted step by step. It should be noticed that several sets of values for the delays are more likely, but once one set is chosen as the compromise, it should be kept for all the samples studied. The following values were finally retained: τ = 19.3 ms, Δ = 20 ms for caffeine and τ = 13.4 ms, Δ = 13 ms for paracetamol, the main point being to keep constant the delay values for all samples studied for a given molecule. In the same conditions (concentration i.e. 40 mg, duration and NMR probe) an effective experiment time gain of 2 and 3 is achieved for caffeine and for paracetamol, respectively, compared to the previous measurement performed using the ‘classical’ irm-^{13}C NMR.[30,31]

Table 4: ^{n}JC-H scalar coupling constants (including ^{1}J) for both molecules caffeine and paracetamol obtained during this work by performing a ^{1}H coupled ^{13}C NMR spectrum. C3 and C5 of caffeine and C1 of paracetamol have two different ^{n}JC-H coupling constants.

Caffeine	$^{1}J_{C-H}$ (Hz)	$^{2}J_{C-H}$ (Hz)	$^{3}J_{C-H}$ (Hz)
C1	-	-	2.6
C2	-	-	2.8
C3	-	-	12.7 / 2.6
C4	210	-	4.1
C5	-	-	4.8 / 2.4
C6	142	-	1.4
C7	142	-	-
C8	142	-	-
Paracetamol	$^{1}J_{C-H}$ (Hz)	$^{2}J_{C-H}$ (Hz)	$^{3}J_{C-H}$ (Hz)
C1	-	6.1 / 2.7	-
C2	-	9.4	2.8
C3	-	8.9	1.5
C4	159	6.5	3.6
C5	159	5.4	-
C6	128	-	-

Performances of irm-^{13}C FS-INEPT

The sensitivity is significantly improved, answering the first part of the initial question. The second step concerns the ability of FS-INEPT to detect small changes in ^{13}C content for each carbon, *i.e.* establish a ^{13}C isotopic profile for origin discrimination purpose. Irm-^{13}C INEPT proved to be robust with relatively short delays τ and Δ (< 2 ms). Although, by increasing significantly these delays in FS-INEPT, other phenomena than the stability of the NMR spectrometer should be accounted for. The first one is associated to the transverse relaxation for the ^{1}H and ^{13}C magnetizations, i.e. vanishing of the magnetization in the transverse plan. This is the origin of the NMR signal when it occurs during the acquisition time. But when it occurs before the acquisition time (e.g. in multi-pulse sequence), there is a loss of signal. It cannot be neglected and the only way to deal with it is to be sure that the induced signal attenuation is always the same, whatever the sample or the measurement. The repeatability evaluation should therefore include the sample tube preparation to avoid significant changes in relaxation mechanism, *e.g.* concentration, solvents, relaxation reagent. The second one is the consistency of the coupling itself: it should be constant independently of light changes of the solution put in the NMR tube. For example in caffeine, the polarization transfer can be altered from the proton on the carbon 4 due to chemical exchange associated to the acidic character of this hydrogen. The associated scalar coupling could be more or less effective to ensure the

polarization process. Therefore, the preparation of the caffeine samples was achieved with no residual water or acidic sources (as reported in the Experimental section).

The repeatability has been assessed by calculating the standard deviation of f_{iR} collected from, at least, 5 independent measurements over one year. Each measurement constituted of 5 consecutive spectra. The relative ^{13}C content was expressed as the reduced molar fractions f_{iR} as shown in published works (see **Experimental section** and **Table 1**). From **Table 5** the standard deviation associated to the long term repeatability is below 2.3‰.

Table 5: Standard deviation (SD) for each carbon (see **Figure 3** for carbon numbering) over five independent measurements by irm-^{13}C FS-INEPT from five samples replicate, over one year, of caffeine and paracetamol. The values have been multiplied by 1000 for a better readability and thus expressed in ‰.

	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**C8**
Caffeine SD (‰)	0.5	0.2	0.8	0.4	0.3	1.0	1.5	1.3
Paracetamol SD (‰)	1.2	1.4	1.1	2.3	1.3	1.7		

Application to caffeine and paracetamol from different sources

The interest of irm-^{13}C FS-INEPT is demonstrated by assessing the capability to collect relative ^{13}C profiles from different sources for caffeine and paracetamol. The objective for caffeine was to test whether the method was able to discriminate between several natural origins and commercial samples. For paracetamol the discrimination aimed to classify each sample because of unique isotope profile as fingerprint representative of the raw material and processes used. The main difference between the previous data and the present ones lies on the absence of link to the real ^{13}C content. From irm-^{13}C NMR, the amount of each isotopomer is determined as the isotope composition of each carbon on the international scale, *i.e.* $\delta^{13}C_i$ (‰).[30,31] As mentioned, irm-^{13}C FS-INEPT gives access to the relative distribution of isotopomers but on an arbitrary scale. Therefore, one piece of information is missing: the actual amount of ^{13}C in the molecule sample. As such, first, we present the capability of the internal isotopic distribution (f_{iR}) to assess the extent of discrimination between origins and second we include the bulk ^{13}C composition $\delta^{13}C_b$, measured by irm-MS. Principal component analysis (PCA) is a simple way to show graphical representation of the whole data set. As a non-predictive tool PCA is well adapted for studying data obtained from a relatively low number of samples and relatively high number of variables (≥ 3).

The caffeine samples are those described in **Table 2** and **Figure 3A** shows the PCA bi-plot (score plot + loading plot) of irm-^{13}C FS-INEPT data set (f_{iR}) using the two main principal components PC1 and PC2 which explain 62.7% of the total variance (39% and 23.7% respectively).

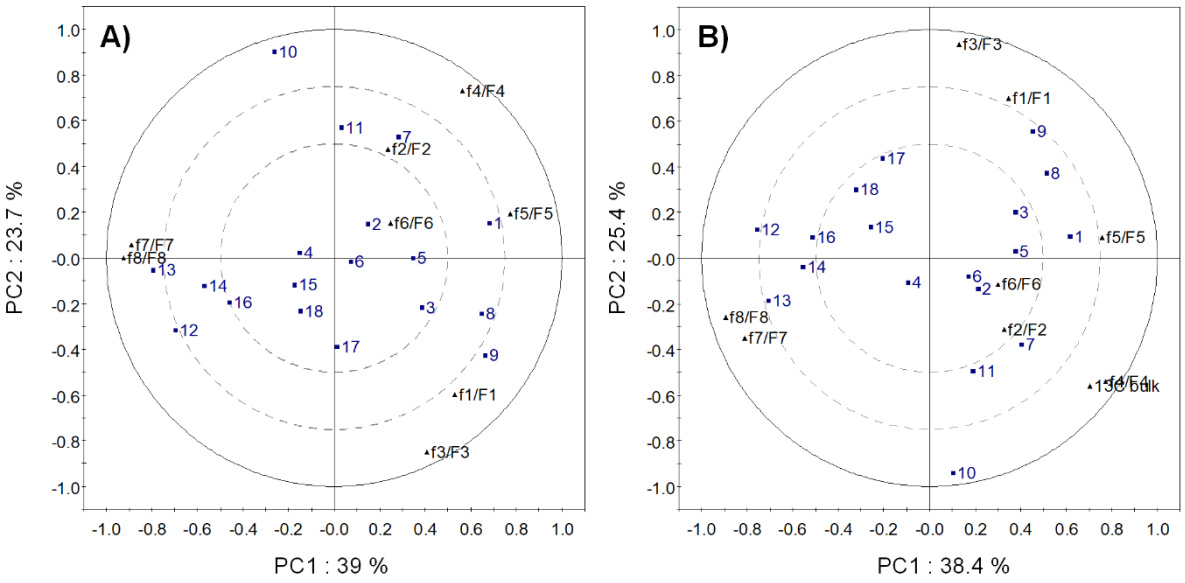


Figure 3: **A)** Principal component analysis on caffeine: PC1 (39%) vs PC2 (23.7%) bi-plot (scores + loadings) using the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments. **B)** Principal component analysis on caffeine: PC1 (38.4%) vs PC2 (25.4%) bi-plot (scores + loadings) using the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C-IRMS. Triangle stands for the loadings (contribution of each measured parameter) used and blue square for the scores (sample identification). The loadings ^{13}C and f_4/F_4 have fortuitously the same position.

That is enough for observing a clear separation between natural (1 to 11) and commercial (12 to 18) samples. The closest variables to the correlated circle should contribute (for PC1 and PC2) the most to the differentiation of the samples. It appears that two carbon positions, C2 and C6, are less discriminant than the others variables (3 protonated carbons and 3 quaternary carbons). This justifies the need to measure the maximum of isotopomers including the quaternary carbons. A similar separation of natural sub-groups was found in the study using irm-^{13}C NMR[31] but, as mentioned above in "The pulse sequence FS-INEPT" section, an average expriment time gain of 2 was obtained for caffeine with a smaller amount of product (40mg) than the classical irm-^{13}C NMR approach (160mg). The caffeine extracted from tea (Sample 8 and 9), cola nut (10) and guarana (11) has a ^{13}C isotopic fingerprint that differs from the one measured for caffeine extracted from coffee. The addition of the total ^{13}C content expressed as the $\delta^{13}C_b$ measured by IRMS leads to a new PCA (**Figure 3B**). This new variable reinforces the discrimination observed solely with f_{iR} measured by irm-^{13}C FS-INEPT. The

third component (PC3) contributes to 18.7% to the total variance and might be useful for refining distribution within a given origin that could be of interest once the database would be significantly enlarged.

Concerning paracetamol, a previous study[30] using classical irm-^{13}C NMR approach has already shown that C1, C3 and C6 have particularly wide ranges on the isotopic composition. That was identified as a marker of the type of synthon added on the amino group and the addition mode of this amino group to the aromatic ring.

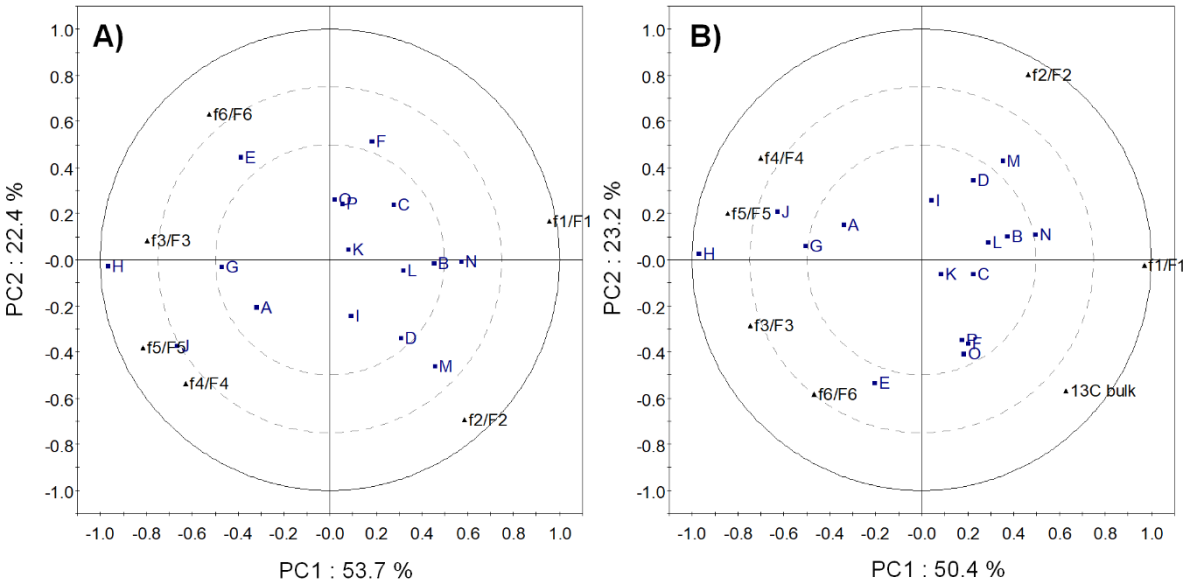


Figure 4: A) Principal component analysis on paracetamol: PC1 (53.7%) vs PC2 (22.4%) bi-plot (scores + loadings) using the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments. **B)** Principal component analysis on paracetamol: PC1 (50.4%) vs PC2 (23.2%) bi-plot (scores + loadings) using the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and IRMS. Triangle stands for the loadings (contribution of each measured parameter) used and blue square for the scores (sample identification).

Thanks to irm-^{13}C FS-INEPT the quaternary carbons as C1 and C3 are included in the isotopic profile. The samples of **Table 3** were submitted to PCA analysis. **Figure 4A** shows the PCA bi-plot (score plot + loading plot) of irm-^{13}C FS-INEPT data set (f_{iR}) using the two main principal components PC1 and PC2 which explain 76.1% of the total variance (53.7% and 22.4% respectively) indicating that most of the variables have a discriminating potential. Further information is gained by addition of $\delta^{13}C_b$ (**Figure 4B**). As expected, each sample has its own isotopic profile and this unique signature can be utilized as a fingerprint for traceability of the supply chain from the manufacturer to the consumer.[26] The proximity of samples O and P might indicate a similar origin (raw materials and process).

Conclusions and perspectives

The principal outcomes of this study are three. First, the study validates the use of INEPT for quantifying all ^{13}C isotopomers including quaternary carbons. The delays were adjusted for long-range $^{n}J_{CH}$ values in order to observe the full spectrum with sufficient SNR. A modified INEPT sequence (180° pulses and ^{1}H decoupling) was used as previously done for a polarization transfer via $^{1}J_{CH}$. The resulting method, irm-^{13}C FS-INEPT shows a good long term repeatability, with a relative standard deviation of the order of 2‰. Secondly, we show that intramolecular isotopic profile expressed on a relative scale is sufficient for classification purpose. In comparison with the measurement achieved by irm-^{13}C NMR, a similar discrimination is observed for caffeine and paracetamol but with a smaller sample amount and a shorter experimental time. Thirdly, a significant reducing time is reached by a factor 2 to 3 for caffeine and paracetamol, respectively. Thus the present methodology can be implemented for working on huge database in which a large number of samples from the same molecule will be measured. Then, other statistics with supervised approach would allow subtle classification between samples.

As perspective we provide evidence that irm-^{13}C FS-INEPT could be used on any molecules available on a relatively small quantity, *i.e.* several tens of mg. The expression of the final results could be done on the $\delta^{13}C_i$ scale after appropriate calibration: the same sample is analysed by the previous method and by the new one irm-^{13}C FS-INEPT, the correcting factor can be then calculated for each position. That possibility is of prime importance when comparison of molecules has to be done for isotopic affiliation, for example. This paves the way to work with samples from the field or from final matrices. The latter is of prime importance in quality control of food, *e.g.* the study of the naturalness of vanillin in ice cream. Similarly, the separation/purification step is much simplified, favoring the implementation of the present methodology in control laboratory for routine use.

Acknowledgments

This work is funded by the French National Research Agency ANR, project FRIIME funded by the project call CE 39. M. Joubert thanks the ANR for funding his PhD bursary through this project. The authors thank Anne-Marie Schiphorst and Mathilde Grand for help with irm-MS.

Conflict of Interest Disclosure

Funding for this research was from a thesis grant to V. J. (see Acknowledgements) and core funding from the CNRS and the French Ministry of Education. There is no conflict of interest.

References

(1) Danezis, G. P.; Tsagkaris, A. S.; Camin, F.; Brusic, V.; Georgiou, C. A. Food Authentication: Techniques, Trends & Emerging Approaches. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 123–132.

(2) Dégardin, K.; Roggo, Y.; Margot, P. Forensic Intelligence for Medicine Anti-Counterfeiting. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *248*, 15–32.

(3) Gentile, N.; Siegwolf, R. T. W.; Esseiva, P.; Doyle, S.; Zollinger, K.; Delémont, O. Isotope Ratio Mass Spectrometry as a Tool for Source Inference in Forensic Science: A Critical Review. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *251*, 139–158.

(4) Camin Federica; Bontempo Luana; Perini Matteo; Piasentier Edi. Stable Isotope Ratio Analysis for Assessing the Authenticity of Food of Animal Origin. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (5), 868–877.

(5) Muccio, Z.; Jackson, G. P. Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst* **2009**, *134* (2), 213–222.

(6) Jézéquel, T.; Joubert, V.; Giraudeau, P.; Remaud, G. S.; Akoka, S. The New Face of Isotopic NMR at Natural Abundance. *Magn. Reson. Chem.* **2017**, *55* (2), 77–90.

(7) Gauchotte-Lindsay, C.; Turnbull, S. M. On-Line High-Precision Carbon Position-Specific Stable Isotope Analysis: A Review. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *76*, 115–125.

(8) Eiler, J.; Cesar, J.; Chimiak, L.; Dallas, B.; Grice, K.; Griep-Raming, J.; Juchelka, D.; Kitchen, N.; Lloyd, M.; Makarov, A.; et al. Analysis of Molecular Isotopic Structures at High Precision and Accuracy by Orbitrap Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2017**, *422*, 126–142.

(9) Martin, G. J.; Martin, M. L. Deuterium Labelling at the Natural Abundance Level as Studied by High Field Quantitative ^{2}H NMR. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (36), 3525–3528.

(10) Martin, G. J.; Martin, M. L.; Akoka, S. Modern Magnetic Resonance. In *Modern Magnetic Resonance*; Graham A.Webb, 2006; pp 1629–1636.

(11) Martin, G. J.; Martin, M. L.; Remaud, G. SNIF-NMR—Part 3: From Mechanistic Affiliation to Origin Inference. In *Modern Magnetic Resonance*; Graham A.Webb, 2008; pp 1669–1680.

(12) Jamin, E.; Martin, G. J. SNIF-NMR—Part 4: Applications in an Economic Context: The Example of Wines, Spirits, and Juices. In *Modern Magnetic Resonance*; Graham A.Webb, 2008; pp 1681–1687.

(13) Jamin, E.; Thomas, F. SNIF-NMR Applications in an Economic Context: Fraud Detection in Food Products. In *Modern Magnetic Resonance*; Springer, Cham, 2017; pp 1–12.

(14) Remaud, G. S.; Giraudeau, P.; Lesot, P.; Akoka, S. Isotope Ratio Monitoring by NMR. Part 1: Recent Advances. In *Modern Magnetic Resonance*; Springer, Cham, 2016; pp 1–26.

(15) Caytan, E.; Botosoa, E. P.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Accurate Quantitative ^{13}C NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific ^{13}C Isotope Ratio Determination. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (21), 8266–8269.

(16) Singleton, D. A.; Thomas, A. A. High-Precision Simultaneous Determination of Multiple Small Kinetic Isotope Effects at Natural Abundance. *J Am Chem SOC* **1995**, *117*, 9357–9358.

(17) Aelion, C. M.; Höhener, P.; Hunkeler, D.; Aravena, R. *Environmental Isotopes in Biodegradation and Bioremediation*; CRC Press, 2009.

(18) Tenailleau, E.; Lancelin, P.; Robins, R. J.; Akoka, S. NMR Approach to the Quantification of Nonstatistical ^{13}C Distribution in Natural Products: Vanillin. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (13), 3818–3825.

(19) Tenailleau, E.; Remaud, G.; Akoka, S. Quantification of the 1H-Decoupling Effects on the Accuracy of ^{13}C-NMR Measurements. *Instrum. Sci. Technol.* **2005**, *33* (4), 391–399.

(20) Caytan, E.; Remaud, G. S.; Tenailleau, E.; Akoka, S. Precise and Accurate Quantitative ^{13}C NMR with Reduced Experimental Time. *Talanta* **2007**, *71* (3), 1016–1021.

(21) Remaud, G. S.; Akoka, S. Isotope Ratio Monitoring by NMR. Part 3: New Applications for Traceability of Active Pharmaceutical Ingredients. In *Modern Magnetic Resonance*; Springer, Cham, 2017; pp 1–19.

(22) Robins, R. J.; Remaud, G. S.; Akoka, S. Isotope Ratio Monitoring ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry for the Analysis of Position-Specific Isotope Ratios. *Methods Enzymol.* **2017**, *596*, 369–401.

(23) Primasova, H.; Bigler, P.; Furrer, J. Chapter One - The DEPT Experiment and Some of Its Useful Variants. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, G. A., Ed.; Academic Press, 2017; Vol. 92, pp 1–82.

(24) Bussy, U.; Thibaudeau, C.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Remaud, G. S.; Silvestre, V.; Akoka, S. Isotopic Finger-Printing of Active Pharmaceutical Ingredients by ^{13}C NMR and Polarization Transfer Techniques as a Tool to Fight against Counterfeiting. *Talanta* **2011**, *85* (4), 1909–1914.

(25) Thibaudeau, C.; Remaud, G.; Silvestre, V.; Akoka, S. Performance Evaluation of Quantitative Adiabatic ^{13}C NMR Pulse Sequences for Site-Specific Isotopic Measurements. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5582–5590.

(26) Remaud, G. S.; Bussy, U.; Lees, M.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Silvestre, V.; Akoka, S. NMR Spectrometry Isotopic Fingerprinting: A Tool for the Manufacturer for Tracking Active Pharmaceutical Ingredients from Starting Materials to Final Medicines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 464–473.

(27) Merchak, N.; Silvestre, V.; Rouger, L.; Giraudeau, P.; Rizk, T.; Bejjani, J.; Akoka, S. Precise and Rapid Isotopomic Analysis by ^{1}H–^{13}C 2D NMR: Application to Triacylglycerol Matrices. *Talanta* **2016**, *156–157*, 239–244.

(28) Homer, J.; Perry, M. C. Enhancement of the NMR Spectra of Insensitive Nuclei Using PENDANT with Long-Range Coupling Constants. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, *0* (3), 533–536.

(29) Thorn, K. A.; Folan, D. W.; Arterburn, J. B.; Mikita, M. A.; MacCarthy, P. Application of INEPT Nitrogen-15 and Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry to Derivatized Fulvic Acids. *Sci. Total Environ.* **1989**, *81–82*, 209–218.

(30) Silvestre, V.; Mboula, V. M.; Jouitteau, C.; Akoka, S.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Isotopic ^{13}C NMR Spectrometry to Assess Counterfeiting of Active Pharmaceutical Ingredients: Site-Specific ^{13}C Content of Aspirin and Paracetamol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50* (3), 336–341.

(31) Diomande, D. G.; Martineau, E.; Gilbert, A.; Nun, P.; Murata, A.; Yamada, K.; Watanabe, N.; Tea, I.; Robins, R. J.; Yoshida, N.; et al. Position-Specific Isotope Analysis of Xanthines: A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Method to Determine the ^{13}C Intramolecular Composition at Natural Abundance. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (13), 6600–6606.

(32) Broséus, J.; Gentile, N.; Esseiva, P. The Cutting of Cocaine and Heroin: A Critical Review. *Forensic Sci. Int.* **2016**, *262*, 73–83.

(33) Tannús, A.; Garwood, M. Adiabatic Pulses. *NMR Biomed.* **1997**, *10* (8), 423–434.

(34) Tenailleau, E.; Akoka, S. Adiabatic 1H Decoupling Scheme for Very Accurate Intensity Measurements in ^{13}C NMR. *J. Magn. Reson.* **2007**, *185* (1), 50–58.

(35) Hwang, T. L.; van Zijl, P. C.; Garwood, M. Broadband Adiabatic Refocusing without Phase Distortion. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **1997**, *124* (1), 250–254.

(36) Zhang, B. L.; Trierweiler, M.; Jouitteau, C.; Martin, G. J. Consistency of NMR and Mass Spectrometry Determinations of Natural-Abundance Site-Specific Carbon Isotope Ratios. The Case of Glycerol. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (13), 2301–2306.

(37) Werner, R. A.; Brand, W. A. Referencing Strategies and Techniques in Stable Isotope Ratio Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15* (7), 501–519.

(38) Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. M.; Héberger, K. Supervised Pattern Recognition in Food Analysis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1158* (1–2), 196–214.

II-3) Données complémentaires

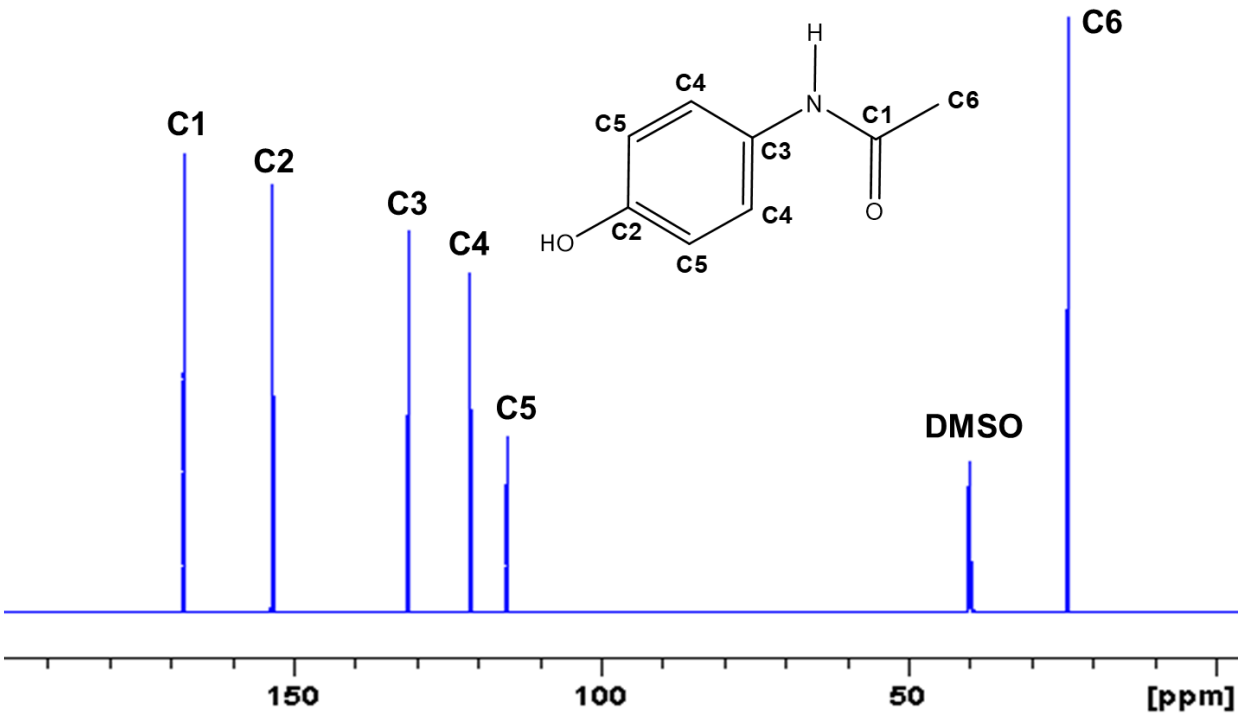


Figure S1: Spectre RMN ^{13}C d'un échantillon de paracétamol obtenu en 33 minutes par une acquisition FS-INEPT ^{13}C avec un S/B de 500.

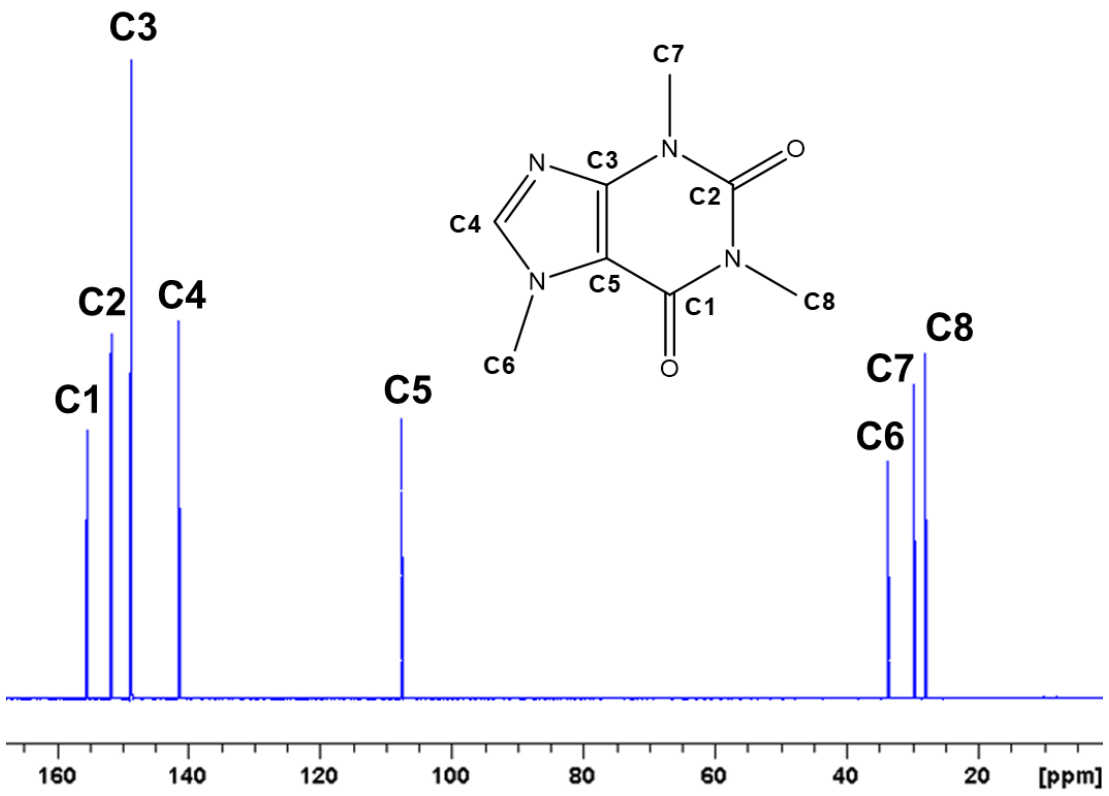


Figure S2: Spectre RMN ^{13}C d'un échantillon de caféine obtenu en 55 minutes par une acquisition FS-INEPT ^{13}C avec un S/B de 500.

Table S1: Fractions molaires réduites (f_{iR}) pour chaque carbone mesuré par la méthode FS-INEPT ^{13}C, ainsi que la moyenne de la composition isotopique globale ($\delta^{13}C_b$) déterminée par irm-MS pour les échantillons de caféine et de paracétamol décrits en **Table II** et **Table III.** Les valeurs de moyenne et de déviation standard (SD) ont été calculées à partir de 18 échantillons de caféine et 16 échantillons de paracétamol.

	Caféine		**Paracétamol**	
f_{iR}	**Moyenne**	**SD (‰)**	**Moyenne**	**SD (‰)**
f_{1R}	0,6686	5,16	1,4873	11,38
f_{2R}	1,1884	4,02	1,2509	3,69
f_{3R}	1,9056	9,44	1,2007	7,17
f_{4R}	1,1165	8,58	1,1655	4,27
f_{5R}	0,9599	4,30	0,8304	2,36
f_{6R}	0,6027	6,56	2,0652	5,16
f_{7R}	0,7406	7,57		
f_{8R}	0,8178	10,45		
$\delta^{13}C$ bulk (‰)	-30,12	3,22	-28,46	1,76

II-4) Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons mis au point l'irm-^{13}C NMR utilisant une séquence INEPT adiabatique refocalisée avec une précision de 2‰ qui permet de transférer la sensibilité des protons sur tous les carbones de la molécule étudiée, y compris les quaternaires. Les délais des deux échos de spins doivent être ajustés pour chaque molécule afin de bénéficier de ce gain de sensibilité sur tous les carbones. Il a été montré que la méthode FS-INEPT permettait d'obtenir des profils isotopiques relatifs qui pouvaient être comparés afin de pouvoir les classifier selon une méthode statistique : l'ACP.

En utilisant les informations obtenues de l'analyse FS-INEPT ^{13}C : une bonne classification des échantillons de caféine en fonction de leur origine (naturelle vs commercial) a été observée. Les carbones C7 et C8 correspondant aux méthyles se montrent très discriminants et sont en accord avec les résultats qui ont été obtenus avec la séquence « one-pulse » sur la caféine. De même pour le paracétamol, les carbones C1, C3 et C6 sont très discriminants entre les échantillons car ils sont dépendants de la méthode de synthèse employée sur le noyau aromatique.

La même classification pour la caféine et le paracétamol a donc été observée en utilisant la séquence FS-INEPT et la séquence « one-pulse ». Cependant, la méthode FS-INEPT requiert une faible quantité d'échantillon par apport à la séquence classique « one-pulse » (40 mg vs 200 mg) avec un temps d'acquisition plus court. Cet avantage non négligeable pourra être mis à profit dans une application forensique utilisant cette séquence FS-INEPT ^{13}C et fera l'objet de la partie IV de ce manuscrit.

Partie III : Développement de la RMN isotopique du ^{15}N haute précision utilisant un transfert de polarisation pour la mesure position-spécifique

III-1) Introduction

Aujourd'hui, aucune méthode par RMN n'est capable de mesurer avec précision (< 1‰) le rapport isotopique site par site du ^{15}N. En effet, l'azote-15 souffre d'une faible abondance naturelle (0,37%) et d'un faible rapport gyromagnétique 3 fois plus petit que celui du carbone-13 rendant la mesure peu raisonnable en temps en utilisant une séquence « one-pulse » pour le ^{15}N.

Comme montré dans les travaux de la partie II, la méthode FS-INEPT ^{13}C offre un gain de sensibilité par apport à la séquence « one-pulse » tout en gardant l'information sur les carbones quaternaires et la précision requise pour l'analyse isotopique position-spécifique. Dans le cadre de cette partie, une stratégie basée sur la transposition de cette séquence sera abordée dans le but de mesurer la teneur isotopique position-spécifique en ^{15}N. Les différentes conditions méthodologiques à respecter pour y parvenir seront présentées dans ces travaux.

Pour y parvenir, un fractionnement isotopique sera provoqué durant une séparation sur colonne de silice sur une molécule modèle : le 1-methylimidazole (2 azotes). Seul 5 % du produit sera collecté afin d'observer un fractionnement isotopique. Cette molécule a été choisie pour sa grande solubilité afin de pouvoir concentrer le produit de façon à obtenir des temps d'expériences raisonnables. Les résultats obtenus en ^{15}N seront complétés par des analyses irm-MS et irm-^{13}C NMR « one-pulse ».

L'implémentation de la séquence FS-INEPT en ^{15}N à partir des travaux réalisés dans la partie II ainsi que sa preuve de concept sur le 1-methylimidazole font l'objet d'un article intitulé « **High-precision quantitative ^{15}N NMR using modified polarization transfer INEPT for isotopomics studies** » et a été soumis au journal *Chemical Communications*.

III-2) Article

High-precision quantitative ^{15}N NMR using optimized polarization transfer INEPT for intramolecular ^{15}N composition determination

Valentin Joubert[1], Virginie Silvestre[1], Maxime Lelièvre[1], Virginie Ladroue[2], Fabrice Besacier[2], Serge Akoka[1], Gérald S. Remaud[1*]

1 Elucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, CEISAM, University of Nantes-CNRS UMR6230, F-44322 Nantes, France

2 Institut National de Police Scientifique, Laboratoire de Lyon, 31 avenue Franklin Roosevelt, 69134 Ecully Cedex, France

**Correspondence: G. Remaud. Phone: 33 2 51 12 57 19; Fax: 33 2 51 12 57 12; e-mail: gerald.remaud@univ-nantes.fr*

Abstract: The determination of the position-specific ^{15}N isotope content, at natural abundance, is for the first time accessible by using quantitative ^{15}N NMR spectrometry. ^{15}N-NMR spectra are obtained by using an adiabatic "Full-Spectrum" INEPT sequence in order to make possible ^{15}N NMR experiments with a high signal-noise ratio (> 500), required for a precision with a standard deviation below 1‰. A proof of concept was presented here on 1-methylimidazole with the measurement of isotopic enrichment factor for each ^{15}N isotopomer associated to the fractionation induced during separation process on silica column. The precision as the long term repeatability of the methodology is good enough to evaluate small changes in the ^{15}N isotope content. As observed for ^{13}C, inverse and normal ^{15}N effects occur concomitantly, giving access to new information not detectable by other techniques as isotope ratio measured by mass Spectrometry, for which global (average) values are obtained.

Isotopic composition determination is a pertinent tool for tracking the origin of molecules in food and pharmaceutical industries, environmental or forensic sciences and metabolic studies.[1] Historically, isotopic composition (δ in ‰) was determined by mass spectrometry (irm-MS: isotope ratios monitoring by Mass Spectrometry, known also as IRMS: Isotope Ratio Mass Spectrometry). This methodology provides the global or bulk isotope composition, *i.e.* the average values of the heavy isotope of the studied element (δ_{bulk}).[2] Information on the isotopic intramolecular distribution is therefore not reachable. Several approaches were proposed for the position-specific isotope analysis (PSIA).[3,4] Among them, Nuclear Magnetic Resonance spectrometry (NMR) is the only analytical method which permits to determine site by site the isotopic distribution for a given molecule, *i.e*. the titration of each isotopomer.

In the early 80's, ^{2}H NMR was introduced under the name of SNIF-NMR™ (Site specific Natural Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance) and was immediately recognized as a powerful technique to authenticate the origin of natural product or the manufacturing process of synthetic product.[5,6] In the case of ^{13}C, a precision about 1‰ is necessary for isotopic analysis due to the restricted isotopic distribution range of ^{13}C (50‰ on the $\delta^{13}C$-scale). This huge constraint is the reason why its implementation appeared only 10 years ago, in its classical structure designed as 'one-pulse'.[7] It was shown that a standard deviation of the order of 1‰ can be achieved by employing: (i) an inverse gated 90° pulse sequence with a repetition time (TR) of 10 times the longest T1 (longitudinal relaxation time) for nuclear Overhauser effect (nOe) suppression, (ii) an efficient and robust ^{1}H decoupling as

constituted by adiabatic pulses, (iii) a signal-to-noise ratio (SNR) higher than 500 and (iv) an area signal determination by peak deconvolution capable of compensating for peak dephasing. Isotope ratio measured by ^{13}C NMR (irm-^{13}C NMR) has been successfully tested and proved as an efficient tool for the ^{13}C position-specific determination.[8] However, the determination of the intramolecular isotopic profile by the one-pulse approach is a lengthy experiment due to the low natural abundance of ^{13}C (1.1%), its small gyromagnetic ratio and long longitudinal relaxation. It requires relatively large amount of material and/or long analysis duration.

