

Identification et dosage de toxiques végétaux
par chromatographie liquide couplée à la
spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS).
Revue de la littérature et expérience
du laboratoire Toxlab

*Identification and quantification of plant
poisons by liquid chromatography-tandem
mass spectrometry (LC-MS/MS).
Bibliographic overview, and Toxlab
laboratory's experience*

Marjorie CHEZE, Marc DEVEAUX, Gilbert PÉPIN*

Laboratoire TOXLAB, 7, rue Jacques Cartier - 75018 PARIS

*Auteur à qui adresser la correspondance : Gilbert PÉPIN, Laboratoire TOXLAB, 7, rue Jacques Cartier
75018 PARIS - Tél : 01 58 59 28 00 - Fax : 01 58 59 28 01 - E-mail : toxlab@wanadoo.fr

(Reçu le 15 janvier 2005 ; accepté après modifications le 7 avril 2005)

RÉSUMÉ

L'utilisation inappropriée ou abusive de certaines plantes potentiellement toxiques et aux principes psychoactifs non réglementés oblige le toxicologue analyste à adapter et améliorer ses techniques de détection et de dosage. Plusieurs travaux utilisant la LC-MS/MS ont déjà été publiés, permettant la recherche des toxiques les plus courants : atropine, scopolamine (belladone, datura), oléandrine (laurier rose), taxol (if), cévadine, vératrine (vératre), colchicine (colchique), atractyloside (chardon à glu), digitoxine et digoxine (digitale). Nous présentons ici quelques exemples d'utilisation de la LC-MS/MS triple quadrupôle, en chromatographie

SUMMARY

The inappropriate use or the abuse of potentially toxic or psychoactive plants obliges the toxicologist analyst to adapt and improve his analytical techniques. Several papers about LC-MS/MS for the determination of the most current poisons such as atropine and scopolamine (deadly nightshade, datura), oleandrine (pink bay-tree), taxol (yew), cevadine and veratrine (hellebore), colchicine (meadow saffron), atractyloside (glue thistle) and digitaline (foxglove), were already published. We present here some examples of the use of LC-MS/MS triple quadrupole with reversed phase chromatography for the detection of less common poisons such as glycyrr

liquide en phase inverse, pour la détection de toxiques moins communs tels l'acide glycyrrhétic (régliasse), le LSA (ipomé violacée), la muscarine, le muscimol et l'acide iboténique (amanite tue-mouches).

L'acide glycyrrhétic total est dosé par LC-MS/MS dans les prélèvements biologiques après hydrolyse enzymatique. L'acquisition est réalisée sur quatre ions fils ($m/z = 189$, $m/z = 235$, $m/z = 149$, $m/z = 119$) de l'ion pseudomoléculaire de l'acide glycyrrhétic ($m/z = 471$). La limite de détection est de l'ordre de 0,5 ng/mL. Cette méthode a été appliquée à deux cas réels. Cas n°1 : chez un consommateur occasionnel ayant ingéré 5 rouleaux de réglisse sur une durée de 8 heures, les concentrations d'acide glycyrrhétic étaient de 13,7 ng/mL dans le sang et 75 ng/mL dans l'urine, 15 heures après la dernière ingestion. Cas n°2 : dans un cas de décès lié à une intoxication chronique, les concentrations en acide glycyrrhétic dans les prélèvements étaient : sang cardiaque : 7,6 ng/mL, humeur vitrée : 5,1 ng/mL, urine : 18,2 ng/mL et contenu gastrique : 83,3 ng/mL.

La mise au point en LC-MS/MS de la détection du LSA a été réalisée par infusion directe d'une solution de macération méthanolique de graines d'*Ipomea violacea* et a permis l'acquisition de trois ions fils : $m/z = 223,3$, $m/z = 207,3$ et $m/z = 180,3$, fragments de l'ion moléculaire protoné ($m/z = 268,3$). Un dosage réalisé sur dix graines saisies a permis de mesurer une concentration de LSA, exprimée en équivalent LSD-d3, de 99 ng/graine. Une gamme d'étalonnage dans l'urine, réalisée par ajouts de la solution de macération, permettait d'atteindre des limites de détection et de quantification estimées respectivement à 0,5 ng/mL et 1 ng/mL.

La détection par LC-MS/MS des principes actifs de l'amanite tue-mouches a été réalisée par fragmentation des ions moléculaires ou pseudo-moléculaires de la muscarine ($m/z = 174,2$), du muscimol ($m/z = 115,1$) et de l'acide iboténique ($m/z = 159,0$). Cette méthode nous a permis de déterminer dans les pieds et les chapeaux de champignons secs, les concentrations respectives de muscimol : 3,6 et 97,2 mg/kg, acide iboténique : 16,4 et 216,8 mg/kg, et muscarine : 39,7 et 2006,0 mg/kg.

MOTS-CLÉS

Plantes, intoxication, hallucinogènes, glycyrrhizine, LSA, muscimol, salvinorine A, LC-MS/MS.

Introduction

L'intérêt croissant porté aux plantes médicinales se traduit par une augmentation des intoxications dues à l'utilisation inappropriée ou abusive de certaines plantes potentiellement toxiques et non réglementées (1,2). Des jeunes gens sont également attirés par des végétaux et des champignons aux effets psychoactifs, couramment vendus sur Internet en tant que «drogues légales» telles l'ipomé violacée (*Ipomea violacea*, *I. tricolor*) et l'amanite tue-mouches (*Amanita muscaria*) comme succédanés du LSD, la sauge divinatoire (*Slavia divinorum*) et la datura (*Datura stramonium* ou *inoxia*) comme succédanés du Cannabis, l'herbe à chat (*Nepeta cataria*), la laitue vireuse (*Lactuca virosa*),

rhétic acid (liquorice), LSA (morning glory seeds) and muscarine, muscimol and ibotenic acid (fly agaric mushrooms). After enzymatic hydrolysis, the total acid glycyrrhetic was quantified in biological samples by LC-MS/MS. Acquisition was carried out on four daughter ions ($m/z = 189$, $m/z = 235$, $m/z = 149$, $m/z = 119$) of the parent ion of glycyrrhetic acid ($m/z = 471$). The detection limit was about 0.5 ng/mL. This method was applied to two real cases. Case n°1: in an occasional consumer having ingested 5 rollers of liquorice candy over 8 hours, glycyrrhetic acid concentrations were of 13.7 ng/mL in blood and 75 ng/mL in the urine, 15 hours after the last ingestion. Case n°2: in a case of death involving a chronic intoxication, glycyrrhetic acid concentrations were: cardiac blood: 7.6 ng/mL, vitreous: 5.1 ng/mL, urine: 18.2 ng/mL, gastric content: 83.3 ng/mL.

The development of the detection of LSA in LC-MS/MS was carried out by direct infusion of methanolic maceration of *Ipomea violacea* seeds. Three daughter ions were acquired: $m/z = 223.3$, $m/z = 207.3$ and $m/z = 180.3$, fragments of the protonated molecular ion ($m/z = 268.3$). The analysis carried out on seized seeds showed a concentration of LSA of 99 ng/seed, expressed in LSD-d3 equivalent. A calibration in urine, carried out by additions of the maceration solution, lead to estimated detection and quantification limits at 0.5 ng/mL and 1 ng/mL, respectively.

The detection by LC-MS/MS of the active agents of fly agaric mushrooms was carried out by fragmentation of the molecular or pseudo-molecular ions of muscarine ($m/z = 174.2$), muscimol ($m/z = 115.1$) and ibotenic acid ($m/z = 159.0$). This method enabled us to determine concentrations in dry mushrooms of muscimol: 3.6 and 97.2 mg/kg, acid ibotenic: 16.4 and 216.8 mg/kg, and muscarine: 39.7 and 2006.0 mg/kg, in the feet and the heads, respectively.

KEY-WORDS

Plants, poisoning, glycyrrhizin, hallucinogens, LSA, muscimol, salvinorin A, LC-MS/MS.

l'absinthe (*Artemisia absinthium*), et dont les doses toxiques, les principes actifs, et leur détection dans les fluides biologiques sont mal documentés.

Cependant, les principes actifs des plantes toxiques ou médicinales ainsi que ceux des plantes ou champignons hallucinogènes sont, pour la plupart, détectables par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS) (3-9).

