



HAL
open science

Intérêt de rechercher la 4-ANPP dans les milieux biologiques comme marqueur d'une exposition au fentanyl ou à un analogue structural [Interest in testing for 4-ANPP in biological matrices as a precursor of exposure to fentanyl or to a fentanyl derivative]

Emilie Feisthauer, Audrey Farrugia, Alice Ameline, Laurie Gheddar, Nadia Arbouche, Jean-Sébastien Raul, Pascal Kintz

► **To cite this version:**

Emilie Feisthauer, Audrey Farrugia, Alice Ameline, Laurie Gheddar, Nadia Arbouche, et al.. Intérêt de rechercher la 4-ANPP dans les milieux biologiques comme marqueur d'une exposition au fentanyl ou à un analogue structural [Interest in testing for 4-ANPP in biological matrices as a precursor of exposure to fentanyl or to a fentanyl derivative]. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 2021, 33 (4), pp.338-342. 10.1016/j.toxac.2021.09.001 . hal-03625512

HAL Id: hal-03625512

<https://hal.science/hal-03625512v1>

Submitted on 5 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

(Article court)

Intérêt de rechercher la 4-ANPP dans les milieux biologiques comme marqueur d'une exposition au fentanyl ou à un analogue structural

Interest in testing for 4-ANPP in biological matrices as a precursor of exposure to fentanyl or to a fentanyl derivative

E.Feisthauer^{1,*}, A. Farrugia¹, A.Ameline¹, L.Gheddar¹, N. Arbouche¹, J-S. Raul¹, P.Kintz^{1,2}

¹Institut de médecine légale, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France

²X-Pertise Consulting, Mittelhausbergen, France

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail: emiliefeisthauer@gmail.com

Résumé :

Dans le cadre d'une intoxication fatale au fentanyl, les auteurs ont voulu vérifier que la 4-ANPP (4-anilino N-phenethyl-piperidine) pouvait être retrouvée dans plusieurs matrices biologiques d'intérêt médico-judiciaire. En France, le fentanyl est utilisé en milieu hospitalier et son usage détourné est principalement limité au personnel soignant. Pour échapper aux régulations légales, le fentanyl fait partie des molécules les plus copiées et on retrouve, dans la famille des nouvelles substances psychoactives (NPS), plus d'une cinquantaine d'analogues. Pour pallier à l'impossibilité de disposer de tous les standards en laboratoire, la recherche ciblée de 4-ANPP semble être un excellent moyen de dépistage pour cette classe de narcotiques.

Un homme de 36 ans est retrouvé décédé à son domicile et après investigation, l'individu aurait pu utiliser un patch de fentanyl en l'appliquant sous la langue. L'homme était un consommateur connu de produits stupéfiants. Aucune cause traumatique de la mort n'ayant pu être constatée lors de l'autopsie, le Procureur de la République a requis une expertise toxicologique de référence.

Une méthode analytique par UHPLC-MS/MS (Xevo TQD) permettant de doser le fentanyl et ses métabolites (norfentanyl et 4-ANPP) a été utilisée. Le fentanyl a été dosé à 44 ng/mL dans le sang cardiaque et à 30 ng/mL dans le sang fémoral, ce qui tend à démontrer une possible redistribution post mortem avec un ratio de 1,5. Le norfentanyl est à 2 ng/ml et la 4-ANPP à 0.6 ng/mL dans les 2 échantillons de sang. On retrouve également le fentanyl, le norfentanyl ainsi que la 4-ANPP dans les autres échantillons : urine (20, 2 et 0,2 ng/mL), bile (112, 10 et 1,6 ng/mL), contenu gastrique (101, 1 et 0.3 ng/mL) et enfin cheveux (652, 92 et 9,5 pg/mg).

Les concentrations de fentanyl sont supérieures aux concentrations thérapeutiques usuelles et sont potentiellement létales. Les faibles concentrations de norfentanyl sont en faveur d'un décès rapide. La présence de 4-ANPP dans tous les prélèvements confirme son statut de marqueur d'exposition aux dérivés du fentanyl.

Mots clés : Fentanyl, Norfentanyl, 4-ANPP, marqueur, intoxication, nouveaux opiacés de synthèse (NOS).