Now an exploitable technique provides substantial reduction in the acquisition time of ^{13}C NMR experiments by sensitivity enhancement using polarization transfer from the sensitive ^{1}H to ^{13}C nuclei.[9] "Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer" (INEPT) allowed obtaining, after subsequent modifications (as adiabatic pulses) the required reproducibility (1‰).[10] Moreover, the repetition time of the experiment becomes ^{1}H-T_1 dependent, thus allowing further time reduction, because the TR is now monitored by the longest Proton-T_1 that are much shorter than Carbon-T_1. A sensitivity factor enhancement of 6-10 can be reached depending on the studied molecule. Although the proportionality coefficient between peak area and ^{13}C content is not the same for all isotopomers, a relative isotopic ^{13}C profile can thus be obtained leading to the isotopome elucidation via an isotopomics experiment. However, since the sensitivity of the proton is transferred to the less sensitive ^{13}C via the direct scalar coupling between these two nuclei, the information on the quaternary carbon is lost. The irm-^{13}C INEPT NMR has been successfully applied in different domains.[10–12] Recently an adaptation of this methodology has been proposed as "Full-Spectrum" INEPT (FS-INEPT) using long-range scalar coupling ^{n}J still with both high precision (1.5‰) and high sensitivity in order to open access to the titration of all ^{13}C isotopomers (including those from quaternary carbons) on the molecule of interest.[13]

In this communication, we report for the first time a methodology that enables measuring the intramolecular ^{15}N content of a given molecule. We investigate the optimization of the adiabatic FS-INEPT sequence for ^{15}N PSIA. In literature, the use of polarization transfer for ^{15}N at natural abundance based on long-range couplings was dedicated to structure elucidation. Thus, several studies were conducted on purines and derivatives for assigning correctly isomeric N^7- and N^9-substituted structural elucidation.[14–16] Modifications of INEPT was also proposed to enhance signals via polarization transfer from small ^{15}N, ^{1}H coupling constants (1–12 Hz) of caffeine and wyosine by using $^{n}J_{NH}$ values.[17,18] However, to our knowledge, there is only one publication on the use of quantitative ^{15}N NMR[19] which introduced the different analytical conditions in

order to experiment quantitative ^{15}N NMR. The target precision was not at the level required for ^{15}N PSIA. We were also aware of only one work based on (bio)chemical fragmentations for ^{15}N PSIA.[20] It was applied on polynitrogenous amino acids by off-line removal of an N-containing moiety. This approach is not extendable to other types of molecule unless tedious work is undertaken. However, this work highlighted that ^{15}N intramolecular distribution differed in a given molecule and between molecules. As a proof of concept, the present work aims to demonstrate that the enrichment factor (or isotope effect) associated to position-specific ^{15}N fractionation can be measured with an adequate precision. As a result, the methodology has to be sensitive and repeatable at the order of 1‰.

The gyromagnetic ratio of ^{15}N is about three times lower than ^{13}C and about ten times lower than ^{1}H. Moreover, its natural abundance is also three times lower than ^{13}C (0.36% vs 1.1%) which provides a significant loss of sensitivity in ^{15}N NMR compared to ^{13}C NMR. The use of "one-pulse" sequence in ^{15}N NMR will conduct to a very long experiment (few days) to reach SNR > 500. As an alternative, we propose the use of polarization transfer with the INEPT sequence in order to increase the sensitivity. Since ^{15}N nucleus has similar properties as ^{13}C such as relaxation times and the presence of nOe (negative for ^{15}N), the recent work done with the FS-INEPT on ^{13}C could be transposed to our goal.[13]

The study has been performed on a small molecule: 1-methylimidazole showing two nitrogen atoms, non-equivalent, coupled to protons via long range coupling $^{n}J_{1H\text{-}15N}$. In this communication, we report the application of a modified INEPT sequence using adiabatic pulses FS-INEPT to study the precision and the long term reproducibility on ^{15}N PSIA carried out on 1-methylimidazole. The isotopic fractionation was generated during the elution process on silica chromatography column. Previous work has shown that the chromatographic elution leads to normal and inverse ^{13}C effects, *i.e.* ^{13}C position-specific fractionation.[21] The enrichment factor ε_i was determined according to Julien *et al.*.[22] Thus, ε_i was calculated using only one data point of the conversion process in addition to the initial point (t0). Very similar results to the classical Rayleigh plot method using multiple data points are obtained when the process conversion is $\leq$ 30%. By collecting only 5% (w/w) of the introduced 1-methylimidazole from the first eluted fraction we expected to observe fractionation. As a control of the experiment, ^{13}C fractionation has been also studied by irm-^{13}C NMR using the classical one-pulse approach.

For irm-^{13}C NMR and FS-INEPT ^{15}N NMR, 400 µL of 1-methylimidazole were dissolved in 200 µL of DMSO-d_6 in 5 mm NMR tubes. Two samples of 1-methylimidazole were purchased

from TCI and Sigma-Aldrich. The sample from TCI was used in order to simulate isotopic fractionation during the separation process on silica gel column. 10 mL (precisely weighed) were dropped on the silica gel column, after elution 0.5 mL was collected which represent 5% of the initial product.

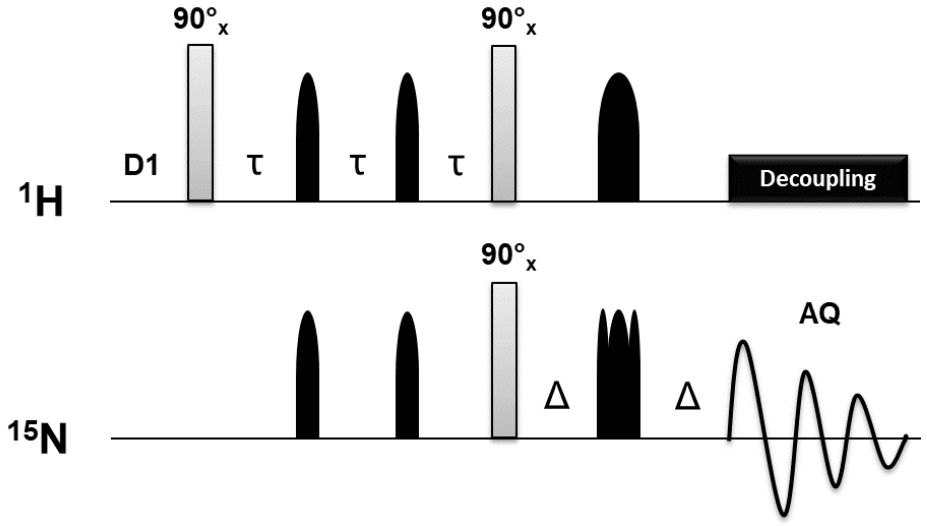


Figure 1: Adiabatic refocused double echo INEPT sequence with ^{1}H and ^{15}N 180° adiabatic full passage inversion pulses and ^{15}N 180° composite refocusing pulses. τ is the polarization transfer delay, and Δ is the refocalisation delay. TR = AQ + D1 corresponding to 21 s. The decoupling is also using adiabatic pulses.[23]

NMR experiments were performed on a Bruker AVANCE HD 700 MHz spectrometer fitted with an inverse CRYO $^{1}H/^{13}C/^{15}N/^{2}H$ ATMA grad Z, 5 mm, carefully tuned to the recording frequency of 70.93 MHz. The multipulse sequence for FS-INEPT ^{15}N NMR used is displayed in **Figure 1**. A subsequent modification was done from the previous work.[13] The first echo in INEPT was replaced by a double echo to reduce the power of 180° adiabatic pulses. The use of the double spin-echo overcomes the high power of the ^{15}N pulse power required to keep enough sensitivity, thus limiting the potential damage of the probe. The delay τ has the same value as classical INEPT, *i.e.* = $1/4J_{NH}$ for ensuring efficient coherence transfer (however, in the present study $^{n}J_{NH}$ is used). The 180° ^{15}N pulse during the second simple echo serves to refocus ^{15}N chemical shift evolution during Δ delays. Adiabatic full passage pulses were generated using Mathcad 8 (MathSoft, Inc.). They were designed with a cosine amplitude modulation of the RF field (ω_1^{max} = 157.1 and 93 kHz for ^{15}N and ^{1}H, respectively) and an offset independent adiabaticity (OIA) by optimizing the frequency sweep ΔF (ΔF = 30 and 17 kHz for ^{15}N and ^{1}H, respectively). For inversion pulses and the refocusing pulses of the double spin echo, adiabatic full passage pulses were used. For the refocusing pulses of the simple echo, composite adiabatic pulses were used.

The τ and Δ delays must be adjusted from long-range $^{n}J_{NH}$. Step by step experimental optimization was conducted to maximize SNR of the smallest peak. Several sets of values for the delay may be acceptable but once one set is chosen as the compromise, it should be kept for all the experiments and samples studied. The following values optimized were: τ = 11.8 ms and Δ = 12 ms for 1-methylimidazole. The main point is to keep constant experimental conditions: concentration, delay values τ and Δ, NMR probe. TR = 21 s and 532 scans were needed to obtain SNR higher than 500 (as shown in figure 2). The measurement time was lower than 16 h for five spectra. ^{15}N spectra were processed as follows: an exponential window function inducing a line broadening of 1.5 Hz for ^{15}N was applied to the FID prior to Fourier transform. An automatic polynomial baseline correction was subsequently applied to the resulting spectra. Peak areas of ^{15}N peaks were determined by the curve-fitting process implemented within Perch (Perch NMR Software, University of Kuopio, Finland).

The main goal of this study is to detect small changes in ^{15}N content for each nitrogen, *i.e.* calculating ε, appropriate precision is therefore essential. In order to evaluate the repeatability of this sequence, a number of considerations must be taken into account: (i) due to the transverse relaxation (T2) for ^{1}H and ^{15}N magnetization, a loss of signal was induced during the multipulse sequence during the spin echo delays τ and Δ. Therefore, the signal attenuation should be always the same, whatever the sample or the measurement; (ii) the repeatability evaluation must include the sample tube preparation to avoid any significant changes in relaxation mechanism (concentration, solvents, relaxation agents); (iii) the consistency of the coupling itself should be constant in the solution. For example, all traces of water must be eliminated in order to avoid chemical exchange associated to the acidic character of the hydrogen. The associated scalar coupling could be more or less effective to ensure the polarization process. Consequently, the NMR preparation of 1-methylimidazole was achieved with no residual water or acidic sources.

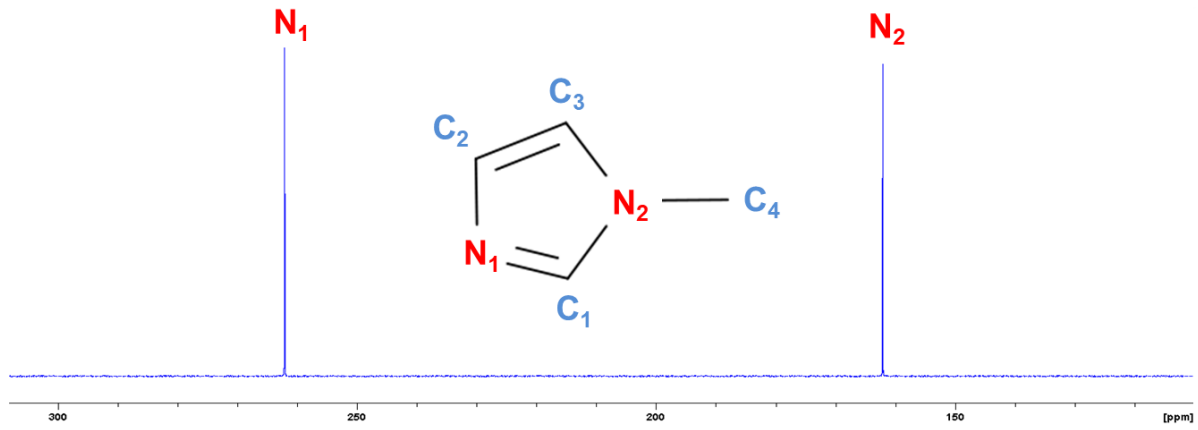


Figure 2: ^{15}N NMR spectrum of 1-methylimidazole sample from Sigma-Aldrich obtained in 3 hours and 8 min by adiabatic refocused FS-INEPT ^{15}N with a signal noise ratio up to 500. 1-methylimidazole molecule with carbon and nitrogen sites numbered in decreasing ^{13}C and ^{15}N chemical shift.

The repeatability has been evaluated by calculating the standard deviation of partial reduced molar fractions f_{iR} collected from five independent measurements over 6 months (NMR data processing was described in **Supplementary information**). Each measurement constituted of five consecutive spectra. The relative ^{15}N content was expressed as shown for ^{13}C in published works (See **ESI data processing**). From **Table 1** the standard deviation associated to the long-term repeatability is below 0.7 ‰ for each ^{15}N isotopomer.

Table 1: Partial reduced molar fractions (f_{iR}) and standard deviation (SD) obtained over five independent measurements by irm-^{15}N FS-INEPT from five replicates, over six months, of 1-methylimidazole. The SD values have been multiplied by 1000 for a better readability and are thus expressed in ‰. See **Figure 2** for nitrogen numbering of 1-methylimidazole.

Nitrogen	f_{iR}	f_{iR}	f_{iR}	f_{iR}	f_{iR}	$f_{iR\ average}$	SD (‰)	RSD (‰)
N_1	1.1104	1.1100	1.1116	1.1112	1.1103	1.1107	0.67	0.58
N_2	0.8896	0.8900	0.8884	0.8888	0.8897	0.8893	0.66	0.72

This precision is good enough to distinguish two samples from two suppliers, just on the basis of the ^{15}N PSIA (see **Table 1**). In that case, the ^{15}N composition ($\delta^{15}N_i$) can be used, even if it is on the relative scale (for absolute values, a correction is needed from molecules with known intramolecular ^{15}N, but not commercially available yet), but it has the advantage to express the results in which the global ^{15}N content obtained by irm-MS ($\delta^{15}N_{bulk}$) contributes to the potential

discrimination. It is also easier to appraise the level of change between the two nitrogen positions and between the two products.

The interest of FS-INEPT ^{15}N is further demonstrated by measuring for the first time ^{15}N isotopic fractionation of 1-methylimidazole caused by separation process on silica gel column. A residue of 5% was collected in order to have significant isotopic fractionation. Table 2 shows the relative $\delta^{15}N_i$ for the initial product and the fractionated one using the same mode of expression. As expected, there is a concomitant normal and reverse effect, *i.e.* isotopomer 1 is favored (it is eluted first) while the other one, isotopomer 2 is more retained on the column. As a result, the global effect is close to zero, *i.e.* not observable by irm-MS (**Table 2**).

Table 2: ^{13}C and ^{15}N composition (‰) obtained by irm-^{13}C NMR ($\delta^{13}C_i$) and irm-^{15}N NMR ($\delta^{15}N_i$) of 1-methylimidazole Sigma-Aldrich product and TCI product (brut) and after (fractionated product) the separation process. Each line of the table represent one experiment with the average of 5 spectra.

Product	Residue (%)	$\delta^{13}C_1$	$\delta^{13}C_2$	$\delta^{13}C_3$	$\delta^{13}C_4$	$\delta^{13}C_{bulk}$	$\varepsilon^{13}C_{bulk}$	$\delta^{15}N_1$	$\delta^{15}N_2$	$\delta^{15}N_{bulk}$	$\varepsilon^{15}N_{bulk}$
Sigma-Aldrich brut	100	-43.03	-31.2	-30.8	-46.2	-37.83	na	96.3	-99.2	-1.55	na
TCI brut	100	-27.43	-35.84	-27.13	-30.64	-30.26	na	107.97	-113.58	-2.85	na
TCI fractionated	5	-29.97	-34.96	-27.53	-28.74	-30.30	0.03	111.35	-117.18	-2.96	0.07

[a] Mass percentage of the remaining 1-methylimidazole.

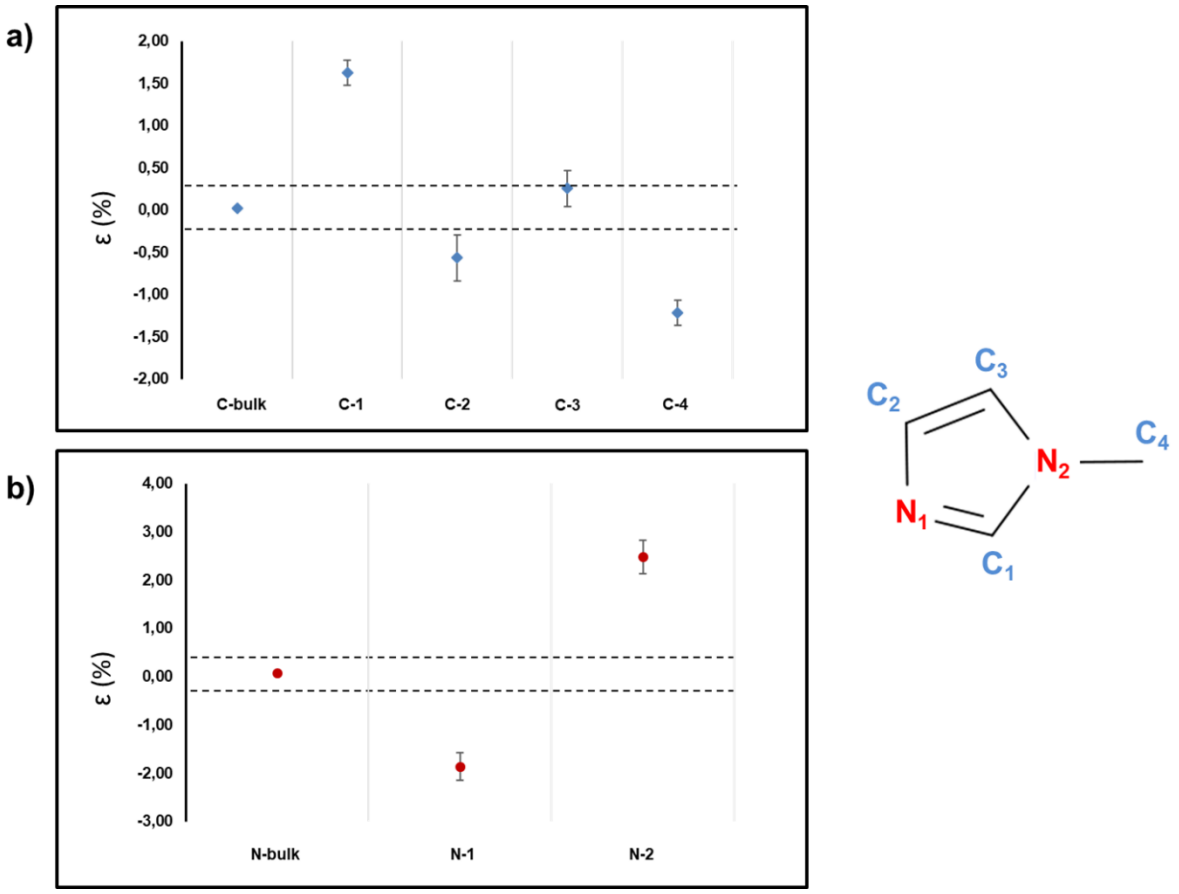


Figure 3: Enrichment factor ε (‰) obtained from irm-EA/MS (bulk, ε_{bulk}) or from irm-^{13}C NMR (a) in blue and irm-^{15}N NMR (b) in red (position-specific, ε_i) upon separation process in silica gel column. Broken black lines represent limits for significant effects SD (‰) of the method. Positive enrichment factors mean an inverse isotope effect in which heavy isotopomers ^{13}C and ^{15}N are preferentially transferred to the first fraction (5% residue): the remaining liquid is thus depleted in ^{13}C and ^{15}N. Conversely, it is the opposite for negative enrichment factors. Also shown are the molecular structures of 1-methylimidazole with the carbon and nitrogen numbering in relation to decreasing ^{13}C and ^{15}N chemical shift in the ^{13}C and ^{15}N NMR spectrum.

For comparison, irm-^{13}C NMR was performed on the same samples (in that case the $\delta^{13}C_i$ are the values as they have been obtained by the 'one-pulse' methodology, but remained uncalibrated to compensate the instrument response).[24] The position-specific enrichment factors for ^{15}N and ^{13}C during the fractionation are shown in **Figure 3A** and **Figure 3B**. ^{13}C ε_i confirm that effective selections between each ^{13}C isotopomer occurred during the elution. An exhaustive interpretation of this phenomenon is beyond the scope of this article but the present observation is in agreement with data in previous studies. The types of interaction between the solute (1-methylimidazole) and the stationary phase (silica) are based on weak bonding (polar and/or hydrogen, for example). It is likely that ^{15}N isotopomer 1, due to its basic properties through its lone pair, should behave differently from the other ^{15}N isotopomer 2 for which the balance of its electronic environment to maintain the aromaticity requires other characteristics.

In both cases, the presence of ^{15}N atom may change these intrinsic properties upon interaction with the stationary phase. As a first hypothesis, ^{15}N at the position 1 reduces the basic character and thus weakens the interaction strength. It is the opposite for the position 2. As a corollary, ^{13}C isotopomer 1 shows a strong effect opposite to ^{13}C isotopomer 4, while for positions 2 and 3 no significant effect are observed. For ^{13}C isotopomer 1, its relative acidic character may be evoked to explain this behavior with respect to the other two isotopomers C2 and C3.[25]
In the present work, we have demonstrated that it is now possible to determine the position-specific ^{15}N composition within a given molecule. The combination of a high magnetic field with the sensitivity improvement via polarization transfer allowed obtaining a high SNR, essential for a high precision as the standard deviation is lower than 1‰. There is no direct scalar coupling between ^{15}N and ^{1}H (one bond $^{1}J_{15N\text{-}1H}$) in 1-methyl imidazole but the polarization transfer was ensured via long-range coupling thanks to the FS-INEPT sequence developed previously for ^{13}C. The repeatability is good enough for observing different ^{15}N profiles between two samples from two suppliers. Furthermore, as it has been shown, position-specific enrichment factor ε_I could be calculated enabling the access to new information on the fractionation mechanism during the process under investigation.

These pioneering findings open new perspectives for a large panel of applications. For example, in forensic investigations deducing the source is the major step for the determination of the liable party of pollutants is an important step. The ^{15}N profiles offer an efficient information on the intimate structure of the molecule. This additional picture provides a new characteristic of the history of a product. Generally speaking it can afford information about the geographical or botanical origin of the substance, or an insight into the chemical of biochemical pathway by which it was formed. Further improvement of the methodology can be envisaged in terms of sensitivity. The probe used in the present work is not dedicated for observing ^{15}N nucleus. Even if it is a cryo-probe the inverse configuration (*i.e.* optimized for ^{1}H) is not in favor for heteronuclei (pulse length, quality factor, noise). INEPT is not the only way to improve the SNR, pulse sequence as HSQC (1D or even 2D) could give further easiness to reach a high SNR. Works are in progress to explore these prospects.

Acknowledgments

This work is funded by the French National Research Agency ANR, project FRIIME funded by the project call CE 39. M. Joubert thanks the ANR for funding his PhD bursary through this project.

Conflict of Interest Disclosure

Funding for this research was from a thesis grant to V. J. (see Acknowledgements) and core funding from the CNRS and the French Ministry of Education. There is no conflict of interest.

References

(1) Lichtfouse, E. Compound-Specific Isotope Analysis. Application to Archaelogy, Biomedical Sciences, Biosynthesis, Environment, Extraterrestrial Chemistry, Food Science, Forensic Science, Humic Substances, Microbiology, Organic Geochemistry, Soil Science and Sport. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14* (15), 1337–1344.

(2) Muccio, Z.; Jackson, G. P. Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst* **2009**, *134* (2), 213–222.

(3) Gauchotte-Lindsay, C.; Turnbull, S. M. On-Line High-Precision Carbon Position-Specific Stable Isotope Analysis: A Review. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *76*, 115–125.

(4) Dennis, M. J.; Wilson, P.; Kelly, S.; Parker, I. The Use of Pyrolytic Techniques to Estimate Site Specific Isotope Data of Vanillin. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1998**, *47* (1), 95–103.

(5) Martin, G. J.; Martin, M. L. Deuterium Labelling at the Natural Abundance Level as Studied by High Field Quantitative ^{2}H NMR. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (36), 3525–3528.

(6) Jamin, E.; Thomas, F. SNIF-NMR Applications in an Economic Context: Fraud Detection in Food Products. In *Modern Magnetic Resonance*; Springer, Cham, 2017; pp 1–12.

(7) Caytan, E.; Botosoa, E. P.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Accurate Quantitative 13C NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific ^{13}C Isotope Ratio Determination. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (21), 8266–8269.

(8) Jézéquel, T.; Joubert, V.; Giraudeau, P.; Remaud, G. S.; Akoka, S. The New Face of Isotopic NMR at Natural Abundance. *Magn. Reson. Chem.* **2017**, *55* (2), 77–90.

(9) Thibaudeau, C.; Remaud, G.; Silvestre, V.; Akoka, S. Performance Evaluation of Quantitative Adiabatic ^{13}C NMR Pulse Sequences for Site-Specific Isotopic Measurements. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5582–5590.

(10) Bussy, U.; Thibaudeau, C.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Remaud, G. S.; Silvestre, V.; Akoka, S. Isotopic Finger-Printing of Active Pharmaceutical Ingredients by ^{13}C NMR and Polarization Transfer Techniques as a Tool to Fight against Counterfeiting. *Talanta* **2011**, *85* (4), 1909–1914.

(11) Remaud, G. S.; Bussy, U.; Lees, M.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Silvestre, V.; Akoka, S. NMR Spectrometry Isotopic Fingerprinting: A Tool for the Manufacturer for Tracking Active Pharmaceutical Ingredients from Starting Materials to Final Medicines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 464–473.

(12) Merchak, N.; Bejjani, J.; Rizk, T.; Silvestre, V.; Remaud, G. S.; Akoka, S. ^{13}C Isotopomics of Triacylglycerols Using NMR with Polarization Transfer Techniques. *Anal. Methods* **2015**, *7* (12), 4889–4891.

(13) Joubert, V.; Silvestre, V.; Grand, M.; Loquet, D.; Ladroue, V.; Besacier, F.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Full Spectrum Isotopic ^{13}C NMR Using Polarization Transfer for Position-Specific Isotope Analysis. *Anal. Chem.* **2018**.

(14) Remaud, G.; Kjellberg, J.; Bazin, H.; Johansson, N. G.; Chattopadhyaya, J. The Use of ^{15}N-NMR Spectroscopy for Assigning the Structures of Isomeric N_7- and N_9-Substituted Purines. *Tetrahedron* **1986**, *42* (18), 5073–5080.

(15) Remaud, G.; Zhou, X.-X.; Chattopadhyaya, J.; Oivanen, M.; Lönnberg, H. The Effect of Protecting Groups of the Nucleobase and the Sugar Moieties on the Acidic Hydrolysis of the Glycosidic Bond of 2′-deoxyadenosine: A Kinet. *Tetrahedron* **1987**, *43* (19), 4453–4461.

(16) Remaud, G.; Welch, C. J.; Zhou, X. X.; Chattopadhyaya, J. An Assessment of Electronic Properties of Pyrimidine and Purine Nucleosides by ^{15}N-NMR Spectroscopy. *Nucleosides Nucleotides* **1988**, *7* (2), 167–179.

(17) Glemarec, C.; Remaud, G.; Chattopadhyaya, J. Distinction of ^{15}N Resonances Based on Differences in Small ^{15}N, ^{1}H Coupling Constants. An Application of ^{1}H-Decoupled INEPT Experiments. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26* (4), 307–310.

(18) Glemarec, C.; Remaud, G.; Chattopadhyaya, J. ^{15}N NMR Spectra of Wyosine (Y-Nucleoside) Triacetate and Its 7-Methyl Congener. Chemical Shifts and ^{15}N,^{1}H Coupling Constants. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26* (5), 435–438.

(19) Levy, G. C.; Pehk, T.; Srinivasan, P. R. Quantitative ^{15}N NMR Spectroscopy. *Org. Magn. Reson.* **1980**, *14* (2), 129–132.

(20) Sacks, G. L.; Brenna, J. T. ^{15}N/^{14}N Position-Specific Isotopic Analyses of Polynitrogenous Amino Acids. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (4), 1013–1019.

(21) Botosoa, E. P.; Caytan, E.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Unexpected Fractionation in Site-Specific ^{13}C Isotopic Distribution Detected by Quantitative ^{13}C NMR at Natural Abundance. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (2), 414–415.

(22) Julien, M.; Parinet, J.; Nun, P.; Bayle, K.; Höhener, P.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Fractionation in Position-Specific Isotope Composition during Vaporization of Environmental Pollutants Measured with Isotope Ratio Monitoring by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Environ. Pollut.* **2015**, *205*, 299–306.

(23) Tenailleau, E.; Akoka, S. Adiabatic ^{1}H Decoupling Scheme for Very Accurate Intensity Measurements in ^{13}C NMR. *J. Magn. Reson.* **2007**, *185* (1), 50–58.

(24) Bayle, K.; Gilbert, A.; Julien, M.; Yamada, K.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Yoshida, N.; Remaud, G. S. Conditions to Obtain Precise and True Measurements of the Intramolecular

^{13}C Distribution in Organic Molecules by Isotopic ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *846*, 1–7.

(25) Boga, C.; Del Vecchio, E.; Forlani, L.; Todesco, P. E. Tetrahalogenomethanes: Simple Reagents for the Synthesis of Monohalogenated and Mixed Dihalogenated Aromatic Heterocycles via Metal–Halogen Exchange from Lithium Compounds. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *601* (2), 233–236.

Supplementary Information

Irm-^{13}C NMR "one-pulse" experiment

The on-pulse ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 MHz spectrometer fitted with a 5 mm-i.d. DUAL+ ^{1}H/^{13}C ATMA grad 5 mm carefully tuned to the recording frequency of 100.57 MHz. Inverse-gated decoupling was applied in order to avoid nOe, with TR > 10 T1(^{13}C)max, 101 s. Adiabatic ^{1}H-decoupling was applied as previously described. 12 scans are needed with this sequence to obtain a signal-to-noise ratio higher than 500, which is a prerequisite for a precision around 1 per mil. The measurement time was therefore 1 hours 20 min for five spectra.

^{13}C spectra were processed as follows: an exponential window function inducing a line broadening of 1.8 Hz was applied to the FID prior to Fourier transform. An automatic polynomial baseline correction was subsequently applied to the resulting spectra. Peak areas of ^{13}C were determined by the curve-fitting process implemented within Perch (Perch NMR Software, University of Kuopio, Finland).

Comments on the NMR ^{13}C and ^{15}N data processing

The peak areas measured in ^{13}C NMR spectra were corrected to take into account the presence of satellites peaks from ^{13}C–^{13}C isotopologues. In ^{15}N NMR spectra there is no satellites peaks correction. Partial reduced molar fractions f_{iR} were calculated for each visible site according to equation 1:

$$f_{iR} = \frac{S_i}{(F_i \times S_T)} \qquad (1)$$

where S_i is the corrected peak area for position i, and S_T is the sum of the peak areas of all the measured sites. F_i is the statistical molar fraction of site i.

From the reduced molar fraction, the specific isotope composition $\delta^{13}C_i$ and $\delta^{15}N_i$ of the carbon and nitrogen in position i is obtained from the isotope composition of the whole molecule $\delta^{13}C_b$ or $\delta^{15}N_b$ measured by isotope measurement by mass spectrometry as follows. (i) The isotopic abundance of each NMR peak, x_i is defined from the bulk abundance x_b: $x_i = f_{iR} \times x_b$; (ii) x_b is determined from δ_b obtained by IRMS through: $R_b = \left((\delta_b/1000) + 1\right) \times R_{std}$; where R_b is the bulk isotope ratio of $^{13}C/^{12}C$ or $^{15}N/^{14}N$ and R_{std} is the isotope ratio $^{13}C/^{12}C$ of the international reference PeeDee Belemnite (R_{PDB} = 0.0112372) or isotope ratio $^{15}N/^{14}N$ of the atmospheric N_2 international reference (R_{air-N2} = 0.003677); (iii) $R_i = x_i/(1 - x_i)$; then (iv) the site-specific content for each carbon or nitrogen i, $\delta_i = \left((R_i/R_{std}) - 1\right) \times 1000$ (‰). In this paper, the positional $\delta^{13}C_i$ and $\delta^{15}N_i$ of 1-methylimidazole are expressed following the carbons and nitrogen numbering in Fig. 2.

The global value (or bulk composition) for the whole molecule, $\delta^{13}C_b$ and $\delta^{15}N_b$ (‰), is determined by isotope ratio monitoring by mass spectrometry and calculated from: $\delta_i = \left((R_b/R_{std}) - 1\right) \times 1000$; $\delta^{13}C_b$ and $\delta^{15}N_b$was determined by irm-MS using an Integra2 spectrometer (Sercon Instruments, Crewe, UK) linked to a Sercon elemental analyzer (EA) fitted with an autosampler (Sercon Instruments, Crewe, UK).

Calculation of ε_{bulk} and ε_i

The enrichment factor ε (‰) was obtained from the isotope fractionation factor α calculated according to the common Rayleigh approach in equation 2:

$$\varepsilon = \ln\left(\frac{\delta^{13}C_{tx}+1000}{\delta^{13}C_{t0}+1000}\right)\left(\frac{1000}{\ln f}\right) \qquad (2)$$

where $\delta^{13}C_{t0}$ and $\delta^{13}C_{tx}$ are respectively the isotopic compositions of the starting compound (initial state) and the remaining product after elution in the silica column (final state) and f is the degree of advancement of the reaction. The same equation was used for nitrogen enrichment factor ($\delta^{15}N_{t0}$, $\delta^{15}N_{tx}$).

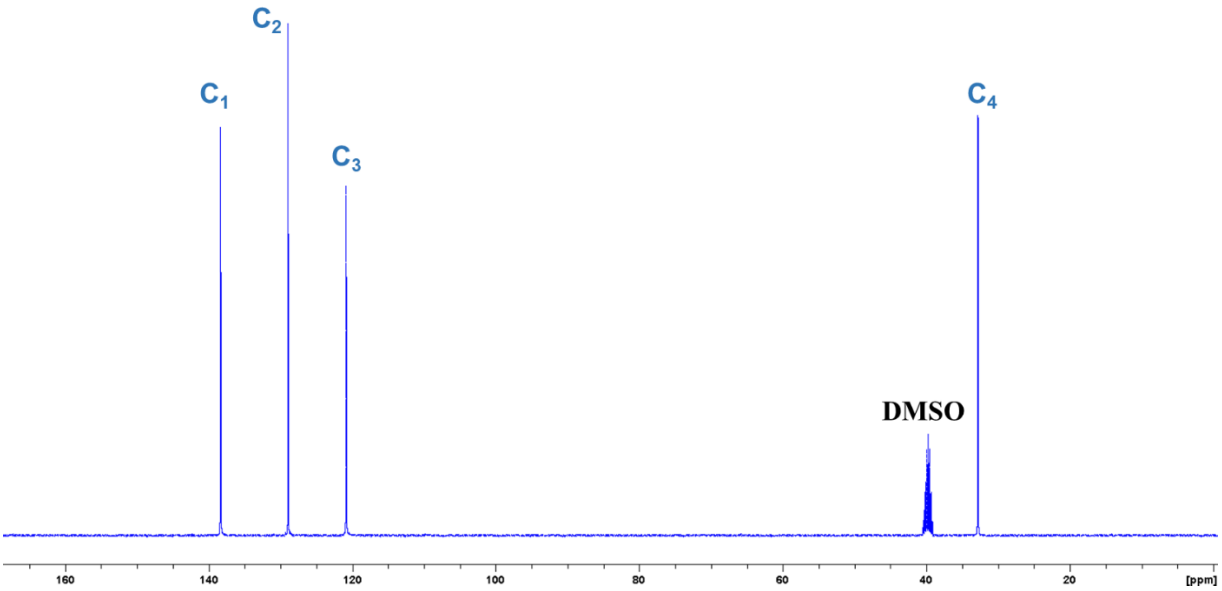


Figure S1: ^{13}C NMR spectrum of 1-methylimidazole sample from Sigma-Aldrich obtained in 20 min by one pulse ^{13}C acquisition with a signal noise ratio of 500.

III-3) Données complémentaires

Table S1: Constantes de couplage longues distances ($^{2}J_{N-H}$) pour la molécule de 1-methylimidazole.

1-Methylimidazole	$^{2}J_{N-H}$ (Hz)
N1	11,4
N2	1,7 / 6

III-4) Conclusion

Le développement de l'irm-^{15}N NMR a montré qu'il était possible de mesurer la composition position-spécifique en ^{15}N d'une molécule d'intérêt avec une précision de 1‰. Cette mesure n'est possible qu'avec un gain de sensibilité induit par le transfert de polarisation entre un noyau sensible ^{1}H et un noyau très peu sensible ^{15}N. Etant donné qu'il n'y a pas de couplage direct ($^{1}J_{NH}$) dans le 1-methylimidazole, ce sont les couplages longues distances ($^{n}J_{NH}$) qui ont permis ce gain de sensibilité grâce aux travaux entrepris précédemment (**Partie II :**) avec la séquence FS-INEPT en ^{13}C. Une modification de cette séquence décrite dans cette partie a permis de mesurer pour la première fois différents profils isotopiques en ^{15}N du 1-methylimidazole ainsi que l'enrichissement isotopique (ε) position-spécifique induit par le fractionnement isotopique durant le processus de séparation.

Cette méthode permettant de fournir la composition position-spécifique en ^{15}N d'une molécule donnée sera appliquée sur le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) dans le cadre d'une application forensique afin de déterminer le profil isotopique en ^{15}N de chaque échantillon en fonction de leur origine, en plus de son profil isotopique en ^{13}C. Cette étude fera l'objet de la partie V de ce manuscrit.

Partie IV : Application de la méthode FS-INEPT du ^{13}C pour l'analyse « isotopomics » des agents de coupage : une nouvelle approche pour aider à l'élucidation des trafics de drogues illégales

IV-1) Introduction

Dans la deuxième partie de ce manuscrit il a été montré que la méthode FS-INEPT ^{13}C permettait de classifier les échantillons de paracétamol et de caféine en fonction de leur origine avec un gain de sensibilité important et une faible quantité de produit (40 mg). Une application de cette méthode dans le cadre d'une étude forensique sur des échantillons réels d'héroïne contenant des agents de coupage tels que le paracétamol et la caféine est présentée dans cette partie.

Jusqu'à présent, la police scientifique utilise le concept de profilage chimique du produit stupéfiant pour lutter contre le trafic de drogue en identifiant les teneurs en impuretés de synthèses, les solvants résiduels etc. Le même objectif sera poursuivi dans ces travaux mais en étudiant la teneur isotopique du paracétamol et de la caféine.