Le principal atout de cette méthode est la combinaison d'une technique chromatographique presque universelle et robuste, à la spécificité et la sensibilité de la spectrométrie de masse. Cette technique d'analyse, plus particulièrement adaptée aux xénobiotiques thermolabiles

ou de haut poids moléculaire (supérieur à 400 u.m.a.), permet des extraits moins purs avec de meilleurs rendements et des gradients plus courts en s'appuyant sur la spécificité de la spectrométrie de masse tandem et sa très grande sensibilité pour la recherche de traces. La dérivation des analytes est rarement utile et la détection simultanée des molécules mères et de leurs métabolites polaires est plus aisée que par chromatographie en phase gazeuse. La principale limitation de cette technique est due aux éventuelles difficultés d'ionisation des analytes mais les constructeurs y travaillent et de nouvelles sources permettant des modes d'ionisation multiples apparaissent sur le marché.

Plantes toxiques

Revue de la littérature

Les dernières publications parues sur les intoxications par les plantes font état de 21 cas d'empoisonnements humains par des graines de *Cycas* (cycasine et neocycasine, glycosides cyanogénétiques) à Taiwan (10), 2 cas d'empoisonnement de chevaux par des feuilles d'if (*Taxus*, taxol ou paclitaxel) dans l'Oregon (11), 2 cas accidentels en Slovénie par des bulbes de colchique (*Colchicum autumnale*, colchicine) confondus avec de l'ail sauvage (*Allium arsinium*) (12,13) et 1 cas d'intoxication par des graines de *Datura* (*Datura innoxia*, atropine, scopolamine) en Afrique du Sud (14). Une revue des cas d'intoxications aiguës par le chardon à glu (*Atractylis gummifera*, atractyloside), plante largement présente en Afrique du nord, a également été publiée par le Centre anti-poison de Tunis (15). Les intoxications par les végétaux chez l'enfant ont été l'objet d'études rétrospectives et prospectives en République Tchèque (16), en République Sud Africaine (17) et en Italie (18), recensant un total de plus de 350 cas.

De nombreux travaux utilisant la LC-MS/MS ont été publiés, permettant la recherche des toxiques les plus courants : atropine, scopolamine (belladone, datura), oléandrine (laurier rose), taxol (if), cévadine, vératrine (vétrate), colchicine (colchique), atractyloside (chardon à glu), digitaliques (digitale) (3-9)

Outre ces toxiques bien connus, certaines plantes médicinales communément utilisées et ayant la réputation d'être sans risque, ne sont pas dénuées d'une toxicité réelle. Compte tenu de la recrudescence de l'automédication par les plantes, les risques associés à ces pratiques ont été bien décrits. Les auteurs indiquent les problèmes rénaux et hépatiques pouvant survenir. L'hépatotoxicité du kava (*Piper methysticum*), utilisé comme une alternative aux anxiolytiques, a ainsi récemment été soulignée (21) malgré des travaux aus-

traliens contradictoires (22). Ses extraits ont été retirés de la vente dans l'Union Européenne et au Canada en janvier 2003. Cette plante est actuellement sujette à caution aux Etats-Unis. Les effets indésirables de *l'Ephedra sp.* (éphédrine) et de la noix d'Arec (arécoline) ont été également soulevés et discutés (23,24).

Un exemple de plante toxique à haute dose : la réglisse

La réglisse commune, *Glycyrrhiza glabra* (*Fabaceae*), a pour principaux constituants actifs des saponosides, et majoritairement, la glycyrrhizine et son dérivé déglucuronconjugué, l'acide glycyrrhétique (24). Les différentes variétés de réglisse proviennent de plantes sauvages (Espagne) et de cultures qui sont souvent semi-sauvages en Irak, Syrie et Afghanistan. La France importe des racines de Turquie, d'Iran, de Chine ou du Pakistan et des extraits de Chine et des Etats-Unis. Ce sont les racines et les stolons de la plante qui sont utilisés.

Utilisation :

La réglisse est utilisée pour son pouvoir sucrant (50 fois supérieur à celui du saccharose) autant que pour ses propriétés médicinales. Elle aurait des vertus anti-inflammatoires, antispasmodiques, antiulcéreuses, antifongiques et hépatoprotectrices (24-26). En pratique, elle sert par voie orale, au traitement symptomatique des gastralgies, comme aromatisant dans les mélanges pour infusion et dans les tisanes à visée laxative, bonbons, chewing-gums, sodas, pastis sans alcool. Il existe également des rouleaux de réglisse et des bâtons à sucer (stolons).

Toxicité :

Sa toxicité semble être surtout chronique (usage régulier pendant plus de six semaines). Son usage est contre-indiqué en cas d'hypertension car sa consommation abusive entraîne des risques d'hypertension irréversible et des troubles cardiaques (24, 28, 29) accompagnés des symptômes d'intoxication minéralocorticoïde : céphalées, rétention d'eau et de sodium, hypokaliémie et parfois même arrêt cardiaque. Ce phénomène a pour origine l'inhibition de l'enzyme responsable de la dégradation du cortisol par l'acide glycyrrhétique. La consommation de 2 à 4 rouleaux de réglisse par jour, pendant 4 à 6 semaines, peut être toxique et l'AFSSAPS recommande de ne pas dépasser la dose de 3 mg/kg/jour de glycyrrhizine. Les cas d'intoxications chroniques sont le plus souvent observés lors de consommation excessive de bonbons rafraîchissants pour l'haleine, après arrêt du tabac entre autres, et plus particulièrement lors de consommation d'apéritifs anisés sans alcool (30, 31). Plusieurs décès ont été rapportés (32, 33).

Propriétés physico-chimiques :

Outre de l'amidon et des sucres, la racine de réglisse renferme des saponosides, essentiellement de la glycyrrhizine (C₄₀H₆₂O₁₆, PM : 798), représentant 3 à 5 % de la drogue sèche. Cette molécule libère par hydrolyse, deux molécules d'acide D-glucuronique et une molécule d'acide glycyrrhétic (C₃₀H₄₆O₄, PM : 470) représentée figure 1 (24). Celui-ci est extrait en milieu acide par le dichlorométhane et détectable par LC-MS/MS en mode positif ou négatif.

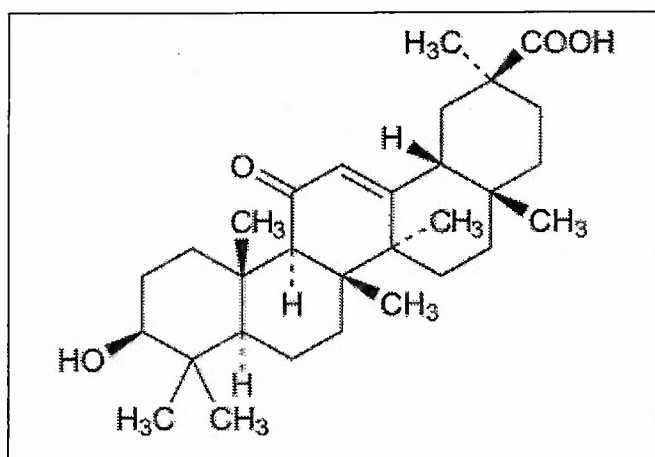


Figure 1 : Formule développée de l'acide glycyrrhétic (réglisse).

Identification et dosage

Matériel végétal, infusions, extraits

Les préparations (extraits) et les infusions peuvent être traités par extraction en milieu acide au dichlorométhane et analyse par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (LC-DAD). Le matériel végétal brut sera plus facilement analysé par LC-MS/MS pour des raisons de sensibilité, compte tenu des faibles concentrations présentes.

Milieux biologiques

Les concentrations attendues dans les fluides biologiques étant faibles la LC-DAD n'est pas suffisamment sensible et l'utilisation de la LC-MS/MS est recommandée. Une seule publication est parue très récemment (34) sur une méthode de détection simultanée de la glycyrrhizine et de l'acide glycyrrhétic dans le plasma en LC-MS/MS avec source électrospray (ESI), après extraction en phase solide (SPE). La limite de quantification retenue est de 10 ng/mL pour les deux analytes. Malheureusement aucun cas réel n'est cité.