Summary :

In the context of fatal fentanyl poisoning, the authors aimed to verify that 4-ANPP (4-anilino N-phenethyl-piperidine) is found in several biological matrices of forensic interest. In France, fentanyl is used in hospitals and its misuse is mainly limited to health personal. To escape legal regulations, fentanyl is one of the most copied molecules, in the family of new psychoactive substances (NPS), more than fifty analogues do exist. To overcome the impossibility of maintaining all standards in the laboratory, the targeted research of 4-ANPP seems to be a suitable approach for screening for this class of narcotics. A 36-year-old man was found dead at his home, and after investigation, the individual could have used a fentanyl patch by applying it under his tongue. This man was known as user of narcotics. No traumatic cause of death was found during the autopsy, and the Public Prosecutor requested a reference toxicological expertise. An analytical method by UHPLC-MS/MS (Xevo TQD) to test for fentanyl and its metabolites (norfentanyl and 4-ANPP) was used. Fentanyl concentration was 44 ng/mL in cardiac blood and 30 ng/mL in femoral blood, which tends to demonstrate a possible postmortem redistribution, with a ratio of 1.5. Norfentanyl concentration was 2 ng/ml and 4-ANPP concentration was 0.6

ng/mL in all 2 blood samples. Fentanyl, norfentanyl and 4-ANPP were also found in the other samples, including urine (20, 2 and 0.2 ng / mL), bile (112, 10 and 1.6 ng / mL), gastric contents (101, 1 and 0.3 ng / mL) and hair (652, 92 and 9.5 pg / mg). These fentanyl concentrations are higher than usual therapeutic concentrations and are potentially lethal. Low concentrations of norfentanyl are in favor of rapid death. The presence of 4-ANPP confirms its status as a marker of exposure to fentanyl derivatives.

Key-words: Fentanyl, Norfentanyl, 4-ANPP, precursor, intoxication, New synthetic opioids.

Introduction :

En 2019, Salomone et al publiaient que la 4-ANPP (4-anilino N-phenethyl-piperidine), précurseur et métabolite de nombreux dérivés du fentanyl (figure 1), pouvait servir de marqueur d'exposition dans les cheveux à cette classe de molécules ultra-actives. [1,2,3] Dans le cadre d'une intoxication fatale au fentanyl sur un homme âgé de 36 ans, les auteurs ont voulu vérifier que la 4-ANPP, pouvait également être retrouvée dans d'autres matrices biologiques d'intérêt médico-judiciaire. En France et plus généralement en Europe, le fentanyl et ses analogues structuraux sont moins fréquemment responsable de décès qu'aux Etats Unis. [4,5] Dans les pays européens, le fentanyl est principalement utilisé comme analgésique chez les patients cancéreux. Son usage détourné est surtout limité au personnel hospitalier, mais peut s'observer par diversion de patches (Durogésic). [6] Pour échapper aux régulations légales, le fentanyl fait partie des molécules les plus copiées et l'on retrouve, dans la grande famille des nouvelles substances psychoactives (NPS), plus d'une cinquantaine d'analogues, dont le carfentanil, le furanylfentanil [7,8] ou encore l'ocfentanil. [9,10] Face à cette prolifération et à la quasi-impossibilité pour un laboratoire de disposer de tous les standards de référence, la recherche ciblée des métabolites et plus spécifiquement de la 4-ANPP semble être un excellent moyen de dépistage pour cette classe de narcotiques. [11,12,13]

Matériels et Méthodes :

Matériels

L'Ammonium formate (99%), et le di-sodium tetraborate decahydraté proviennent de chez VWR (Louvain, Belgique). L'acide formique (99-100%), de qualité LC-MS, l'acétonitrile (ACN), le dichlorométhane, le méthanol, et l'hexane proviennent de chez VWR (Louvain, Belgique). L'alcool isoamylique SUPELCO provient de chez Merck (Molsheim, France). Les standards de fentanyl, norfentanyl, fentanyl-D5 et norfentanyl-D5 ont été achetés chez Lipomed (Arlesheim, Suisse). La 4-ANPP a été obtenue chez LGC (Molsheim, France)