Pour cela, l'INPS de Lyon nous a procuré des saisies de mélange en paracétamol/caféine ainsi que des saisies d'héroïne contenant du paracétamol et de la caféine. Dans un premier temps, une méthode par chromatographie flash a été optimisée pour séparer ces agents de coupage et les récupérer pures pour l'analyse RMN. Dans un deuxième temps, la méthode FS-INEPT ^{13}C a été employée pour dresser le profil isotopique en ^{13}C des échantillons de paracétamol et de la caféine. Ces analyses isotopiques ont été complétées par des mesures irm-MS en ^{13}C et ^{15}N afin d'obtenir un profil isotopique complet. Dans un troisième temps, les profils isotopiques obtenus en irm-^{13}C NMR et irm-MS ont été comparés à l'aide d'un outil statistique : la PCA, afin de classer les échantillons saisis par l'INPS de Lyon selon leur origine. Dans un dernier temps, la capacité des méthodes irm-MS et irm-^{13}C NMR à discriminer les échantillons a été évaluée à l'aide d'un algorithme de comparaison (voir **Partie I :I-6-3**).

Les résultats obtenus suite à cette étude ont fait l'objet d'un article intitulé « **Isotopomics analysis by irm-^{13}C NMR on cutting agents in heroin: a new approach for illicit drugs trafficking route elucidation** » et seront soumis à publication dans le journal *Forensic Science International*.

IV-2) Article

Isotopomics by isotope ratio monitoring by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry on cutting agents in heroin: a new approach for illicit drugs trafficking route elucidation

Valentin Joubert[1], Matéo Trébuchet[1], Mariana Mikic[1], Virginie Silvestre[1], Anne-Marie Schiphorst[1], Denis Loquet[1], Virginie Ladroue[2], Fabrice Besacier[2*], Serge Akoka[1], Gérald S. Remaud[1]

1 Elucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, CEISAM, University of Nantes-CNRS UMR6230, F-44322 Nantes, France

2 Institut National de Police Scientifique (INPS), Laboratoire de Lyon (LPS69), 31 Avenue Franklin Roosevelt, 69134 Ecully Cedex, France

**Corresponding author:*

E-mail address: fabrice.besacier@interieur.gouv.fr (F. Besacier)

Abstract

In the battle against the illicit drugs market, methodologies have been developed by forensic laboratories to address origin determination and trafficking route dismantlement for various target molecules such as heroin and cocaine. These drug profiling methods are not straightforward especially when the target molecules are very pure, resulting in poorly informative impurity profiles, e.g. New Psychoactive Substances and cutting agents. A tool based on the determination of intramolecular isotopic profiles has been developed to provide origin discrimination with a new way to profile seized cutting agents and heroin samples. Whereas stable isotope analyses by Mass Spectrometry give the bulk isotopic composition, Nuclear Magnetic Resonance gives direct access to the position-specific isotope content at natural abundance. In this report, it is shown how both ^{13}C NMR spectrometry and ^{13}C, ^{15}N MS can provide complementary and valuable information that could be applied to link seized caffeine and paracetamol to their origin. Here, isotopic ratio monitoring by ^{13}C NMR (irm-^{13}C NMR) offers additional benefits over irm-MS in its capability to determine a detailed isotopic profile, leading to a better method to distinguish different caffeine and paracetamol batches.

Keywords: irm-^{13}C NMR, irm-MS, isotopic profile, illicit drug, caffeine, paracetamol

Introduction

Forensic science laboratories generally apply a 3-steps procedure to illicit drugs analysis: (i) Identification of main compounds and cutting agents, (ii) Purity determination, (iii) Profiling. According to the European Network of Forensic Science Institutes – Drugs Working Group, drug profiling is the use of methods to define the chemical and/or physical properties of a drug seizure for comparing seizures for intelligence (tactical, strategic) and evidential purposes.[1] For instance, in the Police Forensic Laboratory of Lyon, cocaine profiling has been performed for more than 15 years using alkaloid or occluded residual solvents profiles.[2,3]

In the present work, a new complementary approach has been employed to profile illicit drugs, no longer based on impurity compounds coming from the plant or the manufacturing process, but on the cutting agents. At this moment, too little is known on the production sources and distribution networks of these cutting agents even though they represent a major contribution in illicit drugs trafficking.[4,5] Typically, cutting agents refer to adulterants such as pharmacologically active substances or diluents such as pharmacologically inactive and readily available substances.[6] Cutting agents may be added at different levels of the supply chain such as in the manufacturing country or at the retailing stage. Their addition has various objectives, e.g. to increase profit, or to modify/enhance the psychoactive effects of the illicit drug.

In France, 86% of the heroin seizures analyzed in 2017 by the 5 French Police Forensic Laboratories contain the same cutting mixture made of paracetamol and caffeine [7]. Furthermore, dozens of such mixtures, in similar proportions (60% paracetamol / 40% caffeine), linked to heroin trafficking and physically resembling to brown heroin have been seized every year by the police, confirming their use for heroin adulteration.[7,8] The networks involved in this trafficking are likely to be closely interconnected with the heroin supply chain. In that perspective, tracking paracetamol/caffeine distribution routes is expected to be a valuable tool to law enforcement intelligence.

Isotopic analysis appears as a complementary method to the classical chemical profiling ones used by forensic laboratories to trace and source illicit drugs. Isotopic Ratio Monitoring by Mass Spectrometry (irm-MS) (known also as IRMS) has already been applied on cutting agents by few forensic laboratories in order to evaluate its potential to trace such compounds. Besacier *et al*. used irm-MS to measure the $^{15}N/^{14}N$ ratio of caffeine in heroin samples and showed that the measured values were spread over a wide isotopic range (global isotope composition $\delta^{15}N_g$: –26.99‰ to –1.69‰) allowing enough discrimination between caffeine samples, even though

the data set was rather small (only 14 samples).[9] Ladroue *et al.* studied phenacetin, a well-known cutting agent in cocaine seizures. The $^{13}C/^{12}C$ and $^{2}H/^{1}H$ ratios of phenacetin measured from more than 200 samples were concentrated in a narrow range ($\delta^{13}C_g$: -29.29‰ to -23.52‰ and $\delta^{2}H_g$: -181‰ to -145‰). It was concluded that irm-MS could only be used to exclude a common source between several samples.[10]

Whereas irm-MS provides only the mean isotope ratio for the target element content as the global isotope composition, an innovative method using Position-Specific Isotopic Analysis (PSIA) is able to measure the isotope ratios at individual sites of the molecule. The measurement of position-specific ^{2}H isotope compositions based on Nuclear Magnetic Resonance spectrometry (SNIF-NMR^{TM}) was first proposed by Martin *et al.* .[11] Nowadays, irm-^{2}H NMR is a well-established technique for food authentication and is used for the official control of wine, spirits, fruit juices and flavors.[12,13] However irm-^{2}H NMR still suffers from a number of limitations, notably the ^{2}H low sensitivity, the potential H-exchange during the manufacturing process, the lack of resolution due to overlapping signals and the low molecular dynamic ranges because of the quadrupolar relaxation, limiting irm-^{2}H NMR to molecules of low molecular weight (< 250 g/mol).

Fortunately, in order to overcome these difficulties, the possibility of measuring position-specific $^{13}C/^{12}C$ ratios directly using quantitative ^{13}C NMR has been investigated.[14–16] The main difficulty of irm-^{13}C NMR is to obtain a high level of precision: a standard deviation lower than 1‰ due to the low isotopic ^{13}C deviation range (~ 60 ‰). Despite this, the method has been successfully applied in several fields[13] including isotope profiling on Active Pharmaceutical Ingredients such as paracetamol[17] and natural products like caffeine.[18] Another limitation of irm-^{13}C NMR is the experiment duration which might be prohibitive for routine analysis. Recent technological developments have improved the method sensitivity with the use of polarization transfer from highly sensitive ^{1}H to less sensitive ^{13}C nuclei, except for quaternary carbons.[19] The pulse sequence was a modified INEPT experiment and has provided a ^{13}C isotopic profile of ibuprofen and naproxen with the required precision (1‰) and a reasonable experiment time.[20,21] In 2018, Joubert et al. extended the polarization transfer method (FS-INEPT ^{13}C) to establish a complete ^{13}C isotopic profile (even quaternary carbons) of paracetamol and caffeine molecules with the appropriate precision.[22]

The aim of the application presented here is to use this latest approach and evaluate irm-^{13}C NMR, and its combination with irm-^{13}C and ^{15}N MS, to characterize the most complete isotopic profile of paracetamol and caffeine present in heroin samples for intelligence purposes.

Materials and Methods

Chemicals and Samples

Chloroform-d_1 and DMSO-d_6 were purchased from Eurisotop. Acetic acid, Chloroform, ethyl acetate, methanol HPLC quality (>99.9%) and phosphorus anhydride (P_2O_5) were purchased from Sigma-Aldrich.

For the study, 8 heroin samples cut with paracetamol and caffeine were collected, together with 5 pure caffeine seizures and 26 caffeine/paracetamol mixtures. They issued from samples submitted to the Police Forensic Laboratory of Lyon (France). Moreover, 7 caffeine samples and 5 paracetamol samples were also purchased from different commercial sources. The total number of studied samples was 46 for caffeine and 39 for paracetamol (see **Table S1** and **Table S2**).

Seized paracetamol and caffeine mixtures were labeled “M”, seized caffeine samples were labeled “C” and seized heroin samples containing paracetamol and caffeine were labeled “H”. If different seized samples have the same number, such as “M1” and “H1”, it means that they come from the same judiciary case.

Separation of paracetamol and caffeine from heroin

A minimum amount of distillate water was added on heroin seizures cut with paracetamol and caffeine. As the heroin molecule is insoluble in water, it was removed via Büchner filtration with a vacuum pump. The water filtrate was then collected and stored in a 10 mL vial.

Purification of paracetamol and caffeine

Before performing the separation of caffeine and paracetamol, a yellow/light brown colorant present in the samples was removed from heroin and cutting agent seizures in order to avoid any trace of pollution in the chromatographic column. The filtrate from heroin extraction, or the dissolved cutting agent mixture, was treated with 3 × 30 mL of chloroform and 3 x 30 mL

of ethyl acetate. While the aqueous layer containing the colorant was discarded, paracetamol and caffeine were recovered from the organic phase after vacuum evaporation to dryness. 50 mg of each cutting agent was the target amount for irm-NMR and irm-MS analysis.

The resulting paracetamol/caffeine powder was dissolved in methanol and then separated with a Puriflash 430 Interchim flash chromatography equipped with a UV detector and an automatic fraction collector. The size of the reversed-phase column was 16.8 × 2.1 cm, and the average particle size was 15 µm. The column was first moistened by methanol and then conditioned by water containing 2‰ acetic acid. Then, 4 mL of a paracetamol/caffeine mixture dissolved in methanol was loaded onto the column (1 mL / run), and the eluent was constituted as methanol / water with 2‰ acetic acid (70/30 vol.) with a flow rate of 8 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm. The effluent from the column was collected into test tubes with a fraction collector set at 22 mL for each tube. Fractions corresponding to the same peak, paracetamol or caffeine, were combined, concentrated under vacuum in order to remove methanol, and neutralized by 4 M NaOH. Caffeine was extracted with 3 × 40 mL of chloroform, dried with $MgSO_4$, and filtered using a fritted glass funnel. Chloroform was removed under vacuum, and then, caffeine was dried overnight at 80 °C. The same protocol was used for paracetamol after extraction with 3 x 40 mL of ethyl acetate.

It is worth noting that this purification method induces no isotopic fractionation when recovering above 90% of the initial caffeine or paracetamol amount, as tested on a commercial sample.

Irm-^{13}C NMR experiments

Samples were prepared as follows: for caffeine, 40 mg were dissolved in 700 µL of $CDCl_3$; for paracetamol, 40 mg were dissolved in 700 µL of DMSO-d_6. For both, the solution was filtered into a 5 mm o.d. tube. Irm-^{13}C FS-INEPT experiments on caffeine and paracetamol were performed on a Bruker AVANCE III 500 MHz spectrometer fitted with a CRYO ^{1}H/^{13}C ATMA grad, 5 mm, carefully tuned to the recording frequency of 125.76 MHz.

The same NMR experiment procedure described by Joubert et *al.* on paracetamol and caffeine[22] was used to perform irm-^{13}C NMR measurement.

NMR data processing

For each ^{13}C NMR spectrum, an exponential window function inducing a line broadening of 1.8 Hz was applied to the free induction decay prior to Fourier transform. An automatic polynomial baseline correction was subsequently applied to the resulting spectra. Surface areas of ^{13}C peaks were determined by the curve-fitting process implemented within Perch (Perch NMR Software, University of Kuopio, Finland).

The peak areas measured in ^{13}C NMR spectra were corrected to account for the presence of ^{13}C-^{13}C isotopomers in the molecule, which gives rise to satellite lines.[23] Partial reduced molar fractions f_{iR} were calculated for each visible site (See the numbered carbons in **Figure 1**) according to eq. 1:

$$f_{iR} = \frac{S_i}{(F_i \times S_T)} \qquad (1)$$

where S_i defines the corrected peak area of site i in the spectrum and S_T represents the sum of the peak areas of all measured sites. F_i corresponds to the statistical molar fraction of site i: $F_i = n/N$, where n is the number of nuclei contributing to the peak area of site i in the NMR spectrum, and N is the total number of carbons observed in the spectrum. Symmetrical carbons like ortho and meta of the aromatic ring in paracetamol cannot be differentiated by NMR and it is therefore the fraction of the sites 4 and 5 that is measured.

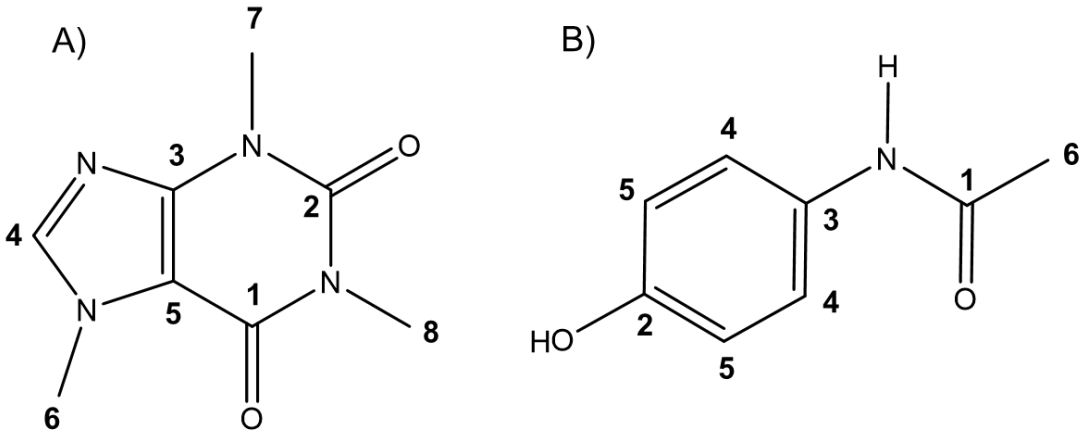


Figure 1: Caffeine (A) and paracetamol (B) molecules with carbon sites numbered in decreasing ^{13}C chemical shift.

Determination of the global $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of caffeine and paracetamol by irm-MS

The ^{13}C and ^{15}N global isotope compositions of the whole molecule, were expressed as $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$ values (in ‰). They are the deviations of the isotopic ratio of the sample R_s relative to that of the international standard R_{std} (std: Vienna-PDB for ^{13}C and air N_2 for ^{15}N). They are determined by isotope ratio monitoring by mass spectrometry and calculated from:

$$\delta_g = \left(\frac{R_s}{R_{std}} - 1\right) \times 1000$$

Where the value of R_{PDB} = 0.0112372 and R_{airN2}= 0.003677.[24]

The global compositions $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$ of caffeine and paracetamol from seized cutting agents mixtures were determined, after flash chromatography separation, by EA/irm-MS using an Integra2 spectrometer (Sercon Instruments, Crewe, UK) linked to a Sercon elemental analyzer (EA) fitted with an autosampler (Sercon Instruments, Crewe, UK). Each compound was weighted into tin capsules (2 × 5 mm, Thermo Fisher scientific) to give approximately 0.8 mg of caffeine and 0.5 mg of paracetamol. The $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$ values of the resulting gases, CO_2 and N_2, were determined by reference to a working standard of glutamic acid standardized against calibrated international reference material (IAEA-CH6 and IAEA-CH7 for carbon isotope ratio and IAEA-N1 and IAEA-N2 for nitrogen isotope ratio).

Heroin samples cut with paracetamol and caffeine were analyzed by Gas Chromatography – Combustion – Isotope Ratio Monitoring by Mass Spectrometry (GC-C-irm-MS) at the Police Forensic Laboratory of Lyon. Acetylation of paracetamol was necessary before injection to avoid transacetylation by diacetylmorphine during the chromatographic process.[25] For that, 4 mg of each heroin sample were mixed with 3 drops of 1-methylimidazole and 5 drops of acetic anhydride, and allowed to react for 5 min. The mixture was then solubilized in 1 mL of $CHCl_3$ (50:50) in a GC vial of 1.5 mL and directly injected into an Agilent 7890 gas chromatograph interfaced to a combustion furnace prior to continuous flow measurement by an Isoprime mass spectrometer (Isoprime Ltd, Cheadle, UK). Chromatography was performed on a J&W HP-5 capillary column from Agilent which dimensions were 30 m x 320 µm x 0.25 µm. GC methods for ^{13}C and ^{15}N measurements are detailed in Supporting Information. The instrument was

calibrated for $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$ with IAEA reference materials USGS40 and USGS43 and instrumental deviation followed via a laboratory standard of paracetamol and caffeine.

Multivariate Data Analysis

Principal Component Analysis (PCA) was performed on the irm-NMR and irm-MS values of paracetamol and/or caffeine. PCA allows reduction of a data set by sequential linear transformation of the data where often the first few principal components (PC) retain much of the variability by preserving as much information as possible from the original dataset. The data was normalized to zero mean and unit variance prior to PCA and performed using SIMCA-P+ software, version 12.0, (Umetrics, Umeå, Sweden) through its routine applications.

Results and Discussions

Caffeine and paracetamol are usually mixed together, colored, distributed, and then added to pure heroin samples. As the mixture is made before the cutting process, our hypothesis is that the isotope profiles in caffeine and paracetamol should show the same discrimination between the seizures.

Then, the main objective of this work is to reply to the question: "can our ability to profile cutting agents via irm-MS be significantly improved by adding data on intramolecular isotope distribution (PSIA)?".

Irm-MS data set for seized caffeine and paracetamol

For the 46 caffeine samples, the $\delta^{13}C_g$ values are ranged from -39.12‰ to -30.37‰ with SD = 2.79‰, and the $\delta^{15}N_g$ values ranged from -23.81‰ to +0.66‰ with SD = 4.01‰. For the 39 paracetamol samples, the $\delta^{13}C_b$ values are ranged from -31.25‰ to -25.11‰ with SD = 1.72‰. These values were measured either by GC (heroin cut with caffeine/paracetamol) or EA (pure caffeine or paracetamol) interfaced to the Isotope Ratio Mass Spectrometer. The ^{13}C vs ^{15}N caffeine data are plotted in **Figure 2**.

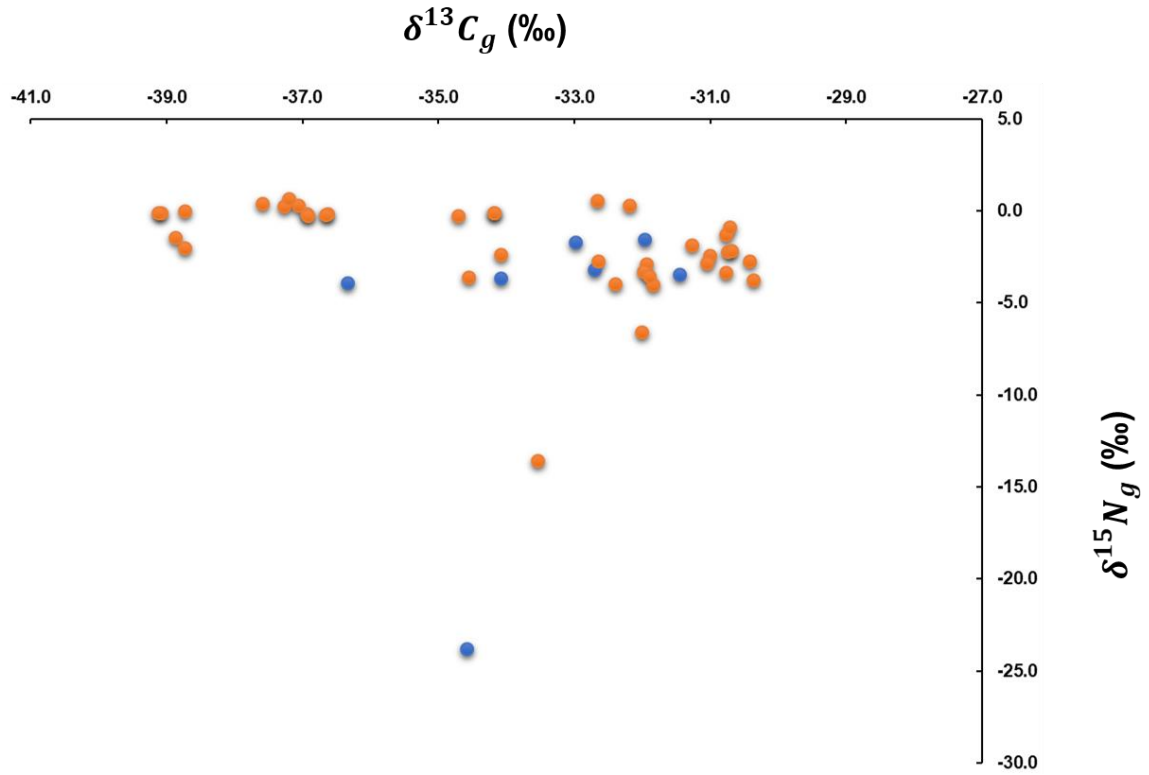


Figure 2: Nitrogen vs carbon data for caffeine samples from seizures in orange and standards in blue analyzed by irm-MS.

They show that most of the seized samples are concentrated in a narrow range, between -34 and -30‰ in ^{13}C and -5 and 0‰ in ^{15}N. Thus it is likely that most of the caffeine samples are provided by a single manufacturer, or, more probably, synthesized by the same process. They do not reflect the diversity of the studied seizures. Except for atypical samples, irm-MS suffers from a lack of discrimination power. More variables need to be collected in order to improve this profiling tool. In that perspective, irm-^{13}C NMR data set for seized caffeine and paracetamol is expected to bring valuable information.

Irm-^{13}C NMR data set for seized caffeine and paracetamol as separated probes

As mentioned in an earlier publication,[22] irm-^{13}C NMR FS-INEPT gives access to the relative distribution of isotopomers but on an arbitrary scale. Performance of irm-^{13}C FS-INEPT to discriminate paracetamol and caffeine was assessed but on a very small sample set. In this work, we used the same methodology on both cut heroin samples and paracetamol/caffeine mixtures. The bulk composition $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$, as measured by irm-MS, were also included to increase the discrimination power. Thus, caffeine samples can be described by up to 10 variables: 8

intramolecular f_{iR} ^{13}C data, $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$, whereas paracetamol can be described by up to 7 variables: 6 intramolecular f_{iR} ^{13}C data and $\delta^{13}C_g$.

First, PCA was performed on caffeine (**Figure 3**) and paracetamol (**Figure 4**) samples to compare the internal isotopic distribution (f_{iR}) and the bulk composition $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$ between the samples in order to show a graphical representation of the whole data set. As a nonpredictive tool, PCA is well adapted for studying data obtained from a relatively low number of samples (< 50) and relatively high number of variables (≥ 5).

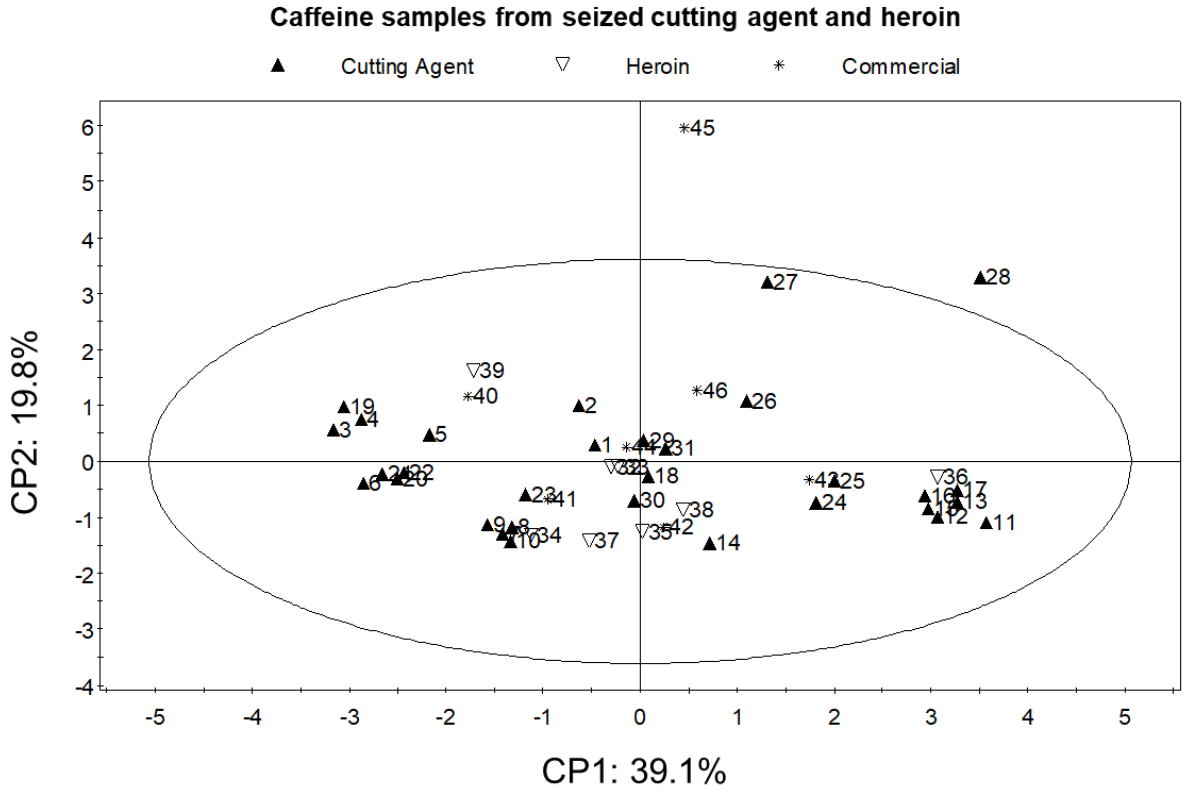


Figure 3: Principal component analysis on caffeine samples: PC1 (39.1%) vs PC2 (19.8%) plot (scores) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. The black triangle stands for the scores from cutting agents seizures (M or C), the inverted white triangle stands for the scores from heroin seizures (H) and the black star stands for the scores from commercial product (See Table S1 for sample identification).

Figure 3 shows the PCA plot (score plot) of the irm-^{13}C FS-INEPT data set (f_{iR}) and irm-MS data set ($\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$) for caffeine samples using the two main principal components PC1 and PC2, which explain 59.9 % of the total variance (39.1 and 19.8 % respectively). The PC3 explains 13.6 % of the total variance. The closest variables to the correlated circle should contribute (for PC1 and PC2) the most to the differentiation of the samples. The carbons C4, C7 and C8 contribute largely to the discrimination along the PC1 like it was demonstrated in

the previous work (See **Figure S1A**).[22] Combining irm-^{13}C NMR and irm-MS greatly improves the discrimination between the caffeine samples. The contribution of reduced molar fraction determined by NMR permits to differentiate the various cases. Indeed, the caffeine N°1 and 2, 3 and 4, 7 to 10, 11 to 13, 15 to 17, and 20 and 21 form different groups where each group represents one judiciary case (See **Table S1**). This distribution shows that seizures from the same case have often the same isotopic profile, supporting the hypothesis that they originate from the same batch. Moreover, sample N°34 which corresponds to a heroin case (H5) has the same isotopic profile than the cutting mixtures N°7 to 10, coming from the same case (M5), meaning that those mixtures probably came from the same batch, and were used to cut the corresponding heroin sample. One atypical case is M14, with samples N°24 to 26, which provides two different isotopic profiles. Interestingly, in that particular case, the seized cutting mixtures were divided into two groups depending on their color (brown and greenish brown). Each color corresponds to one isotopic profile confirming that two caffeine batches were present. The caffeine standards purchased from different commercial sources N°40 to 46 show an isotopic profile which overlap seized samples. This distribution probably indicates that caffeine from industrial production is used to cut heroin samples.

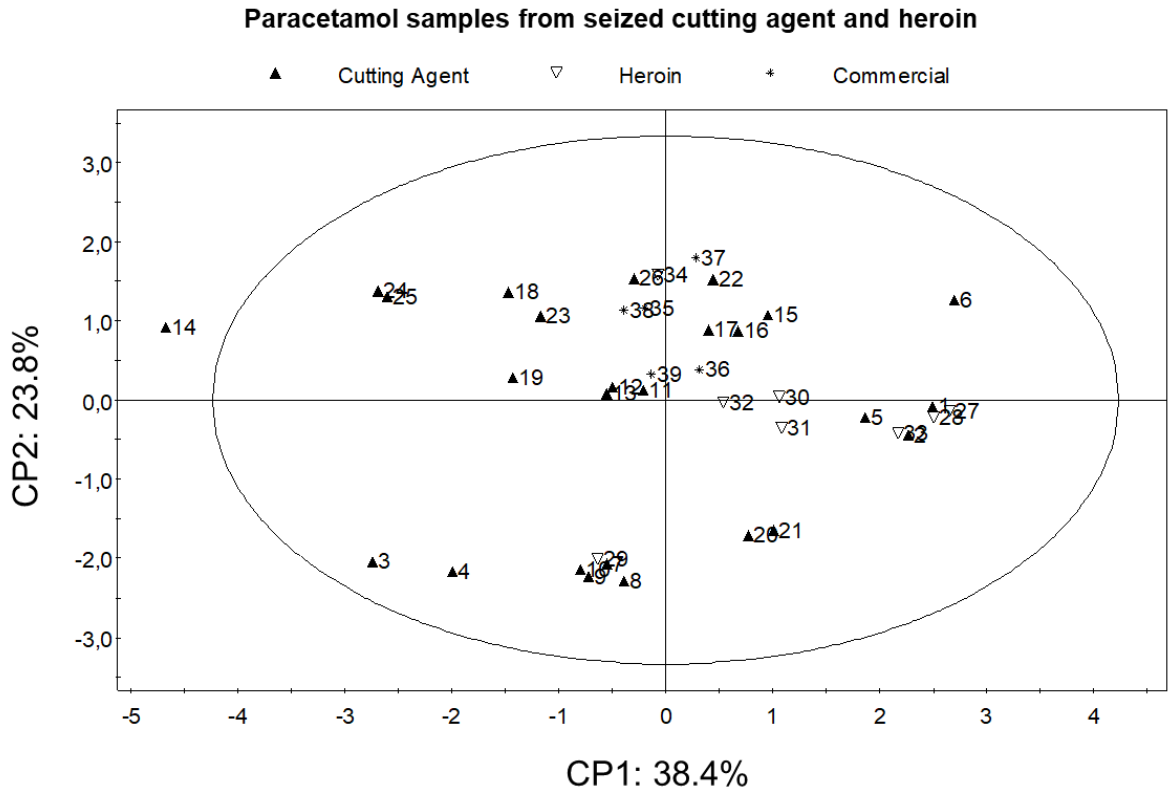


Figure 4: Principal component analysis on paracetamol from cutting agents seizures (M), heroin seizures (H) and commercial product: PC1 (38.4%) vs PC2 (23.8%) plot (scores) using the whole

experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C-irm-MS. The black triangle stands for the scores from cutting agents seizures (M), the inverted white triangle stands for the scores from heroin seizures (H) and the black star stands for the scores from commercial product (See Table S2 for sample identification).

Concerning the seized paracetamol samples described in **Table S2**, **Figure 4** shows the PCA (score plot) of irm-^{13}C FS-INEPT data set (f_{iR}) and irm-NMR data set ($\delta^{13}C_g$) using the two main principal components PC1 and PC2, which explain 62.2 % of the total variance (38.4 and 23.8 %, respectively). The PC3 explains 21.1 % of the total variance. It appears that one carbon position, C5, is less discriminatory than other variables. C1, C3 and C6 contribute largely to the discrimination as published in a previous work (See **Figure S1B**).[22] As expected, the same isotopic distribution than caffeine was observed with paracetamol: samples N°1 to 2, 3 to 4, 7 to 10, 11 to 13, 15 to 17, 20 to 21 and 27 to 28 are grouped separately, which is in line with caffeine groups made from the same cases (M1, M2, M5, M6, M8, M11 and H1 see **Table S2**). Moreover, sample N°29 which corresponds to a heroin case (H5) has the same isotopic profile than the cutting mixtures N°7 to 10, coming from the same case (M5), meaning that those mixtures probably came from the same batch, and were used to cut the heroin sample. The isotopic profile of paracetamol standards purchased from different commercial sources N°35 to 39, like caffeine, overlap the different isotopic signature of seized paracetamol samples meaning that industrial production is used to cut heroin samples along the distribution chain.

Irm-^{13}C NMR data set for seized caffeine and paracetamol as combined probes

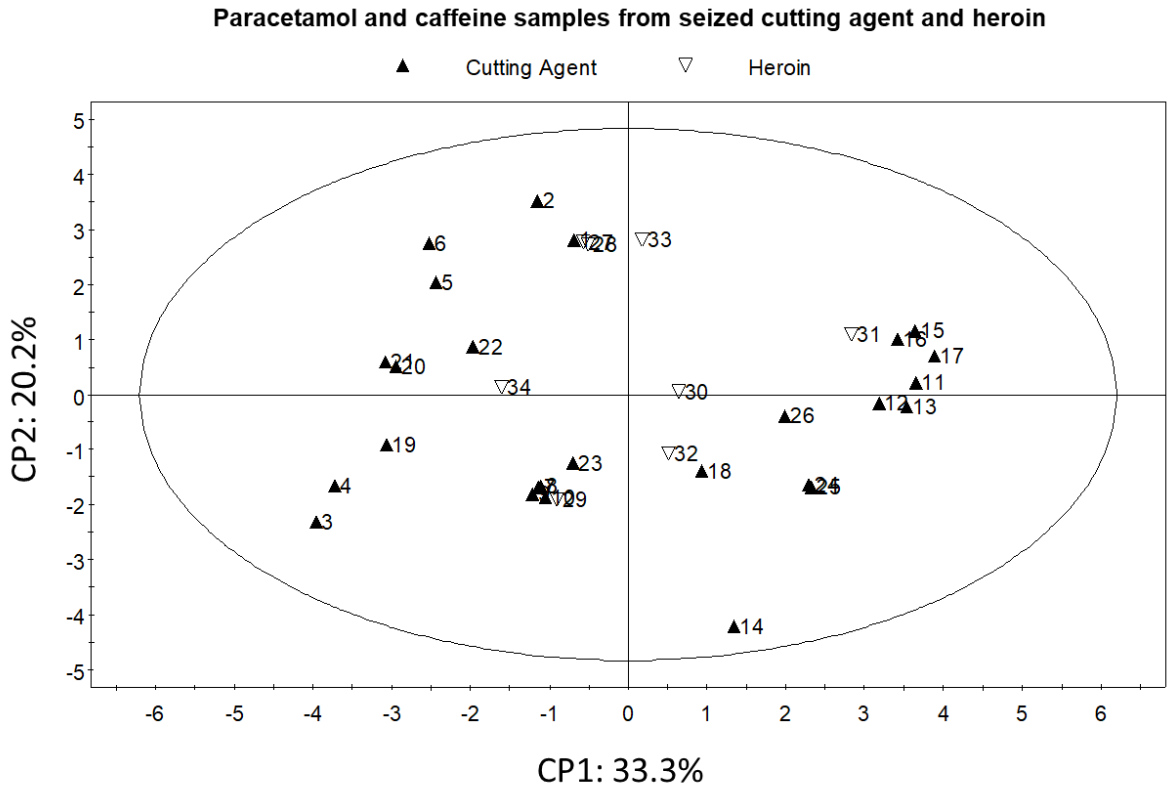


Figure 5: Principal component analysis on the paracetamol/caffeine data combination from seizures: PC1 (33.3%) vs PC2 (20.2%) plot (scores) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. The black triangle stands for the seized cutting agents (M) scores and inverted white triangle stands for the seized heroin (H) scores (See Table S3 for sample identification).

After this first description of caffeine and paracetamol datasets taken separately, PCA was applied to samples containing both caffeine and paracetamol as described in **Table S3**. The objective is to determine if all the variables available for each sample could be considered together. **Figure 5** shows the PCA (score plot) of irm-^{13}C FS-INEPT data set (f_{iR}) of paracetamol and caffeine (14 variables) and irm-MS data set (δ_g) using the two main principal components PC1 and PC2, which explain 53.5 % of the total variance (33.3 and 20.2 %, respectively). The PC3 explains 13.7 % of the total variance. The discrimination shown separately with caffeine and paracetamol is confirmed when combining irm-NMR and irm-MS for both molecules. The samples N°1 to 2, 3 to 4, 7 to 10, 11 to 13, 15 to 17, 20, 21, 27 and 28 corresponding to cases M1, M2, M5, M6, M8, M11 and H1 respectively form different groups with the same isotopic signature for each case. In addition, the paracetamol/caffeine from heroin

sample N°29 corresponding to case H5 has the same isotopic profile than the cutting agent mixtures N°7 to 10 from the same case. The fact that the distributions observed separately for caffeine and paracetamol are similar when combining all data, confirm that heroin is usually cut by the mixture of both products together, and not independently.

Capability of isotope profiles to reveal network distribution of caffeine and paracetamol in heroin

To assess the potential of irm-NMR and irm-MS to track paracetamol and caffeine, this collection was evaluated thanks to the Euclidian distance. The sample set consisted of 19 samples originating from 19 different cases. Each sample was described with 17 variables which are partial reduced molar fractions (f_{iR}) of paracetamol (6 carbons) and caffeine (8 carbons) and the isotopic bulk compositions $\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$for caffeine and $\delta^{13}C_g$ for paracetamol. First, one sample from each case was selected and defined as the "not Linked samples". To establish the "linked" population, 15 replicates of paracetamol and caffeine from the same batch were selected and analyzed over a 1 year period, to determine the magnitude of intra-batch variability.