Nous présentons ici la méthode que nous avons mise au point pour le dosage de l'acide glycyrrhétic dans les prélèvements biologiques. Pour plus de facilité analy-

tique et afin d'éviter des compromis aléatoires de température de source censés éviter la dégradation du dérivé glucuronoconjugué, nous n'avons pas cherché à déterminer la glycyrrhizine mais seulement l'acide glycyrrhétic total, après hydrolyse enzymatique des échantillons. L'extraction est réalisée sur 1 mL ou 1 g de prélèvement biologique. Le standard interne est le clonazépam-d4 à 1 ng/mL. L'hydrolyse est obtenue par ajout de 30 µL de bêta-glucuronidase (25 000 unités) et 2 mL de tampon phosphate 0,2 M pH 6,5, pendant une heure à 56°C. L'échantillon est ensuite acidifié par 0,5 mL d'acide chlorhydrique 1N, avant l'extraction liquide-liquide par 4 mL de dichlorométhane. L'extrait est évaporé à sec puis repris par 50 µL de méthanol. La colonne analytique est une colonne C18 (150 x 2,1 mm- 5 µm Uptisphere ODB (Interchim)). La chromatographie utilise un gradient de tampon formiate d'ammonium 2mM pH3 / acétonitrile, pour un débit de 200 µL/min. La détection se fait en spectrométrie de masse tandem triple quadripôle muni d'une source électrospray avec nébuliseur chauffé, en mode positif. Cependant, le mode négatif est possible car il y a présence d'un groupement acide. Les paramètres de source ont été optimisés sur l'ion pseudomoléculaire de l'acide glycyrrhétic (m/z = 471), ainsi que les énergies de collision pour quatre ions fils (tableau I). Le spectre de masse est enregistré en mode SRM (Selected Reaction Monitoring ou MRM).

Le rendement d'extraction est de 57 % à 20 ng/mL. La méthode est linéaire sur la gamme étudiée en 5 points (de 1 à 20 ng/ml) : $y = 1,040 x - 0,342$; $r^2 = 0,999$. La limite de détection estimée à trois fois le rapport signal sur bruit, est de l'ordre de 0,5 ng/mL. Cette méthode a été appliquée à deux cas réels.

Cas n°1 : données obtenues chez un consommateur de réglisse

Les quelques cas d'intoxication publiés à ce jour et mettant en cause l'acide glycyrrhétic (réglisse, pastis sans alcool...) ne font part d'aucune concentration dans les milieux biologiques. Afin d'évaluer notre technique nous avons réalisé l'expérience chez un consommateur occasionnel de 35 ans ayant ingéré 5 rouleaux de réglisse d'environ 9,5 grammes répartis sur 8 heures. Des prélèvements sanguins (sur tube sec) et urinaires ont été réalisés 15 heures après la dernière ingestion. L'analyse toxicologique par la méthode décrite ci-dessus a montré la présence d'acide glycyrrhétic après hydrolyse : sang périphérique = 13,7 ng/mL et urine = 75 ng/mL.

Cas n°2 : intoxication mortelle

Un homme de 56 ans était retrouvé mort dans ses toilettes, le corps penché en avant. Un bâton de réglisse était découvert au sol. L'autopsie du corps en bon état

Tableau I : Fragmentation SRM de différents toxiques végétaux sur LC-MS/MS triple quadripôle en mode positif et source ESI.

	Ions fils		Energies de collision
Acide glycyrrhétique m/z = 471	I ₁	119,2	40
	I ₂	149,2	36
	I ₃	189,3	24
	I ₄	235,3	18
LSA m/z = 268,3	I ₁	180,3	36
	I ₂	207,3	30
	I ₃	223,3	24
muscarine m/z = 174,2	I ₁	43,3	34
	I ₂	57,3	24
	I ₃	97,2	24
	I ₄	115,1	22
muscimol m/z = 115,1	I ₁	39,4	42
	I ₂	67,2	26
	I ₃	98,1	16
acide iboténique m/z = 159,0	I ₁	42,3	26
	I ₂	113,1	16

de conservation, concluait à une mort cardiaque dans un contexte d'insuffisance cardiaque et de coronarite évoluée, pour laquelle une participation toxique n'était pas exclue. L'analyse toxicologique a montré la présence d'acide glycyrrhétique après hydrolyse dans l'ensemble des prélèvements d'autopsie : sang cardiaque = 7,6 ng/mL (fig. 2) ; humeur vitrée = 5,1 ng/mL ; urine = 18,2 ng/mL et contenu gastrique = 83,3 ng/mL. Aucune autre substance médicamenteuse ou stupéfiante n'était retrouvée. Il n'y avait pas d'alcool dans le sang.

Ces concentrations apparaissent modérées comparées à celles retrouvées dans le cas n°1, cependant la chronicité de la consommation de bâtons de réglisse journalière, établie par l'enquête, permet de suspecter fortement une contribution toxique de la réglisse dans le processus de décès cardiaque. Ce cas est à notre connaissance le premier cas de décès lié à une intoxication chronique, pour lequel les concentrations dans les prélèvements d'autopsie ont été obtenues.

Plantes psychoactives communes

La plante psychoactive la plus répandue est sans conteste le cannabis (*Cannabis sativa*). Au vu du grand

nombre de publications traitant de sa détection dans les plantes et les fluides biologiques, autant par chromatographie gazeuse que par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, nous n'aborderons pas ces méthodes ici. D'autres plantes aux «vertus» psychoactives telles que le Khat (cathinone) et l'Iboga (ibogaine) sont bien connues mais très peu utilisées sous nos latitudes. Elles sont facilement identifiées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Dans un seul cas, nous avons pu identifier dans le sang par LC-MS (5) la lobéline, principe actif de la lobélie, une plante euphorisante utilisée essentiellement en Martinique et en Guadeloupe.

Datura (atropine, scopolamine)

La datura est une plante psychoactive peu fréquentée mais bien connue des toxicologues. Toute la plante est toxique, mais plus particulièrement les graines. Ses effets anticholinergiques ont été bien décrits (35). En cas de surdosage, cette drogue entraîne un délire toxique marqué par une amnésie antérograde, confusion, dissociation, hallucinations, incoordination, état d'excitation, mydriase, sécheresse des muqueuses, fièvre et arythmie (36). La détection d'atropine et de scopolamine par LC-MS/MS dans les fluides biologiques a largement été décrite dans la littérature (5,6,37,38) et permet d'atteindre des concentrations de

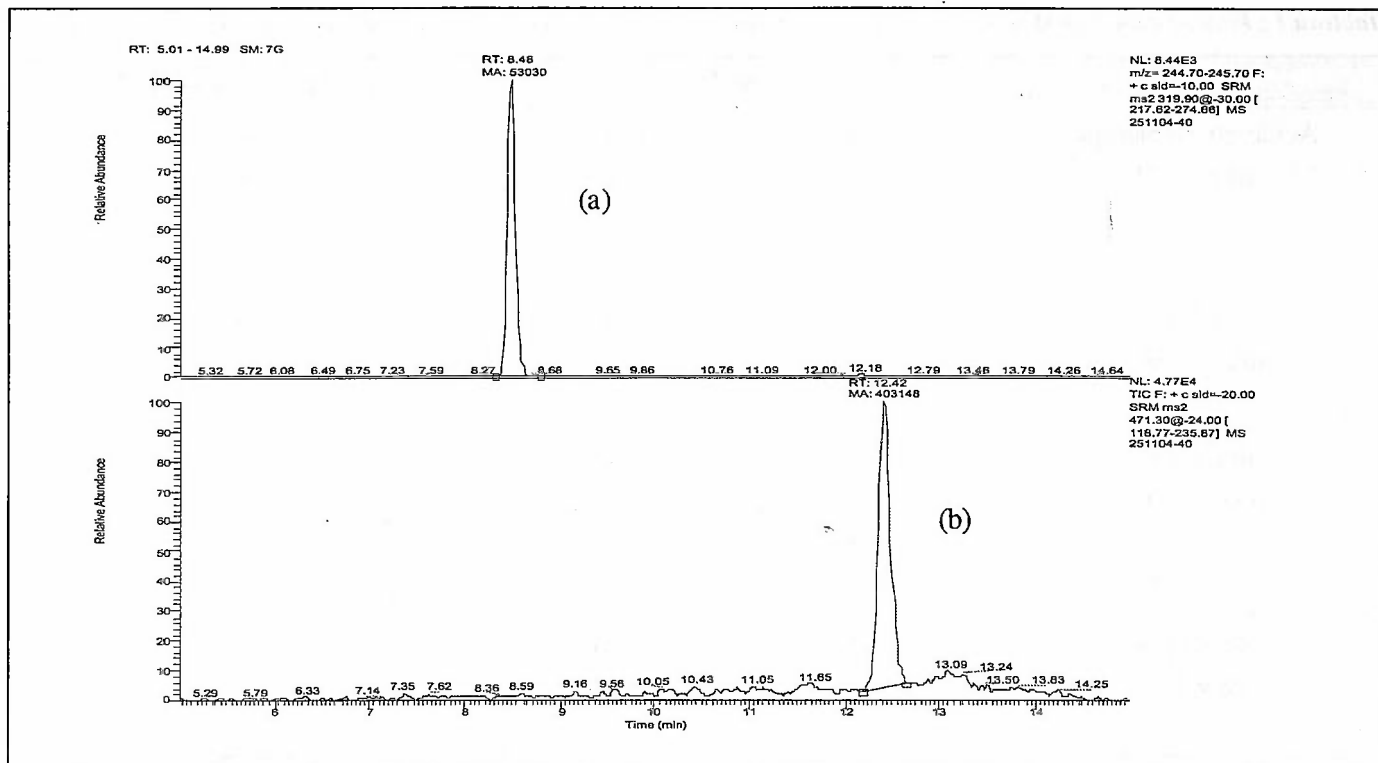


Figure 2 : Chromatogramme d'un extrait de sang à 7,6 ng/ml d'acide glycyrrhétique. (a) somme des ions fils de l'étalon interne (clonazépam-d4, $m/z = 319,9$), (b) somme des ions fils de l'acide glycyrrhétique ($m/z = 417,0$).

l'ordre de 0,1 ng/ml . L'analyse des graines a été décrite en LC-DAD/MS (39).

