

DERLEME

Nuri Cenk Coşkun¹
Ertuğrul Kaya¹

¹Düzce Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi Farmakoloji
Ana Bilim Dalı, Düzce,
Türkiye

Yazışma Adresi:
Nuri Cenk Coşkun
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı,
Düzce, Türkiye
Email: cenkcoşkun@duzce.edu.tr
Tel: 0380 542 14 16 (4173),

Geliş Tarihi: 08.08.2019
Kabul Tarihi: 27.11.2019
DOI: 10.18521/ktf.604023

Konuralp Tıp Dergisi
e-ISSN1309-3878
konuralptipdergi@duzce.edu.tr
konuralptipdergisi@gmail.com
www.konuralptipdergi.duzce.edu.tr

Zehirli Mantar Toksinlerinin Analiz Yöntemleri**ÖZET**

Misetizm olarak da bilinen şapkalı mantarlar ile zehirlenme vakaları tıbbi imkanların çok geliştiği günümüzde bile ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Yaklaşık 100 çeşit zehirlenmeye yol açan mantar türünün arasında yaklaşık 10 tanesi ölümcül zehirlenmelere yol açabilmektedir. Zehirlenme durumunda bu mantar toksinlerinin erken tespiti hayati önem taşımaktadır. Bu derlememizde mantar toksinlerinin hangi yöntemler ile tespit edildikleri tek bir kaynaktan toplanmıştır. Başlıca toksinler olarak; Amatoksinler, Fallotoksinler, Virotoksinler, Koprin, Giromitrin, İbotenik asit ve Muskimol, Muskarin, Orellanin, Psilosin ve Psilosibin yer almıştır. Analiz yöntemleri içerisinde ise; İnce tabaka kromatografisi, Eliza yöntemi, LC-MS/MS, HPLC, Gaz Kromatografi, LC-QTOF yer almaktadır. Bu derlememizde amaç; özellikle ölümcül zehirlenmeye sebep olan başlıca şapkalı mantar toksinlerinin analiz metotlarını tek bir kaynaktan toplayarak araştırmacılara güvenilir bir kaynak sağlamaktır.

Anahtar Kelimeler: Mantar, Zehirlenme, Analiz, Toksin, Analitik

Analysis Methods of Poisonous Mushroom Toxins**ABSTRACT**

Mushroom poisoning, also known as misetism, can lead to death, even in the present day, where medical facilities are highly developed. Of the 100 fungal species that cause poisoning, about 10 can cause fatal poisoning. Early detection of these fungal toxins is vital in case of poisoning. In this review, the methods by which fungal toxins are detected are collected in a single source. The main toxins; Amatoxins, Fallotoxins, Virotoxins, Coprin, Giromitrin, Ibotenic acid and Muscimol, Muscarin, Orellanin, Psilocin and Psilocybin. In the analysis methods; Thin layer chromatography, Eliza method, LC-MS/MS, HPLC, Gas Chromatography, LC-QTOF. The purpose of this review; The aim of this study is to provide a reliable source for researchers by combining the analysis methods of the main mushroom toxins which cause fatal poisoning.

Keywords: Mushroom, Poisoning, Analysis, Toxin, Analytical

1. GİRİŞ

Mantarlar, heterotrof, spor oluşturan, klorofil bulundurmayan, parazit ve saprofit olarak yaşayan ökaryotik canlılardır. Üremeleri hem eşeyli hem de eşeysiz olarak sporlar oluşturarak meydana gelir. Bünyelerinde klorofil bulunmadığından, organik madde oluşturma kabiliyetine sahip değildirler. Beslenmeleri için diğer canlılar ve ölü artıkları gerekir. Yaşam gereksinimleri rutubet, ışık, sıcaklık ve toprak-odun asitliğidir. Mantarlar parazitik organizmalar olduklarından bitkiler ile simbiyotik veya çürümüş bir konakta saprofitik olarak yaşarlar(1).

Fungus kelimesinin kaynağının eski Yunancadaki öldürme manasında kullanılan “fungus ago”ya dayandığı düşünülmektedir(1).

Antik çağlardan beri pek çok uygarlıkta mantarların izlerine rastlanabilir. Tarihte mantarlar tedavi amacıyla kullanıldıkları gibi kötü amaçlar için de kullanılmışlardır. Eski Yunanlı hekimlerce tedavi amacıyla kullanıldıkları yazıtlarda karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde pek çok hastalığın tedavisinde öncü olmuş penisilinlerin “Penisillium” türü mantarlardan üretildiği bilinmektedir(2).