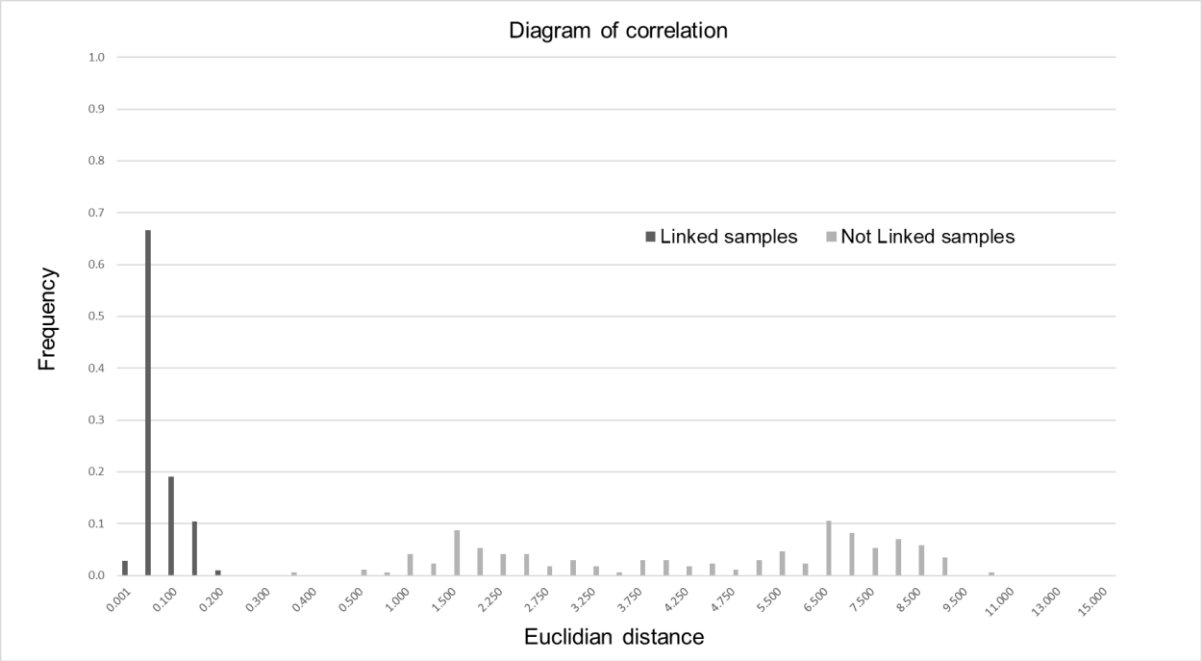


Figure 6: Diagram of correlation of Linked and Not linked samples based on Euclidian distance calculation over irm-NMR (f_{iR}) and irm-MS data ($\delta^{13}C_g$ and $\delta^{15}N_g$).

Correlations inside each population (Linked and Not Linked) were calculated using Euclidian distances (See Ladroue *et al.* [10]) and plotted (**Figure 6**). The resulting histogram shows enough separation between both populations. If a threshold is chosen at 0.3, corresponding to the limit between both populations, 0 % of the not Linked correlations are wrongly considered as linked (false positives), and 0 % of the linked correlations are interpreted as not Linked (false negatives). In drug profiling, such positive results are considered as sufficient to validate the method as a valuable tool to compare paracetamol and caffeine samples.

Conclusion

The ability of stable isotopes to compare paracetamol and caffeine in heroin samples was investigated. For that purpose, carbon and nitrogen isotope ratios were measured in a large number of samples (39 for paracetamol and 46 for caffeine) by irm-MS and irm-^{13}C NMR method. The paracetamol and caffeine samples were mixed with heroin, paracetamol/caffeine mixtures seized as such, or purchased from commercial sources.

The results showed that the only use of irm-MS is not discriminant enough to differentiate without ambiguities the samples. It is possible to exclude a common origin though. In order to improve the discrimination power, it was necessary to combine such isotope values with others obtained from irm-NMR technique. By providing intramolecular isotopic profile on each paracetamol and caffeine samples, irm-^{13}C NMR is sufficient to distinguish isotopic signatures between the different seizures. A similar discrimination pattern is observed for caffeine and paracetamol within a cutting mixture and between them.

The apparent results indicate that paracetamol and caffeine mixtures are added at the same time in the production chain of heroin, as expected. There is no independent addition made for both cutting agents. The capability of irm-^{13}C NMR to distinguish the origin of paracetamol and caffeine could be used to link these cutting agents between different seizures, and therefore to help trafficking route elucidation, thanks to the isotopic profile. The same work based on irm-^{13}C NMR is currently under study for cocaine cutting agents such as phenacetin, caffeine and levamisole.

Acknowledgments

This work is funded by the French National Research Agency ANR, project FRIIME funded by the project call CE 39. M. Joubert thanks the ANR for funding his PhD bursary through this project.

Conflict of Interest Disclosure

Funding for this research was from a thesis grant to V. J. (see Acknowledgements) and core funding from the CNRS and the French Ministry of Education. There is no conflict of interest.

References

(1) *Drug Profiling Subcommittee Report, ENFSI-DWG 12th Meeting, Krakow, Poland, 2006*.

(2) Dujourdy, L.; Besacier, F. Headspace Profiling of Cocaine Samples for Intelligence Purposes. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *179* (2–3), 111–122.

(3) Lociciro, S.; Hayoz, P.; Esseiva, P.; Dujourdy, L.; Besacier, F.; Margot, P. Cocaine Profiling for Strategic Intelligence Purposes, a Cross-Border Project between France and Switzerland. Part I. Optimisation and Harmonisation of the Profiling Method. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *167* (2–3), 220–228.

(4) Broséus, J.; Gentile, N.; Bonadio Pont, F.; Garcia Gongora, J. M.; Gasté, L.; Esseiva, P. Qualitative, Quantitative and Temporal Study of Cutting Agents for Cocaine and Heroin over 9 Years. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *257*, 307–313.

(5) Broséus, J.; Gentile, N.; Esseiva, P. The Cutting of Cocaine and Heroin: A Critical Review. *Forensic Sci. Int.* **2016**, *262*, 73–83.

(6) Cole, C.; Jones, L.; McVeigh, J.; Kicman, A.; Syed, Q.; Bellis, M. Adulterants in Illicit Drugs: A Review of Empirical Evidence. *Drug Test. Anal.* **2011**, *3* (2), 89–96.

(7) Schneider, S.; Meys, F. Analysis of Illicit Cocaine and Heroin Samples Seized in Luxembourg from 2005-2010. *Forensic Sci. Int.* **2011**, *212* (1–3), 242–246.

(8) Dujourdy, L.; Besacier, F. Heroin seized in France. Statistical data from National database of Forensic Laboratories. *Ann. Pharm. Fr.* **2010**, *68* (2), 127–132.

(9) Besacier, F.; Chaudron-Thozet, H.; Lascaux, F.; Rousseau-Tsangaris, M. Application Du Couplage Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse Isotopique de l'azote à l'analyse d'échantillons de Drogues. *Analusis* **1999**, *27* (3), 213–217.

(10) Ladroue, V.; Dujourdy, L.; Besacier, F.; Jame, P. IRMS to Study a Common Cocaine Cutting Agent: Phenacetin. *Drug Test. Anal.* **2017**, *9* (3), 479–484.

(11) Martin, G. J.; Martin, M. L. Deuterium Labelling at the Natural Abundance Level as Studied by High Field Quantitative ^{2}H NMR. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (36), 3525–3528.

(12) Jamin, E.; Thomas, F. SNIF-NMR Applications in an Economic Context: Fraud Detection in Food Products. In *Modern Magnetic Resonance*; Springer, Cham, 2017; pp 1–12.

(13) Jézéquel, T.; Joubert, V.; Giraudeau, P.; Remaud, G. S.; Akoka, S. The New Face of Isotopic NMR at Natural Abundance. *Magn. Reson. Chem.* **2017**, *55* (2), 77–90.

(14) Tenailleau, E.; Lancelin, P.; Robins, R. J.; Akoka, S. NMR Approach to the Quantification of Nonstatistical ^{13}C Distribution in Natural Products: Vanillin. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (13), 3818–3825.

(15) Caytan, E.; Botosoa, E. P.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Accurate Quantitative ^{13}C NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific ^{13}C Isotope Ratio Determination. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (21), 8266–8269.

(16) Caytan, E.; Remaud, G. S.; Tenailleau, E.; Akoka, S. Precise and Accurate Quantitative 13C NMR with Reduced Experimental Time. *Talanta* **2007**, *71* (3), 1016–1021.

(17) Silvestre, V.; Mboula, V. M.; Jouitteau, C.; Akoka, S.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Isotopic ^{13}C NMR Spectrometry to Assess Counterfeiting of Active Pharmaceutical Ingredients: Site-Specific ^{13}C Content of Aspirin and Paracetamol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50* (3), 336–341.

(18) Diomande, D. G.; Martineau, E.; Gilbert, A.; Nun, P.; Murata, A.; Yamada, K.; Watanabe, N.; Tea, I.; Robins, R. J.; Yoshida, N.; et al. Position-Specific Isotope Analysis of Xanthines: A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Method to Determine the ^{13}C Intramolecular Composition at Natural Abundance. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (13), 6600–6606.

(19) Thibaudeau, C.; Remaud, G.; Silvestre, V.; Akoka, S. Performance Evaluation of Quantitative Adiabatic ^{13}C NMR Pulse Sequences for Site-Specific Isotopic Measurements. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5582–5590.

(20) Bussy, U.; Thibaudeau, C.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Remaud, G. S.; Silvestre, V.; Akoka, S. Isotopic Finger-Printing of Active Pharmaceutical Ingredients by ^{13}C NMR and Polarization Transfer Techniques as a Tool to Fight against Counterfeiting. *Talanta* **2011**, *85* (4), 1909–1914.

(21) Remaud, G. S.; Bussy, U.; Lees, M.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Silvestre, V.; Akoka, S. NMR Spectrometry Isotopic Fingerprinting: A Tool for the Manufacturer for Tracking Active Pharmaceutical Ingredients from Starting Materials to Final Medicines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 464–473.

(22) Joubert, V.; Silvestre, V.; Grand, M.; Loquet, D.; Ladroue, V.; Besacier, F.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Full Spectrum Isotopic ^{13}C NMR Using Polarization Transfer for Position-Specific Isotope Analysis. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (14), 8692–8699.

(23) Zhang, B. L.; Trierweiler, M.; Jouitteau, C.; Martin, G. J. Consistency of NMR and Mass Spectrometry Determinations of Natural-Abundance Site-Specific Carbon Isotope Ratios. The Case of Glycerol. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (13), 2301–2306.

(24) Werner, R. A.; Brand, W. A. Referencing Strategies and Techniques in Stable Isotope Ratio Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15* (7), 501–519.

(25) Dautraix, S.; Guilluy, R.; Chaudron-Thozet, H.; Brazier, J. L.; Lamotte, A. ^{13}C Isotopic Analysis of an Acetaminophen and Diacetylmorphine Mixture. *J. Chromatogr. A* **1996**, *756* (1), 203–210.

Supporting Information

Table S1: Identification of the different caffeine samples by case number.

Caffeine		
Sample N°	**Seizure**	**Case Label**
1	Cutting Agent	M1-2
2	Cutting Agent	M1-2
3	Cutting Agent	M2-1
4	Cutting Agent	M2-2
5	Cutting Agent	M3
6	Cutting Agent	M4
7	Cutting Agent	M5-1
8	Cutting Agent	M5-2
9	Cutting Agent	M5-3
10	Cutting Agent	M5-4
11	Cutting Agent	M6-1
12	Cutting Agent	M6-2
13	Cutting Agent	M6-3
14	Cutting Agent	M7
15	Cutting Agent	M8-1
16	Cutting Agent	M8-2
17	Cutting Agent	M8-3
18	Cutting Agent	M9
19	Cutting Agent	M10
20	Cutting Agent	M11-1
21	Cutting Agent	M11-2
22	Cutting Agent	M12
23	Cutting Agent	M13
24	Cutting Agent	M14-1
25	Cutting Agent	M14-2
26	Cutting Agent	M14-3
27	Cutting Agent	C1
28	Cutting Agent	C2
29	Cutting Agent	C3
30	Cutting Agent	C4-1
31	Cutting Agent	C4-2
32	Heroin	H1-1
33	Heroin	H1-2
34	Heroin	H5
35	Heroin	H15
36	Heroin	H16
37	Heroin	H17
38	Heroin	H18
39	Heroin	H19

40	Commercial	TCI
41	Commercial	Sigma
42	Commercial	Acros Organics
43	Commercial	Alfa Aesar 99,7%
44	Commercial	FLUKA
45	Commercial	Sigma
46	Commercial	Alfa Aesar 99%

Table S2: Identification of the different paracetamol samples by case number.

Paracetamol		
Sample N°	**Seizure**	**Case Label**
1	Cutting Agent	M1-2
2	Cutting Agent	M1-2
3	Cutting Agent	M2-1
4	Cutting Agent	M2-2
5	Cutting Agent	M3
6	Cutting Agent	M4
7	Cutting Agent	M5-1
8	Cutting Agent	M5-2
9	Cutting Agent	M5-3
10	Cutting Agent	M5-4
11	Cutting Agent	M6-1
12	Cutting Agent	M6-2
13	Cutting Agent	M6-3
14	Cutting Agent	M7
15	Cutting Agent	M8-1
16	Cutting Agent	M8-2
17	Cutting Agent	M8-3
18	Cutting Agent	M9
19	Cutting Agent	M10
20	Cutting Agent	M11-1
21	Cutting Agent	M11-2
22	Cutting Agent	M12
23	Cutting Agent	M13
24	Cutting Agent	M14-1
25	Cutting Agent	M14-2
26	Cutting Agent	M14-3
27	Heroin	H1-1
28	Heroin	H1-2
29	Heroin	H5
30	Heroin	H15
31	Heroin	H16
32	Heroin	H17

33	Heroin	H18
34	Heroin	H19
35	Commercial	Sigma
36	Commercial	TCI
37	Commercial	Sigma
38	Commercial	Sigma
39	Commercial	Acros Organics

Table S3: Identification of samples containing both caffeine and paracetamol found as a cutting mixture, or mixed with heroin

Paracetamol and Caffeine		
Sample N°	**Seizure**	**Case Label**
1	Cutting Agent	M1-2
2	Cutting Agent	M1-2
3	Cutting Agent	M2-1
4	Cutting Agent	M2-2
5	Cutting Agent	M3
6	Cutting Agent	M4
7	Cutting Agent	M5-1
8	Cutting Agent	M5-2
9	Cutting Agent	M5-3
10	Cutting Agent	M5-4
11	Cutting Agent	M6-1
12	Cutting Agent	M6-2
13	Cutting Agent	M6-3
14	Cutting Agent	M7
15	Cutting Agent	M8-1
16	Cutting Agent	M8-2
17	Cutting Agent	M8-3
18	Cutting Agent	M9
19	Cutting Agent	M10
20	Cutting Agent	M11-1
21	Cutting Agent	M11-2
22	Cutting Agent	M12
23	Cutting Agent	M13
24	Cutting Agent	M14-1
25	Cutting Agent	M14-2
26	Cutting Agent	M14-3
27	Heroin	H1-1
28	Heroin	H1-2
29	Heroin	H5
30	Heroin	H15
31	Heroin	H16
32	Heroin	H17

33	Heroin	H18
34	Heroin	H19

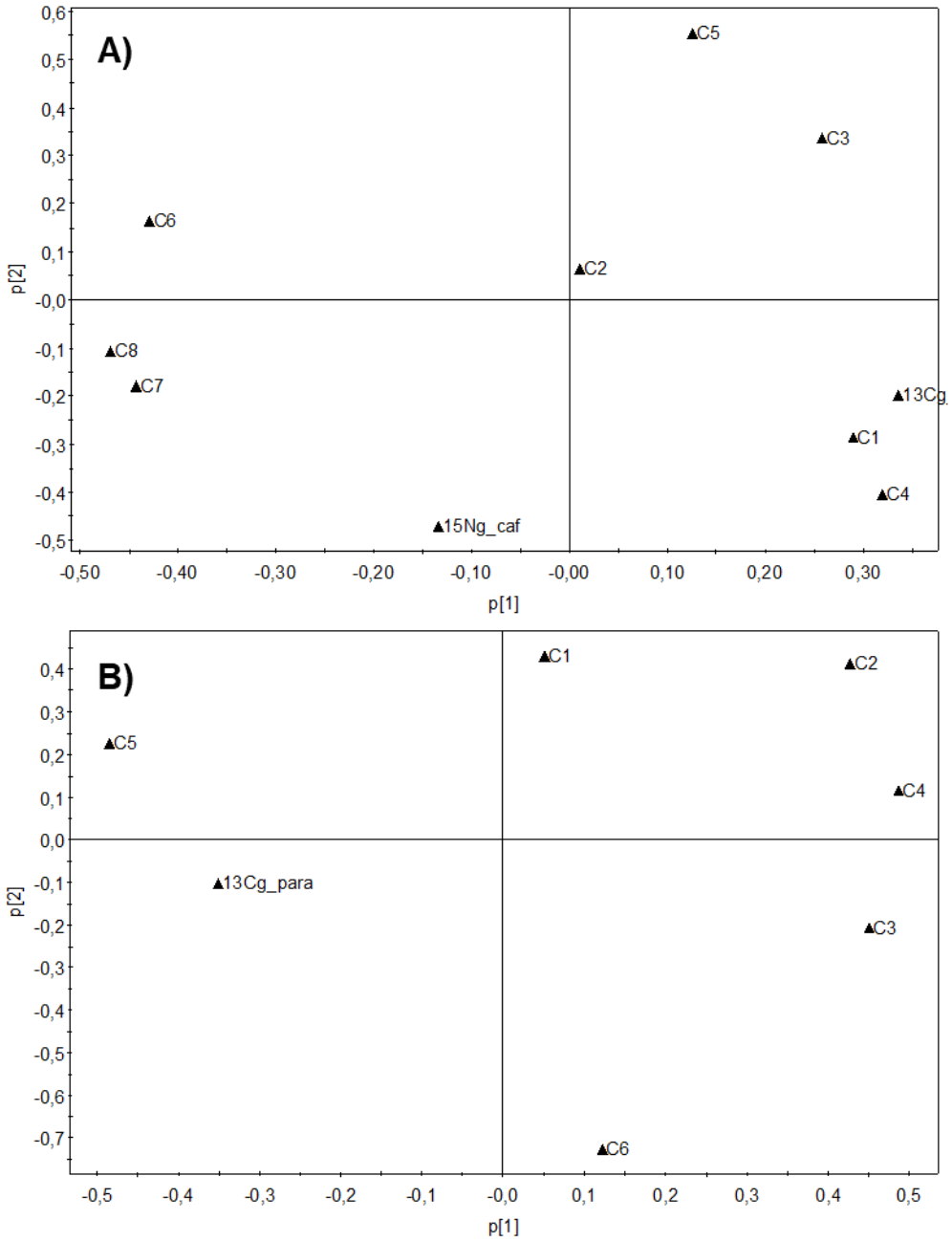


Figure S1: A) Principal component analysis on caffeine from seizures: PC1 (39.1%) vs PC2 (19.8%) plot (loadings) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. **B)** Principal component analysis on paracetamol from seizures: PC1 (38.4%) vs PC2 (23.8%) plot (loadings) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C-irm-MS. The black triangle stands for the loadings (contribution of each measured parameter).

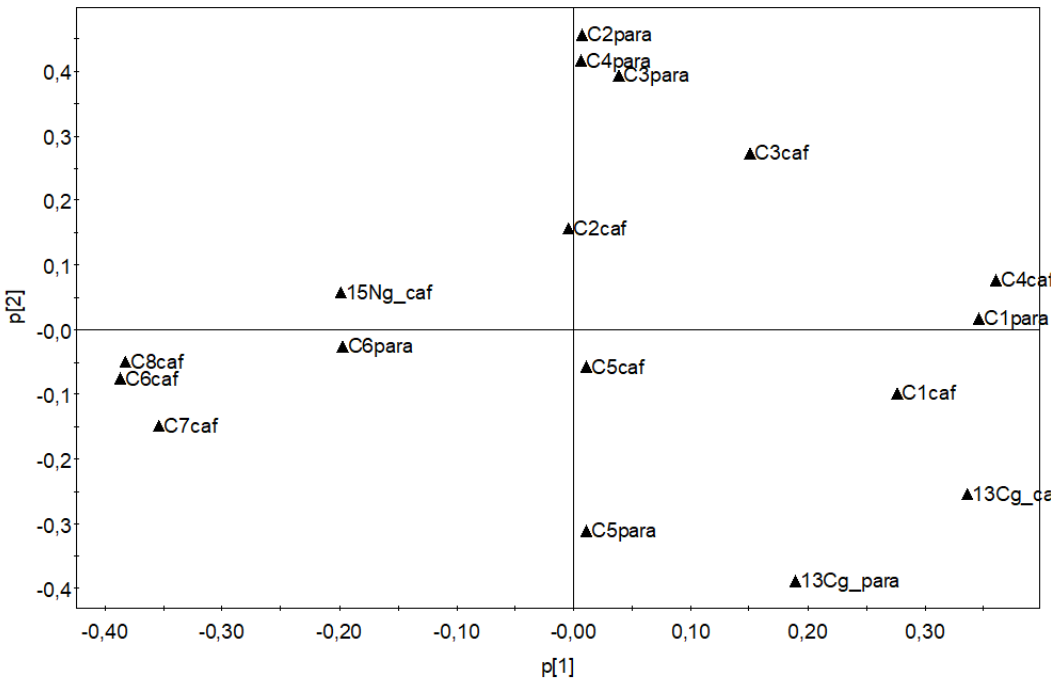


Figure S2: Principal component analysis on the paracetamol/caffeine data combination from seizures: PC1 (33.3%) vs PC2 (20.2%) plot (loadings) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. The black triangle stands for the loadings of paracetamol and caffeine (contribution of each measured parameter).

GC method

For ^{13}C measurements of caffeine and paracetamol from seized heroin, the following gradient was applied starting at 110 °C for 1 min; the temperature was then raised at 40 °C / min up to 180 °C, then at 1 °C / min up to 190 °C, then at 40 °C / min up to 290° and kept at 290 °C for 8 min. The total experiment time was 24 min and 15 s for 1 injection. The injector temperature was set at 260 °C. The injection volume was 0.2 µL for a 2 mg / mL sample volume on split less mode. A constant flow of helium at 1.50 mL / min circulated in the capillary column. The combustion furnace was a quartz tube filled with CuO pellets held at 850 °C. The interface was kept at 350 °C.

For ^{15}N measurements of caffeine from seized heroin, the following gradient was applied starting at 150 °C for 3 min; the temperature was then raised at 30 °C / min up to 300 °C and kept at 300 °C for 2 min. The total experiment time was 13 min for 1 injection. Since only caffeine was analyzed in the nitrogen mode, the program was shortened. The equipment conditions were strictly identical that the ^{13}C measurements.

IV-3) Données complémentaires

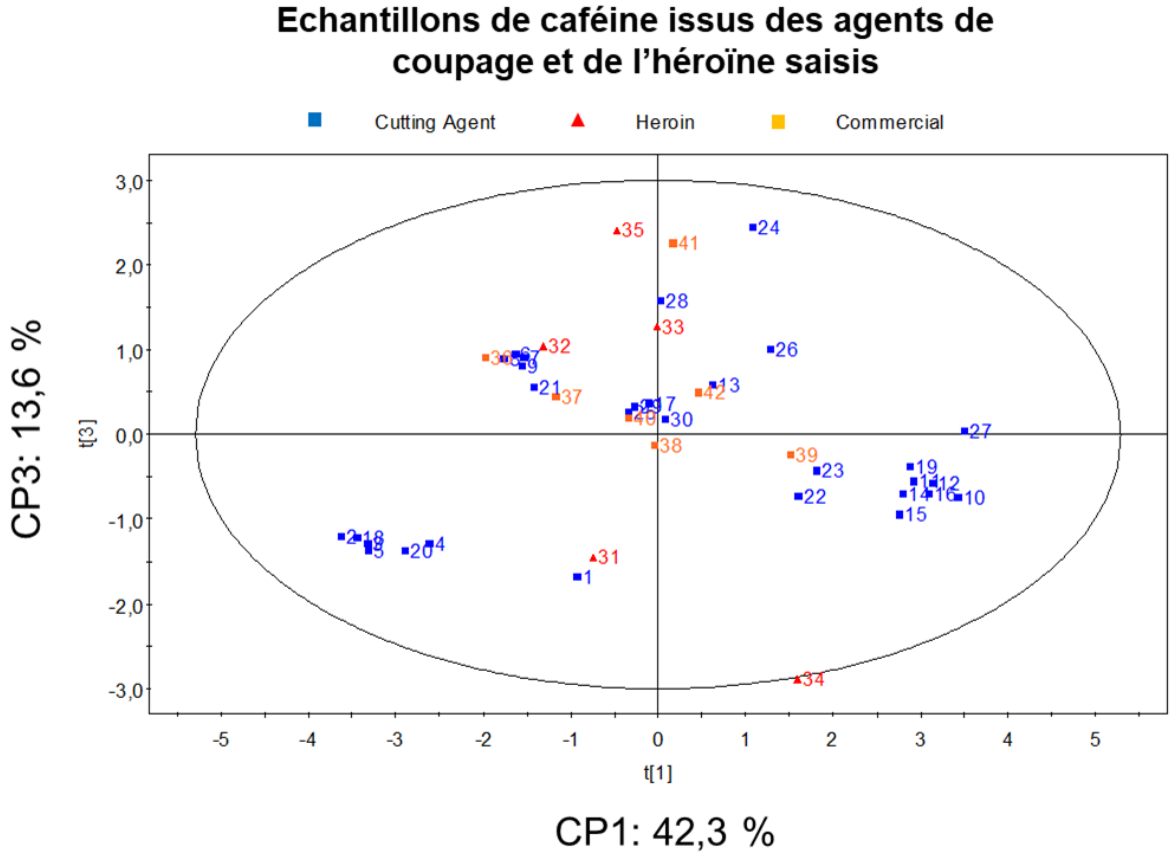


Figure S3 : PCA sur les échantillons de caféine issus des agents de coupage saisis (carrés bleus), des échantillons d'héroïnes saisis (triangles rouges) et des produits commerciaux (carrés oranges) : PC1 (42,3%) vs PC3 (13,6%) plot (scores) utilisant toutes les variables issues des expériences FS-INEPT ^{13}C par RMN et irm-MS ^{13}C.

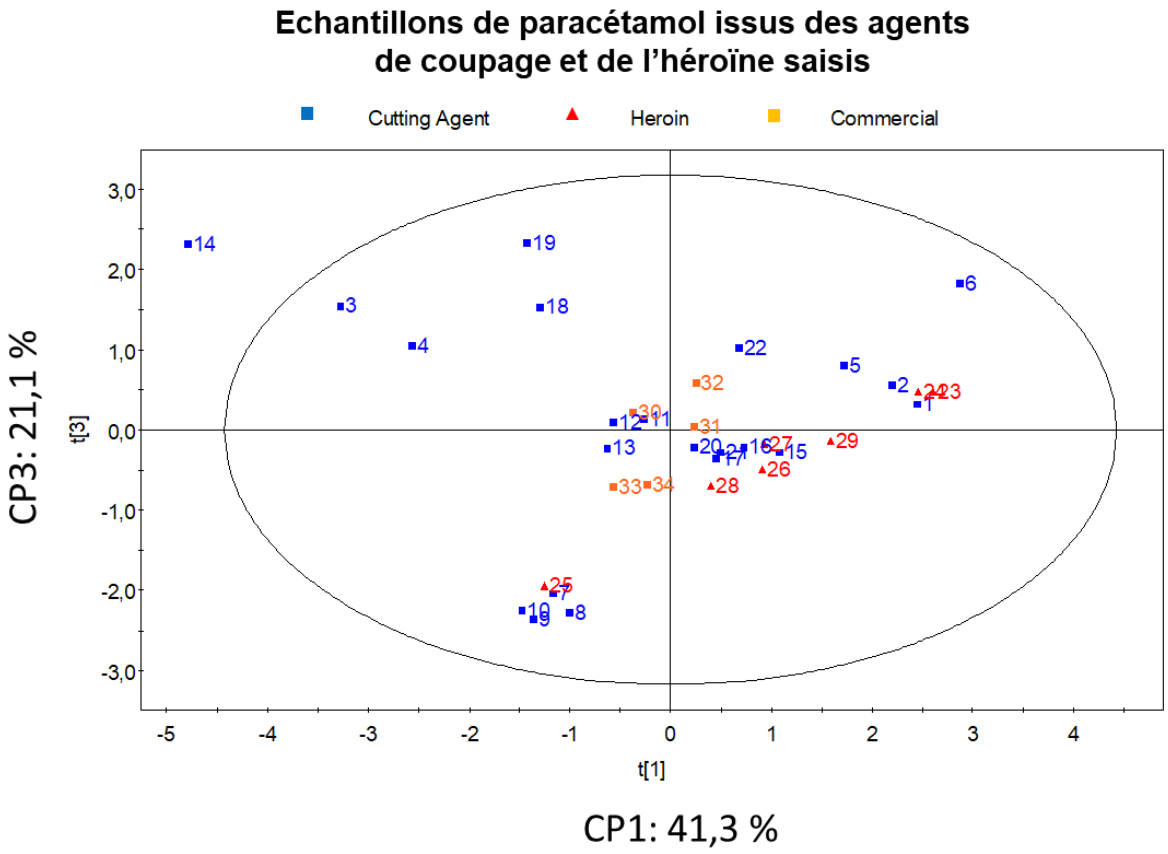


Figure S4 : PCA sur les échantillons de paracétamol issus des agents de coupage saisis (carrés bleus), des échantillons d'héroïnes saisis (triangles rouges) et des produits commerciaux (carrés oranges) : PC1 (41,3%) vs PC3 (21,1%) plot (scores) utilisant toutes les variables issues des expériences FS-INEPT ^{13}C par RMN et irm-MS ^{13}C.

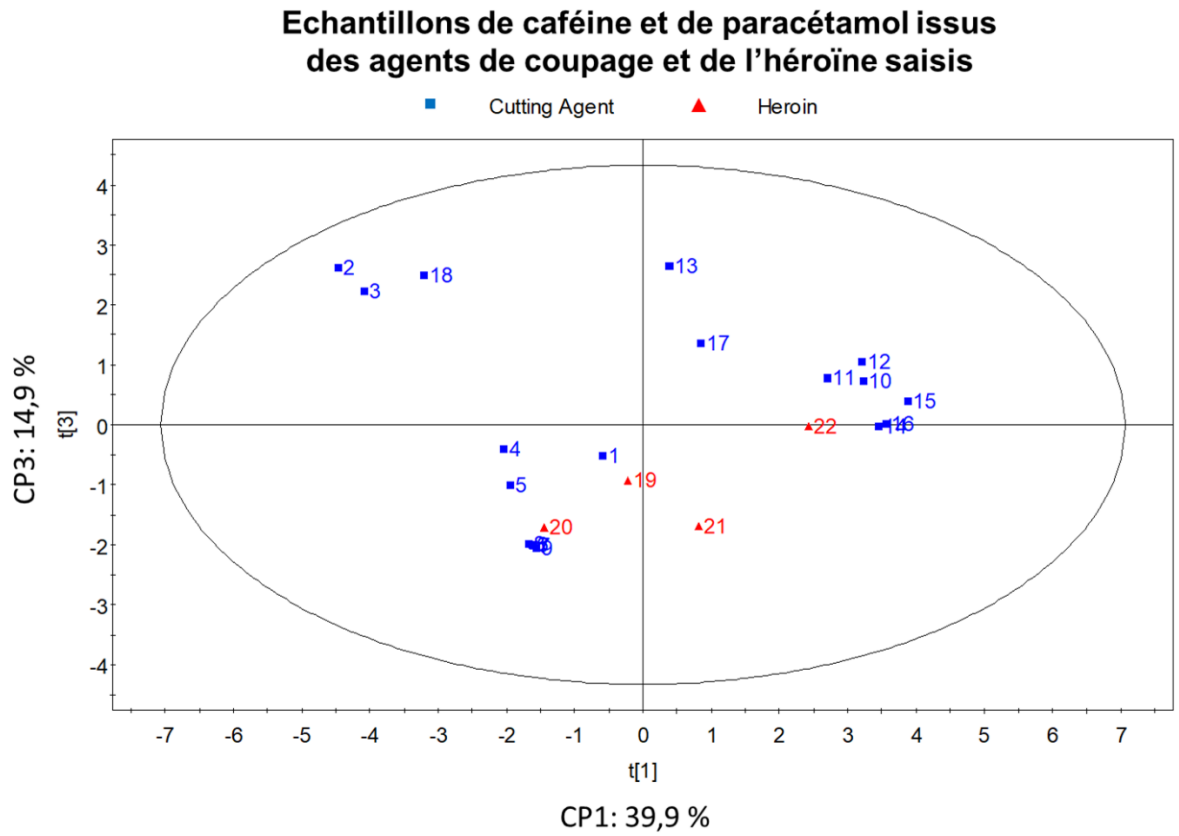


Figure S5 : PCA sur les échantillons de caféine et de paracétamol issus des agents de coupage saisis (carrés bleus) et des échantillons d'héroïnes saisis (triangles rouges): PC1 (39,9%) vs PC3 (14,9%) plot (scores) utilisant toutes les variables issues des expériences FS-INEPT ^{13}C par RMN et irm-MS ^{13}C.

Préparation des échantillons paracétamol/caféine issus des saisies de l'INPS

L'ensemble des échantillons d'héroïnes et des agents de coupage saisis possèdent des teneurs variables en caféine et paracétamol. La teneur en paracétamol varie entre 17 et 56 % pour les échantillons d'héroïnes saisis et entre 49 et 86 % pour les échantillons d'agents de coupage saisis par l'INPS. La teneur en caféine varie entre 9 et 41 % pour les échantillons d'héroïnes saisis et entre 17 et 49 % pour les échantillons d'agents de coupage saisis par l'INPS. Pour chaque échantillon une quantité minimum de 50 mg est requise pour effectuer l'analyse isotopique sur le paracétamol et la caféine par RMN (irm-^{13}C NMR) ainsi que l'analyse par irm-MS. Une quantité de départ est donc calculée pour obtenir au moins 50 mg de chaque agent de coupage en prenant en compte le rendement de la séparation et de l'extraction qui est au minimum de 90 % afin de ne pas provoquer un fractionnement isotopique pouvant fausser les résultats. Chaque échantillon est dilué dans 4 mL d'eau/méthanol (50:50) et injecté en 4 fois 1 mL sur une colonne contenant 20g de silice avec un temps de séparation pour chaque injection

de 12 min soit 1h de « run » pour séparer le paracétamol et la caféine sur un échantillon saisi. Le protocole d'extraction est décrit dans la **Partie IV** :de ce manuscrit.

IV-4) Conclusion

La capacité de l'irm-^{13}C NMR à pouvoir discriminer l'origine de la caféine et du paracétamol issus du trafic de stupéfiant a été étudiée au cours de ces travaux. Pour cela, 34 échantillons de paracétamol et 42 échantillons de caféine ont été analysés par cette technique mais aussi par irm-MS ^{13}C et ^{15}N comme méthode complémentaire. Dans cette étude, le paracétamol et la caféine proviennent de mélanges avec l'héroïne, ou de mélanges pures caféine/paracétamol saisies par la police dans le cadre de plusieurs affaires judiciaires.

Les résultats ont montré que l'irm-MS ^{13}C et ^{15}N seule ne permet pas de discriminer tous les échantillons de paracétamol et de caféine provenant des différentes affaires. Seul les cas atypiques avec des variations importantes dans la composition isotopique globale peuvent être mis en lumière par l'irm-MS. L'utilisation de l'irm-^{13}C NMR a permis de lever ces ambigüités et de discriminer avec efficacité les différents agents de coupage saisis par la police. En mesurant la composition isotopique site-spécifique de chaque carbone il est possible de différencier ces profils isotopiques et ainsi de suivre ces molécules dans le trafic d'héroïne. En effet, les résultats montrent que la caféine et le paracétamol sont ajoutés en mélange et en même temps dans la chaîne de distribution de l'héroïne et qu'il n'y a pas d'ajout unique du paracétamol ou de la caféine pour l'adultération de cette dernière.

L'irm-^{13}C NMR s'avère être un outil de choix pour le suivi de ces agents de coupage dans la chaîne de production par sa capacité à mettre en évidence des liens entre les saisies d'agents de coupage et d'héroïne issus d'une même affaire ou d'affaires différentes. A l'avenir cet outil pourrait aider l'INPS à traquer les différents réseaux de distributions et pourrait même être appliqué à l'analyse des agents de coupage contenus dans la cocaïne par la recherche de nouveaux liens isotopiques entre les échantillons.

Partie V : Application de la méthode FS-INEPT du ^{15}N sur le TNT

V-1) Introduction

Comme démontré dans la **Partie III** :, l'irm-^{15}N NMR est capable de mesurer avec une précision de 1‰ la composition isotopique position-spécifique de chaque noyau ^{15}N d'une molécule donnée grâce à l'utilisation de la méthode FS-INEPT ^{15}N. Cette même méthode est appliquée ici dans le cadre d'une application forensique sur un explosif industriel, le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT). Malgré que ce composé soit facilement identifiable via les outils de chimie analytique disponibles il n'est en général pas possible d'émettre un quelconque lien entre plusieurs échantillons de TNT.

Bien que l'irm-MS fût déjà utilisée pour le TNT il n'est pas toujours possible de différencier avec certitude plusieurs lots de TNT du fait du peu d'information fournie par cette technique. Afin de pallier ce problème les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse proposent d'utiliser une méthode multi-isotopes combinant l'irm-MS et l'irm-NMR en ^{13}C et ^{15}N. A cette fin, 6 échantillons de TNT fournis par l'INPS de Lyon ont pu être analysés via ces différentes techniques et seront complétés plus tard par d'autres échantillons de TNT.

Les analyses irm-^{13}C NMR ont été faites en utilisant la technique « one-pulse » du faite de la grande quantité disponible (> 300 mg) pour chaque échantillon. Tandis que les analyses par irm-^{15}N NMR ont été effectuées par le biais de la méthode FS-INEPT ^{15}N afin de rendre la mesure réalisable par RMN. Ces travaux et ses interprétations ont fait l'objet d'un article intitulé « **Forensic application of Position-Specific Isotopic Analysis of Trinitrotoluene (TNT): A Nuclear Magnetic Resonance method to determine ^{13}C and ^{15}N isotopic profiles** » et vont être soumis dans le journal *Talanta*.