Ayahuasca (diméthyltriptamine, harmaline, harmine)

L'Ayahuasca est une décoction psychotrope originaire d'Amérique du Sud (essentiellement Amazonie, Pérou, Brésil) qui signifie « liane de l'âme » dans la langue vernaculaire des indiens quechuas. Elle est préparée à base d'une liane (*Banisteriopsis caapi*) et de feuilles d'un arbuste (*Psychotria viridis*). Elle contient principalement des β -carbolines : harmaline, tétrahydroharmine et harmine, et de la diméthyltriptamine (DMT). De fabrication artisanale et difficile, son utilisation est peu fréquente et généralement réduite à des rites religieux. Son utilisation dans des sectes a cependant amené à des saisies de ce breuvage en France (40). Les plantes entrant dans la composition de l'Ayahuasca, notamment *B. caapi* et *P. viridis*, ainsi que les β -carbolines qu'elles contiennent, viennent d'être inscrites sur la liste des substances classées comme stupéfiantes (Arrêté du 20 avril 2005, J.O. du 3 mai 2005).

La recherche des principes actifs dans les décoctions se fait facilement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (40). D'autres techniques utilisant la chromatographie liquide couplée

à un détecteur UV ou à fluorescence ont été décrites notamment pour la recherche des β -carbolines dans le plasma (41,42). La DMT est préférentiellement recherchée par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur azote-phosphore (43).

Les amines entrant dans la composition de l'Ayahuasca sont facilement ionisables et sont donc a priori détectables dans les fluides biologiques par une technique unique en LC-MS/MS, cependant aucune publication utilisant cette technique n'est parue à ce jour.

Sauge divinatoire (salvinorine A)

La Sauge divinatoire (*Salvia divinorum*) est une plante de la famille des menthes (*Lamiaceae*). Ses feuilles étaient traditionnellement mâchées par les Indiens Mazatec du Mexique en médecine populaire et lors de pratiques divinatoires (36). Actuellement, les feuilles de la plante sont séchées avant d'être fumées par l'utilisation d'un « bang » ou d'une pipe ou encore infusées comme du thé. Elle apparaît de plus en plus souvent dans les milieux festifs en tant que « drogue légale » (48,49). Le principe actif de la plante, la salvinorine A (ou divinorine A), a des propriétés hallucinogènes (47) et possède une action agoniste sélective sur les récepteurs opioïdes kappa (50,51). Une dose de 200 à 500 μ g de salvinorine A provoque des hallucinations. Elle n'est pas classée comme stupéfiant. En l'absence de

standard commercialement disponible, plusieurs travaux ont été entrepris pour l'extraction du principe actif de la plante (51,52). De bons rendements ont été obtenus, mais le procédé reste fastidieux. Nous avons récemment pu identifier la salvinorine A par GC-MS (bibliothèque Wiley) dans des extraits de plantes saisies, et achetées sur Internet, sans de fait, pouvoir la doser. Sa détection dans les milieux biologiques a été récemment mise au point en LC/MS munie d'une source APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) après extraction du principe actif de la plante (51). En effet cette molécule étant difficilement ionisable en ESI, l'utilisation d'une source APCI pour la LC-MS/MS semble être indispensable.

Ipomée violacée (lysergamide)

L'Ipomée violacée («Morning Glory» des anglosaxons, *Ipomoea violacea*, *Ipomoea tricolor*) fait partie de la famille des *Convolvulaceae*. A l'origine c'est une plante ornementale fréquente, y compris sur les balcons parisiens. Ses graines contiennent une tryptamine naturelle appelée lysergamide (LSA) ou ergine et de structure similaire au LSD. D'autres plantes de la famille des *Convolvulaceae* en contiennent telles que *Turbina corymbosa* et *Argyreia nervosa*, autrement appelée «baby woodrose» par les hawaïens (52).

Utilisation

Les volubilis sacrés du Mexique ont une importance historique comparable à celle des champignons sacrés. Les graines d'Ipomée violacée appelées «tlitlitzin» étaient traditionnellement utilisées dans des rituels aztèques pour leurs vertus psychoactives (24). Dès 1963, ses alcaloïdes sont extraits et identifiés dans la plante par Taber et coll. (53). Les graines sont disponibles commercialement sans contrôle légal (sur

Internet entre autres) et sont actuellement utilisées comme drogue hallucinogène. Elles sont consommées telles quelles ou en macération dans de l'alcool.

Toxicité

Son action est considérée comme 10 fois moins puissante que celle du LSD et légèrement différente puisque engendrant des effets sédatifs marqués. L'effet dure de 4 à 10 heures et les suites peuvent se ressentir jusqu'à 4 heures voire plus selon la dose ingérée. Les doses varient de 50 graines environ pour un effet léger à plus de 400 pour un effet puissant. Les effets secondaires engendrés (léthargie, constipation, nausée, vue trouble) limitent son utilisation (54).

Propriétés physico-chimiques

Le LSA, lysergamide ou ergine ($C_{16}H_{17}N_3O$, PM : 267,3) est le dérivé amide (fig. 3a) de l'acide lysergique tandis que le LSD ($C_{20}H_{25}N_3O$, PM : 323,4) en est le dérivé diéthylamide (fig. 3b). Contrairement au LSD, ses métabolites ne sont pas identifiés et il n'est pas classé stupéfiant.

Identification et dosage du LSA

Matériel végétal

Les techniques d'extraction décrites utilisent l'acétate d'éthyle en milieu alcalin (53). Une macération des graines broyées une nuit dans l'éthanol après sonication pendant trente minutes permet également son extraction. C'est cette seconde méthode que nous avons appliquée.

Dix graines broyées ($m = 322\text{ g}$) sont incubées une nuit dans 2 mL d'éthanol absolu après 30 min aux ultrasons. L'extrait est évaporé puis repris par l'acétonitrile pour identifier le LSA par LC-DAD grâce à son spectre UV, identique à celui du LSD. Cependant afin d'obtenir une identification formelle et une estimation de la

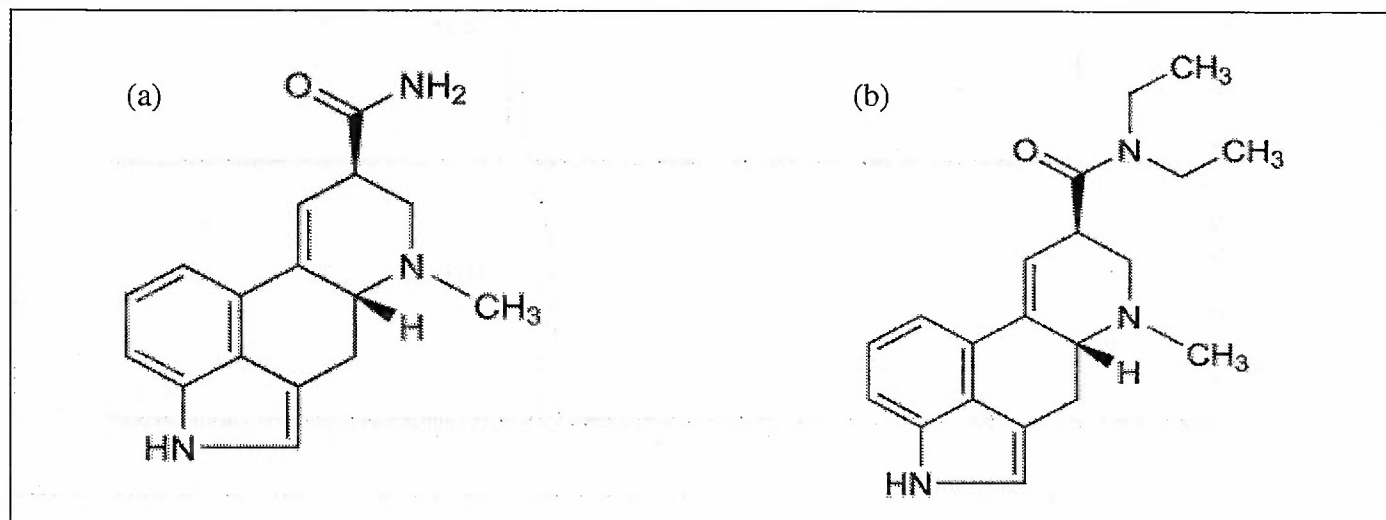


Figure 3 : (a) formule développée du LSA ou lysergamide, (b) formule développée du LSD ou lysergide.