Présentation du cas

Un homme de 36 ans est retrouvé décédé à son domicile. D'après des témoins, l'individu aurait consommé un patch de fentanyl en l'appliquant sous la langue. Cette victime était connue comme consommateur de produits stupéfiants. Lors de l'autopsie, aucune cause traumatique n'a été constatée. Le procureur a ainsi requis une expertise toxicologique de référence. Les matrices classiques ont été prélevés (sang fémorale, sang cardiaque, urine, bile, contenu gastrique, cheveux noirs de 4- 5 centimètres, en vrac). À ce jour, la provenance du patch de fentanyl consommé par la victime n'est pas encore déterminée. Le patch étant dégradé, nous n'avons pas pu déterminer le dosage de fentanyl.

Extraction des liquides biologiques

Les différents liquides biologiques (sang, urines, bile et contenu gastrique) sont analysés dans les mêmes conditions et avec une méthode validée. [14] Le fentanyl et ses métabolites sont extraits dans 1 mL de matrice en présence de 20 ng de standards internes (fentanyl-D₅ et norfentanyl-D₅), dans 1 mL de tampon borate saturé à pH = 9.5 et 5 mL mélange de diethyl éther/dichlorométhane/n-hexane/alcool isoamylique (50:30:20:0.5). Après agitation (15 minutes), centrifugation (15 minutes, 3000 rpm) et évaporation à sec, l'extrait est reconstitué avec 30 µL de tampon ammonium formate ajusté pH 3.0.

Préparation des cheveux et méthode d'extraction

Le fentanyl et ses métabolites ont également été analysés dans les cheveux. Lors de l'autopsie, les cheveux du défunt ont été prélevés en vrac ; ils sont de couleur noire et de longueur 4-5 cm, environ.

Le fentanyl, le norfentanyl et la 4-ANPP, sont extraits dans 20 mg de cheveux décontaminés (2 x 5 mL de dichlorométhane). Après décontamination, les cheveux ont été découpés en segments fins (1mm) avec des ciseaux. Les cheveux sont incubés toute une nuit dans 1 mL de tampon borate pH 9,4 en présence de 200 pg de standard interne (fentanyl D₅ + norfentanyl D₅). Après incubation, on ajoute dans la préparation 5 mL de mélange de diéthyl éther/dichlorométhane/n-hexane/alcool isoamylique (50:30:20:0.5). Après agitation (15 minutes), centrifugation (15 minutes, 3000 rpm) et évaporation à sec, l'extrait est reconstitué avec 30 µL de tampon ammonium formate ajusté pH 3.0.

Analyses en UPLC-MS/MS

Le fentanyl, ses métabolites et les standards internes ont été analysés par chromatographie en phase liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (Waters XEVO TQD). La séparation est effectuée sur une colonne HSS C18 Acquity UPLC Waters (1,8 µm, 2,1 x 150 mm) maintenue à 50°C. Un gradient d'élution a été réalisé à l'aide d'un tampon ammonium formate ajusté à un pH 3.0 (Phase mobile A1) et d'acétonitrile + 0.1% acide formique (Phase mobile B1). Le débit est à 0.4 mL/min. Le gradient initial est de 13% de phase organique B et le gradient final, à 12.25 min, est de 95.0% de phase organique B. Le volume d'injection est de 2 µL. Un Xevo TQD triple quadripôle est utilisé pour la détection en opérant en mode électrospray positif (ESI+), Le capillaire est optimisé à 1.50 kV et la température de la source est de 150°C. Le gaz de désolvatation est chauffé à 600°C et est délivré à un débit de 1L/h. L'énergie de collision est ajustée pour obtenir un signal optimisé sur les deux meilleures transitions. Les transitions retenues sont les suivantes : pour le fentanyl : m/z 337.1 > 188.0 (48 V ; 38 eV) et m/z 337.1 > 105.0 (48 V ; 38 eV). Le norfentanyl et la 4-ANPP ont respectivement les transitions suivantes : m/z 233.0 > 83.9 (30 V ; 18 eV) et m/z 233.0 > 56.2 (30 V ; 18 eV) ainsi que m/z 280.9 > 104.9 (34 V ; 30 eV) et m/z 280.9 > 188.0 (34 V ; 30 eV). Pour quantifier le fentanyl et la 4-ANPP, le standard interne utilisé est le fentanyl-D₅,

ses transitions sont les suivantes : m/z 342.1 > 188.1 (26 V ; 20 eV) et m/z 342.1 > 105.0 (26 V ; 48 eV). Enfin pour quantifier le norfentanyl, le standard interne utilisé est le norfentanyl-D₅, sa transition est la suivante m/z 238.0 > 83.9 (50 V ; 32 eV). Le logiciel utilisé est MassLynx 4.1.