V-2) Article

Forensic application of Position-Specific Isotopic Analysis of Trinitrotoluene (TNT): A Nuclear Magnetic Resonance method to determine ^{13}C and ^{15}N isotopic profiles

Valentin Joubert[1], Virginie Silvestre[1], Paule Blondel[2], Virginie Ladroue[2], Fabrice Besacier[2], Serge Akoka[1], Gérald S. Remaud[1*]

1 Elucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, CEISAM, University of Nantes-CNRS UMR6230, F-44322 Nantes, France

2 Institut National de Police Scientifique, Laboratoire de Lyon, 31 avenue Franklin Roosevelt, 69134 Ecully Cedex, France

*Correspondence: G. Remaud. Phone: 33 2 51 12 57 19; Fax: 33 2 51 12 57 12; e-mail: gerald.remaud@univ-nantes.fr

Abstract

The industrial 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) are easily identified with current instrumental techniques but it is generally impossible to distinguish between sources of the same substance. To overcome this difficulty, we present a multi stable isotope approach using isotope ratio monitoring by mass spectrometry (irm-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (irm-NMR). Irm-MS provides bulk isotopic composition at natural abundance in ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O or ^{34}S. However, irm-NMR enable the determination of positional intramolecular $^{13}C/^{12}C$ ratios ($\delta^{13}C_i$) and $^{15}N/^{14}N$ ratios ($\delta^{15}N_i$) with high precision. This technique shows its potential in the field of authentication but also to study metabolism as retro-biosynthetic pathways.

This publication report an application of recent methodology using irm-^{15}N NMR to determine position-specific ^{15}N isotope content of TNT. In addition, irm-^{13}C NMR and irm-MS (^{13}C and ^{15}N) were performed to obtain a complete isotopic profile of each TNT samples. Thanks to the use of irm-NMR the results show a unique isotopic fingerprint for each TNT which enable the origin discrimination between the samples without ambiguities.

Keywords: PSIA, irm-^{13}C NMR, irm-^{15}N NMR, 2,4,6-Trinitrotoluene, explosives

Introduction

2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) is by far the most important military explosive for blasting charges of all weapons. It is very stable, neutral, and does not attack metals. It can be applied pure and mixed with ammonium nitrate, aluminum powder, with cyclotrimethylenetrinitramine (RDX) and combinations.[1] Furthermore, TNT is an important component of industrial explosives.

Forensic investigation of explosives mainly focuses on the identification of raw materials and post-blast residues. In addition to identification, more information can be extracted from explosives samples by using chemical profiling. Profiling explosives may be used to increase the knowledge on the origin of the explosive as well as to investigate possible relationships between samples, *e.g.* crime scene and suspect samples. In the literature, several attempts were made to develop profiling methods of TNT by determining the presence of various impurities. Most of these methods used liquid chromatography (LC)[2] or gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (GC-MS).[3] However, they could not demonstrate differences between

all TNT samples especially when the purification process removed a large part of the by-products.[4]

Another analytical method using isotope ratio monitoring by mass spectrometry (irm-MS, known also as IRMS)[5] allows to trace the source of the molecules. The result is expressed as the bulk (or global) Heavy isotope composition (for example for carbon-13: $\delta^{13}C_b$). One parameter is thus collected representing the average contribution of all isotopomers and isotopologues of the studied heavy isotope. In the first published work on the isotopic analysis of explosives in 1975,[6] the author used ^{13}C and ^{15}N bulk isotopic compositions ($\delta^{13}C_b$) and ($\delta^{15}N_b$) for discriminating TNT samples from different countries. Several studies on the same topic showed a large range of $\delta^{13}C_b$ (-30 to -23.5‰) and $\delta^{15}N_b$ (-8.7 to +9.6‰) values for TNT samples[6–8] except for the study of Lock *et al.*, which reported a smaller range of $\delta^{13}C_b$ (-28.8 to -27.1‰) and $\delta^{15}N_b$ (-5.9 to -1.7‰) values.[9] It is therefore probable that irm-MS, alone, could not provide enough discrimination between TNT samples for origin assignment and batch linkage.

A possible alternative method is Position-Specific Isotope Analysis (PSIA), because the intramolecular isotope distribution of a molecule provides additional information about its origin, *i.e.* each non-equivalent isotopomer is titrated. In 1981, a PSIA method based on Nuclear Magnetic Resonance spectrometry (known as SNIF-NMR™: Site-specific Natural Isotope Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance) was proposed by Martin *et al*. in order to measure position-specific ^{2}H isotope compositions of organic molecule[10] and become in 1988 the official method to detect sugar addition in wines.[11] Nowadays the use of irm-^{2}H NMR for origin determination of vanillin[12] and acetic acid[13] are recognized by official authorities. Fortunately, driven by few majors limitations such as the small frequency range of ^{2}H leading to signal overlap and small molecules limitation (M < 250 g/mol) scientists have extended this approach to position-specific ^{13}C.

In 2007, isotopic ratio monitoring ^{13}C by NMR (irm-^{13}C NMR) was optimized for measuring position-specific ^{13}C isotope compositions with 1‰ (0.1%) accuracy (as trueness + precision).[14] The usefulness of irm-^{13}C NMR was demonstrated for a number of applications[15–18] but the experiment time can become prohibitive for routine analysis in the "one-pulse" version.[19] Reducing the experimental time and/or the amount of sample could be performed via the use of multi-pulse NMR sequences based on polarization transfer from highly sensitive ^{1}H to less sensitive ^{13}C nuclei. In 2010 Thibaudeau *et al.*, have shown that multi-pulse sequence like

"Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer" (INEPT) provided an increase sensitivity with a high precision of 1‰.[20] This method has been used with success in many applications[21–23] in order to compare relative isotopic profiles and discriminate the different origins of Active Pharmaceutical Ingredients (API) and triacyglycerol in olive oils illustrating the emerging concept of "isotopomics".

However, the isotopic composition of quaternary ^{13}C was lost because only carbons directly coupled with hydrogen ($^{1}J_{CH}$) benefited from the polarization transfer. Hence, in 2018, Joubert *et al.*, proposed a « Full-Spectrum » INEPT (FS-INEPT)[24] method to enhance the sensitivity on each carbon ($^{n}J_{CH}$) with a precision better than 1.5‰, and applied this sequence to the discrimination of caffeine and paracetamol origins. FS-INEPT ^{13}C was extended and adapted to the measurement of position-specific ^{15}N isotope composition (FS-INEPT ^{15}N) by Joubert *et al.* in order to measure for the first time the isotopic compositions ($\delta^{15}N_i$) and enrichment factor upon fractionation with a precision under 1‰. (See **Partie III :**)

Nitrogen-15 is not a favorable nucleus for quantitative NMR because of its intrinsic low sensitivity (gyromagnetic ratio 10 times lower than for ^{1}H) and its low abundance (three times lower than from ^{13}C). The combination of a high field NMR spectrometer and the recent FS-INEPT methodology allowed the measurement of the intramolecular ^{15}N distribution within an adequate precision of the order of 1‰. In the present study, we applied this new approach to TNT samples in order to characterize their sources. Irm-^{15}N NMR appears as a determinant complementarity tool of irm-^{13}C NMR in forensic investigations. The contribution from irm-NMR against irm-MS on the ^{13}C and ^{15}N isotopic profile of TNT is also highlighted in this work.

Materials and Methods

Chemicals and Samples

Acetone-d_6 was purchased from Eurositop. In total, 6 TNT samples were collected by demining center of Lyon from different origin and were extracted from different matrix. (**Table 1**)

Table 1: Identification of the different TNT samples by their origins.

Sample number	Matrix	Geographical origin
1	Unknown	Unknown
2	Unknown	Unknown
3	Unknown	Unknown
4	Unknown	Unknown
5	OF37 grenade	France
6	WG 66 mortar	Switzerland

NMR spectrometry experiments

300 mg of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) was dissolved in 400 µL of acetone-d_6. The solutions were mixed and filtered into a 5 mm o.d. NMR tube. Quantitative ^{13}C and ^{15}N NMR spectra were recorded on a Bruker 700 Avance HD spectrometer fitted with an inverse CRYO $^{1}H/^{13}C/^{15}N/^{2}H$ ATMA grad Z, 5 mm, carefully tuned to the recording frequency of 175.98 MHz and 70.93 MHz respectively for ^{13}C and ^{15}N. The temperature of the probe was set at 303 K with no spinning of the tube. The pulse lengths were calibrated before each experiment, and the probe tuning and matching were adjusted for each sample.

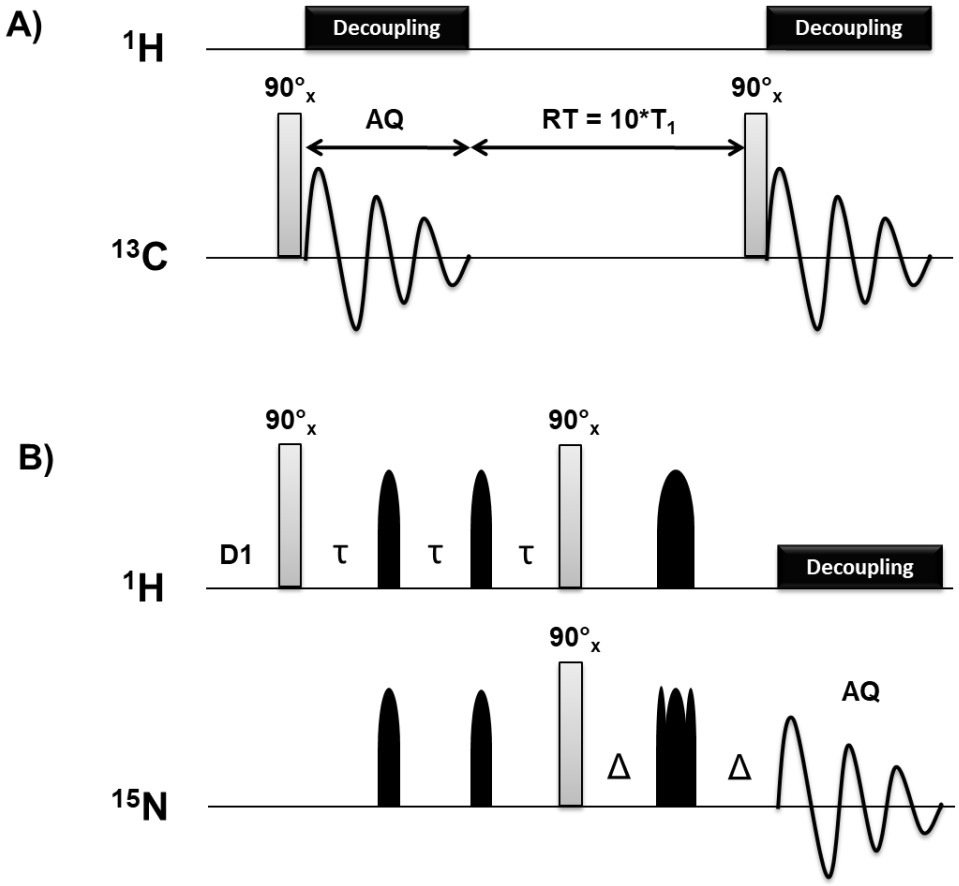


Figure 1: A) Adiabatic decoupling ^{13}C one-pulse sequence using for irm-^{13}C NMR experiments.[25] **B)** Adiabatic refocused double echo INEPT sequence using for irm-^{15}N NMR experiments with ^{1}H and ^{15}N 180° adiabatic full passage inversion pulses and ^{15}N 180° composite refocusing pulses and also adiabatic decoupling. τ is the polarization transfer delay, and Δ is the refocalisation delay. TR = AQ + D1 corresponding to 16 s. (See **Partie III :**)

The experimental parameters for irm-^{13}C NMR as one-pulse acquisition were the following: pulse width 10 µs (90°), sampling period 1 s. The offsets for both ^{13}C and ^{1}H were set at the middle of the frequency range for TNT. 32 scans were acquired using a repetition delay of 130 s corresponding to the full relaxation of ^{13}C ($10 \times T_1 max$), leading to a signal-to-noise ratio (SNR) ≈ 500. Inverse-gated decoupling was applied in order to avoid nuclear Overhauser effect (nOe). The decoupling sequence (**Figure A**) for removing ^{1}H–^{13}C scalar coupling interactions employed a cosine adiabatic pulse with appropriate phase cycles, as described previously.[26] Each measurement consisted of the average of five independently recorded NMR spectra which lead at an experiment time of 5 hours and 50 mins for five consecutive spectra.

For irm-^{15}N NMR experiments using refocused adiabatic INEPT sequence (**Figure B**), typical acquisition parameters were as follows: ^{15}N and ^{1}H offsets were set at 364 and 5.8 ppm, respectively, for TNT and the 90° ^{1}H and ^{15}N high power pulse widths were 10 and 40 µs, respectively. 3200 scans were accumulated to reach SNR > 500 for all peaks with a repetition

time of 16 s corresponding to the full relaxation of ^{1}H ($10 \times T_1 max$). τ was adjusted to 70 ms and Δ to 50 ms. Adiabatic full passage pulses were generated using Mathcad 8 (MathSoft, Inc.). They were designed with a cosine amplitude modulation of the RF field (ω_1^{max} = 157.1 and 93 kHz for ^{15}N and ^{1}H, respectively) and an offset independent adiabaticity (OIA) by optimizing the frequency sweep ΔF (ΔF = 30 and 17 kHz for ^{15}N and ^{1}H, respectively). For inversion pulses and the first refocusing pulses, adiabatic full passage pulses were used. For the second refocusing pulses, composite adiabatic pulses were used. Five spectra were recorded for each measurement with an experiment time of 2 days and 12 hours.

NMR data processing

Free induction decay was submitted to an exponential multiplication inducing a line broadening of 2 Hz for ^{13}C spectra and 1.5 Hz for ^{15}N spectra. After baseline correction, a curve fitting was carried out in accordance with a Lorentzian mathematical model using Perch Software (Perch NMR Software, University of Kuopio, Finland).

The peak areas measured in ^{13}C NMR spectra were corrected for accounting to the presence of ^{13}C-^{13}C isotopomers in the molecule, which give rise to satellite lines.[27] Reduced molar fractions f_{iR} were calculated for C1, C2, C3, C4, C5, N1 and N2 in TNT samples (**Figure 2**) for carbons and nitrogen numbering) according to eq 1:

$$f_{iR} = \frac{S_i}{(F_i \times S_T)} \qquad (1)$$

where S_i defines the corrected surface area of the ^{13}C or ^{15}N peak of site i in a specific spectrum and S_T represents the sum of the surface areas.[24]

From f_{iR} using the global value for δ_b (‰) obtained by irm-EA/MS, the δ_i (‰) for each NMR peak can be calculated following this publication.[28] Then the position-specific carbon or nitrogen content for each carbon or nitrogen i are express as $\delta^{13}C_i$ and $\delta^{15}N_i$ (‰).

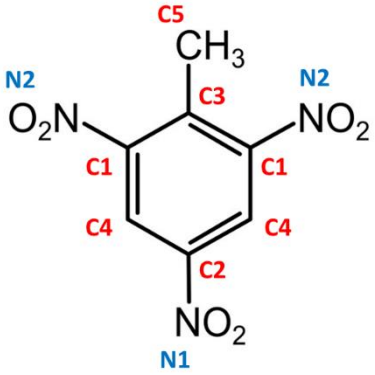


Figure 2: Representation of TNT molecule with carbon and nitrogen sites numbered in decreasing ^{13}C and ^{15}N chemical shift.

Irm-EA/MS: stable-isotope analysis

Carbon ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) isotope ratio measurements are expressed in delta notation $\delta^{13}C_b$ and $\delta^{15}N_b$ (‰)[29] were determined by irm-MS using an Integra2 spectrometer (Sercon Instruments, Crewe, UK) linked to a Sercon elemental analyzer (EA) fitted with an autosampler (Sercon Instruments, Crewe, UK). About 0.7 mg of sample was sealed in a tin capsule. The $\delta^{13}C_b$ and $\delta^{15}N_b$ of the resulting gases, CO_2 and N_2 were determined by reference to a working standard of glutamic acid standardized against calibrated international reference material (IAEA-CH6 and IAEA-CH7 for carbon isotope ratio and IAEA-N1 and IAEA-N2 for nitrogen isotope ratio). The ^{13}C and ^{15}N global (or bulk) isotope compositions of the whole molecule were calculated from:

$$\delta_b\ (‰) = \left(\frac{R}{R_{std}} - 1\right) \times 1000$$

where R is the isotope ratio of the sample and R_{std} is the isotope ratio of Vienna Pee Dee reference standard (V-PDB) for ^{13}C (R_{std} = 0.0112372) or atmospheric air for ^{15}N (R_{std} = 0.003677).

Results and discussion

Reproducibility

We opted to use a much more sensitive instrument: a 700 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe rather than using 400 MHz without cryoprobe. As a result, even by using FS-INEPT the acquisition of one ^{15}N spectrum lasted about 14 hours with SNR > 500. Even if the ability of FS-INEPT sequence to detect small changes in ^{15}N content for each nitrogen has been already demonstrated, the long experiment time (2 days and 8 hours for four spectra) requires to keep attention on the stability of the NMR spectrometer. Moreover, the spin-echo delay using in the FS-INEPT ^{15}N sequence was higher than usual (τ = 70 ms and Δ = 50 ms) which leads to a period of 300 ms before the signal acquisition against 100 ms or under in the previous studies.[24] The short long-range coupling constants between each nitrogen with the neighboring proton implied such a long delays. The loss of signal cannot be neglected and the only way to deal with it was to be sure that the induced signal attenuation was always the same, whatever the sample or the measurement.

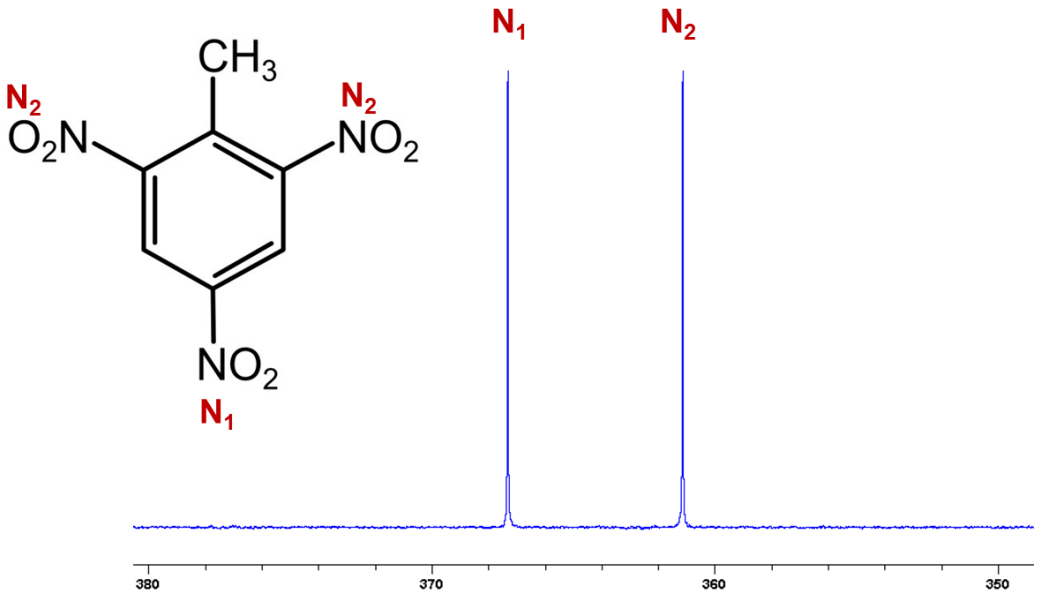


Figure 3: ^{15}N NMR spectrum of a trinitrotoluene (TNT) sample obtained in 14 hours and 13 min by adiabatic refocused FS-INEPT ^{15}N with a signal noise ratio of 500.

The long-term repeatability was established from the standard deviation (SD) obtained from the molar reduced fraction f_{iR} collected from five independent measurements by irm-^{13}C NMR "one-pulse" over three months and irm-^{15}N NMR FS-INEPT over four months. Each measurement constituted of five replicates for irm-^{13}C NMR and four replicates for irm-^{15}N

NMR. For each series, mean ^{13}C and ^{15}N isotopic molar fractions were calculated as well as the associated standard deviations. (See **Table 2**)

Table 2: Standard Deviation (SD) for each carbon[a] and nitrogen[b]

	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**N1**	**N2**
TNT SD (‰)	0.7	0.7	0.7	0.4	0.9	1.6	1.6

[a] SD over five independent measurement by irm-^{13}C NMR "one-pulse" sequence from five replicates, over 3 months, of TNT.

[b] SD over five independent measurement by irm-^{15}N FS-INEPT sequence from four replicates, over 4 months, of TNT.

From **Table 2**, the following conclusions can be drawn: (i) Values determined from NMR spectra recorded using the one-pulse ^{13}C experiment are very precise as expected, SD below 0.9 ‰. (ii) Values of each nitrogen site within TNT can be determined with a sufficient degree of precision from FS-INEPT experiment, SD below 1.6 ‰. These performances is good enough for discrimination purpose of TNT samples

Application to TNT

The present study is pioneering in the use of the intramolecular ^{15}N distribution (PSIA) for classification of an organic molecule with respect to its source. As such the goal of the work was not to collect a large number of samples but rather to highlight the new information brought by irm-^{15}N methodology as compared to irm-MS (^{13}C and ^{15}N) and irm-^{13}C NMR. In this context we did not intend to express each $\delta^{13}C_i$ and $\delta^{15}N_i$ from a calibrated scale. We have shown in a previous work that irm-^{13}C NMR one-pulse does not produce directly the 'true' $\delta^{13}C_i$ since there is a specific response factor for each instrument that can be larger in the case of cryo-probes. Therefore the values presented in Table 3 cannot be used as such for comparison with data from other molecules. A correction factor could be applied if results would have to be positioned on the absolute δ-scale.[30] This is even truer for the expression of the ^{15}N results. The use of FS-INEPT ^{15}N method give only relative intensities which are not only governed by molar fraction f_{iR}, and isotopic abundance x_i but also by the efficiency of the polarization transfer (see Joubert *et al.* publication[24] and **Partie III :**). Nevertheless, the contribution of the multi-pulses sequence to the relative intensities in ^{15}N is always the same for all TNT samples within constant experimental conditions. In both cases (irm-^{13}C and ^{15}N NMR) the interest of the δ_i presentation lies in the incorporation of the global isotope content δ_g (by irm-MS) as

explicated in the calculation mode.[15] The relative scale, as presented herein, is sufficient for comparing isotope profiles between samples from the same molecule.

Table 3: $\delta^{13}C_i$ and $\delta^{15}N_i$ isotopic composition from peak surfaces measured in "one-pulse" ^{13}C NMR spectra and FS-INEPT ^{15}N spectra respectively. $\delta^{13}C_b$ and $\delta^{15}N_b$ bulk composition were also collected by irm-MS method.

	irm-^{13}C NMR					irm-^{15}N NMR		irm-MS	
TNT sample N°	$\delta^{13}C_1$	$\delta^{13}C_2$	$\delta^{13}C_3$	$\delta^{13}C_4$	$\delta^{13}C_5$	$\delta^{15}N_1$	$\delta^{15}N_2$	$\delta^{13}C_b$	$\delta^{15}N_b$
1	33.8	0.8	-48.1	-46.3	-106.0	35.0	-15.5	-25.6	9.7
2	34.5	1.1	-50.9	-25.9	-134.6	2.5	-29.4	-23.9	-13.5
3	26.8	-5.8	-43.8	-41.7	-95.7	21.8	-2.2	-25.0	9.8
4	25.0	-5.8	-43.8	-39.4	-101.4	21.2	-2.2	-25.7	9.5
5	18.9	-14.6	-46.6	-35.7	-92.8	14.3	-20.5	-27.5	-3.1
6	32.4	-5.5	-44.6	-37.8	-106.5	11.3	-12.6	-26.8	-0.6

From **Table 3** five ^{13}C isotopomers and two ^{15}N isotopomers constitute the isotopic profiles of six TNT samples. Irm-MS was also performed on the same samples in order to measure the ^{13}C and ^{15}N bulk composition. The number of samples is not large enough for significant statistical interpretation, but comparison of each profile between samples would indicate the discriminating capability of each technique contribution

The range of measured $\delta^{13}C_b$ values by irm-MS is narrow while it is broader for $\delta^{15}N_b$ values. Generally speaking $\delta^{13}C_b$ is not able to separate clearly the source as $\delta^{15}N_b$ could contribute. Similar signatures for sample 1, 3 and 4 can be observed. Thus from the bulk values it may be thought that these samples are from the same source. This conclusion was not confirmed from position-specific isotopic analyses performed by NMR that raised ambiguities between the $\delta^{13}C_i$ and $\delta^{15}N_i$ values determined by irm-MS.

Irm-^{13}C NMR permit to measure the isotopic composition of the 6 TNT carbon and show great variation between samples, especially on the methyl group ($\delta^{13}C_5$). As expected, TNT samples present a unique isotopic fingerprint for samples 3 and 4 which present a close isotopic fingerprint. Toluene is the raw materials for TNT synthesis and its ^{13}C profile demands on the origin of the crude oil.[31] The nitration process can also impact the isotopic composition of C1 and C2 during the nitrate substitution.

Irm-^{15}N NMR provides $\delta^{15}N_i$ values on the two TNT nitrogen and show a wide isotopic range on these two nitrogen. The samples 3 and 4 have the same isotopic profile in nitrogen confirming that these samples have probably the same origin. Others samples show different

^{15}N isotopic profiles which indicate that the nitric acid using in the TNT synthesis have different origin. In general, irm-^{15}NNMR permit to distinguish different TNT batches especially for the sample 1 which have the same bulk composition than samples 3 and 4 but a different intra-molecular distribution in nitrogen particularly.

Conclusion

The results from this work clearly show that irm- ^{15}N NMR brings new information that are capable to distinguish TNT samples for which other approaches are less performant, especially the bulk value by irm-MS. Thanks to the good long-term repeatability (SD < 1.6‰) of the methodology used (FS-INEPT) the source of TNT sample can be questioned in a tactic or strategic forensic investigation. This work confirms also that the intramolecular $\delta^{13}C_i$ are parameters of importance for discrimination purpose. Then a multi isotopic NMR approach appears determinant and is an excellent complementary tool to irm-MS which shows some limitation.

This first application of irm-^{15}N NMR in a forensic investigation is a proof of concept that opens new perspectives in authenticity, traceability or counterfeiting studies. The results obtained in the present work were achieved using an instrumentation not dedicated to optimum ^{15}N NMR. It is expected that the design of a specific probe would improve dramatically the quality factor and thus the SNR. Other pulse sequences for sensitivity improvement may also be envisaged such as HSQC (1D or 2D).[32,33] These prospects are currently under investigation for driving irm-^{15}N NMR compatible with shorter analysis time and/or smaller amount of product.

Acknowledgments

This work is funded by the French National Research Agency ANR, project FRIIME funded by the project call CE 39. M. Joubert thanks the ANR for funding his PhD bursary through this project.

Conflict of Interest Disclosure

Funding for this research was from a thesis grant to V. J. (see Acknowledgements) and core funding from the CNRS and the French Ministry of Education. There is no conflict of interest.

References

(1) Meyer, R.; Köhler, J.; Homburg, A. *Explosives*, Fifth Edition.; Wiley-VCH, 2002.

(2) McCord, B. R.; Whitehurst, F. W. The Analysis and Characterization of TNT Using Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. *J. Forensic Sci.* **1992**, *37* (6), 1574–1584.

(3) Doyle, S. *Quality and the Trace Detection and Identification of Organic High Explosives*, In Forensic Investigation of Explosions.; CRC Press: Boca Raton, 2012.

(4) Zhao, X.; Yinon, J. Characterization and Origin Identification of 2,4,6-Trinitrotoluene through Its by-Product Isomers by Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2002**, *946* (1), 125–132.

(5) Muccio, Z.; Jackson, G. P. Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst* **2009**, *134* (2), 213–222.

(6) Nissenbaum, A. The Distribution of Natural Stable Isotopes of Carbon As a Possible Tool for the Differentiation of Samples of TNT. *J. Forensic Sci.* **1975**, *20* (3), 455–459.

(7) Coffin, R. B.; Miyares, P. H.; Kelley, C. A.; Cifuentes, L. A.; Reynolds, C. M. Stable Carbon and Nitrogen Isotope Analysis of TNT: Two-Dimensional Source Identification. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20* (12), 2676–2680.

(8) Widory, D.; Minet, J.-J.; Barbe-Leborgne, M. Sourcing Explosives: A Multi-Isotope Approach. *Sci. Justice* **2009**, *49* (2), 62–72.

(9) Lock, C. M.; Meier-Augenstein, W. Investigation of Isotopic Linkage between Precursor and Product in the Synthesis of a High Explosive. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *179* (2–3), 157–162.

(10) Martin, G. J.; Martin, M. L. Deuterium Labelling at the Natural Abundance Level as Studied by High Field Quantitative ^{2}H NMR. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (36), 3525–3528.

(11) Martin, G. J.; Martin, M. L. The Site-Specific Natural Isotope Fractionation-NMR Method Applied to the Study of Wines. In *Wine Analysis*; Linskens, P. D. H.-F., Jackson, P. D. J. F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 1988; pp 258–275.

(12) Remaud, G. S.; Martin, Y.-L.; Martin, G. G.; Martin, G. J. Detection of Sophisticated Adulterations of Natural Vanilla Flavors and Extracts: Application of the SNIF-NMR Method to Vanillin and p-Hydroxybenzaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (3), 859–866.

(13) Remaud, G.; Guillou, C.; Vallet, C.; Martin, G. J. A Coupled NMR and MS Isotopic Method for the Authentication of Natural Vinegars. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, *342* (4–5), 457–461.

(14) Caytan, E.; Botosoa, E. P.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Accurate Quantitative ^{13}C NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific ^{13}C Isotope Ratio Determination. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (21), 8266–8269.

(15) Jézéquel, T.; Joubert, V.; Giraudeau, P.; Remaud, G. S.; Akoka, S. The New Face of Isotopic NMR at Natural Abundance. *Magn. Reson. Chem.* **2017**, *55* (2), 77–90.

(16) Julien, M.; Höhener, P.; Robins, R. J.; Parinet, J.; Remaud, G. S. Position-Specific ^{13}C Fractionation during Liquid–Vapor Transition Correlated to the Strength of Intermolecular Interaction in the Liquid Phase. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (23), 5810–5817.

(17) Merchak, N.; Silvestre, V.; Rouger, L.; Giraudeau, P.; Rizk, T.; Bejjani, J.; Akoka, S. Precise and Rapid Isotopomic Analysis by ^{1}H-^{13}C 2D NMR: Application to Triacylglycerol Matrices. *Talanta* **2016**.

(18) Robins, R. J.; Romek, K. M.; Grand, M.; Nun, P.; Diomande, D.; Julien, M.; Remaud, G. S. Difficulties in Differentiating Natural from Synthetic Alkaloids by Isotope Ratio Monitoring Using ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Planta Med.* **2018**, *84* (12–13), 935–940.

(19) Caytan, E.; Remaud, G. S.; Tenailleau, E.; Akoka, S. Precise and Accurate Quantitative ^{13}C NMR with Reduced Experimental Time. *Talanta* **2007**, *71* (3), 1016–1021.

(20) Thibaudeau, C.; Remaud, G.; Silvestre, V.; Akoka, S. Performance Evaluation of Quantitative Adiabatic ^{13}C NMR Pulse Sequences for Site-Specific Isotopic Measurements. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5582–5590.

(21) Bussy, U.; Thibaudeau, C.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Remaud, G. S.; Silvestre, V.; Akoka, S. Isotopic Finger-Printing of Active Pharmaceutical Ingredients by ^{13}C NMR and Polarization Transfer Techniques as a Tool to Fight against Counterfeiting. *Talanta* **2011**, *85* (4), 1909–1914.

(22) Remaud, G. S.; Bussy, U.; Lees, M.; Thomas, F.; Desmurs, J.-R.; Jamin, E.; Silvestre, V.; Akoka, S. NMR Spectrometry Isotopic Fingerprinting: A Tool for the Manufacturer for Tracking Active Pharmaceutical Ingredients from Starting Materials to Final Medicines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 464–473.

(23) Merchak, N.; Bejjani, J.; Rizk, T.; Silvestre, V.; Remaud, G. S.; Akoka, S. ^{13}C Isotopomics of Triacylglycerols Using NMR with Polarization Transfer Techniques. *Anal. Methods* **2015**, *7* (12), 4889–4891.

(24) Joubert, V.; Silvestre, V.; Grand, M.; Loquet, D.; Ladroue, V.; Besacier, F.; Akoka, S.; Remaud, G. S. Full Spectrum Isotopic ^{13}C NMR Using Polarization Transfer for Position-Specific Isotope Analysis. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (14), 8692–8699.

(25) Tenailleau, E.; Akoka, S. Adiabatic ^{1}H Decoupling Scheme for Very Accurate Intensity Measurements in 13C NMR. *J. Magn. Reson.* **2007**, *185* (1), 50–58.

(26) Tenailleau, E.; Remaud, G.; Akoka, S. Quantification of the ^{1}H-Decoupling Effects on the Accuracy of ^{13}C-NMR Measurements. *Instrum. Sci. Technol.* **2005**, *33* (4), 391–399.

(27) Zhang, B. L.; Trierweiler, M.; Jouitteau, C.; Martin, G. J. Consistency of NMR and Mass Spectrometry Determinations of Natural-Abundance Site-Specific Carbon Isotope Ratios. The Case of Glycerol. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (13), 2301–2306.

(28) Silvestre, V.; Mboula, V. M.; Jouitteau, C.; Akoka, S.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Isotopic ^{13}C NMR Spectrometry to Assess Counterfeiting of Active Pharmaceutical Ingredients: Site-Specific ^{13}C Content of Aspirin and Paracetamol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50* (3), 336–341.

(29) Coplen, T. B. Guidelines and Recommended Terms for Expression of Stable-Isotope-Ratio and Gas-Ratio Measurement Results. *Rapid Commun. Mass Spectrom. 25* (17), 2538–2560.

(30) Bayle, K.; Gilbert, A.; Julien, M.; Yamada, K.; Silvestre, V.; Robins, R. J.; Akoka, S.; Yoshida, N.; Remaud, G. S. Conditions to Obtain Precise and True Measurements of the Intramolecular ^{13}C Distribution in Organic Molecules by Isotopic ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *846*, 1–7.

(31) Julien, M.; Nun, P.; Höhener, P.; Parinet, J.; Robins, R. J.; Remaud, G. S. Enhanced Forensic Discrimination of Pollutants by Position-Specific Isotope Analysis Using Isotope Ratio Monitoring by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Talanta* **2016**, *147*, 383–389.

(32) Giraudeau, P. Quantitative 2D Liquid-State NMR. *Magn. Reson. Chem.* **2014**, *52* (6), 259–272.

(33) Giraudeau, P. Challenges and Perspectives in Quantitative NMR. *Magn. Reson. Chem.* **2017**, *55* (1), 61–69.

V-3) Données complémentaires

Table S1: Constantes de couplage longues distances ($^3J_{N-H}$) pour la molécule de TNT.

2,4,6-Trinitrotoluène (TNT)	$^3J_{N-H}$ (Hz)
N1	3,4
N2	2,8

V-4) Conclusion

La méthode FS-INEPT ^{15}N a été appliquée dans le cadre d'une application forensique sur la molécule de TNT et ouvre l'accès à de nouvelles informations isotopiques qui ne sont pas accessible avec l'irm-MS. Grâce à sa reproductibilité intra-laboratoire (< 1,6‰) et au gain de sensibilité apporté par la méthode FS-INEPT il est maintenant possible d'établir ou non un lien entre les différents lots de TNT. En complément, la composition isotopique site-spécifique ^{13}C permet également de discriminer ces différents échantillons de TNT. Pour la première fois, une combinaison de l'irm-^{13}C et ^{15}N NMR sur l'étude des isotopes montre son intérêt là ou l'irm-MS seule peut se montrer limitée.

Cependant, comme évoqué dans la **Partie III :** la sensibilité du spectromètre RMN utilisé n'est pas optimum pour le ^{15}N du faite de l'utilisation d'une cryosonde inverse (sensibilité ^{1}H). L'utilisation d'une cryosonde dédiée ^{15}N pourrait réduire ce temps d'expérience, environ 14h / spectre, en optimisant le S/B et le facteur de qualité de la sonde. De plus, une autre séquence multi-impulsionnelle telle que l'HSQC (1D ou 2D) pourrait être utilisée pour augmenter encore cette sensibilité afin d'obtenir des temps d'expériences plus courts et/ou une quantité de produit plus faible pour l'analyse.

L'analyse d'autres échantillons de TNT est envisagée afin de combiner l'analyse PCA aux méthodes irm-MS et irm-NMR qui requiert une quantité minimum de 10 échantillons.

Conclusion générale et perspectives

L'intérêt de l'utilisation de l'irm-^{13}C NMR et de l'irm-^{15}N NMR en complément de l'analyse isotopique par irm-MS dans le cadre du suivi des agents de coupage contenu dans les produits stupéfiants ainsi que le suivi d'explosif comme le TNT a pu être démontré dans ce projet. Dans le cas de l'irm-NMR, cette méthode conduit à la détermination de la teneur en carbone-13 et en azote-15 de chaque atome constituant la molécule et on parle ainsi de quantification des isotopomères ^{13}C et ^{15}N. Dans le cas de l'irm-MS, c'est la teneur globale en ^{13}C et/ou en ^{15}N qui est obtenue. Les données complémentaires apportées par la PSIA permettent une meilleure compréhension du phénomène de coupage de l'héroïne ainsi qu'une détermination de l'origine de ces produits de coupage et de la TNT avec plus de certitude.