teneur en l'absence de standard commercialement disponible de LSA, une analyse par LC-MS/MS est entreprise utilisant le LSD-d₃ comme standard interne. La chromatographie utilise les conditions classiques d'analyse du LSD (55). Le spectromètre de masse triple quadripôle est muni d'une source ESI et la détection se fait en mode positif et SRM. La mise au point des paramètres de source et de fragmentation est réalisée sur l'ion moléculaire protoné ($m/z = 268,3$) par infusion de la solution de macération. Trois ions fils sont acquis pour le LSA (tableau I).

A 5 µL de la solution de macération sont ajoutés 5 µL de LSD-d₃ à 1 µg/mL et 90 µL de méthanol. Cet extrait est injecté dans les conditions décrites ci-dessus et permet un dosage estimatif du LSA en équivalent LSD-d₃.

Milieux biologiques

A notre connaissance aucune méthode de détection du LSA dans les fluides biologiques n'a été décrite à ce jour. En l'absence de standard de LSA commercialement disponible la mise au point a été réalisée à partir d'une solution de macération de graines (voir paragraphe précédent : matériel végétal).

Le standard interne est le LSD-d₃ à 0,5 ng/mL. Un millilitre d'urine est extrait sur Toxitube-A (Varian) dans les conditions préconisées par le fabricant. L'extrait est repris par 50 µL de méthanol. Les conditions de la LC-MS/MS sont les mêmes que celles mises au point pour le matériel végétal. Dix microlitres sont injectés dans le système chromatographique. Une gamme d'étalement dans l'urine extraite est réalisée par ajouts de

la solution de macération des graines. Cette méthode permet d'atteindre dans l'urine une limite de détection estimée à 0,5 ng/mL, et une limite de quantification estimée à 1 ng/mL.

Exemple : saisie de graines d'*Ipomoea violacea* achetées sur Internet

Quatre jeunes hommes étaient interpellés en région parisienne, en possession de nombreux végétaux commandés sur Internet, dont un petit sachet plastique contenant une centaine de petites graines noires allongées.

Le dosage réalisé par LC-MS/MS dans les conditions décrites ci-dessus permettait de mesurer une concentration de LSA, exprimée en équivalent LSD-d₃, de 99 ng/graine d'*Ipomea violacea*, (fig. 4). Cependant les mis en cause ayant été interpellés dès la réception des sachets de graines, intacts, ils n'en avaient pas consommé et l'analyse de leurs urines était négative.

Champignons hallucinogènes les plus fréquemment rencontrés

Psilocybes

La saisie et l'utilisation des champignons hallucinogènes du genre *Psilocybe* restent saisonnières, bien qu'ils soient assez communs. Les méthodes d'identi-

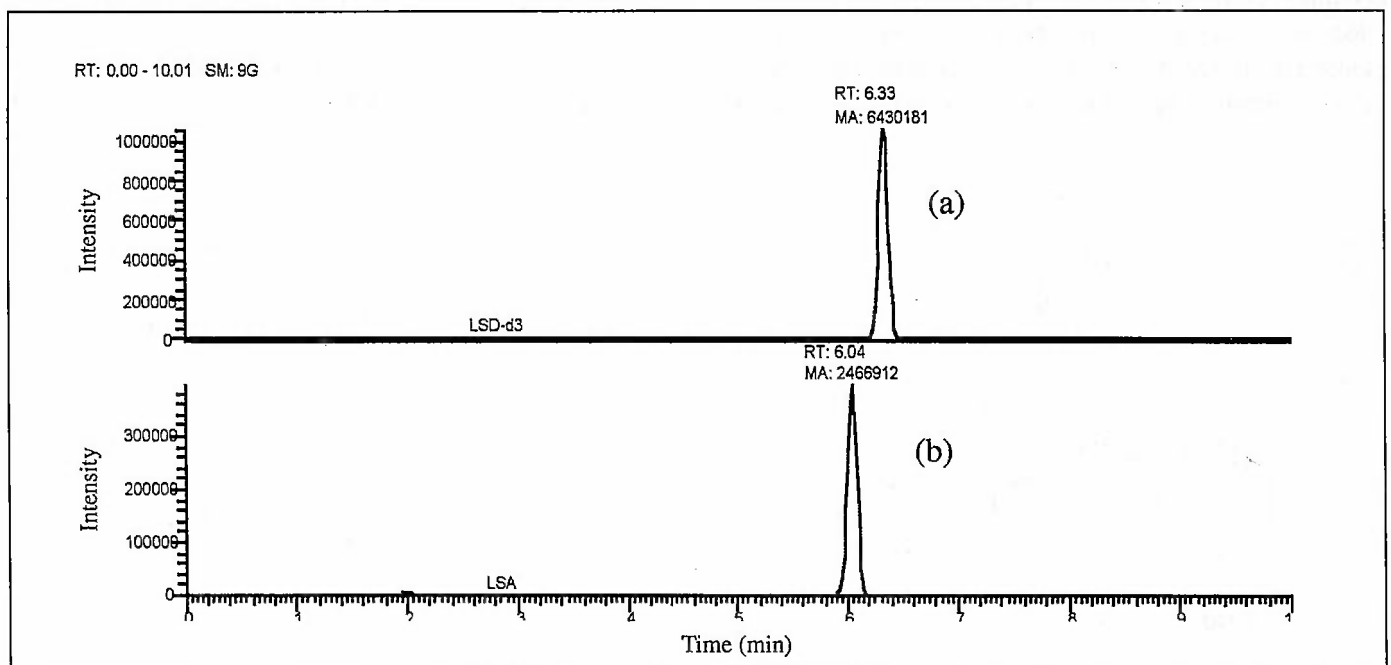


Figure 4 : Chromatogramme d'un extrait de graines d'*Ipomoea violacea*. (a) somme des ions fils du LSD-D3 ($m/z = 327,3$), (b) somme des ions fils du LSA ($m/z = 268,3$).

cation et de dosage ont donc relativement peu évolué (56). La chromatographie en phase gazeuse (GC) est encore très utilisée. Cette technique, après dérivation, permet de détecter simultanément la psilocybine et la psilocine dans les champignons et la psilocine dans l'urine, avec une limite de quantification de 10 ng/mL (57). Compte tenu de leur faible volatilité et de leur polarité, il est cependant préférable de les analyser par chromatographie liquide. Des détecteurs classiques ont été utilisés (UV, fluorimétrie, électrochimie) mais la spectrométrie de masse tandem semble la plus appropriée au vu des faibles concentrations circulantes des principes actifs (58,59).

Amanite tue-mouches : *Amanita muscaria*

L'amanite tue-mouches (*Amanita muscaria*, *Agaricaceae*) est un champignon peu toxique aux propriétés hallucinogènes connues mais faibles. Néanmoins les réactions sont dépendantes des individus et le surdosage peut être fatal. Elle est responsable de trois actions : l'une cholinergique, due à la présence de muscarine et de ses isomères ; la seconde hallucinogène, due à la présence, au moins, du muscimol ; la troisième hypnotique et sédative, due à la présence de l'acide iboténique et de la muscazone. Ces trois derniers constituants sont des agonistes du GABA (60).

Utilisation

L'Amanite tue-mouches était traditionnellement utilisée en Sibérie par les chamans pour entrer en contact avec les esprits (24). Les champignons cuisinés et les phénomènes digestifs convertissent par décarboxylation la majeure partie de l'acide iboténique en muscimol, agent responsable des hallucinations. C'est vraisemblablement pour cette raison qu'il est habituel de manger les champignons desséchés par chauffage ou cuits, réduisant ainsi les effets indésirables de l'acide iboténique (61).