Résultats et discussion :

La demande du Procureur de la République mène les auteurs à analyser toutes les matrices disponibles afin de rechercher une cause de décès. Les analyses ont mis en évidence une prise récente de cannabis, de morphine et de fentanyl. La méthode « fentanyl » étant dédiée à plus d'une vingtaine d'analogues, leur absence confirme que seul le fentanyl a été utilisé. L'alcoolémie était nulle. La morphine (11 ng/mL) et le cannabis (THC : 2,4 ng/mL ; 11-OH-THC : 3,4 ng/mL ; THC-COOH : 24,5 ng/mL) présentent des concentrations non létales. Les concentrations de fentanyl se sont révélées être potentiellement létales par dépression respiratoire, même pour un consommateur régulier. (Tableau 1) [15]

Dans le sang fémoral, la concentration obtenue de fentanyl est de 30 ng/mL. Elle est de 44 ng/mL pour le sang cardiaque. Ainsi, une possible redistribution post mortem est à envisager avec un ratio de 1,5. Un ratio de 1,6 a été rapporté dans la littérature. [3] Les patchs de fentanyl sont commercialisés aux doses suivantes 12, 25, 50, 75 et 100 µg/H. Les concentrations thérapeutiques de fentanyl rapportées dans la littérature, varient entre 0,3 µg/L à 3,8 µg/L. [15] Dans ces mêmes prélèvements, les concentrations de norfentanyl sont de 1,7 ng/mL pour le sang fémoral et 1,5 ng/mL pour le sang cardiaque. La transformation du fentanyl en norfentanyl s'effectue par l'intermédiaire du cytochrome P450 (CYP) 3A4 et est donc dépendant d'un éventuel polymorphisme génétique. Les concentrations de fentanyl et de norfentanyl ont été rapportés par plusieurs auteurs. Une première étude présente les concentrations thérapeutiques retrouvées chez 11 patients sous traitement par patch. La concentration moyenne est de 0,785 ng/mL pour le fentanyl et de 0,531 ng/mL pour le norfentanyl soit des valeurs très superposables. [16] En cas de décès, si la concentration de fentanyl est peu élevée, celle du norfentanyl est proche : 5,6 et 5,9 ng/mL, respectivement. [17] Au contraire, si la concentration de fentanyl est très élevée, celle de norfentanyl est plus faible, le décès survenant rapidement. C'est ce qui a été observé dans notre cas, mais aussi dans le travail de Coopman et al [18],

avec des concentrations de 28,6 et 3,0 ng/mL. Les concentrations retrouvées pour la 4-ANPP sont les suivantes : 0,6 ng/mL pour le sang fémoral et 0,7 ng/mL pour le sang cardiaque. Les trois molécules d'intérêt (fentanyl, norfentanyl et 4-ANPP) ont également été retrouvées dans les autres liquides biologiques (urines, contenu gastrique et bile). Dans les urines, le fentanyl est retrouvé à une concentration de 20 ng/mL, le norfentanyl à 2 ng/mL et enfin la 4-ANPP à 0.2 ng/mL. Pour le contenu gastrique et la bile, les concentrations sont respectivement les suivantes : fentanyl (101 ng/mL, 113 ng/mL), norfentanyl (1 ng/mL, 10 ng/mL) et 4-ANPP (0.3 ng/mL, 1.6 ng/mL).