La première problématique de ce projet était de savoir si la méthode utilisée en irm-^{13}C NMR pouvait être améliorée tout en gardant une précision de 0,1%. Il a été montré qu'en utilisant une séquence multi-impulsionnelles « INEPT » avec un transfert de polarisation des protons sur tous les carbones de la molécule quelles que soient leurs constantes de couplage ($^{n}J_{CH}$), celle-ci permettait d'augmenter la sensibilité par apport à une séquence mono-impulsionnelle jusqu'à un facteur 3. Cette méthode appelée « FS-INEPT » permet donc d'obtenir un profil isotopique complet en ^{13}C, contrairement à la séquence INEPT adiabatique refocalisée ^{1}J, utilisée jusqu'à présent, qui ne s'intéressait qu'au couplage direct ^{1}H-^{13}C ($^{1}J_{CH}$) et engendrait une perte d'information sur les carbones quaternaires. Ces informations se sont avérées utiles pour la discrimination des origines du paracétamol et de la caféine puisque certains carbones quaternaires contribuent fortement dans cette détermination. Les caféines d'origines commerciales et naturelles ont ainsi pu être différenciées selon leur profil isotopique ^{13}C avec une différenciation entre les échantillons naturels issus du thé, du café, du cola et du guarana. Pour le paracétamol issu de différents laboratoires pharmaceutiques il a été montré que chaque échantillon possédait un profil isotopique ^{13}C propre à la molécule.

L'étude des conditions méthodologiques nécessaires pour mettre au point l'irm-^{15}N NMR a permis de répondre à la deuxième problématique de ce projet, posée en introduction, concernant les conditions requises pour l'implémentation d'une séquence RMN de haute précision afin de mesurer la composition isotopique position-spécifique en ^{15}N. La FS-INEPT ^{13}C a pu être transposée pour pouvoir effectuer des mesures isotopiques position-spécifiques en ^{15}N et obtenir un gain important en sensibilité. Après transposition de cette séquence, une preuve de

concept sur le 1-methylimidazole a permis de mesurer le facteur d'enrichissement au cours du fractionnement isotopique induit durant un processus de chromatographie liquide avec une précision de 0,1% et rendant pour la première fois possible la mesure PSIA par irm-^{15}N NMR. De plus, une étude complémentaire utilisant cette technologie a permis d'affiner le profil isotopique d'échantillon de TNT en obtenant une discrimination de l'origine pour chaque échantillon tout en gardant une précision de 0,1% dans le cadre d'une application forensique.

L'utilisation des mesures isotopiques position-spécifiques en ^{13}C apporte de nouveaux éléments permettant de retracer l'origine des agents de coupage contenu dans l'héroïne dans le cadre d'une étude forensique. Les résultats obtenus permettent de répondre à la troisième problématique de ce projet sur les avantages d'une telle méthode. L'irm-^{13}C NMR conduit à une augmentation du nombre de paramètres permettant une caractérisation plus précise de l'origine de l'agent de coupage étudiée par apport à l'irm-MS utilisée jusqu'à présent. Nous avons montré que dans certains cas une même affaire judiciaire peut contenir des lots différents d'agent de coupage. Il a également été montré que le paracétamol et la caféine étaient utilisés en mélange par les trafiquants et ajoutés en même temps dans le processus d'adultération de l'héroïne permettant d'obtenir un suivi commun de ces molécules dans les réseaux de distributions. Cette application a été rendue possible grâce à la mise au point de la méthode FS-INEPT en irm-^{13}C NMR permettant de travailler sur des quantités plus faibles par apport à la séquence mono-impulsionnelle classiquement utilisée (40 mg vs 250 mg).

Actuellement, lors des saisies de produits de coupage comme le paracétamol et la caféine aucune classification n'est possible pour ces molécules et par conséquent aucune procédure pénale n'est alors menée contre la personne interpellée, sauf si le produit est vendu comme stupéfiant. L'irm-^{13}C NMR a montré qu'il était possible d'établir un lien entre ces produits et les saisies de stupéfiants coupés par ces premiers grâce à la détermination du profil isotopique de chaque molécule impliquée dans le coupage d'un stupéfiant. D'un point de vue tactique et stratégique, cet outil permettrait à l'INPS de mettre en évidence la participation indirecte à un trafic de stupéfiant, par la mise en avant d'un lien entre les produits de coupage saisis et les saisies de stupéfiants coupés par ces premiers dans d'autres affaires judiciaires. Cela ne garantit par la poursuite pénale, mais permettrait à la police de justifier une surveillance et de continuer les investigations. De plus, lors de l'identification d'un site de production d'agents de coupage il serait possible grâce à l'irm-^{13}C NMR de démontrer un lien avec des saisies de stupéfiants coupées et poursuivre ainsi pénalement les employés et ceux qui détournent les produits.

Malgré l'intérêt d'utiliser l'irm-^{13}C et ^{15}N NMR avec la méthode FS-INEPT pour les études isotopiques dans le domaine forensique, certaines limites peuvent encore exister. En effet, la caféine pourrait être analysée par l'irm-^{15}N NMR car cette molécule possède 4 azotes ce qui rendrait le profil isotopique bien plus complet. Cependant, la caféine est peu soluble dans les solvants organiques (< 100 mg) rendant la mesure très longue (> 1 semaine) et non réalisable pour une série d'échantillons. Pour pallier ce défaut de sensibilité une sonde spécifiquement dédiée à l'observation directe du noyau ^{15}N pourrait être envisagée. Même si la sonde utilisée dans ces travaux de thèse est une cryosonde, la configuration inverse (optimisée pour le ^{1}H) n'est pas optimale pour un noyau comme le ^{15}N. De plus, une autre séquence pourrait améliorer le S/B comme l'HSQC 1D (ou 2D) pour analyser la molécule de caféine.

Par ailleurs, l'application forensique à la cocaïne et ses produits de coupage pourrait être envisagée. En effet, des molécules comme la caféine et la phénacétine sont régulièrement utilisées pour le coupage de la cocaïne et pourraient être sujettes à des mesures isotopiques par le biais de la méthode FS-INEPT ^{13}C afin de différencier les différents lots et émettre des liens entre les différentes saisies policières. De même que pour les saisies de paracétamol/caféine en mélange, des saisies de caféine et de phénacétine pures sont également fréquemment effectuées par la police. L'irm-^{13}C NMR appliquée sur ce type de saisie pourrait émettre en évidence un lien entre les différentes saisies de ces produits de coupage et de ceux contenus dans la cocaïne saisie par la police.

D'une manière générale, l'apport de nouveaux paramètres tels que la composition position-spécifique ^{13}C et ^{15}N enrichissent les connaissances actuelles. Tous les outils disponibles tels que l'irm-MS et l'irm-NMR combinées aux outils statistiques (ACP et méthode de comparaison) sont complémentaires et permettent une description de plus en plus fine des phénomènes et des différents liens observés.

Annexes

Liste des figures

Partie I : Rappels bibliographiques

Figure 1 : Procédé de synthèse permettant d'obtenir de l'héroïne pure à partir de l'opium cultivé dans le pavot somnifère. 8
Figure 2 : Procédé de synthèse permettant d'obtenir de la cocaïne sous forme de sel chlorhydrate à partir des feuilles de coca issues du cocaïer. 10
Figure 3 : Représentation des 3 étapes clés dans le profilage chimique effectué par la police scientifique. 13
Figure 4 : Représentations des adultérants principaux retrouvés dans l'héroïne de rue : le paracétamol et la caféine 18
Figure 5 : Représentations chimiques des adultérants principaux retrouvés dans la cocaïne de rue : la phénacétine, le lévamisole et la caféine. 19
Figure 6 : Définition et généralité sur les isotopes. Cas des différents isotopes du carbone 24
Figure 7 : Différence entre un isotopologue et un isotopomère. Exemple avec la molécule d'éthanol. Les isotopologues différent uniquement selon leur composition en isotope tandis que les isotopomères ont le même nombre d'isotopes lourds qui différent par leur position dans la molécule. 26
Figure 8 : Equilibre initial du système soumis au champ B0 avant l'utilisation d'une impulsion RF. 32
Figure 9 : Application de l'impulsion RF : apparition du champ B_1 qui bascule l'aimantation dans le plan transversal. 33
Figure 10 : Représentation schématique des différents termes métrologiques avec en : A) la représentation de la justesse d'une méthode avec une mauvaise précision, B) la représentation de la précision d'une méthode avec une mauvaise justesse et C) représente le résultat exact provenant d'une méthode juste et précise. 37
Figure 11 : Représentation d'une séquence RMN impulsionnelle classique en ^{13}C. α : angle de l'impulsion RF, AQ : Temps d'acquisition, TR : Temps de répétition et D1 : délai de relaxation. 38
Figure 12 : Spectre ^{13}C de la vanilline A) sans découplage et B) avec découplage ^{1}H. 41
Figure 13 : Séquence mono-impulsionnelle ^{13}C utilisant un découplage ^{1}H en créneau inverse afin de minimiser l'influence du nOe. Le temps de répétition (TR) est égale à D1 + AQ. 42
Figure 14 : Variation des intensités relatives (Δ) en fonction de l'offset de découplage ^{1}H de deux échantillons bi-marqués : l'acide acétique (-●-) et de l'éthanol (-■-). Les expériences de découplages ont été réalisées avec une séquence WALTZ-16 (a) ou une séquence utilisant des impulsions cos/OIA[103] (b). 43

Figure 15 : Spectre RMN ^{13}C découplé ^{1}H acquis avec la séquence « one-pulse ». Présence d'un doublet dû au couplage ^{13}C-^{13}C induit par un isotopologue de la molécule. 45
Figure 16 : Séquence DEPT multi-impulsionnelles. Elle permet d'obtenir des raies positives et/ou négatives en fonction de l'angle α utilisé sur la dernière impulsion ^{1}H. (DEPT 45, DEPT 90 ou DEPT 135) 51
Figure 17 : Evolution en fonction de α de l'intensité recueillie avec la séquence DEPT pour les systèmes de spins CH_n. (Courbe continue n=1, pointillés n=2 et tirets n = 3). 52
Figure 18 : Séquence DEPT dans laquelle les impulsions RF à 180° de refocalisation et de découplage sont des impulsions adiabatiques de formes cos/OIA.[125] 53
Figure 19 : Séquence INEPT-refocalisée proposée par Burum et Ernst.[126] Elle permet d'obtenir des raies positives et/ou négatives en fonction du délai Δ utilisé. 54
Figure 20 : Evolution en fonction du délai Δ de l'intensité recueillie avec la séquence INEPT-refocalisée pour les systèmes de spins CH_n. (Courbe continue n=1, pointillés n=2 et tirets n = 3) 55
Figure 21 : Séquence INEPT-refocalisée dans laquelle les impulsions RF à 180° d'inversion, de refocalisation et de découplage sont des impulsions adiabatiques de formes cos/OIA.[125] 56
Figure 22 : Schématisation de la distance Euclidienne. 70
Figure 23 : Schématisation de la distance cosinus. 71
Figure 24 : Estimation de la performance de séparation des 2 types de population : échantillons liés et non liés. Trois situations possibles a), b) et c). 72

Partie II : Développement de la RMN isotopique du ^{13}C utilisant un transfert de polarisation sur tout le spectre pour la mesure en position-spécifique (FS-INEPT)

Article

Figure 1: The ^{13}C INEPT sequence. τ is the polarization transfer delay and Δ is the refocalisation delay. 180° proton and carbon pulses of the sequence were composite adiabatic pulses for refocalisation and adiabatic for inversion, in order to minimize the influence of imperfections and off-resonance effects on the precision of the measured ^{13}C peak areas (adapted from[25]). 90
Figure 2: A) Caffeine molecules with carbon sites numbered in decreasing ^{13}C chemical shift and at the right carbons detected by INEPT using $^{1}J_{CH}$ (in blue) and by FS-INEPT using long range coupling between carbon and hydrogen, $^{n}J_{CH}$, in red. **B)** Paracetamol molecules with carbon sites numbered in decreasing ^{13}C chemical shift and at the right carbons detected by INEPT using $^{1}J_{CH}$ (in blue) and by FS-INEPT using long range coupling between carbon and hydrogen, $^{n}J_{CH}$, in red. 90
Figure 3: **A)** Principal component analysis on caffeine: PC1 (39%) vs PC2 (23.7%) bi-plot (scores + loadings) using the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments. **B)** Principal component analysis on caffeine: PC1 (38.4%) vs PC2 (25.4%) bi-plot (scores + loadings) using

the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C-IRMS. Triangle stands for the loadings (contribution of each measured parameter) used and blue square for the scores (sample identification). The loadings ^{13}C and f_4/F_4 have fortuitously the same position. 99
Figure 4: A) Principal component analysis on paracetamol: PC1 (53.7%) vs PC2 (22.4%) bi-plot (scores + loadings) using the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments. **B)** Principal component analysis on paracetamol: PC1 (50.4%) vs PC2 (23.2%) bi-plot (scores + loadings) using the whole experimental variables set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and IRMS. Triangle stands for the loadings (contribution of each measured parameter) used and blue square for the scores (sample identification)..... 100

Donnés complémentaires

Figure S1: Spectre RMN ^{13}C d'un échantillon de paracétamol obtenu en 33 minutes par une acquisition FS-INEPT ^{13}C avec un S/B de 500..... 105
Figure S2: Spectre RMN ^{13}C d'un échantillon de caféine obtenu en 55 minutes par une acquisition FS-INEPT ^{13}C avec un S/B de 500. 106

Partie III : Développement de la RMN isotopique du ^{15}N haute précision utilisant un transfert de polarisation pour la mesure position-spécifique

Article

Figure 1: Adiabatic refocused double echo INEPT sequence with ^{1}H and ^{15}N 180° adiabatic full passage inversion pulses and ^{15}N 180° composite refocusing pulses. τ is the polarization transfer delay, and Δ is the refocalisation delay. TR = AQ + D1 corresponding to 21 s. The decoupling is also using adiabatic pulses.[23] 114
Figure 2: ^{15}N NMR spectrum of 1-methylimidazole sample from Sigma-Aldrich obtained in 3 hours and 8 min by adiabatic refocused FS-INEPT ^{15}N with a signal noise ratio up to 500. 1-methylimidazole molecule with carbon and nitrogen sites numbered in decreasing ^{13}C and ^{15}N chemical shift. 116
Figure 3: Enrichment factor ε (‰) obtained from irm-EA/MS (bulk, ε_{bulk}) or from irm-^{13}C NMR (a) in blue and irm-^{15}N NMR (b) in red (position-specific, ε_i) upon separation process in silica gel column. Broken black lines represent limits for significant effects SD (‰) of the method. Positive enrichment factors mean an inverse isotope effect in which heavy isotopomers ^{13}C and ^{15}N are preferentially transferred to the first fraction (5% residue): the remaining liquid is thus depleted in ^{13}C and ^{15}N. Conversely, it is the opposite for negative enrichment factors. Also shown are the molecular structures of 1-methylimidazole with the carbon and nitrogen numbering in relation to decreasing ^{13}C and ^{15}N chemical shift in the ^{13}C and ^{15}N NMR spectrum. 118

Supporting information

Figure S1: ^{13}C NMR spectrum of 1-methylimidazole sample from Sigma-Aldrich obtained in 20 min by one pulse ^{13}C acquisition with a signal noise ratio of 500. 124

Partie IV : Application de la méthode FS-INEPT du ^{13}C pour l'analyse « isotopomics » des agents de coupage : une nouvelle approche pour aider à l'élucidation des trafics de drogues illégales

Article

Figure 1: Caffeine (A) and paracetamol (B) molecules with carbon sites numbered in decreasing ^{13}C chemical shift. 134
Figure 2: Nitrogen vs carbon data for caffeine samples from seizures in orange and standards in blue analyzed by irm-MS. 137
Figure 3: Principal component analysis on caffeine samples: PC1 (39.1%) vs PC2 (19.8%) plot (scores) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. The black triangle stands for the scores from cutting agents seizures (M or C), the inverted white triangle stands for the scores from heroin seizures (H) and the black star stands for the scores from commercial product (See Table S1 for sample identification). 138
Figure 4: Principal component analysis on paracetamol from cutting agents seizures (M), heroin seizures (H) and commercial product: PC1 (38.4%) vs PC2 (23.8%) plot (scores) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C-irm-MS. The black triangle stands for the scores from cutting agents seizures (M), the inverted white triangle stands for the scores from heroin seizures (H) and the black star stands for the scores from commercial product (See Table S2 for sample identification). 139
Figure 5: Principal component analysis on the paracetamol/caffeine data combination from seizures: PC1 (33.3%) vs PC2 (20.2%) plot (scores) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. The black triangle stands for the seized cutting agents (M) scores and inverted white triangle stands for the seized heroin (H) scores (See Table S3 for sample identification). 141
Figure 6: Diagram of correlation of Linked and Not linked samples based on Euclidian distance calculation over irm-NMR (fiR) and irm-MS data ($\delta 13Cg$ and $\delta 15Ng$). 142

Supporting information

Figure S1: A) Principal component analysis on caffeine from seizures: PC1 (39.1%) vs PC2 (19.8%) plot (loadings) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. **B)** Principal component analysis on paracetamol from seizures: PC1 (38.4%) vs PC2 (23.8%) plot (loadings) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C-irm-MS. The black triangle stands for the loadings (contribution of each measured parameter)..... 149

Figure S2: Principal component analysis on the paracetamol/caffeine data combination from seizures: PC1 (33.3%) vs PC2 (20.2%) plot (loadings) using the whole experimental variable set from ^{13}C FS-INEPT NMR experiments and ^{13}C and ^{15}N-irm-MS. The black triangle stands for the loadings of paracetamol and caffeine (contribution of each measured parameter). 150

Figure S3 : PCA sur les échantillons de caféine issus des agents de coupage saisis (carrés bleus), des échantillons d'héroïnes saisis (triangles rouges) et des produits commerciaux (carrés oranges) : PC1 (42,3%) vs PC3 (13,6%) plot (scores) utilisant toutes les variables issues des expériences FS-INEPT ^{13}C par RMN et irm-MS ^{13}C. 151

Figure S4 : PCA sur les échantillons de paracétamol issus des agents de coupage saisis (carrés bleus), des échantillons d'héroïnes saisis (triangles rouges) et des produits commerciaux (carrés oranges) : PC1 (41,3%) vs PC3 (21,1%) plot (scores) utilisant toutes les variables issues des expériences FS-INEPT ^{13}C par RMN et irm-MS ^{13}C. 152

Figure S5 : PCA sur les échantillons de caféine et de paracétamol issus des agents de coupage saisis (carrés bleus) et des échantillons d'héroïnes saisis (triangles rouges): PC1 (39,9%) vs PC3 (14,9%) plot (scores) utilisant toutes les variables issues des expériences FS-INEPT ^{13}C par RMN et irm-MS ^{13}C. 153

Partie V : Application de la méthode FS-INEPT du ^{15}N sur le TNT

Article

Figure 1: A) Adiabatic decoupling ^{13}C one-pulse sequence using for irm-^{13}C NMR experiments.[25] **B)** Adiabatic refocused double echo INEPT sequence using for irm-^{15}N NMR experiments with ^{1}H and ^{15}N 180° adiabatic full passage inversion pulses and ^{15}N 180° composite refocusing pulses and also adiabatic decoupling. τ is the polarization transfer delay, and Δ is the refocalisation delay. TR = AQ + D1 corresponding to 16 s. (See **Partie III :**)..... 162

Figure 2: Representation of TNT molecule with carbon and nitrogen sites numbered in decreasing ^{13}C and ^{15}N chemical shift. 164

Figure 3: ^{15}N NMR spectrum of a trinitrotoluene (TNT) sample obtained in 14 hours and 13 min by adiabatic refocused FS-INEPT ^{15}N with a signal noise ratio of 500. 165

Liste des tableaux

Partie I : Rappels bibliographiques

Tableau I : Influence du temps de répétition en fonction de la justesse de la mesure RMN 39
Tableau II : Effets des impulsions RF 180° ^{1}H et ^{13}C sur la précision de la détermination des aires mesurées avec les séquences DEPT et INEPT utilisant deux formes d'impulsions différentes : rectangulaire ou adiabatique. 57
Tableau III : Variation intra-échantillon sur l'ibuprofène avec l'acquisition de 5 spectres RMN consécutifs afin d'évaluer la répétabilité à court terme. 58
Tableau IV : Variation intra-échantillon sur l'ibuprofène avec l'acquisition sur 5 préparations différentes afin d'évaluer la reproductilibité intra-laboratoire. 59
Tableau V : Propriétés RMN des noyaux principaux, ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N 63

Partie II : Développement de la RMN isotopique du ^{13}C utilisant un transfert de polarisation sur tout le spectre pour la mesure en position-spécifique (FS-INEPT)

Article

Table 1: Symbol used in this work 88
Table 2: Identification of the different caffeine samples by their origins. 92
Table 3: Identification of the different paracetamol samples by origin and manufacturer/supplier. 94
Table 4: ^{n}JC-H scalar coupling constants (including ^{1}J) for both molecules caffeine and paracetamol obtained during this work by performing a ^{1}H coupled ^{13}C NMR spectrum. C3 and C5 of caffeine and C1 of paracetamol have two different ^{n}JC-H coupling constants. 97
Table 5: Standard deviation (SD) for each carbon (see **Figure 3** for carbon numbering) over five independent measurements by irm-^{13}C FS-INEPT from five samples replicate, over one year, of caffeine and paracetamol. The values have been multiplied by 1000 for a better readability and thus expressed in ‰. 98

Données complémentaires

Table S1: Fractions molaires réduites (fiR) pour chaque carbone mesuré par la méthode FS-INEPT ^{13}C, ainsi que la moyenne de la composition isotopique globale ($\delta^{13}C_b$) déterminée par irm-MS pour les échantillons de caféine et de paracétamol décrits en **Table II** et **Table III.** Les valeurs de moyenne et de déviation standard (SD) ont été calculées à partir de 18 échantillons de caféine et 16 échantillons de paracétamol. 106

Partie III : Développement de la RMN isotopique du ^{15}N haute précision utilisant un transfert de polarisation pour la mesure position-spécifique

Article

Table 1: Partial reduced molar fractions (fiR) and standard deviation (SD) obtained over five independent measurements by irm-^{15}N FS-INEPT from five replicates, over six months, of 1-methylimidazole. The SD values have been multiplied by 1000 for a better readability and are thus expressed in ‰. See **Figure 2** for nitrogen numbering of 1-methylimidazole. 116
Table 2: ^{13}C and ^{15}N composition (‰) obtained by irm-^{13}C NMR ($\delta^{13}C_i$) and irm-^{15}N NMR ($\delta^{15}N_i$) of 1-methylimidazole Sigma-Aldrich product and TCI product (brut) and after (fractionated product) the separation process. Each line of the table represent one experiment with the average of 5 spectra.... 117

Données complémentaires

Table S1: Constantes de couplage longues distances ($^2J_{N-H}$) pour la molécule de 1-methylimidazole. 124

Partie IV : Application de la méthode FS-INEPT du ^{13}C pour l'analyse « isotopomics » des agents de coupage : une nouvelle approche pour aider à l'élucidation des trafics de drogues illégales

Article

Table 1: Identification of the different TNT samples by their origins..... 161
Table 2: Standard Deviation (SD) for each carbon[a] and nitrogen[b] 166
Table 3: δ13Ci and δ15Ni isotopic composition from peak surfaces measured in "one-pulse" ^{13}C NMR spectra and FS-INEPT ^{15}N spectra respectively. δ13Cb and δ15Nb bulk composition were also collected by irm-MS method**.** 167

Supporting information

Table S1: Identification of the different caffeine samples by case number. 146
Table S2: Identification of the different paracetamol samples by case number. 147
Table S3: Identification of samples containing both caffeine and paracetamol found as a cutting mixture, or mixed with heroin 148

Partie V : Application de la méthode FS-INEPT du ^{15}N sur le TNT

Article

Données complémentaires

Table S1: Constantes de couplage longues distances ($^{3}J_{N-H}$) pour la molécule de TNT..... 171

Valorisation scientifique

Articles dans des revues disposant d'un comité de lecture

1- **T. Jézéquel, V. Joubert**, P. Giraudeau, G.S. Remaud, S. Akoka, The new face of isotopic NMR at natural abundance, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 55 (2017) 77–90.

2- **V. Joubert**, V. Silvestre, M. Grand, D. Loquet, V. Ladroue, F. Besacier, S. Akoka, and G.S. Remaud, Full Spectrum Isotopic ^{13}C NMR Using Polarization Transfer for Position-Specific Isotope Analysis, *Anal. Chem.,* 2018, 90 (14), pp 8692–8699

Communications dans des congrès

Présentation d'un poster

1- 8ème Journées de l'Ecole Doctorale (JED) 3MPL, 23-24 juin 2016, Nantes Forensic Research using Isotope Intra-Molecular Experiments: Development and use of quantitative ^{13}C and ^{15}N NMR spectrometry" - **V. Joubert**, V. Silvestre, S. Akoka , G.S. Remaud

2- 8th International Symposium on Isotopomer (ISI2016), 3-6 octobre 2016, Nantes (France) - "Development of irm-^{15}N NMR for position-specific isotope analysis" - **V. Joubert**, V. Silvestre, V. Ladroue, F. Besacier, S. Akoka, and G.S. Remaud

3- 11ème édition du Workshop Interdisciplinaire sur la Sécurité Globale (WISG), 14-15 septembre 2017, Paris (France) – « Expériences de mesures intra-moléculaires isotopiques pour la police scientifique : Développement et utilisation de la spectrométrie RMN quantitative ^{13}C et ^{15}N » - **V. Joubert,** S. Akoka , G.S. Remaud

4- European Magnetic Resonance Meetings (EUROMAR 2018), 1-5 Juillet 2018, Nantes (France) - "Development of high-precision quantitative ^{15}N NMR using modified polarization transfer INEPT for "isotopomics" studies" - **V. Joubert**, V. Ladroue, F. Besacier, S. Akoka, and G.S. Remaud

Communications orales

1- The Cross-Disciplinary Conference on Stable Isotope Sciences (ISOTOPES2017), 9-14 juillet 2017, Ascona (Suisse) - "Increased sensitivity for position-specific isotope analysis by irm-^{13}C NMR using INEPT" – **V. Joubert**

2- Autumn Meetings on Isotopomics (AMIS2017), 12 Octobre 2017, Laboratoire CEISAM, Nantes - "Increased sensitivity for position-specific isotope analysis by irm-^{13}C NMR using INEPT" - **V. Joubert**

3- Young scientist symposium (8th) (SFIS2017), 9-11 Octobre 2017, Laboratoire CEISAM, Nantes (France) - « Gain de sensibilité pour l'analyse isotopique position spécifique par irm-^{13}C NMR utilisant l'INEPT » - **V. Joubert**

4- 8th European Academy of Forensic Science (EAFS2018), 29-31 Août 2018, Lyon (France) - "Isotopomics analysis by irm-^{13}C NMR on cutting agents: a new approach for illicit drugs trafficking route elucidation" – **V. Joubert**

Feature article review

MRC

Received: 13 July 2016 Revised: 28 October 2016 Accepted: 2 November 2016 Published online in Wiley Online Library: 5 December 2016

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/mrc.4548

The new face of isotopic NMR at natural abundance

Tangi Jézéquel,[a] Valentin Joubert,[a] Patrick Giraudeau,[a,b] Gérald S. Remaud[a] and Serge Akoka[a]*

The most widely used method for isotope analysis at natural abundance is isotope ratio monitoring by Mass Spectrometry (irm-MS) which provides bulk isotopic composition in ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O or ^{34}S. However, in the 1980s, the direct access to Site-specific Natural Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR^{TM}) was immediately recognized as a powerful technique to authenticate the origin of natural or synthetic products. The initial – and still most popular – application consisted in detecting the chaptalization of wines by irm-^{2}H NMR. The approach has been extended to a wide range of methodologies over the last decade, paving the way to a wide range of applications, not only in the field of authentication but also to study metabolism. In particular, the emerging irm-^{13}C NMR approach delivers direct access to position-specific ^{13}C isotope content at natural abundance. After highlighting the application scope of irm-NMR (^{2}H and ^{13}C), this article describes the major improvements which made possible to reach the required accuracy of 1‰ (0.1%) in irm-^{13}C NMR. The last part of the manuscript summarizes the different steps to perform isotope analysis as a function of the sample properties (concentration, peak overlap) and the kind of targeted isotopic information (authentication, affiliation). Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: isotope analysis; SNIF-NMR; irm-NMR; Position-Specific Isotope Analysis; internal standard

Introduction

Isotopic analysis at natural abundance is a powerful tool to track the origin of molecules. Isotopic fractionation may induce small, but significant variations in the isotope composition of molecules, and these variations depend on the physical or (bio)chemical processes which have led to these compounds. The determination of the isotope content is used in a wide range of scientific applications such as food science, pharmaceutical industry, environmental or forensic sciences, geochemistry, archaeology, ecology or metabolic studies.[1]

Isotope ratio monitoring Mass Spectrometry (irm-MS) is the most commonly used technique to determine the bulk isotopic composition of a sample, that is, the average isotope composition.[2,3] Irm-MS makes it possible to measure small variations in the natural abundance of major stable isotopes found in natural processes: ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O and ^{34}S. Other less common isotopic analysis techniques for bulk isotopic composition have been reported, such as isotope ratio infrared spectroscopy (IRIS)[4,5] or multiple collector–inductively coupled plasma–mass spectrometry (MC-ICP-MS).[6] However, these techniques do not enable Position-Specific Isotope Analysis (PSIA) without a previous degradation (chemical, biochemical and pyrolysis). This is a major limitation, because the isotope distribution on the different chemical positions of a molecule provides additional information about its origin.[7–10] Pyrolysis fragmentation has the advantage to be performed on-line coupled to GC-irm-MS (Py-GC/irm-MS),[11] but it gives access to four C-atom positions at most in the molecule. Recently, Eiler *et al.*[12] proposed an alternative method based on high-resolution MS, but it is not widely used yet for isotope analysis.

In 1981, an alternative method to measure position-specific ^{2}H isotope compositions based on Nuclear Magnetic Resonance spectrometry (SNIF-NMR^{TM}) was proposed by Martin *et al.*[13] In this review, we will use the more recent terminology of isotope ratio measurement by NMR (irm-NMR). Contrary to irm-MS, irm-NMR may provide isotopic information on each molecular position while being non-destructive.

In 1988, irm-^{2}H NMR has become the official method to detect sugar addition in wines[14] and to authenticate their origin.[15,16] Other applications such as the detection of sugar addition in fruit juices[17] and the origin determination of vanillin[18] or acetic acid[19] are recognized by official authorities. Apart from its application to authentication, irm-^{2}H NMR is also a powerful tool to determine which metabolic pathway has led to a molecule of biological relevance.[20,21]

However, irm-^{2}H NMR presents four major limitations: (i) the ^{2}H low sensitivity, (ii) the small frequency range of ^{2}H leading to signal overlap, (iii) low molecular dynamic ranges because of the quadrupolar relaxation and (iv) potential exchange with the solvent. Therefore, the applications of irm-^{2}H NMR are limited to small molecules ($M < 300$ g/mol). Fortunately, driven by these limitations and by scientific curiosity, scientists have extended this approach to irm-^{13}C NMR – which in turn has its own limitations – over the last 15 years.

In addition to a description of the main concepts and definitions of NMR-based isotope analysis at natural abundance, this paper

* *Correspondence to: S Akoka, Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230, Nantes, France. E-mail: serge.akoka@univ-nantes.fr*

a *Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230Nantes, France*

b *Institut Universitaire de France, Paris, France*

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

describes the application scope of irm-NMR (^{2}H and ^{13}C), and the major improvements which made possible to reach the required accuracy of 1‰ (0.1%) in irm-^{13}C NMR. Further improvements such as multi-pulse sequences using polarization transfer, internal reference or 2D developments are also discussed. Finally, a flowchart summarizes the different ways to implement irm-^{13}C NMR.

Principles of Isotopic NMR Analysis

Isotopic isomers

Molecules with identical formulas but with different isotope constitutions (Fig. 1) could react differently during enzymatic or chemical processes, thus leading to position-specific natural abundance values that slightly differ from their average value. For the most common elements (H, C, N, O or S), the natural abundance of the heavy isotopes is low. The relative variations from the average value are very small, but detectable by NMR, and they form a unique source of information.

Specific parameters are used to describe such variations.[22] The isotopic ratio R (Eqn (1)) represents the molar ratio between a heavier and a lighter isotope of the element *E* (noted ^hE and ^lE, respectively):

$$R\left({}^hE/{}^lE\right) = \frac{N\left({}^hE\right)}{N\left({}^lE\right)}. \quad (1)$$

The isotopic abundance *x* (Eqn (2)) is defined by the molar fraction of the heavy isotope:

$$x\left({}^hE/{}^lE\right) = \frac{N\left({}^hE\right)}{\sum_1^k N\left({}^jE\right)}. \quad (2)$$

In the case of irm-^{2}H NMR, the isotopic abundance can be replaced by the isotope ratio because of the very low isotopic abundance of deuterium.

Because the variations of the two previous parameters are very low, the isotope composition δ (Eqn (3)) expressed in ‰ (per mil) is used to study variations between the analyte against an international measurement standard (*std*). For ^{13}C, the international standard is Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) with $R_{PDB} = 0.0112372$.

$$\delta\,{}^hE_{std} = \left(\frac{R\left({}^hE/{}^lE\right)}{R\left({}^hE/{}^lE\right)_{std}} - 1\right) \times 1000 \quad (3)$$

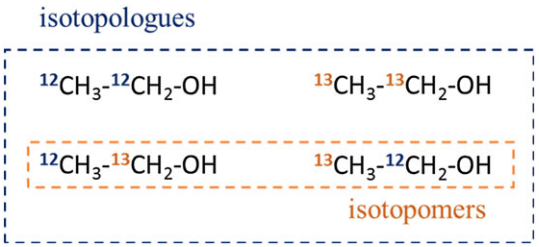


Figure 1. Difference (illustrated in the case of ethanol and for the carbon element) between isotopologues and isotopomers. Isotopologues only differ by their isotope compositions whereas isotopomers have the same numbers of heavy isotopes but they differ by their positions.

Isotopic fractionation

Isotopic fractionation is the modification in isotope composition during a transformation (difference between initial and final state). If the conversion from substrate to product is complete, there is no fractionation, by mass balance. For incomplete transformations, the fractionation factor (α) for two states *A* and *B* is defined as in Eqn(4):

$$\alpha_{A-B} = \frac{R_A}{R_B}. \quad (4)$$

If $\alpha < 1$, the phase *B* is enriched in heavy isotope (normal isotope effect) and *vice versa* (inverse isotope effect). For practical reasons, the isotopic fractionation is generally expressed as the enrichment factor ε (expressed in ‰):

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1000. \quad (5)$$

NMR conditions for isotopic analysis

Because isotopic variations at natural abundance are very small, very stringent conditions for irm-NMR are essential to obtain an accurate determination of these deviations (accuracy being defined as the contribution of both precision and trueness).[23] Trueness and precision are imposed by the range of isotope composition; while 1% accuracy is sufficient for irm-^{2}H NMR because the range of ^{2}H isotope composition is about 50%, 1‰ becomes the target value for irm-^{13}C NMR because of a more restricted isotope composition range (50‰). The four following points are particularly critical: (i) Signal-to-Noise Ratio (SNR), (ii) pulse angle (α) and repetition time (*TR*), (iii) spectrometer stability and (iv) ^{1}H decoupling conditions.

SNR has a direct impact on the measurement precision in irm-NMR because the relative error $\frac{\Delta S}{S}$ on the peak area S is expressed through Eqn (6)[24]:

$$\frac{\Delta S}{S} \geq \frac{1}{2 \times (SNR)}. \quad (6)$$

Therefore, obtaining a precision of 1‰ requires a SNR of at least 500.[25] *TR* must be optimized to avoid partial saturation that would affect the peak areas in a T_1-dependent fashion.[26] For instance, $TR = 7.T_1^{max}$ (where T_1^{max} is the greater value of T_1 encountered in the sample) should lead to the relative error of 1‰ required for ^{13}C isotopic NMR. However, in practice $TR = 10.T_1^{max}$ is required to eliminate the impact of nuclear Overhauser effect (nOe) on ^{13}C peak areas[27] in ^{1}H decoupled spectra. With such TR/T_1 values, it was shown that the optimal pulse angle to achieve an optimal SNR is always close to 90°.[28] In the case of irm-^{2}H NMR, there is no need to take nOe account because of the quadrupolar nature of the ^{2}H nucleus; therefore, $TR = 5.T_1^{max}$ is sufficient because the target precision is 1%. Moreover, typical T_1 values for ^{2}H nuclei are shorter than for ^{13}C or ^{15}N, resulting in lower *TR*.[29]

Hardware improvements have made NMR spectrometers more and more stable; however, the proportionality constant between the number of resonating spins and the signal intensity depends on a great number of factors such as the amplifier gain, the probe quality factor and the temperature. These factors are not perfectly stable during the NMR experiment and can induce variation of the flip angles (amplifier gain, probe quality factor), of the signal intensities (flip angles, probe quality factor) or of the position of the peaks (temperature). Furthermore, cross effects can be observed; as an example imperfect 180° pulses (during a multi-pulse sequence or during the decoupling scheme) lead to incomplete

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

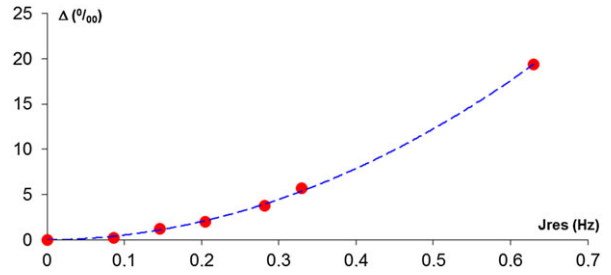


Figure 2. Impact of the residual coupling Jres (resulting from imperfect ^{1}H decoupling) on the trueness of isotopic ^{13}C NMR measurements. Δ is the variation of relative intensities for ethanol.

inversion or refocusing and modulate NMR peak intensities by resonance frequencies.[30,31] A simple calibration procedure cannot correct for this modulation: a small change in the temperature, for instance, may result in changes in resonance frequencies of some of the NMR peaks; peak intensities may, in turn, be modulated to a different extent.

Decoupling is indispensable – not only to make the peak integration easier, but also to improve the SNR and thus the accuracy of the method. Conditions used for routine spectra on modern spectrometers are sufficient to obtain an accuracy close to 1% and can be used for irm-^{2}H NMR.[32] However, non-uniform proton decoupling over the ^{1}H bandwidth constitutes the main obstacle to obtain a better accuracy (1‰) over the entire ^{13}C spectrum.[31] Even a very small residual coupling (apparent coupling under decoupling conditions) can degrade the trueness by several per mil (Fig. 2).