Toxicité

L'intoxication par l'amanite tue-mouches est de type mycoatropinique, dans la mesure où les symptômes sont proches de ceux induits par des plantes contenant de l'atropine telles que *Datura stramonium* et *Atropa belladonna*. Les symptômes apparaissent 30 minutes à 2 heures après l'ingestion : confusion, fatigue, vertiges, étourdissements, hypersensibilité visuelle et auditive, distorsion et conscience accrue du temps. Sécheresse buccale et mydriase ont été rapportées, tandis que les hallucinations, la perception de couleurs éclatantes et la sensation de temps suspendu, sont discutés. Une période de somnolence de 2 heures s'ensuit accompagnée de rêves colorés (61). Un profond sommeil termine l'intoxication qui dure généralement 8 heures. L'effet est

plus ou moins puissant en fonction des quantités absorbées : léger de 1 à 5 g, usuel de 5 à 10 g, fort de 10 à 30 g. Aucun dommage des organes n'a été rapporté.

Propriétés physico-chimiques

La muscarine ($C_9H_{20}NO_2^+$, PM = 209,7), principe actif toxique, est un azote quaternaire et une molécule polaire de petite taille (fig. 5a). L'acide iboténique ($C_5H_6N_2O_4$, PM = 158,1), principe actif hypnotique et sédatif, est une molécule polaire de petite taille facilement ionisable (fig 5b). Le muscimol ($C_4H_6N_2O_2$, PM = 114,1), principe actif hallucinogène et produit de décarboxylation de l'acide iboténique, est également une molécule polaire de petite taille facilement ionisable (fig. 5c). Leurs propriétés physico-chimiques respectives permettent de les analyser aisément par LC-MS/MS.

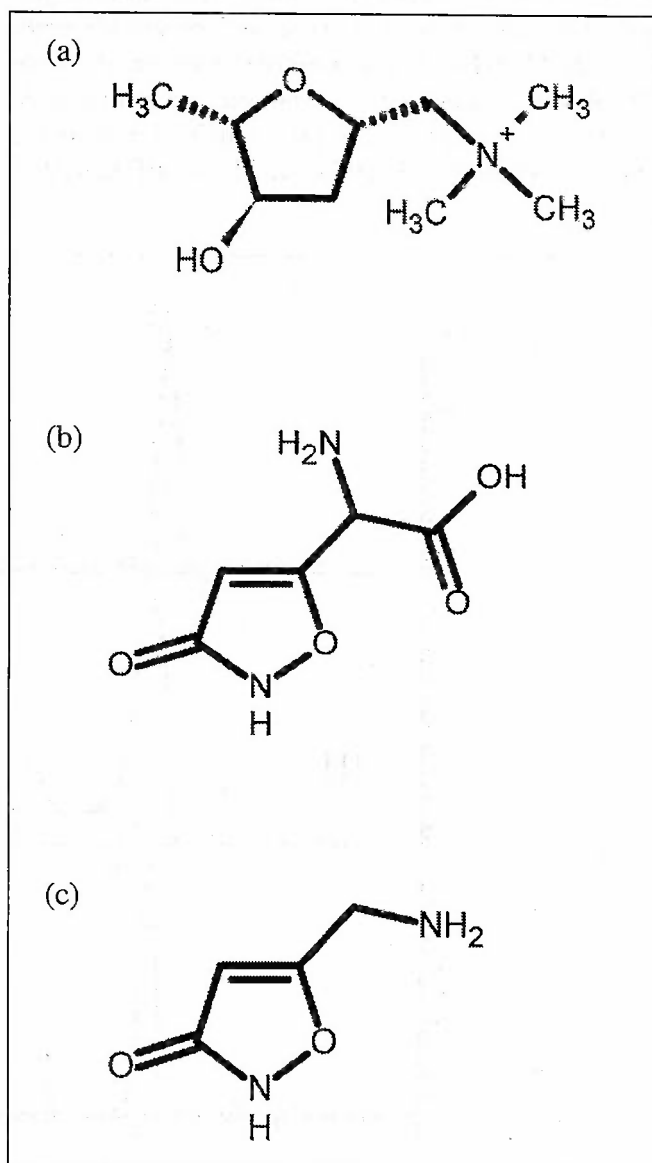


Figure 5 : (a) formule développée de la muscarine, (b) formule développée du muscimol, (c) formule développée de l'acide iboténique.

Identification et dosage : muscarine, muscimol et acide iboténique

Matériel végétal

Nous n'avons retrouvé dans la littérature que deux publications décrivant l'analyse de champignons frais après extraction méthanolique ou aqueuse par HPLC d'interaction ionique et détection UV (62,63). Nous décrivons ici une méthode d'analyse de la muscarine, du muscimol et de l'acide iboténique dans les champignons séchés par LC-MS/MS. L'extraction des principes actifs est effectuée à partir de 100 mg de champignons secs (pieds et chapeaux). L'extraction aqueuse des broyats est effectuée par sonication 5 minutes puis agitation pendant 15 min. L'extrait est filtré sur filtre cellulose 0,45 µm, puis injecté dans le système chromatographique muni d'une colonne C18 (150 x 2,1 mm - 5 µm Uptisphère ODB (Interchim)). La chromatographie utilise un gradient de tampon formiate d'ammonium 2mM pH3 et d'acétonitrile pour un débit de 200 µL/min. La détection se fait en spectrométrie de masse tandem triple quadripôle munie d'une source ESI avec nébuliseur chauffé en mode positif. Les para-

mètres de source ont été optimisés sur les ions moléculaires ou pseudo moléculaires de la muscarine (m/z = 174,2), du muscimol (m/z = 115,1) et de l'acide iboténique (m/z = 159,0), à partir de standards commercialisés par Sigma (France). Les énergies de collision ont été optimisées sur chaque ion fils (tableau I).

Exemple : saisie d'Amanites tue-mouches desséchées

Les jeunes gens interpellés en possession de graines d'*Ipomoea violacea* (cf. 2.4.5), s'étaient également procurés des Amanites tue-mouches sur Internet. L'analyse des champignons saisis (fig. 6) par la méthode décrite ci-dessus nous a permis de mettre en évidence la présence simultanée de muscimol, d'acide iboténique et de muscarine dans les pieds et les chapeaux des champignons secs (tableau II).

Seules des concentrations sur champignons frais ont été publiées (63, 64) et montrent des valeurs du même ordre de grandeur ou un peu plus élevées en muscimol et acide iboténique. A notre connaissance la concentration en muscarine donnée ici est la première à être publiée.