Un dosage dans les cheveux a également été effectuée. Avec une moyenne de pousse d'un centimètre par mois environ et une longueur de 4-5 cm, l'analyse des cheveux permettra d'avoir une visibilité de la consommation de fentanyl sur les 5 derniers mois. Le fentanyl, le norfentanyl et la 4-ANPP ont été retrouvés dans les cheveux. Le fentanyl est présent à une concentration de 652 pg/mg, le norfentanyl a une concentration de 92 pg/mg e la 4-ANPP est présente à une concentration de 9,5 pg/mg. Selon Salomone et al, la moyenne des concentrations de fentanyl retrouvées dans les cheveux pour au moins une exposition est de 3 pg/mg. Dans le cas de la 4-ANPP, la moyenne des concentrations était de 3 pg/mg également. [1] Au vu de la littérature et des résultats obtenus pour le fentanyl et la 4-ANPP, nous pouvons émettre l'hypothèse que le défunt était un consommateur régulier de fentanyl sur les 5 derniers mois avant son décès. Au total, la 4-ANPP a été retrouvée dans l'ensemble des prélèvements biologiques.

Les résultats obtenus pour la 4-ANPP dans notre cas confirment les écrits de la littérature mettent en avant l'intérêt de cette molécule dans l'identification future des nouveaux opioïdes de synthèse. Dans la littérature, des cas de décès au furanyl fentanyl sans fentanyl ont également été rapportés, la 4-ANPP a été identifiée confirmant son statut de marqueur de groupe. [1,7,8]

Conclusion :

Dans cette étude, les concentrations de fentanyl retrouvées sont supérieures aux concentrations thérapeutiques usuelles et sont potentiellement létales par dépression respiratoire, chez un sujet consommateur régulier de cette molécule. Les faibles concentrations de norfentanyl tendent en faveur d'un décès rapide de l'individu après

consommation. Retrouvée dans toutes les matrices biologiques, la 4-ANPP confirme son statut de marqueur d'exposition aux dérivés du fentanyl. Quelques observations complémentaires au laboratoire sur d'autres dérivés du fentanyl ont confirmé cette approche, le concept étant qu'un criblage positif de la 4-ANPP donne lieu à des investigations très poussées pour identifier la source.

Déclaration d'intérêts :

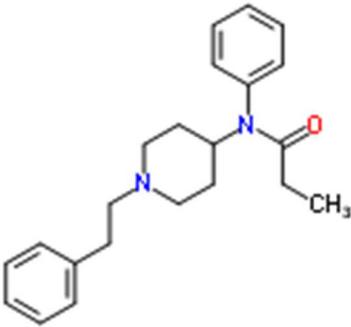
Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt en relation avec cet article.

Références :

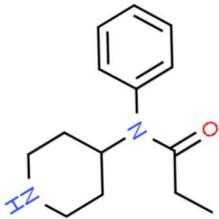
- [1] Salomone A, Palamar JJ, Bigiarini R, Gerace E, Di Corcia D, Vincenti M. Detection of Fentanyl Analogs and Synthetic Opioids in Real Hair Samples. *J Anal Toxicol.* 1 mai 2019;43(4):259-65.
- [2] Salomone A, Bigiarini R, Di Corcia D, Vincenti M. Interpretation of hair analysis for fentanyl and analogues. *Toxicol. Anal. Clin.* 2019;31(2):S15-S16.
- [3] McIntyre IM, Anderson DT. Postmortem fentanyl concentrations: a review. *Journal of Forensic Research.* 2012;3(157):2.
- [4] Raffa RB, Pergolizzi JV, LeQuang JA, Taylor R, NEMA Research Group, Colucci S, et al. The fentanyl family: A distinguished medical history tainted by abuse. *J Clin Pharm Ther.* févr 2018;43(1):154-8.
- [5] Hoizey G, Rey-Salmon C, Meyer P, Chèze M, Billault F, Medrano E, Deveaux M. Intoxication mortelle d'un nourrisson par un dispositif transdermique de fentanyl. *Toxicol. Anal. Clin.* 2018; 30(4):263-267.
- [6] Lelong J, Venisse N, Houpert T, Brunet B, Mura P. Décès d'un chirurgien par rémifentanil, fentanyl et midazolam : explorations toxicologiques. *Toxicol. Anal. Clin.* Mai 2021;29(2):220-224
- [7] Freni F, Pezzella S, Vignali C, Moretti M, Cisini S, Rossetti C, et al. A case report on potential postmortem redistribution of furanyl fentanyl and 4-ANPP. *Forensic Sci Int.* nov 2019;304:109915.
- [8] Martucci HFH, Ingle EA, Hunter MD, Rodda LN. Distribution of furanyl fentanyl and 4-ANPP in an accidental acute death: A case report. *Forensic Sci Int.* févr 2018;283:e13-7.
- [9] Garneau B, Desharnais B, Beauchamp-Doré A, Lavallée C, Mireault P, Lajeunesse A. Challenges Related to Three Cases of Fatal Intoxication to Multiple Novel Synthetic Opioids. *J Anal Toxicol.* 7 janv 2020;44(1):86-91.
- [10] Qin N, Shen M, Xiang P, Wen D, Shen B, Deng H, et al. Determination of 37 fentanyl analogues and novel synthetic opioids in hair by UHPLC-MS/MS and its application to authentic cases. *Sci Rep.* 14 juill 2020;10(1):11569.
- [11] Stanton JD, Whitley P, LaRue L, Bundy WL, Dawson E, Huskey A. Fentanyl analog positivity among near-real-time urine drug test results in patients seeking health care. *Drug Alcohol Depend.* 1 déc 2020;217:108264.
- [12] Wu F, Slawson MH, Johnson-Davis KL. Metabolic Patterns of Fentanyl, Meperidine, Methylphenidate, Tapentadol and Tramadol Observed in Urine, Serum or Plasma. *J Anal Toxicol.* 1 mai 2017;41(4):289-99.