Because this effect comes partly from the spectrometer instability, it is not repeatable and also degrades the precision. Therefore, the ^{1}H decoupling must be uniform on a wide range of ^{1}H chemical shifts. Specific decoupling conditions are therefore needed in the case of irm-^{13}C NMR, characterized by large coupling constants and by the need for a high precision. These conditions are described in sub-section 'Requirements and peculiarities'.

irm-^{2}H NMR

Requirements and peculiarities

As mentioned before, irm-^{2}H NMR was the first isotopic NMR experiment developed, because its characteristic properties make it relatively straightforward to achieve quantitative conditions. However, the low natural abundance and the small magnetogyric ratio of ^{2}H lead to quite long experimental times. As an example, with such constraints, the analysis of a 500-mg vanillin sample on an 11.75-T spectrometer (500-MHz ^{1}H) takes 5.8 h for three spectra.[33]

To determine the position-specific isototopic abundance from peak areas, irm-^{2}H NMR uses chemical internal references with known isotopic composition. In the case of irm-^{2}H NMR, the official internal reference is tetramethylurea (TMU).[14,18,34,35] A comparison with the area of the molecule of interest makes it possible to determine the position-specific isotopic abundance of position *i* thanks to Eqn (7). The studied molecule and the reference are supposed to be perfectly pure.

$$x_i = x_{ref} \cdot \frac{S_i}{S_{ref}} \cdot \frac{n_{ref}}{n_i} \cdot \frac{C_{ref}}{C} \qquad (7)$$

x_i Isotopic abundance of position *i* (isotopomer i)
x_{ref} Isotopic abundance of the reference compound
S_i Peak area of position *i* in the molecule
S_{ref} Peak area of the reference compound
n_i Number of equivalent hydrogens associated to position *i* of the molecule
n_{ref} Number of equivalent hydrogens associated to the reference
C Molar concentration of the product
C_{ref} Molar reference concentration

Applications

As mentioned in the introduction, irm-^{2}H NMR is nowadays commonly used for metabolism elucidation and to authenticate the origin of wines, fruit juices and natural products. Recent reviews cover the major contributions in these domains. Because the latest one published in 2006, several publications[33] have described similar applications; therefore, only recent works will be detailed here. The price of natural vanillin compared to its synthetic alternative is very high, leading to increasing fraudulent adulterations, notably by the addition of non-natural vanillin to vanilla extracts. The irm-^{2}H NMR method proposed by Remaud et al.[18] was validated and made official as a result of a collaborative study.[36] The two other food products that are recognized by official authorities are wine and vinegar. As a consequence, several papers on these applications were published. A protocol based on the determination of the ^{2}H content of the methyl group in acetic acid was established from a collaborative study.[37] Therefore, it can be used to assess the undeclared addition of synthetic acetic acid in canned products (e.g. pickles)[38] or in vinegar having a specific botanical origin, such as rice.[39] Regularly, works on the characterization of wines associated to their geographical origin are published. As an illustration, Romanian wines were extensively studied by irm-^{2}H NMR. The authors[40] concluded that wine-producing regions from Romania were isotopically distinct because of geoclimatic conditions and grape varieties. Finally, recent works aimed at finding correlations between isotopic data (including ^{2}H PSIA) and parameters defining the denomination of the product. Statistics were then employed for chemometric analysis.[41–43] A full strategy was developed to analyze the position-specific fractionation of tree-ring cellulose by irm-^{2}H NMR.[21] By combining the climate data (temperature and humidity) and physiological signals (photosynthesis, water taking),[44] demonstrated the adaptation of trees to past environmental changes during a century time-scale. In this study, high magnetic fields (>14 T) associated to cryo-probes made it possible to work with much smaller amounts of material, that is, hundred of milligrams instead of grams. The authors demonstrated that the ^{2}H intramolecular pattern in glucose depended on the CO_2 level in atmosphere, establishing an indicator of the long-term increase of CO_2 in plants.[45]

However, because of the low chemical shift range (10 ppm) and the low sensitivity of ^{2}H, the applications of irm-^{2}H NMR have been limited to small molecules (M < 300 g/mol) and concentrated samples, requiring a high product quantity (m > 500 mg).

Furthermore, ^{2}H NMR spectra can be corrupted by chemical exchange with hydrogens from the solvent. That is particularly true for labile hydrogens in HOD, but it can also be observed with other solvents such as $CDCl_3$.

Irm-^{13}C NMR – whose specific limitations are described in the section 'irm-13C NMR' – was developed more recently.[46] The huge chemical range (250 ppm) and the lower linewidth provide the

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

possibility to analyze bigger molecules than with irm-^{2}H NMR, 2 and chemical exchange does not disturb the isotopic data. Moreover, this method provides position-specific isotopic ratio for each carbon yielding complementary information that will be discussed in this review. The analysis of mixtures is also theoretically possible with the use of an internal reference and will be discussed in subsection 'Determination of the 13C intramolecular composition'.

irm-^{13}C NMR

Requirements and peculiarities

In 1995, Singleton *et al.*,[47] performed the first ^{13}C isotopic measurement at natural abundance by NMR to study a Diels–Alder reaction by measuring relative position-specific isotopic compositions. The isotope effects are assessed by relative comparison of peak areas within the molecule and one peak of the substrate (or the product) is used as internal reference. While it is quite efficient for such purposes,[48–50] this approach does not provide the complete ^{13}C intramolecular composition of the molecule and is not able to compare the isotope composition between substrates and products. Indeed, the experimental conditions (particularly ^{1}H-decoupling) used in these works were too far from the criteria described in this section to reach the accuracy needed for isotopic analysis at natural abundance.

However, Tenailleau *et al.*[51] showed in 2004 that such precision and trueness could be reached using an inverse-gated decoupling pulse sequence with $TR = 10.T_{1\ max}$ and specific ^{1}H decoupling conditions. But it is only in 2007 that optimized ^{1}H-decoupling using adiabatic pulses was proposed[31] (Fig. 3). It was demonstrated that the decoupling efficiency could be measured using a ^{13}C bi-labeled molecule such as ethanol or acetic acid. These two molecules are complementary. Ethanol allows the characterization of the ^{1}H decoupling efficiency in the presence of ^{1}H–^{1}H homonuclear coupling whereas for acetic acid decoupling is easier because all the protons have the same frequency. On the other hand, chemical shift range of acetic acid is 4 times larger than the one for ethanol, which allows the evaluation of the effect of ^{13}C shift range.

The signal of each ^{13}C in these bi-labeled molecules is described by a doublet arising from carbon–carbon coupling. Because the two doublets arise from the same molecule, their area should be strictly identical, that is, the ratio between the two doublets should be equal to 1.000. The relative variation from this value is an efficient tool to evaluate the accuracy of ^{13}C NMR. As represented in Fig. 3, Tenailleau *et al.*,[31] compared WALTZ-16 and Cos/OIA adiabatic pulses on bi-labeled ^{13}C ethanol and ^{13}C acetic acid for different decoupling offsets.

These conditions allowed the acquisition of NMR spectra for isotopic analysis with 1‰ accuracy – the low variability is also an indication of the measurement precision. In 2007, Caytan *et al.*[52] developed a precise and accurate method to reduce the experiment time, based on a paramagnetic reagent (Chromium (III) acetylacetonate) to decrease the T_1 and consequently *TR*. In the case of vanillin at natural abundance, the use of a paramagnetic reagent allowed a reduction of *TR* by a factor of 10 without decreasing the accuracy.

Another peculiarity of irm-^{13}C NMR (vs irm-^{2}H NMR) is that the satellite peaks because of the presence of adjacent ^{13}C should be taken into account because neglecting them leads to an error of 1.1%, namely 11‰ error on the isotopic composition. The peak area of the studied carbon position *i* (isotopomer *i*) must therefore be corrected by a factor compensating for the loss of intensity because of ^{13}C–^{13}C satellites according to Eqn (8):

$$S_i = S\,(1 + u \times 0.011) \tag{8}$$

where S_i is the corrected peak area for position *i*, *S* the area without any correction, *u* is the number of carbons directly connected to the considered carbon position *i* and 0.011 (1.1%) represents the average natural abundance of ^{13}C. However, that supposes an appropriate separation between the main peak of interest and its satellites.

The long-term stability of this procedure was also demonstrated using natural abundance samples.[24] The trueness of irm-^{13}C NMR was assessed by Gilbert *et al.*[53] and Bayle *et al.*,[54] based on a comparison of NMR to the Py-GC/IRMS method on small molecules such as ethanol and acetic acid. A good agreement between the Δ value and the 'true value' obtained by mass spectrometry was observed. As a result, the use of bi-labeled ethanol and acetic acid is advised to qualify NMR spectrometers for irm-^{13}C NMR.

Determination of the ^{13}C intramolecular composition

Two strategies can be used to determine the position-specific isotopic abundance (x_i) from the peak areas (S_i).

In the first one, the molar fractions f_i for each position are calculated with Eqn (9):

$$fi = \frac{Si}{\sum_n Si}. \tag{9}$$

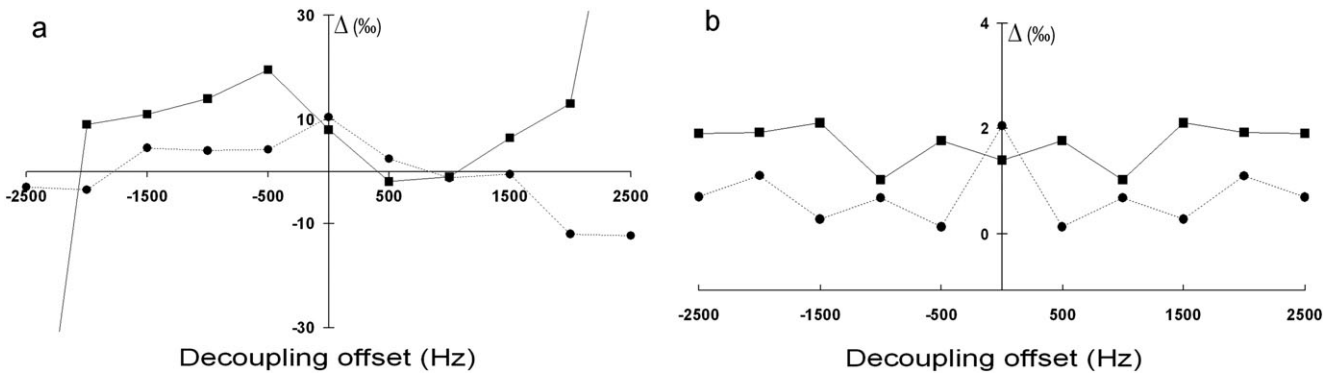


Figure 3. Variation (in ‰) of relative intensities as a function of the decoupling offset for ^{13}C of two bi-labeled samples: acetic acid (--●--) and ethanol (-▪-). (a) The initial decoupling experiment was performed with a WALTZ-16 sequence (b) The optimized decoupling experiment used cos/OIA pulses. Reprinted with permission from Ref.[31] Copyright 2007 Journal of Magnetic Resonance.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Then, the isotopic ^{13}C abundance of position i (x_i) is obtained according to Eqn (10):

$$xi = x_b \times \frac{fi}{Fi}. \quad (10)$$

Here, x_b represents the bulk isotopic abundance determined by irm-MS and F_i is the statistic molar fraction $F_i = p_i/\sum p_i$. This approach requires that the irm-MS measurement is reliable and that the integration of all signals in the ^{13}C NMR spectrum is possible. The former is often achieved, but accurate irm-MS values are difficult to obtain for halogenated molecules, and for the latter overlapping signals preclude a correct integration.

The second strategy would be to perform irm-^{13}C NMR using an internal reference as for irm-^{2}H NMR. The chosen substance used as a reference should meet the following criteria: (i) it should not react with the analyte and should show adequate solubility, (ii) the chemical shifts of the reference have to be different from those of the analyte to avoid peak overlapping and thus erroneous quantitative measurements, (iii) the longitudinal relaxation time T_1 of the reference should be of the same order of magnitude as the ones of the analyte, (iv) the chosen molecule should have a large number of equivalent nuclei that minimizes the reference concentration and so, avoids dilution of the sample, and (v) for isotopic analysis, the reference compound must also have a well-known isotope content.

The introduction of the reference can be either direct into the sample solution (internal reference) or into a coaxial insert to avoid co-solubility issues and potential interactions (external reference). However, the external reference approach induces a lower precision than the internal reference.[55] Therefore, this calibration method was not applied very often to perform irm-NMR.

The choice of an adequate internal reference is constraining because bringing together the necessary conditions may turn out to be a challenge. In this context, Electronic Reference To access *in vivo* Concentration (ERETIC) has been developed in order to avoid the addition of a chemical standard in the field of *in vivo* NMR.[56] The signal coming from the chemical reference is here replaced by an electronic signal whose area and chemical shift can be freely chosen by the operator. It provides several advantages as it simplifies sample preparation, avoids both chemical interaction and peak overlap between the reference and the analyte. The ERETIC™ method was successfully applied in numerous fields[57–60] and notably for isotopic ^{2}H NMR.[61–63] The use of TMU as an internal reference is thus not necessary anymore which provides a main advantage because the NMR analysis is no more governed by the T_1 of TMU which is often longer than those of the analytes.[64] However, The ERETIC™ method was never applied to irm-^{13}C NMR because the stability of the electronic reference signal did not match the needed precision.

At first sight, the determination of x_i by irm-^{13}C NMR could be achieved using a variant of Eqn (9) adapted to ^{13}C NMR analysis. The concentration ratio of the reference over the molecule of interest ($\frac{C_{ref}}{C}$) depends on both the weighed mass and the purity of the two compounds. The isotopic abundance of ^{13}C is therefore calculated by Eqn (11) where P_m^{ref} represents the purity of the internal reference and P_m the purity of the analyte:

$$x_i = \frac{n^{ref}}{n_i} \times \frac{\boldsymbol{m^{ref}} \times \boldsymbol{P_m^{ref}}}{\boldsymbol{m} \times \boldsymbol{P_m}} \times \frac{M}{M^{ref}} \times \frac{S_i}{S^{ref}} \times x^{ref}. \quad (11)$$

However, as explained previously, irm-^{13}C NMR requires an accuracy better than 1‰ which means that both the weighed mass and the purity of the compound of interest and of the internal reference have to be known with a precision better than 1‰. This is extremely challenging: although the purity of the internal reference can be given by a certificate of analysis, an accurate knowledge of the analyte purity is much more difficult, especially in a routine context. Hence, the protocol used in irm-^{2}H NMR cannot be simply transferred to irm-^{13}C NMR.

An alternative way to determine x_i is to quantify *in situ* the concentration ratio of both compounds by quantitative ^{1}H NMR with a 1‰ accuracy and precision. This strategy has been first established to perform ^{2}H-irm NMR more easily.[65] Position-specific isotopic abundances are then obtained using Eqn (12):

$$x_i = \frac{n^{ref}}{n_i} \times \frac{S_{1_H}^{ref} \times n_{H_i}}{S_{1H_i} \times n_H^{ref}} \times \frac{S_i}{S^{ref}} \times x^{ref}. \quad (12)$$

An important consideration to take into account is that this analytical strategy requires performing both ^{1}H NMR and ^{13}C NMR analysis on the same sample in order to determine the concentration ratio and the x_i values respectively. Because of the low sensitivity of ^{13}C NMR, there is no other choice but to work with highly concentrated samples. Unfortunately, because ^{1}H NMR is much more sensitive, the analysis of highly concentrated samples by ^{1}H NMR can induce signal intensity and line shape distortions by radiation damping (RD) which severely hamper the accurate quantitative analysis of concentrated samples by ^{1}H NMR.

Different approaches could be considered to cope with this phenomenon,[66] such as the dilution of the sample or the mistune of the receiver coil. However, both solutions would significantly affect the reproducibility of the experiment, thus being incompatible with the precision requirement of irm-^{13}C NMR.

A solution was recently suggested by Bayle *et al.*,[67] who developed a new sequence called Double-WET (DWET) to suppress RD while being able to perform highly accurate quantitative analysis without having to dilute the sample or to modify the hardware. The DWET sequence (Fig. 4) is based on the principles of the WET sequence[68] and the Outer Volume Suppression (OVS) method used in localized spectroscopy to saturate the signal arising from outside the volume of interest.[69,70] Only the spins resonating in a thin slice in the middle of the sample are detected, which is a tiny portion of the initial sensitive volume.

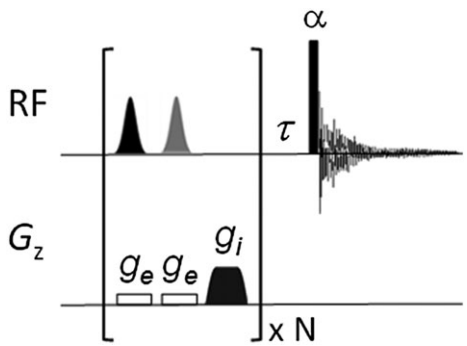


Figure 4. The DWET sequence. The basic segment (between brackets) is composed of two selective RF pulses applied simultaneously with the gradient g_e and followed by a dephasing gradient pulse g_i. Each selective pulse excites a bandwidth ΔF, the central frequency of the first one is $+\delta f$ ($\delta f > \Delta F/2$), that of the second one is $-\delta f$. This basic segment is repeated N times. A non-selective hard pulse is then applied after the gradient recovery delay τ, and only the spins resonating at frequencies between $-\delta f + \Delta F/2$ and $+\delta f - \Delta F/2$ are detected.[67]

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

This new strategy was successfully applied to discriminate the origin of vanillin samples based on their ^{13}C isotopic profiles.[71] Thanks to this new approach, it is now possible to perform PSIA by irm-^{13}C NMR without the need to know precisely the weighed mass and the purity of both the internal reference and the analyzed compound. A summary of the analytical protocol to measure x_i through this approach is described below (Fig. 5).

The use of an internal reference method for ^{13}C-irm NMR offers several advantages. Because the use of irm-MS is not necessary anymore, the analysis of mixtures and impure compounds becomes possible, and acquisitions performed with multi-pulse sequences no longer prevent determination of position-specific isotopic abundances after appropriate calibration (see sub-section 'Applications'). This approach should enable, in the near future, the study of isotope affiliations between substrates and products relying on these more sensitive and better resolved experiments.

Applications

The protocol described in the two previous sub-sections (except for the recently developed internal reference approach) has led to an inter-laboratory study showing that irm-^{13}C NMR can be used as a routine methodology,[72] as discussed in the last section of this manuscript. The irm-^{13}C NMR methodology has opened the way to new applications in a variety of fields, which would not have been accessible to irm-^{2}H NMR because of sensitivity and/or

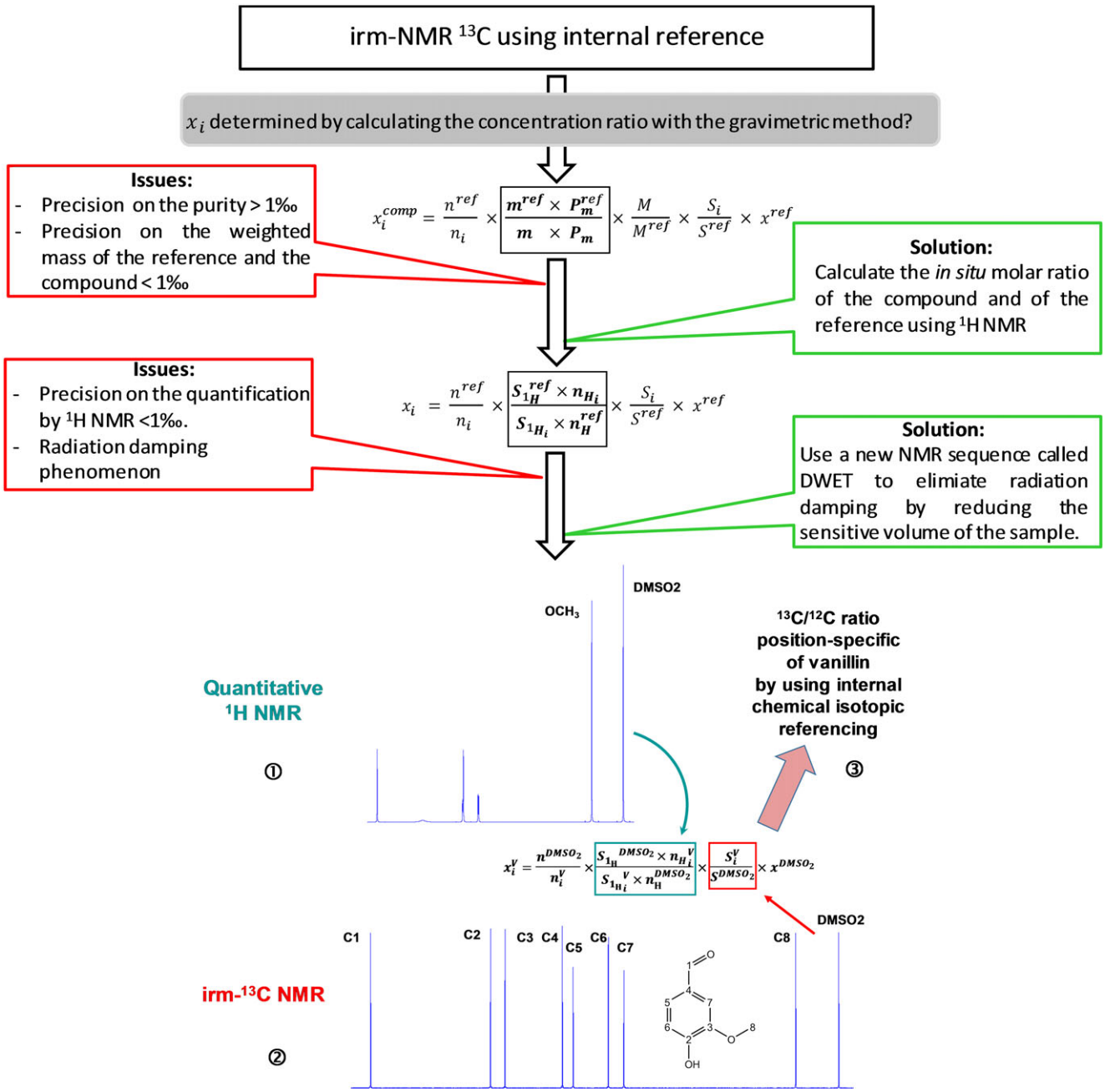


Figure 5. Flowchart illustrating how ^{13}C position specific isotope ratios can be accurately measured relying on a pure NMR strategy combining ^{13}C isotopic experiments with a high precision quantitative ^{1}H NMR strategy.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

resolution limitations. The paragraphs below illustrate this application potential, focusing on the specificities of the associated NMR experiments.

Irm-^{13}C NMR was used to study the isotopic composition of multistep-synthesized products – such as active pharmaceutical ingredients (API). Pharmaceutical counterfeiting is one of the world's most prolific black market industries; in this context the irm-^{13}C NMR method allowed a better definition of the ^{13}C signature of the API according to (i) the raw materials, (ii) the types of chemical reactions involved in patent violation and (iii) the geographic origin of API. The first work carried out by Silvestre *et al.*[73] demonstrated the efficiency of irm-^{13}C NMR by applying the experimental procedure described above to the origin discrimination of two 'common' drug medicines: aspirin and paracetamol (Fig. 6). These results illustrate the potential of the method to detect counterfeiting and patent infringement in the pharmaceutical industry.

The same protocol could be applied *a priori* to any molecule. But for some of them, a direct measurement is not possible because of a lack of solubility or to the existence of several iso-forms in solution. The analysis of pure glucose or fructose is a good example because isomers cannot be avoided in solution. The optimum procedure requires appropriate derivatives for such molecules. Gilbert *et al*. proposed a global strategy for PSIA of glucose, fructose and sucrose.[74,75] After observing that the ^{13}C intramolecular content within ethanol differed between C_3 and C_4 plants, efforts were made to measure PSIA on sugars even if derivatization was required.

The authors pointed out that great care should be taken for the choice of the derivatives when considering the required accuracy of 1‰. Among the derivatives some of them had free OH functions. They clearly demonstrated that any traces of ^{2}H (from lock substances, as residual HDO, for example) could generate 'extra peaks' via the isotope chemical shift effect and therefore unexpected sources of errors for $\delta^{13}C_i$.[76] The use of solvent free of HDO prevents such problems. Their work also revealed that the intramolecular ^{13}C distribution in sugars is significantly different, not only according to the photosynthesis pathway (C_3, C_4 and CAM), but also to the post photosynthesis isotope effects.[77,78] Thus, the plant origin for sugars can be now assessed by irm-^{13}C NMR. One original application is to detect the adulteration of tequila by cheaper alcohol from cane sugar or maize. Once the direct isotope link between sugar and the corresponding ethanol was established,[79] irm-^{13}C NMR applied to ethanol was able to distinguish pure ethanol from agave (tequila) from other sources including C_4-plant origin (maize and sugar cane). It should be emphasized that other techniques like mass spectrometry (irm-MS) measuring the bulk ^{13}C content are inefficient to tackle this problem.

Another application was reported by Diomande *et al.*[80] on natural xanthines like caffeine, theobromine and theophylline with major commercial relevance as flavoring agents in coffee, tea, guarana, kola nut and cocoa. Their authentication is a major issue because consumers need to be reassured regarding the equivalence between the label and the origin of the product. The main difficulty of such a study is the very low solubility of xanthines in classical organic solvents: a few milligrams for theobromine and theophylline (~9 mg in 1 mL of $CDCl_3$) and a few tens of mg for caffeine (~90 mg in 1 mL of $CDCl_3$). This low solubility is incompatible with the target SNR of 500. The authors proposed a double strategy: (i) derivatization of theobromine or theophylline into caffeine and (ii) use of a cryoprobe to boost the sensitivity of irm-^{13}C NMR. In this study, different types of caffeine from natural or commercial coffee, cocoa and tea were analyzed by irm-^{13}C NMR. The range of $\delta^{13}C_i$ values for caffeine is very large (over 60‰ difference between different origins). The ^{13}C depletion of methyl groups is particularly discriminant and differs between the isotopic profiles of synthetic and natural caffeine, thus reflecting their sequential incorporation

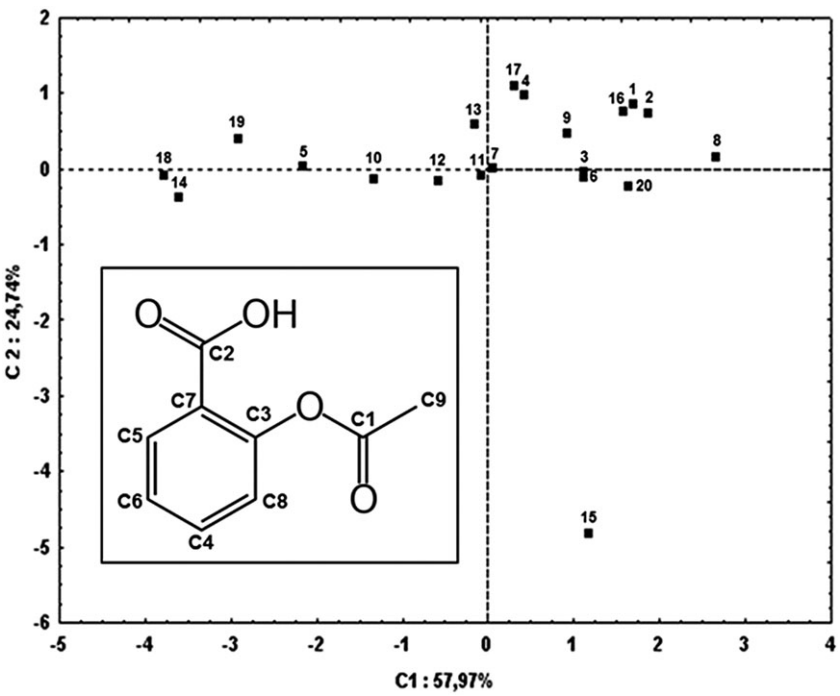


Figure 6. Principal component analysis (PCA) of acetylsalicylic acid (aspirin) samples, showing how samples from different geographical origins and from different batches of starting material (phenol) can be differentiated based on the $\delta^{13}C_i$ of the aromatic carbons C3–C8 as variables. Numbers indicate the origin of aspirin: France 1,2; Spain 3; Greece 4; 5,12, United Kingdom 13; USA 6,7,14; Turkey 8; Poland 9,11,16,20; Italy 10; Germany 15; Mexico 17; Australia 18,19. Reprinted with permission from Ref..[73] Copyright 2009 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

during the biosynthetic process. The irm-^{13}C NMR analysis method was successfully applied to origin authentication, providing more detailed information than the global isotopic composition analysis by irm-MS.

The interpretation of isotopic fractionation during natural processes is also an exciting application of isotopic irm-^{13}C NMR analysis and of isotopic measurements in general. Isotopic analysis makes it possible to characterize reaction mechanisms and distinguish between different biosynthetic origins.[79,81,82] A recent work carried out by Romek *et al.*[83] examined position-specific isotope composition ($\delta^{13}C_i$) within tramadol. This well-known synthetic analgesic was recently found in the bark and wood of roots of the African medicinal tree *Nauclea latifolia*. However, no theory can explain the high level of tramadol obtained in this natural environment which is totally deprived of human activity or cattle grazing that could contaminate the site through residues of pharmaceutical or veterinary processes. Based on results from irm-^{13}C NMR, Romek *et al.* demonstrated that a biosynthetic origin could explain this occurrence, and they suggested two hypothetical biosynthetic pathways to explain it.

PSIA also shows great promises to determine the fate of pollutants in environment. In forensic environmental investigations, it could be a promising tool to determine the source of a pollution and hence the liable party. Moreover, it could help to understand remediation processes better. Julien *et al.*[84] recently measured the position-specific isotopic composition of fuel additives such as Methyl *Tert*-Butyl Ether (MTBE), to investigate whether irm-^{13}C NMR could be used as a tool to identify the origin of environmental contaminations. In particular, PSIA could help tracking the origin of ether precursors. The same authors[85] used irm-^{13}C NMR to study the isotopic fractionation induced by liquid–vapor transformations that occur during evaporation (the main remediation process for volatile organic compounds). Several liquid–vapor transition processes were studied by irm-^{13}C NMR in order to simulate the position-specific fractionation during evaporation. The authors demonstrated that the Craig–Gordon isotope model, originally derived for water evaporation, is also valid for organic liquids, especially for describing the volatilization of nonpolar organic liquids with air-side limitation of the volatilization rate.[86] Models of ^{13}C fractionation upon sorption were also established[87] from previous works on the position-specific isotope effects observed during chromatography elutions from which normal and inverse isotope effects were determined.[88]

Irm-^{13}C NMR Performed by Multi-Pulse Sequences

Requirements and peculiarities

While the usefulness of irm-^{13}C NMR was demonstrated for a number of applications after some adaptations, the experiment duration can become prohibitive for routine analysis. An alternative to reduce the experiment time is to use multi-pulse NMR sequences based on polarization transfer from highly sensitive ^{1}H to less sensitive ^{13}C nuclei. The two most common polarization transfer sequences mediated by $^{1}J_{CH}$ are Distortionless Enhancement by Polarization Transfer[89] (DEPT) and Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer[90–93] (INEPT). Both sequences theoretically allow a maximum SNR enhancement in the order of $\gamma(^{1}H)/\gamma(^{13}C) \approx 4$. Moreover, because the repetition rate is now governed by ^{1}H longitudinal relaxation, the experiment duration can be significantly shortened. However, the DEPT and INEPT sequences must be performed in very particular condition to reach the accuracy (precision and trueness) needed for isotopic analysis.

The precision is *a priori* more critical in multi-pulse sequences than in the one-pulse experiment, because of (i) signal variations resulting from pulse imperfections arising from RF field inhomogeneity – especially for 180° pulses (see sub-section 'NMR conditions for isotopic analysis'); (ii) off-resonance effects.[94] These drawbacks are combined with the ^{1}H decoupling issue already mentioned, and could prevent the use of INEPT and DEPT to perform a precise position-specific ^{13}C isotope analysis. In 2010, Thibaudeau *et al.*[30] developed optimized DEPT and INEPT sequences in order to reach the precision requirements of isotopic analysis.[76] To minimize the contribution of the pulse imperfections and off-resonance effect on the NMR signals, all the 180° hard pulse were replaced by adiabatic pulses. The precision of these multi-pulse approaches was studied in details by Bussy *et al.* in 2011[95] by comparing the short-term and long-term stability of DEPT and INEPT *versus* the one-pulse experiment. The results obtained on an ibuprofen sample confirmed the high precision of the three evaluated pulse sequences (one-pulse, DEPT and INEPT) for isotopic finger-printing (Table 1).

However, the long-term stability was much better for INEPT than for DEPT. The explanation can be found in the stability of the RF pulse amplitude. The 180° pulses used in the two sequences were adiabatic pulses and were therefore immune to transmitter variations. For other pulses, the signal intensity is proportional to cos (θ); therefore, a variation in θ induces a signal variation proportional to sin(θ). Consequently, 90° pulse variations have low impact on intensities while for pulses different from 90°; small variations in the flip angle can induce significant signal intensity variations. The INEPT sequence contains only 90° and 180° pulses, but the last proton pulse of the DEPT was 60°. Therefore, the INEPT sequence was found more suitable than DEPT for ^{13}C isotopic measurements.

Concerning trueness, when polarization transfer techniques are used, a bias in the isotope ratio measurement is generated because the signal intensities of the different CH_n systems depend on several experimental parameters such as the number of attached protons, the pulse flip angles, the coupling constants and the evolution periods.[30] This can be exploited to edit a decoupled ^{13}C spectrum, and this characteristic often makes people say that multi-pulse sequences are 'not quantitative'. Another source of error affecting the polarization transfer efficiency in a position-specific fashion is the loss of signal intensity resulting from relaxation during the evolution periods. According to the usual values of ^{1}H and ^{13}C T_2, such distortion can reach several per mil. As a consequence, the

Table 1. Stability of the reduced molar fractions of ibuprofen measured by one pulse and multipulse (DEPT and INEPT) NMR experiments[95]

	One pulse	DEPT	INEPT
Short-term stability (‰)[a]	1.6	1.7	1.4
Long-term stability (‰)[a]	b	6.2	0.7

[a]*The short and long-term stabilities were calculated according to the formula:* $1000 \times \sigma_i/(f_{iR})_{av}$ *where* $(f_{iR})_{av}$ *and* σ_i *are the average value and the standard deviation of the partial reduced molar fraction of the position i calculated, respectively, over five consecutive experiments and over five experiments performed over three months.*[95]

[b]*Long-term stability was not measured in this work for the one-pulse sequence; however, it was done previously for other molecules, and the value found was always very close to the short-term stability.*

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

observed relative intensities are not only governed by molar fractions. Therefore, x_i values are not directly accessible by such methods. However, in the case of profiling applications – such as authentication – the compared samples are prepared in a very rigorous manner and contain the same molecule at the same concentration and temperature and in the same solvent; consequently, with the same relaxation times, coupling constants and number of attached protons. The contribution of the pulse sequence to the relative intensities is therefore the same for all the samples. Because this contribution is reproducible – under previously described conditions – isotope fingerprinting from reduced molar fractions, even based on a limited number of carbons, can be obtained, as attested by results presented in sub-section 'Applications'.[95,96]

When x_i values are needed – as in affiliation studies – it is important to note that multi-pulse NMR sequences only allow the observation of carbon positions carrying at least one proton; consequently, the isotopic information given by quaternary carbons is lost. As mentioned, ^{13}C position-specific isotopic abundances are currently determined from the global ^{13}C abundance measured by irm-MS and from the total molar fractions f_i (Eqn (11)) including the one of quaternary carbons. Consequently, for molecules containing quaternary carbons, the determination of the x_i values is not possible with the currently applied strategy because molar fractions cannot be calculated for all carbons. However, this drawback is overcome by using an internal reference in irm-^{13}C NMR (see sub-section 'Determination of the ^{13}C intramolecular composition'). In this case, there is no need to measure all the carbons of the molecule. Nevertheless, it will be necessary to determine – for each measured carbon – the contribution of the sequence to the signal intensity, in order to apply a correction. That could be done by comparing, on a standard sample, intensities obtained with the INEPT sequence with those obtained with the one-pulse sequence.

Applications

The irm-^{13}C INEPT approach has already been applied in different domains. In 2013, Remaud *et al.*[96] applied the INEPT pulse sequence on 11 samples of naproxen obtained from different geographical origins and companies. PCA was then performed to observe which carbon allowed the discrimination of the analyzed samples (Fig. 7). Naproxen is a molecule for which the classical one-pulse irm-^{13}C NMR would lead to very long analysis durations because of its size and limited solubility, making the INEPT methodology very efficient for the PSIA of such molecules. The INEPT method was also capable to discriminate 13 different samples of ibuprofen from five countries by their ^{13}C distribution with the targeted precision and within a reasonable measurement time: 1 h35 min for five spectra instead of 49 h using a one-pulse sequence.[95]

In 2015, Merchak *et al.*[97] performed ^{13}C isotopic analysis for isotope-profiling applications by simultaneously determining the position-specific ^{13}C content and the metabolomics profile of

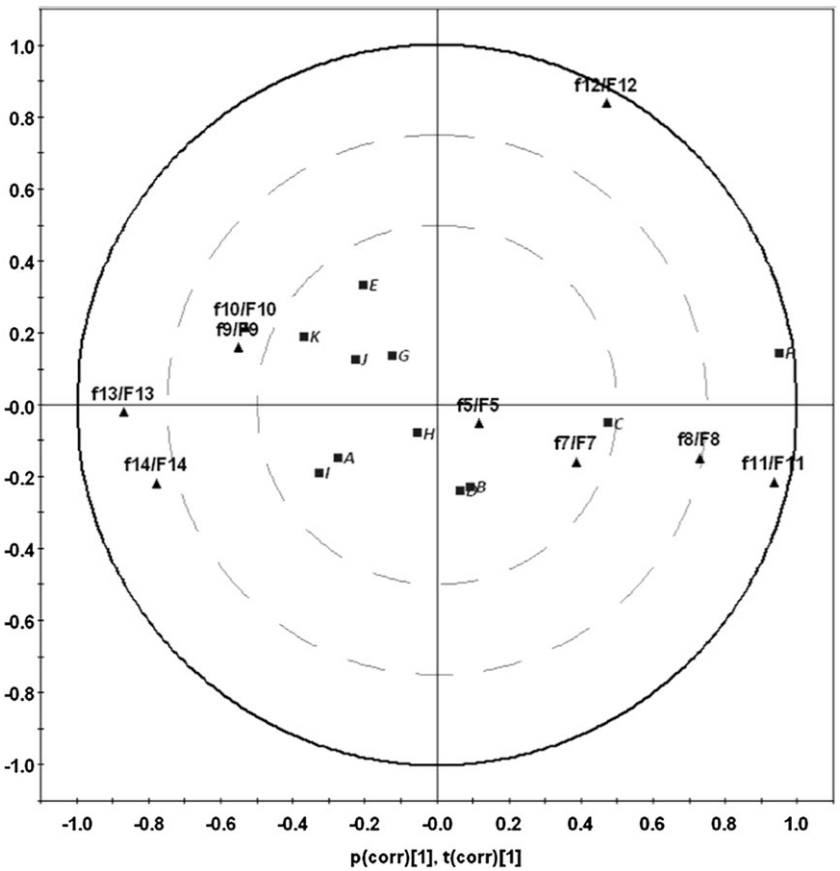


Figure 7. Principal component analysis (PCA) on naproxen, whole data set of f_i/F_i from ^{13}C INEPT NMR experiments: PC1 (41%) *versus* PC2 (36%) bi-plot (score + loading plots). The triangles stand for the parameters (variables) used for PCA, and the squares for the sample identification. Through that bi-plot, it is possible to determine which carbon of the molecule allows the discrimination of the samples as a function of their origin production point (raw material and process). Reprinted with permission from Ref.[96] Copyright 2013 European Journal of Pharmaceutical Sciences.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

triacyglycerols in olive oils from four different geographical origins, illustrating the emerging concept of 'isotopomics' that merges isotopic analysis with metabolomics. NMR spectra were obtained with the one-pulse and INEPT sequences. Both experiments allowed the classification of olive oils as a function of their geographical origin but with an experiment time seven-fold lower for the INEPT sequence when compared to the one-pulse sequence.