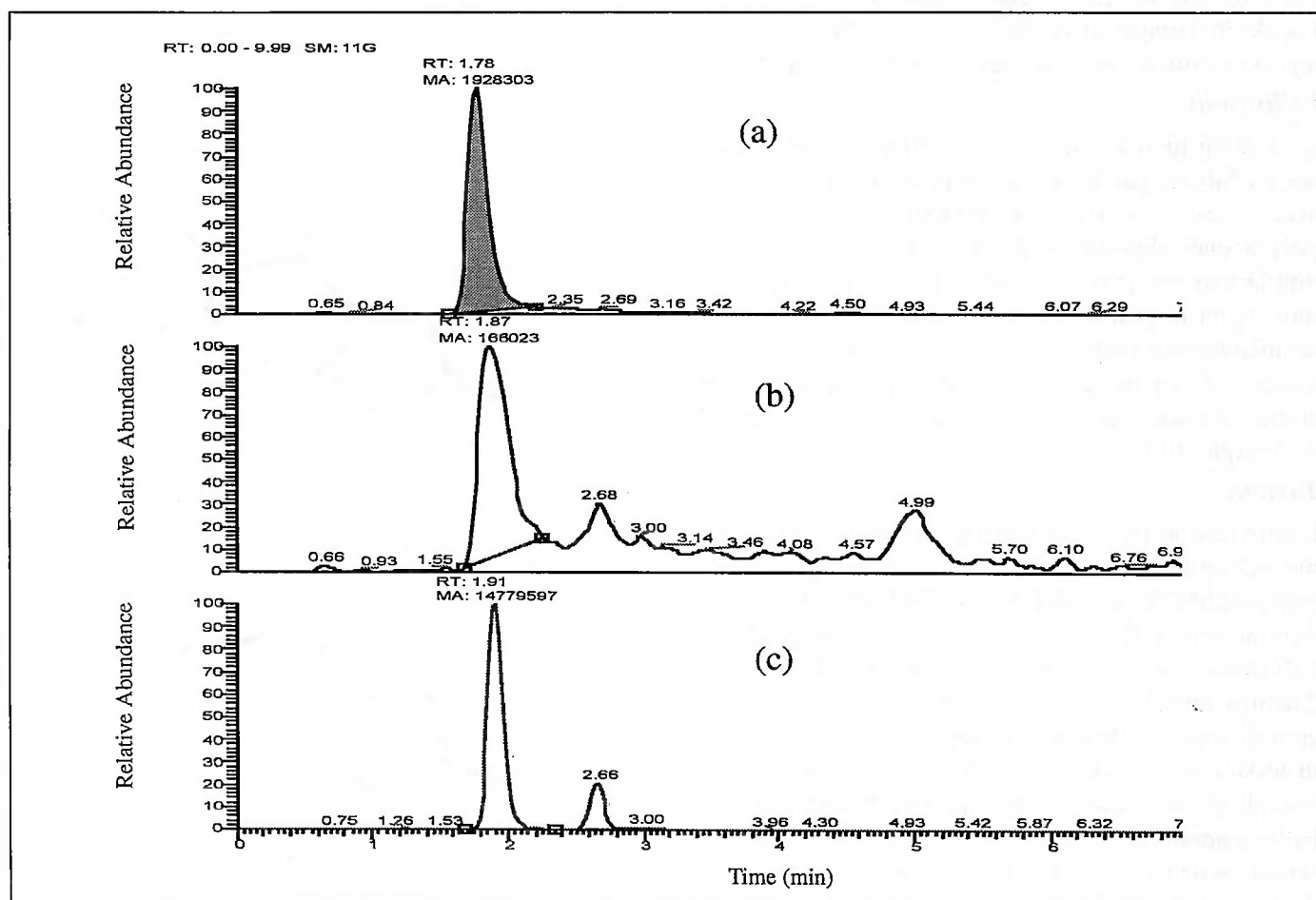


Figure 6 : Chromatogramme d'un extrait de champignons séchés d'Amanita muscaria. (a) somme des ions fils de la muscarine (m/z = 174,2), (b) somme des ions fils de l'acide iboténique (m/z = 159,0), (c) somme des ions fils du muscimol (m/z = 115,1).

Tableau II : Concentrations en principes actifs de l'*Amanita muscaria* dans les champignons secs et frais.

	Concentrations (mg/kg)				
	Champignons secs		Champignons frais		
	Chapeaux*	Pieds*	Chapeaux ⁽⁶³⁾	Pieds ⁽⁶³⁾	Chapeaux ⁽⁶⁴⁾
muscimol	97,2	3,6	380	80	41,8
acide iboténique	216,8	16,4	990	230	86,6
muscarine	2006,0	39,7	/	/	/

* données internes

Milieux biologiques :

Aucune technique d'analyse n'a été publiée à ce jour pour la recherche de la muscarine, de l'acide iboténique et du muscimol dans le sang et l'urine, mais la LC-MS/MS nous paraît la technique la mieux adaptée pour ce type de molécules.

Conclusion

L'intérêt croissant porté à la médecine par les plantes et aux substances psychoactives non réglementées, représentées majoritairement par des plantes ou champignons, oblige le toxicologue analyste à adapter et améliorer ses techniques de détection et de dosage. En effet ces principes actifs ont parfois des propriétés physico-chimiques et/ou des concentrations circulantes rendant difficile leur mise en évidence par les techniques classiques comme la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (65). Comme l'ont montré les différents exemples abordés ici, la LC-MS/MS est une technique de choix pour la recherche des toxiques végétaux dans le domaine de l'expertise médico-légale. Son intérêt réside aussi bien dans la recherche de traces (sensibilité) que dans sa spécificité. Elle permet également la détection directe de molécules phosphorylées, comme la psilocybine, et ionisées, comme la muscarine, difficilement détectables en chromatographie gazeuse. Les efforts des constructeurs sur l'amélioration des sources (différents modes d'ionisation disponibles sur une même source) et la facilité d'utilisation des appareils alliés à la diminution des prix devraient permettre, à terme, une démocratisation plus importante encore de la LC-MS/MS dont les applications ne cessent de se multiplier.

Références

1. Isnard Bagnis C., Deray G., Beaumelou A., Le Quintrec M., Vanherweghem J.L., Herbs and the kidney. *Am. J. Kidney Dis.* 2004 ; 44 : 1-11.
2. Pak E., Esrason K.T., Wu V.H., Hepatotoxicity of herbal remedies : an emerging dilemma. *Prog. Transplant.* 2004 ; 14 : 91-6.
3. Beike J., Frommherz L., Wood M., Brinkmann B., Kohler H., Determination of aconitine in body fluids by LC-MS/MS. *Int. J. Legal. Med.* 2004 ; 118 : 289-93.
4. Gaillard Y., Blaise P., Darré A., Barbier T., Pépin G., An unusual case of death : suffocation caused by leaves of common ivy (*Hedera helix*). Detection of hederacoside C, α -hederin and hederagenin by LC-EL/MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* 2003 ; 27 : 257-62.
5. Chèze M., Gaillard Y., Pépin G., Réponses analytiques aux intoxications par substances végétales. *Ann. Toxicol. Anal.* 2000 ; 4 : 307-14.
6. Gaillard Y., Pépin G., Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high performance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 1999 ; 733 : 181-229.
7. Laccassie E., Marquet P., Martin-Dupont S., Gaulier J.M., Lachâtre G., A non-fatal case of intoxication with foxglove, documented by means of liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *J. Forensic Sci.* 2000 ; 45 : 1154-58.
8. Mroczek T., Baj S., Chrobok A., Glowniak K., Screening for pyrrolizidine alkaloids in plant materials by electron ionization RP-HPLC-MS with thermobeam interface. *Biomed. Chromatogr.* 2004 ; 18 : 745-51.
9. Parker C.E., Verma S., Tomer K.B., Reed R.L., Buhler D.R., Determination of Senecio alkaloids by thermospray liquid chromatography/ mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1990 ; 19 : 1-12.
10. Chang S.S., Chan Y.L., Wu M.L., Deng J.F., Chiu T., Chen J.C., Wang F.L., Tseng C.P., Acute *Cycas* seed poisoning in Taiwan. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2004 ; 42 : 49-54.
11. Cope R.B., Camp C., Lohr C.V., Fatal yew (*Taxus sp.*) poisoning in Willamette Valley, Oregon, horses. *Vet. Hum. Toxicol.* 2004 ; 46 : 279-81.