- [13] de Bruin-Hoegée M, Kleiweg D, Noort D, van Asten AC. Chemical attribution of fentanyl: The effect of human metabolism. *Forensic Chem.* 2021;24:100330.
- [14] Chetaru E, Farrugia A, Ameline A, Raul JS, Kintz P. Décès impliquant un surdosage de fentanyl par diversion d'un dispositif transdermique. A propos d'un cas original avec mastication. *Rev. de Med. Leg.* 2018, 9, 174-178.
- [15] Randall C. B. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Twelfth Edition. Biomedical Publications; 2020.
- [16] Bista SR, Lobb M, Haywood A, Hardy J, Tapuni A, Norris R. Development, validation and application of an HPLC–MS/MS method for the determination of fentanyl and nor-fentanyl in human plasma and saliva. *J Chromatogr B.* 2014; 960:27-33.
- [17] Teske J, Weller JP, Larsch K, Tröger HD, Karst M. Fatal outcome in a child after ingestion of a transdermal fentanyl patch. *Int J Legal Med.* 2007Mar;121(2):147-51
- [18] Coopman V, Cordonnier J, Pien K, Van Varenbergh D. LC-MS/MS analysis of fentanyl and norfentanyl in a fatality due to application of multiple Durogesic transdermal therapeutic systems. *Forensic Sci Int.* 2007 Jul 4;169(2-3):223-7

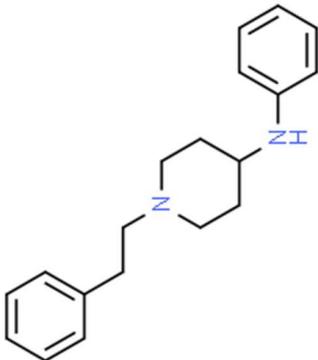
Figure 1.



Fentanyl



Norfentanyl



4-ANPP

Structure chimique du fentanyl et de ses métabolites, le norfentanyl et la 4-ANPP

Tableau 1. Tableau des résultats du fentanyl, norfentanyl et 4-ANPP dans les différentes matrices

Matrices	Concentration en Fentanyl	Concentration en Norfentanyl	Concentration en 4-ANPP
Sang fémoral (ng/mL)	29,6	1,7	0,6
Sang cardiaque (ng/mL)	44,4	1,5	0,7
Urines (ng/mL)	20,1	2,1	0,2
Bile (ng/mL)	112,5	10,3	1,6
Liquide gastrique (ng/mL)	101,1	1,1	0,3
Cheveux (pg/mg)	651,9	91,7	9,5