Multi-pulse NMR sequences can thus be applied to perform isotopic finger-printing and used as an analytical tool in pharmaceutical and food industries. However, these methods share a drawback with the one-pulse approach: the risk of signal overlap that may prevent the accurate determination of peak areas. Even for small molecules such as ibuprofen, two carbon signals can be slightly overlapped, leading to a lower precision on the corresponding peak areas.[95] The quantitative isotopic analysis of larger molecules and/or complex mixtures would be severely hampered by the same drawback. An appealing solution is to rely on quantitative two-dimensional (2D) NMR, whose potential for isotopic analysis was recently investigated.[98]

Two-Dimensional NMR

Requirements and peculiarities

Multi-dimensional (nD) NMR, proposed by J. Jeener in 1971[99] and further developed by Ernst and coworkers,[100] offers a better discrimination of resonances than 1D NMR and provides a solution to the overlap problem.[98] Hetero-nuclear 2D NMR experiments[101,102] are particularly appealing for irm-^{13}C NMR. However, similarly to the INEPT sequence, the multi-pulse character of 2D NMR affects its trueness. A bias in the isotope ratio measurement is generated because the signal intensities of the different CH_n systems depend on several experimental parameters and the observed relative intensities of correlation peaks are not only governed by molar fractions. However, as for the INEPT sequence, it is not a problem for applications to origin discrimination, and this drawback could be overcome by using an internal reference in irm-^{13}C NMR (see sub-section 'Requirements and peculiarities').

Yet, the repeatability and reproducibility of 2D experiments are affected by their long experiment time. The latter is directly linked to the incremental nature of 2D NMR spectroscopy. Indeed, because the number of t_1-incremented experiments determines the resolution in the indirect F_1 dimension and because the number of scans impacts the sensitivity, both parameters need to be sufficient to perform precise quantitative analysis. As a consequence, the duration of 2D NMR experiments can reach several hours, making NMR spectra more sensitive to spectrometer hardware instabilities over time.[103–105] Fortunately, the last decades have witnessed the development of various approaches to reduce this duration.[32,106,107]

To perform ^{13}C isotopic analysis by 2D NMR, it is thus necessary to achieve ^{1}H–^{13}C correlation experiments with a very high precision (2 per mil or lower) with short experimental times (1 h or lower) in order to limit the impact of the spectrometer instability. Such performance has been reached only very recently, through the work of Martineau *et al.*,[108] who obtained 2D ^{1}H–^{13}C heteronuclear spectra with a precision better than 2‰ thanks to methods permitting a reduction of the experiment duration based on the reduction of the number of indirect-domain increments: spectral aliasing,[109] non-uniform sampling (NUS)[110] and linear prediction (LP).[111] This study was achieved with ^{1}H–^{13}C Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) which is the most widely used heteronuclear pulse sequence in NMR.[101] The precision of experiments was evaluated from their repeatability, measured on an ibuprofen sample.

A very high precision was obtained (2‰) despite the fact that no adiabatic pulses and no optimized decoupling schemes were used. This result was attributed to the intrinsic symmetry of HSQC sequence which effectively compensates numerous pulse imperfections arising from RF field inhomogeneities and off-resonance effects. Spectral aliasing and linear prediction provided very good results, while NUS failed to yield the precision required for isotopic analysis (Fig. 8). However, the processing of NUS data was not yet optimized in this study, which could explain such a low precision.

It must be noted that the HSQC sequence is mainly composed of two INEPT blocks and does not include any RF pulse with a flip angle different from 90° or 180°. Consequently, although its long-term repeatability has not been yet evaluated, the same behavior as INEPT can be expected (see sub-section 'Requirements and peculiarities').

Applications

This methodology was exploited by Merchak *et al.* on complex triacylglycerol matrices with the aim to discriminate commercial edible oils from different origins.[112] A precision of 2 per mil was obtained for HSQC spectra recorded in only 22 min, using a cryoprobe. These promising results show that our method can be used to classify oil samples depending on their geographical and botanical origin. These results could open application perspectives for authentication purposes in various fields such as food or pharmaceutical sciences.

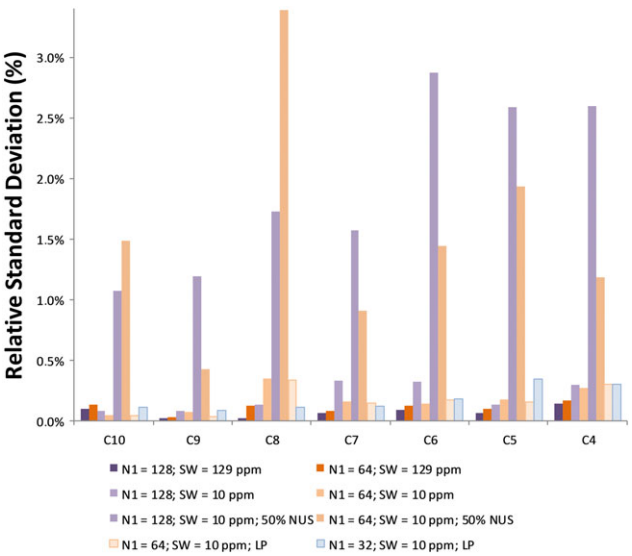


Figure 8. Precision of 2D ^{1}H–^{13}C HSQC experiments evaluated from their repeatability, measured on a ibuprofen sample, on a 500-MHz Bruker spectrometer equipped with a cryoprobe. Relative standard deviations (RSD) were calculated on reduced peak volume ratios (i.e. the volume of a given peak is divided by the sum of all the integrated volumes). Dark-filled rectangles correspond to the spectra acquired in classical conditions (full SW), light-filled rectangles to those acquired with spectral aliasing (10 ppm SW). Dotted rectangles correspond to the non-uniform sampling (NUS) experiments and hatched rectangles to those processed with linear prediction (LP). Reprinted with permission from Ref.[108] Copyright 2013 American Chemical Society.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Irm-^{13}C NMR Implementation

The impact of an analytical method depends on its ability to be widely implemented and applied routinely. Because irm-NMR methods are particularly critical in terms of analytical performance, it is indispensable to ensure that they provide the expected trueness and precision on a given spectrometer prior to their application. The following paragraphs describe the most critical aspects during the implementation of irm-^{13}C NMR methods.

Qualification of the NMR spectrometer: accuracy evaluation before implementation

As shown in section irm-^{13}C NMR, the uniformity of the ^{1}H decoupling is the first point to be evaluated before implementing and applying irm-^{13}C NMR. Therefore, a careful evaluation of the decoupling performance is a prerequisite. As previously discussed, [1,2-$^{13}C_2$] ethanol and [1,2-$^{13}C_2$] acetic acid are well suited to evaluate the precision and trueness of irm-^{13}C NMR.[54] Such molecules are considered as standards for the instrumental qualification (operational and performance) of the spectrometer in a given configuration (probe + hardware). A series of acquisitions must be performed with a systematic change of the decoupler offset.[54]

The use of these test molecules allows evaluating the gap between the experimental measurements and the 'true' value Δ (‰) using Eqn (13) (given for ethanol, but it is the same principle for acetic acid):

$$\Delta\,(‰) = \left(\frac{f_{CH2}}{F_{CH2}} - 1\right) \times 1000 = \left(\frac{f_{CH2}}{0,5} - 1\right) \times 1000. \qquad (13)$$

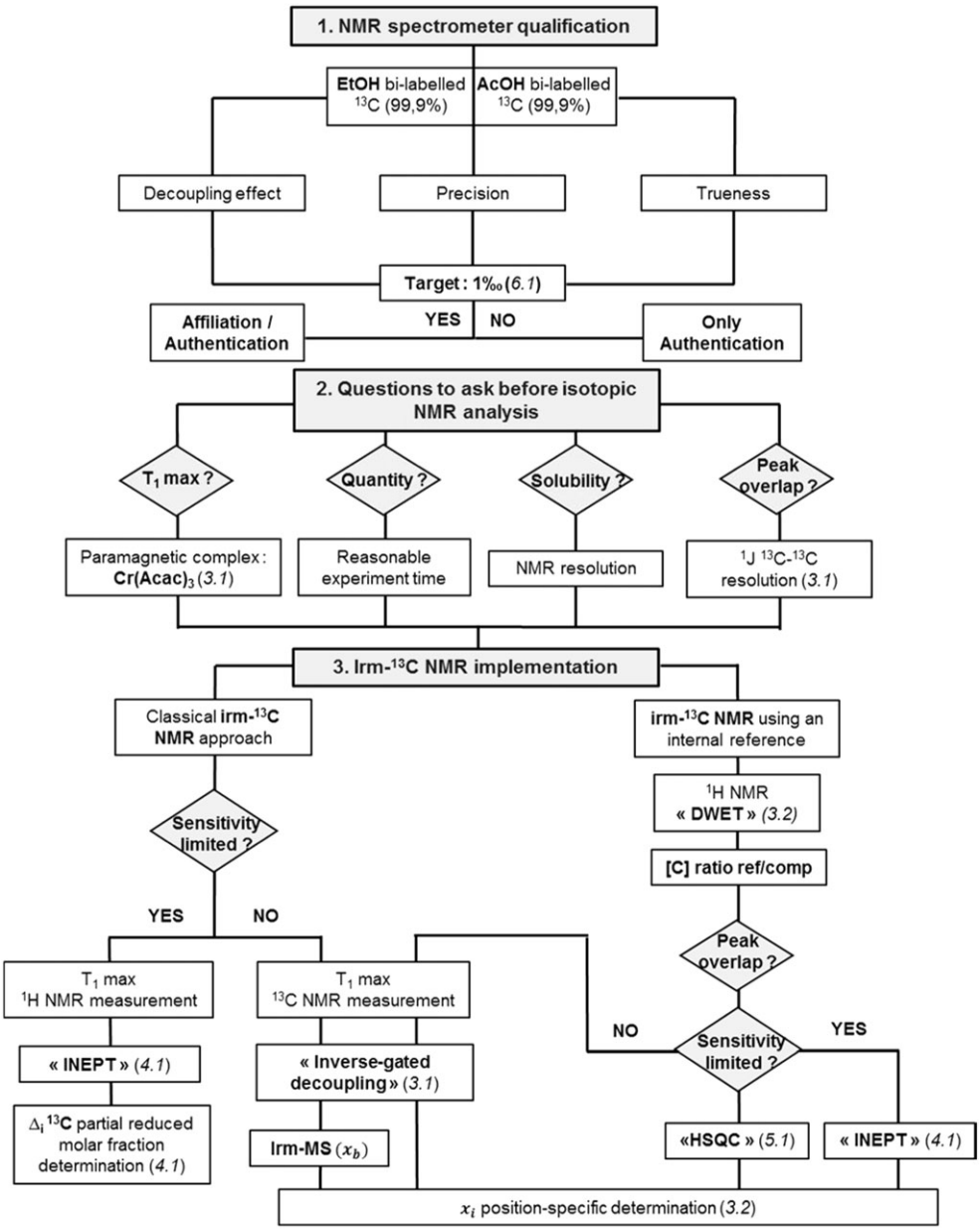


Figure 9. irm-^{13}C NMR isotopic analysis flowchart in three steps: (i) NMR qualification of the spectrometer; (ii) questions one should ask before starting the NMR isotopic experiment; (iii) different protocols for irm-^{13}C NMR. For the classical approach, irm-MS must be performed in parallel to obtain bulk isotopic values and calculate position-specific x_i values.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

The error made on the partial molar fraction determination by ^{13}C NMR is given by the parameter whose absolute value must reach a value of 1‰ (with a repeatability of 1‰) to perform valuable irm-^{13}C NMR experiments: a shift in indicates a trueness default, while the standard deviation of repeated experiments characterizes the precision. If these conditions are met, the spectrometer can be used directly for studying isotope affiliations or authentication. If not, it can only be used for comparative data, for example authenticity studies but can also be used to obtain the 'true' values by applying appropriate correction factors.[54]

Irm-^{13}C NMR flowchart

The analytical approach to perform irm-^{13}C NMR is represented in Fig. 9 through a flowchart which summarizes the different steps that should be taken into account to perform isotopic analysis and the different analytical strategies available.

The flowchart is divided into three principal steps: (i) the spectrometer qualification before isotopic analysis as shown in the previous paragraph, (ii) the crucial criteria to be considered for quantitative isotopic analysis and (iii) a description of the two analytical approaches to perform irm-^{13}C NMR, that is, with or without internal reference. This last block presents the workflow as a function of the analyzed sample (low or high molecular weight molecule), the pulse sequence (one-pulse or multi-pulse – 1D or 2D) and the targeted application (authentication or affiliation).

Conclusion

Isotope analysis by NMR provides unique information on the isotopome in domains where the use of irm-MS only is not sufficient to acquire position-specific information. Thanks to careful methodological developments, irm-^{13}C NMR has considerably extended the possibilities of this analytical approach. The optimization of one-pulse experiments has been critical in reaching the 1‰ precision and trueness requirements set by the tiny variations of the ^{13}C natural abundance. A major breakthrough was achieved thanks to adiabatic pulses that improved the uniformity of ^{1}H decoupling. These first improvements have made it possible to trace molecules according to their origin and/or their manufacturing process in many applications fields such as pharmaceutical counterfeiting, environmental sciences, metabolic pathways elucidation or food adulteration. Moreover, it is now possible to get the true values of the position-specific isotopic compositions by the one-pulse sequence (assuming that the global isotopic abundance is measured by irm-MS, and that all the peaks are separated and measurable). However the experiment duration is still an issue because of the low sensitivity of ^{13}C and to the long ^{13}C longitudinal relaxation times. This difficulty was recently circumvented by multi-pulse sequences such as INEPT or HSQC to improve the sensitivity or resolution. New approaches were successfully applied to the discrimination of olive oil samples by INEPT, opening a wide range of new application perspectives under the isotopomics concept. However, the molar fraction of all the carbons cannot be calculated, therefore preventing the determination of the position-specific isotopic abundances, x_i, values. The use of an internal reference will solve this problem by making it possible to determine the x_i values after appropriate calibration, without the need to observe the signal of all the carbons of the analyzed compound. The analysis of larger molecules and complex mixtures is now possible regardless of purity and peak overlap considerations.

Although isotopic analysis by NMR spectrometry has been widely improved in the last decade, there is yet a large room for improving the analysis efficiency in terms of duration and accuracy. As an example, the electronic referencing method could be applied to irm-^{13}C NMR to overcome the different constraints induced by the use of a chemical reference. However, it would be necessary to ensure that the electronic signal is sufficiently stable and reproducible to reach an accuracy of 1‰. It has been proved that it was possible to perform isotopic analysis by 2D NMR. Therefore, it would be interesting to investigate the potential of ultrafast 2D NMR (2D NMR UF)[106,113] in this field, because this approach makes it possible to record 2D spectra in a much reduced time compared to conventional – and even to other fast – 2D methods.

Another prospect to extend the application of isotopic analysis is the development of irm-^{15}N NMR whose implementation will be made easier because it requires the same kind of parameters as those used in irm-^{13}C NMR, mainly ^{1}H decoupling with adiabatic pulses and multi-pulse sequences. Irm-^{15}N could be applied to forensic studies involving molecules containing more than two non-equivalent N atoms. Molecules with single nitrogen atoms will be used in attribution and comparative studies, particularly with the use of an internal standard.

Further, NMR could also be involved in new emergent analyses: enantiomer-specific isotope analysis (ESIA)[114,115] and isotopologues containing two heavy atoms (clumped isotopes).[116] For ESIA, it is clear that enantiomeric separation is within the scope of NMR, then the irm-^{13}C NMR criteria could be applied on each separated position leading to complete or partial PSIA of each enantiomer. The titration of ^{2}H-^{13}C clumped isotopes by NMR has been already demonstrated as a proof of concept.[117] Several pulse sequences as 2D INADEQUATE[103] offer the analyst a potential access to ^{13}C–^{13}C clumped isotopes[118] in organic molecules.

Acknowledgements

The authors acknowledge funding from the Région Pays de la Loire (grant PLAISIR).

References

[1] E. Lichtfouse. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1337–1344.
[2] T. B. Hofstetter, M. Berg. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 618–627.
[3] M. Thullner, F. Centler, H.-H. Richnow, A. Fischer. *Org. Geochem.* **2012**, *42*, 1440–1460.
[4] A. G. West, G. R. Goldsmith, P. D. Brooks, T. E. Dawson. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 1948–1954.
[5] L. Zhao, H. Xiao, J. Zhou, L. Wang, G. Cheng, M. Zhou, L. Yin, M. F. McCabe. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 3071–3082.
[6] R. Santamaria-Fernandez, D. Carter, R. Hearn. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5963–5969.
[7] G. Rinaldi, W. G. Meinschein, J. M. Hayes. *Biol. Mass Spectrom.* **1974**, *1*, 415–417.
[8] W. G. Meinschein, G. G. L. Rinaldi, J. M. Hayes, D. A. Schoeller. *Biol. Mass Spectrom.* **1974**, *1*, 172–174.
[9] T. Weilacher, G. Gleixner, H.-L. Schmidt. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1073–1077.
[10] A. Rossmann, M. Butzenlechner, H.-L. Schmidt. *Plant Physiol.* **1991**, *96*, 609–614.
[11] T. N. Corso, J. T. Brenna. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 1049–1053.
[12] J. M. Eiler, M. Clog, P. Magyar, A. Piasecki, A. Sessions, D. Stolper, M. Deerberg, H.-J. Schlueter, J. Schwieters. *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, *335*, 45–56.
[13] G. J. Martin, M. L. Martin. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3525–3528.
[14] G. J. Martin, M. L. Martin, in *Wine Analysis* (Eds: P. D. H.-F. Linskens, P. D. J. F. Jackson) (Eds:, Springer, Berlin Heidelberg, **1988**, 258–275.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

[15] Commission Regulation of the European Communities (EEC), **1990**.
[16] Office International de la Vigne et du Vin (OIV), **2001**.
[17] G. J. Martin, J. Koziet, A. Rossmann, J. Dennis. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *321*, 137–146.
[18] G. S. Remaud, Y.-L. Martin, G. G. Martin, G. J. Martin. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 859–866.
[19] G. Remaud, C. Guillou, C. Vallet, G. J. Martin. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, *342*, 457–461.
[20] O. Roger, R. Lavigne, M. Mahmoud, C. Buisson, B. Onno, B.-L. Zhang, R. J. Robins. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24923–24928.
[21] T. R. Betson, A. Augusti, J. Schleucher. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8406–8411.
[22] T. B. Coplen. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2538–2560.
[23] A. Menditto, M. Patriarca, B. Magnusson. *Accreditation Qual. Assur.* **2006**, *12*, 45–47.
[24] E. Caytan, E. P. Botosoa, V. Silvestre, R. J. Robins, S. Akoka, G. S. Remaud. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8266–8269.
[25] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford University Press, New York, **1991**.
[26] T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura, T. Maeda. *Metrologia* **2004**, *41*, 213.
[27] B. Vögeli. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *78*, 1–46.
[28] S. Gillet, J.-J. Delpuech. *J. Magn. Reson.* **1980**, *38*, 433–445.
[29] T. A. Darwish, N. R. Yepuri, P. J. Holden, M. James. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *927*, 89–98.
[30] C. Thibaudeau, G. Remaud, V. Silvestre, S. Akoka. *Anal. Chem.* **2010**, *2010*, 5582–5590.
[31] E. Tenailleau, S. Akoka. *J. Magn. Reson.* **2007**, *185*, 50–58.
[32] E. Kupce, R. Freeman. *J. Magn. Reson.* **2003**, *162*, 300–310.
[33] G. J. Martin, M. L. Martin, S. Akoka, in *Modern Magnetic Resonance* (Ed: G. A. Webb), **2006**, 1629–1636.
[34] W. Jiang, J. Xue, X. Liu, D. Wang, Y. Guo, L. Wang. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2015**, *50*, 774–781.
[35] H. W. Schroer, K. L. Langenfeld, X. Li, H.-J. Lehmler, C. L. Just. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2015**, *2*, 362–366.
[36] E. Jamin, F. Martin, G. G. Martin. *J. AOAC Int.* **2007**, *90*, 187–195.
[37] F. Thomas, E. Jamin. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *649*, 98–105.
[38] A. Grégrová, E. Neradová, V. Kružík, J. Mazáč, P. Havelec, H. Čížková. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *239*, 169–174.
[39] C.-W. Hsieh, P.-H. Li, J.-Y. Cheng, J.-T. Ma. *Ind. Crops. Prod.* **2013**, *50*, 904–908.
[40] A. Pîrnău, M. Bogdan, D. A. Măgdaş, D. Stătescu. *Food Biophys.* **2013**, *8*, 24–28.
[41] C. Aghemo, A. Albertino, R. Gobetto. *Magnetic Resonance in Food Science : An Exciting Future*. **2011**, 30–35.
[42] Y. B. Monakhova, R. Godelmann, A. Hermann, T. Kuballa, C. Cannet, H. Schäfer, M. Spraul, D. N. Rutledge. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *833*, 29–39.
[43] F. Camin, N. Dordevic, R. Wehrens, M. Neteler, L. Delucchi, G. Postma, L. Buydens. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 384–390.
[44] A. Augusti, T. R. Betson, J. Schleucher. *Chem. Geol.* **2008**, *252*, 1–8.
[45] I. Ehlers, A. Augusti, T. R. Betson, M. B. Nilsson, J. D. Marshall, J. Schleucher. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 15585–15590.
[46] V. Caer, M. Trierweiler, G. J. Martin, M. L. Martin. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2306–2313.
[47] D. A. Singleton, A. A. Thomas. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9357–9358.
[48] O. M. Gonzalez-James, X. Zhang, A. Datta, D. A. Hrovat, W. T. Borden, D. A. Singleton. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12548–12549.
[49] J. S. Hirschi, T. Takeya, C. Hang, D. A. Singleton. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2397–2403.
[50] M. J. Vetticatt, D. A. Singleton. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2370–2373.
[51] E. Tenailleau, P. Lancelin, R. J. Robins, S. Akoka. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3818–3825.
[52] E. Caytan, G. S. Remaud, E. Tenailleau, S. Akoka. *Talanta* **2007**, *71*, 1016–1021.
[53] A. Gilbert, R. Hattori, V. Silvestre, N. Wasano, S. Akoka, S. Hirano, K. Yamada, N. Yoshida, G. S. Remaud. *Talanta* **2012**, *99*, 1035–1039.
[54] K. Bayle, A. Gilbert, M. Julien, K. Yamada, V. Silvestre, R. J. Robins, S. Akoka, N. Yoshida, G. S. Remaud. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *846*, 1–7.
[55] P. Giraudeau, I. Tea, G. S. Remaud, S. Akoka. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *93*, 3–16.
[56] L. Barantin, A. Le Pape, S. Akoka. *Magn. Reson. Med.* **1997**, *38*, 179–182.
[57] V. Silvestre, S. Goupry, M. Trierweiler, R. J. Robins, S. Akoka. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1862–1868.
[58] S. Akoka, L. Barantin, M. Trierweiler. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2554–2557.
[59] I. Billault, S. Akoka. *Instrum. Sci. Technol.* **2000**, *28*, 233–240.
[60] N. Michel, S. Akoka. *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 118–123.
[61] G. S. Remaud, V. Silvestre, S. Akoka. *Accreditation Qual. Assur.* **2005**, *10*, 415–420.
[62] F. Le Grand, G. George, S. Akoka. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5125–5129.
[63] I. Billault, R. J. Robins, S. Akoka. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5902–5906.
[64] F. Le Grand, G. George, S. Akoka. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5125–5129.
[65] C. Fauhl, R. Wittkowski. *Z. Für Lebensm.-Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 541–545.
[66] V. V. Krishnan, N. Murali. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *68*, 41–57.
[67] K. Bayle, M. Julien, G. S. Remaud, S. Akoka. *J. Magn. Reson.* **2015**, *259*, 121–125.
[68] R. J. Ogg, P. B. Kingsely, J. S. Taylor. *J Magn Reson Ser B* **1994**, *104*, 1–10.
[69] T.-K. C. Tran, D. B. Vigneron, N. Sailasuta, J. Tropp, P. Le Roux, J. Kurhanewicz, S. Nelson, R. Hurd. *Magn. Reson. Med.* **2000**, *43*, 23–33.
[70] Y. Luo, R. A. de Graaf, L. DelaBarre, A. Tannús, M. Garwood. *Magn. Reson. Med.* **2001**, *45*, 1095–1102.
[71] K. Bayle, M. Grand, A. Chaintreau, R. J. Robins, W. Fieber, H. Sommer, S. Akoka, G. S. Remaud. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7550–7554.
[72] A. Chaintreau, W. Fieber, H. Sommer, A. Gilbert, K. Yamada, N. Yoshida, A. Pagelot, D. Moskau, A. Moreno, J. Schleucher. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *788*, 108–113.
[73] V. Silvestre, V. M. Mboula, C. Jouitteau, S. Akoka, R. J. Robins, G. S. Remaud. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 336–341.
[74] A. Gilbert, V. Silvestre, R. J. Robins, G. Tcherkez, G. S. Remaud. *New Phytol.* **2011**, *191*, 579–588.
[75] A. Gilbert, V. Silvestre, R. J. Robins, G. S. Remaud. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8978–8985.
[76] A. Gilbert, V. Silvestre, R. J. Robins, G. S. Remaud. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1979–1984.
[77] A. Gilbert, V. Silvestre, R. J. Robins, G. S. Remaud, G. Tcherkez. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 476–486.
[78] A. Gilbert, R. J. Robins, G. S. Remaud, G. G. B. Tcherkez. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 18204–18209.
[79] A. Gilbert, V. Silvestre, N. Segebarth, G. Tcherkez, C. Guillou, R. J. Robins, S. Akoka, G. S. Remaud. *Plant Cell Environ.* **2011**, *34*, 1104–1112.
[80] D. G. Diomande, E. Martineau, A. Gilbert, P. Nun, A. Murata, K. Yamada, N. Watanabe, I. Tea, R. J. Robins, N. Yoshida, et al. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6600–6606.
[81] E. P. Botosoa, C. Blumenstein, D. A. MacKenzie, V. Silvestre, G. S. Remaud, R. A. Kwiecień, R. J. Robins. *Anal. Biochem.* **2009**, *393*, 182–188.
[82] K. Bayle, S. Akoka, G. S. Remaud, R. J. Robins. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 4118–4128.
[83] K. M. Romek, P. Nun, G. S. Remaud, V. Silvestre, G. S. Taïwe, F. Lecerf-Schmidt, A. Boumendjel, M. D. Waard, R. J. Robins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 8296–8301.
[84] M. Julien, P. Nun, P. Höhener, J. Parinet, R. J. Robins, G. S. Remaud. *Talanta* **2016**, *147*, 383–389.
[85] M. Julien, J. Parinet, P. Nun, K. Bayle, P. Höhener, R. J. Robins, G. S. Remaud. *Environ. Pollut.* **2015**, *205*, 299–306.
[86] M. Julien, P. Nun, R. J. Robins, G. S. Remaud, J. Parinet, P. Höhener. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 12782–12788.
[87] P. Höhener, V. Silvestre, A. Lefrançois, D. Loquet, E. P. Botosoa, R. J. Robins, G. S. Remaud. *Chemosphere* **2012**, *87*, 445–452.
[88] E. P. Botosoa, V. Silvestre, R. J. Robins, J. M. M. Rojas, C. Guillou, G. S. Remaud. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7043–7048.
[89] D. Doddrell, D. Pegg, M. Bendall. *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 323–327.
[90] G. A. Morris, R. Freeman. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*(3), 760–762.
[91] M. R. Bendall, D. T. Pegg, D. M. Doddrell. *J. Magn. Reson.* **1981**, *45*, 8–29.
[92] A. Bax, S. K. Sarkar. *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 170–176.
[93] O. Sørensen, R. Ernst. *J. Magn. Reson. 1969.* **1983**, *51*, 477–489.
[94] N. Karabulut, E. Baguet, M. Trierweiler, S. Akoka. *Anal Lett.* **2002**, *35*, 2549–2563.
[95] U. Bussy, C. Thibaudeau, F. Thomas, J.-R. Desmurs, E. Jamin, G. Remaud, V. Silvestre, S. Akoka. *Talanta* **2011**, *85*, 1909–1914.
[96] G. S. Remaud, U. Bussy, M. Lees, F. Thomas, J.-R. Desmurs, E. Jamin, V. Silvestre, S. Akoka. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 464–473.
[97] N. Merchak, J. Bejjani, T. Rizk, V. Silvestre, G. S. Remaud, S. Akoka. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4889–4891.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

[98] P. Giraudeau, N. Guignard, H. Hillion, E. Baguet, S. Akoka. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 1243–1248.
[99] J. Jeener, Lect. Present. Ampere Int. Summer Sch. II Basko Polje Yugosl. **1971**.
[100] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.
[101] G. Bodenhausen, D. J. Ruben. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189.
[102] P. Schanda, B. Brutscher. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8014–8015.
[103] E. Martineau, P. Giraudeau, I. Tea, S. Akoka. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 252–257.
[104] G. A. Morris. *J. Magn. Reson. 1969.* **1992**, *100*, 316–328.
[105] A. Mehlkopf, D. Korbee, T. Tiggelman, R. Freeman. *J. Magn. Reson. 1969.* **1984**, *58*, 315–323.
[106] L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu. *Prod. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15858–15862.
[107] L. Rouger, B. Gouilleux, P. Giraudeau, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 3rd (Eds: J. Lindon, G. Tranter, D. Koppenaal), **2016**.
[108] E. Martineau, S. Akoka, R. Boisseau, B. Delanoue, P. Giraudeau. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4777–4783.
[109] D. Jeannerat. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 3–17.
[110] J. C. J. Barna, E. D. Laue, M. R. Mayger, J. Skilling, S. J. P. Worrall. *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 69–77.
[111] H. Barkhuijsen, R. De Beer, W. M. M. J. Bovée, D. Van Ormondt. *J. Magn. Reson.* **1985**, *61*, 465–481.
[112] N. Merchak, V. Silvestre, L. Rouger, P. Giraudeau, T. Rizk, J. Bejjani, S. Akoka. *Talanta* **2016**, *156–157*, 239–244.
[113] P. Giraudeau, L. Frydman. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 129–161.
[114] S. Ogawa, H. Tadokoro, M. Sato, T. Higashi. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *98*, 387–392.
[115] S.-L. Badea, A.-F. Danet. *Sci. Total Environ.* **2015**, *514*, 459–466.
[116] A. K. Tripati, R. A. Eagle, N. Thiagarajan, A. C. Gagnon, H. Bauch, P. R. Halloran, J. M. Eiler. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2010**, *74*, 5697–5717.
[117] P. Lesot, O. Lafon, P. Berdagué. *Magn. Reson. Chem.* **2014**, *52*, 595–613.
[118] J. M. Eiler, B. Bergquist, I. Bourg, P. Cartigny, J. Farquhar, A. Gagnon, W. Guo, I. Halevy, A. Hofmann, T. E. Larson, et al. *Chem. Geol.* **2014**, *372*, 119–143.

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

Titre : Analyse isotopique positionnelle pour les sciences forensiques : développement et utilisation de la spectrométrie RMN quantitative ^{13}C et ^{15}N

Mots clés : RMN ^{13}C isotopique, RMN ^{15}N isotopique, analyse isotopique positionnelle, SMRI, drogues, explosifs

Résumé : Dans la bataille contre le trafic des stupéfiants, c'est le concept de profilage du produit illicite qui est couramment utilisé comme outil de lutte contre les réseaux de distribution de la drogue. Ce profilage est réalisé à partir des teneurs en impuretés de synthèse, des solvants résiduels, etc. Le projet ANR FRIIME propose de suivre le même objectif en utilisant la teneur isotopique comme marqueur intrinsèque de la molécule cible. Jusqu'à présent seule la teneur moyenne en isotope a été exploitée et mesurée par spectrométrie de masse isotopique (SMRI). En recourant à une technologie innovante utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN), la capacité de mesurer site par site les teneurs isotopiques, donne maintenant accès à de nouvelles informations.

Ces travaux de thèse reposent sur l'optimisation d'une séquence multi-impulsionnelle (INEPT) permettant d'améliorer significativement la sensibilité de la RMN ^{13}C et d'assurer un traçage isotopique complet des molécules de taille importante. Ce nouvel outil sera testé sur des échantillons réels de drogue pour lesquels les agents de coupage seront analysés afin d'obtenir un profil isotopique marqueur de leur origine. De nouvelles informations sur les réseaux seront ainsi collectées.

Pour la première fois, ce savoir-faire sera également transposé à l'analyse isotopique positionnelle en ^{15}N par RMN quantitative comme contribution pour les analyses d'explosifs comme le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT).

Title : Forensic Research using Isotope Intra-Molecular Experiments: development and use of quantitative ^{13}C and ^{15}N NMR spectrometry

Keywords: irm-^{13}C NMR, irm-^{15}N NMR, position-specific isotopic analysis, irm-MS, drugs, explosives

Abstract: In the battle against the illicit drugs market, this is drug profiling which is currently used as a tool to track drugs trafficking routes. Profiling methods can rely on synthetic impurities, residual solvents, etc. In the ANR project FRIIME, the same objective will be pursued but using the intrinsic marker of the isotopic content of the target molecules. So far, only overall isotopic content has been exploited and measured by isotope ratio mass spectrometry (irm-MS). By using innovative methods employing nuclear magnetic resonance (NMR), the study of the position-specific isotopic distribution of the targeted products is now obtained.

This work was based on the optimization of a multi-pulse sequence (INEPT) enabling to improve significantly NMR ^{13}C sensitivity in order to ensure full isotopic tracing on large molecules. This new tool will be tested on real samples of drug for which the cutting agents will be analyzed to have an isotopic profile marker of their origin. Then new information on networks will be obtained.

For the first time, this knowledge will be transposed to ^{15}N position-specific isotopic analysis by quantiative NMR as contribution for explosives analyses as 2,4,6-trinitrotoluene (TNT).

UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

Titre : Analyse isotopique positionnelle pour les sciences forensiques : développement et utilisation de la spectrométrie RMN quantitative ^{13}C et ^{15}N

Mots clés : RMN ^{13}C isotopique, RMN ^{15}N isotopique, analyse isotopique positionnelle, SMRI, drogues, explosifs

Résumé : Dans la bataille contre le trafic des stupéfiants, c'est le concept de profilage du produit illicite qui est couramment utilisé comme outil de lutte contre les réseaux de distribution de la drogue. Ce profilage est réalisé à partir des teneurs en impuretés de synthèse, des solvants résiduels, etc. Le projet ANR FRIIME propose de suivre le même objectif en utilisant la teneur isotopique comme marqueur intrinsèque de la molécule cible. Jusqu'à présent seule la teneur moyenne en isotope a été exploitée et mesurée par spectrométrie de masse isotopique (SMRI). En recourant à une technologie innovante utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN), la capacité de mesurer site par site les teneurs isotopiques, donne maintenant accès à de nouvelles informations.

Ces travaux de thèse reposent sur l'optimisation d'une séquence multi-impulsionnelle (INEPT) permettant d'améliorer significativement la sensibilité de la RMN ^{13}C et d'assurer un traçage isotopique complet des molécules de taille importante. Ce nouvel outil sera testé sur des échantillons réels de drogue pour lesquels les agents de coupage seront analysés afin d'obtenir un profil isotopique marqueur de leur origine. De nouvelles informations sur les réseaux seront ainsi collectées.

Pour la première fois, ce savoir-faire sera également transposé à l'analyse isotopique positionnelle en ^{15}N par RMN quantitative comme contribution pour les analyses d'explosifs comme le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT).

Title : Forensic Research using Isotope Intra-Molecular Experiments: development and use of quantitative ^{13}C and ^{15}N NMR spectrometry

Keywords: irm-^{13}C NMR, irm-^{15}N NMR, position-specific isotopic analysis, irm-MS, drugs, explosives

Abstract: In the battle against the illicit drugs market, this is drug profiling which is currently used as a tool to track drugs trafficking routes. Profiling methods can rely on synthetic impurities, residual solvents, etc. In the ANR project FRIIME, the same objective will be pursued but using the intrinsic marker of the isotopic content of the target molecules. So far, only overall isotopic content has been exploited and measured by isotope ratio mass spectrometry (irm-MS). By using innovative methods employing nuclear magnetic resonance (NMR), the study of the position-specific isotopic distribution of the targeted products is now obtained.

This work was based on the optimization of a multi-pulse sequence (INEPT) enabling to improve significantly NMR ^{13}C sensitivity in order to ensure full isotopic tracing on large molecules. This new tool will be tested on real samples of drug for which the cutting agents will be analyzed to have an isotopic profile marker of their origin. Then new information on networks will be obtained.

For the first time, this knowledge will be transposed to ^{15}N position-specific isotopic analysis by quantiative NMR as contribution for explosives analyses as 2,4,6-trinitrotoluene (TNT).