12. Gabrsceck L., Lesnicar G., Krivec B., Voga G., Sibanc B., Blatnik J., Jagodic B., Accidental poisoning with autumn crocus. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2004 ; 42 : 85-8.
13. Bvar M., Kozelj G., Mozina M., Bunc M., Acute poisoning with autumn crocus (*Colchicum autumnale* L.). *Wien. Klin. Wochenschr.* 2004 ; 116 : 205-8.
14. DeFrates L.J., Hoehns J.D., Sakornbut E.L., Glascock D.G., Tew A.R., Antimuscarinic intoxication resulting from the ingestion of moonflower seeds. *Ann. Pharmacother.* 2005 ; 39 : 173-6.
15. Hamouda C., Hedhili A., Ben Salah N., Zhioua M., Amamou M., A review of acute poisoning from *Atractylis gummifera* L. *Vet. Hum. Toxicol.* 2004 ; 46 : 144-6.
16. Vichova P., Jahodar L., Plant poisonings in the Czech Republic, 1996-2001. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003 ; 22 : 467-72.
17. Tindimwebwa G., Dambisya Y.M., When is it herbal intoxication ? A retrospective study of children admitted with herbal intoxication at Umata General Hospital, South Africa. *Cent. Afr. J. Med.* 2003 ; 49 : 111-4.
18. Marchi A.G., Renier S., Valent F., Poisoning in first age. A multicenter study. *Minerva Pediatr.* 2004 ; 56 : 541-6.
19. Caksen H., Odabas D., Akbayram S., Cesur Y., Arslan S., Uner A., Oner A.F., Deadly nightshade (*Atropa belladonna*) intoxication : an analysis of 49 children. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003 ; 22 : 665-8.
20. Clouatre D.L., Kava-kava : examining new reports of toxicity. *Toxicol. Lett.* 2004 ; 150 : 85-96.
21. Anke J., Ramzan I., Kava hepatotoxicity : are we any closer to the truth ? *Planta. Med.* 2004 ; 70 : 193-96.
22. Soni M.G., Carabin I.G., Griffiths J.C., Burdock G.A., Safety of ephedra : lessons learned. *Toxicol. Lett.* 2004 ; 150 : 97-110.
23. Chu N.S., Effects of betel chewing on the central and autonomic nervous systems. *J. Biomed. Sci.* 2001 ; 8 : 229-36.
24. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris : éditions Tec et Doc et éditions médicales internationales, 3^{me} ed., 1999 pp1120.
25. Motsei M.L., Lindsey K.L., van Staden J., Jager A.K., Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J. Ethnopharmacol.* 2003 ; 86 : 235-41.
26. Luper S., A review of plants used in the treatment of liver disease : part two. *Altern. Med. Rev.* 1999 ; 4 : 178-88.
27. Conn J.W., Rovner D.R., Cohen E.L., Licorice induced pseudoaldosteronism. Hypertension, hypokaliemia, aldosteronopenia, and suppressed plasma renin activity. *JAMA.* 1968 ; 205 : 492-6.
28. Olukoga A., Donaldson D., Liquorice and its health implications. *J.R. Soc. Health.* 2000 ; 120 : 83-89.
29. Russo S., Mastropasqua M., Mosetti M.A., Persegani C., Paggi A., Low doses of liquorice can induce hypertension encephalopathy. *Am. J. Nephrol.* 2000 ; 20 : 145-8.
30. Kageyama K., Watanobe H., Nishie M., Imamura K., Suda T., A case of pseudoaldosteronism induced by a mouth refresher containing licorice. *Endocr. J.* 1997 ; 44 : 631-2.
31. Kerlan V., Ogor C., Bercovici J.P., Glycyrrhizin poisoning following smoking cessation. *Presse Med.* 1994 ; 23 : 50.
32. Bedock B., Janin-Mercier A., Jouve P., Lamaison D., Meyrieux J., Chipponi P.N., Haberer J.P., Fatal poisoning by alcohol free anised aperitif. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 1985 ; 4 : 374-7.
33. Jellimann S., Nune S., Perrin B., Boussat S., Weryha G., Klein M., Arrêt cardiorespiratoire après consommation de boisson anisée sans alcool. *Presse Med.* 2001 ; 30 : 1879-80.
34. Lin Z.J., Qiu S.X., Wufuer A., Shum L., Simultaneous determination of glycyrrizin, a marker component in *radix glycyrrhizae*, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005 ; 814 : 201-7.
35. Cohen S., Berny C., Meyran S., Mialon A., Manchon M., Intoxication volontaire par une tisane de feuilles de *Datura*. *Ann. Toxicol. Anal.* 2003 ; 4 : 287-91.
36. Halpern J.H., Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Pharmacol. Therap.* 2004 ; 102 : 131-8.
37. Oertel R., Richter K., Ebert U., Kirch W., Determination of scopolamine in human serum and microdialysis samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001 ; 750 : 121-8.
38. Xu A., Havel J., Linderholm K., Hulse J., Development and validation of an LC-MS/MS method for the determination of L-hyosциamine in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995 ; 14 : 33-42.
39. Steenkamp P.A., Harding N.M., van Heerden F.R., van Wyk B.E., Fatal *Datura* poisoning : identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/ photodiodes array/ mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 2004 ; 145 : 31-9.
40. Pépin G., Chèze M., Billault F., Gaillard Y., Un nouvel hallucinogène en Europe : *l'ayahuasca* ou vin de l'esprit. *J. Méd. Lég. Droit Méd.* 2000 ; 43 : 666-75.
41. Callaway J.C., Raymon L.P., Hearn W.L., McKenna D.J., Grob C.S., Brito G.S., Mash D.C., Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J. Anal. Toxicol.* 1996 ; 20 : 492-7.
42. Kartal M ; Altun M.L., Kurucu S., HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003 ; 31 : 263-9.
43. Yirita M., Riba J., Ortuno J., Ramirez A., Castillo A., Alfaro Y., de la Torre R., Barbanj M.J., Determination of N,N-dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002 ; 779 : 271-81.
44. Giroud C., Felber F., Augsburg M., Horisberger B., Rivier L., Mangin P., *Salvia divinorum* : an hallucinogenic mint which might become a new recreational drug in Switzerland. *Forensic Sci. Int.* 2000 ; 112 : 143-50.

45. Note d'information du dispositif TREND issue du Système d'Identification National des Toxiques et Substances (SINTES). Première identification du principe actif de la *Salvia divinorum* dans SINTES. 19 juillet 2002.
46. Arditti J., Bourdon J.H., Gilli R., Giraudon I., Bello P.Y., Consommation de nouvelles plantes à potentiel d'abus dans les lieux festifs. *Ann. Toxicol. Anal.* 2004 ; 15 : 171.
47. Valdés L.J., *Salvia divinorum* and the unique diterpene hallucinogen, salvinorin (divinorin) A. *J. Psychoactive Drugs.* 1994 ; 26 : 277-83.
48. Chavkin C., Sud S., Jin W., Stewart J., Zjawiony J.K., Siebert D.J., Toth B.A., Hufeisen S.J., Roth B.L., Salvinorin A, an active component of the hallucinogenic sage *Salvia divinorum* is a highly efficacious kappa-opioid receptor agonist : structural and functional considerations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004 ; 308 : 1197-203.
49. Munro T.A., Rizzacasa M.A., Roth B.L., Toth B.A., Yan F., Studies toward the pharmacophore of salvinorin A, a potent kappa-opioid receptor agonist. *J. Med. Chem.* 2005 ; 48 : 345-8.
50. Valdés L.J., Butler W.M., Hatfield G.M., Paul A.G., Koreeda M., Divinorin A, a psychotropic terpenoid, and divinorin B from the hallucinogenic Mexican Mint, *Salvia divinorum*. *J. Org. Chem.* 1984 ; 49 : 4716.
51. Tidgewell K., Harding W.W., Schmidt M., Holden K.G., Murry D.J., Prisinzano T.E., A facile method for the preparation of deuterium labeled salvinorin A : synthesis of [2,2,2-³H₃]-salvinorin A. *Bioorg. & Med. Chem. Letters.* 2004 ; 5099-102.
52. Ghysel M.H., Trotin F., Les substances hallucinogènes provenant de l'ergot de seigle et des volubilis. *Ann. Toxicol. Anal.* 2004 ; 15 : 65-75.
53. Taber W.A., Heacock R.A., Mahon M.E., Ergot-type alkaloids in vegetative tissues of *Rivea Corymbosa*. *Phytochemistry.* 1963 ; 2 : 99-101.
54. Ellenhorn M.J., Barceloux D.G., Psychoactive and hallucinogenic plant in medical toxicology. Diagnostic and treatment of human poisoning. New York, Elsevier. 1988 ; 1288-90.
55. Chèze M., Vayssette F., Pépin G., Dosage du LSD dans les phanères par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ou par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse tandem. *Ann. Toxicol. Anal.* 2001 ; 13 : 63-8.
56. Courtecuisse R., Deveaux M., Champignons hallucinogènes d'Europe et des Amériques : mise au point mycologique et toxicologique. *Ann. Toxicol. Anal.* 2004 ; 15 : 36-48.
57. Grishaber A.F., Moore K.A., Levine B., The detection of psilocin in human urine. *J. Forensic Sci.* 2001 ; 46 : 627-30.
58. Hasler F., Bourquin D., Brenneisen R., Vollenweider F.X., Renal excretion profiles of psilocin following oral administration of psilocybin : a controlled study in man. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 2002 ; 30 : 331-9.
59. Kamata T., Nishikawa M., Katagi M., Tsuchihashi H., Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003 ; 796 : 421-27.
60. Heim R., Les champignons toxiques et hallucinogènes. Paris : Société nouvelle des éditions Boubée, 1978 : 89-99.
61. Michelot D., Melendez-Howell L.M., *Amanita muscaria* : chemistry, biology, toxicology. *Mycol. Res.* 2003 ; 107 : 131-46.
62. Tsunoda K., Inoue N., Aoyagi Y., Sugahara T., Simultaneous analysis of ibotenic acid and muscimol in toxic mushroom, *Amanita muscaria*, and analytical survey on edible mushrooms. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 1993 ; 43 : 12-7.
63. Gennaro M.C., Giacosa E., Gioannini E., Angelino S., Hallucinogenic species in *Amanita muscaria*. Determination of muscimol and ibotenic acid by ion-interaction HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 1997 ; 20 : 413-24.
64. Gore M.G., Jordan P.M., Microbore single-column analysis of pharmacologically active alkaloids from the fly agaric mushroom *Amanita muscaria*. *J. Chromatogr.* 1982 ; 243 : 323-8.
65. Peters F.T., Beyer J., Ewald A.H., Maurer H.H., Colchicine poisoning after mix-up of Ramson (*Allium ursinum* L.) and Meadow Saffron (*Colchicum autumnale* L.) - A case report. *TIAFT Bulletin*, 2005 ; 35 : 3-6.