Yeryüzünde tanımlanmış 22.000 civarında şapkalı mantar türü olmasına rağmen dünyada yüzbinler ile ifade edilen şapkalı mantar türü olduğu konusunda çeşitli spekülasyonlar bulunmaktadır. Ülkemizde ise yaklaşık 2200 şapkalı mantar türü tanımlandığı ve bu tanımlanan türlerden 100 civarında zehirli mantar türü bulunduğu, bu türlerden yaklaşık 10 tanesinin ölümcül olduğu bilinmektedir. 2014 yılı verilerine göre ülkemizde 5000 civarında mantar zehirlenmesi (misetizm) vakası Ulusal Zehir Danışma Merkezi'ne bildirilmiştir(2).

Ülkemizin kırsal kesimleri başta olmak üzere pek çok yerinde halk mantarları toplayarak gıda olarak tüketmektedir. Mantarın protein içermesi ve bedava olması ile lezzeti nedeniyle insanlar tarafından tüketildiği görülmektedir. Ülkemizde yeterli bilgiye sahip olmayan toplayıcılar tarafından toplanan mantarların besin olarak tüketilmesi ile ölümler görülebilmektedir. Aynı zamanda yanlış inanışlar nedeniyle de mantarların zehirli olmadığı kanısına varılarak zehirlenme vakalarının görüldüğü bildirilmiştir. Mantarların zehirli olan çeşitleri doğada zehirsiz olan mantarların arasında yetişebildiği gibi zehirsiz olan mantarlara da benzeyebilmektedir. Bu nedenle mantarların ayırımı uzman bir kişi tarafından yapılmalıdır. Zehirlenmeler özellikle mantarların yoğun olarak yetiştiği sonbahar ve ilkbahar

aylarında görülmektedir. Modern tıpta görülen tüm gelişmelerine rağmen günümüzde bazı mantar zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılan kesin etkili bir ilaç bulunamamıştır.

2. MANTAR TOKSİN ANALİZLERİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Mantarların toksin analizleri, toksinin çeşidine ve kimyasal özelliklerine göre farklılık arz edebilmektedir. Mantar toksini analizlerinde en sık kullanılan metotlar aşağıda belirtilmiştir.

2.1. SELEKTİF METOTLAR;

2.1.1. ELİZA: Eliza (ELISA: Enzym-linked immunosorbent assay) yöntemi; peptid, protein, antikor gibi maddelerin ölçümünde kullanılan ve antikoru enzimle işaretleme prensibiyle çalışan bir yöntemdir. Bu yöntemde antikor veya antijen enzim ilave edilerek işaretlenmekte ve oluşan enzimatik reaksiyon aktivitesi ölçülmektedir. Bu analiz metodunda direkt, indirekt ve sandviç metodları vardır. En sık kullanılanı sandviç metodudur. Sıklıkla mikrobiyolojik analizlerde kullanılan bu yöntem hızlı ve yüksek standarda sahiptir(3).

2.1.2. Lateral akım immünassay (LFI)(Kalitatif)(Kart test) : Mobil kart şeklinde uygulanabilen bir yöntemdir. Normalde test yapılmadan önce kart üzerinde gözle görülebilen herhangi bir çizgi bulunmaz. Bu testlerde esas reaksiyon antijen-antikor kompleksinin oluşmasına bağlıdır. Genel olarak, antijen veya antikordan birisi kart testin zemininde bulunan nitroselüloz membrana sabitlenir, diğerinin ise reaksiyon pedinde hareketli kalması sağlanır. Bu hareket esnasında kompleks oluşur ve bu kompleksin varlığına veya yokluğuna göre sonuç yorumlanır. Kart testlerde, test çizgisi alanında nitroselüloz zemine sabitlenen moleküllere göre, sandviç model ve yarışmalı model olmak üzere 2 farklı çalışma prensibi bulunmaktadır. Bu yöntem prensip olarak mantar toksinlerinin analizi için uygun olmakla birlikte, halen bu amaçla üretilmiş herhangi bir kit bulunmamaktadır(4).

2.2. KROMATOGRAFİK METOTLAR

2.2.1. İnce tabaka kromatografisi: Bu ölçüm metodunun temeli “katı-sıvı absorpsiyon kromatografisi” dir. İnce tabaka kromatografisinde sabit faz, çeşitli boyutlardaki plakalar üzerine ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban maddedir. Bu yöntemde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğru olmaktadır. Çözücü, kapiller etkisi ile içerisine yerleştirilen ince tabaka plakası üzerinde ilerler. Bu ilerleme sırasında, sabit faz üzerine damlatılan numune içeriğindeki maddeler farklı hızlarda ilerlerken birbirlerinden ayrılırlar(5).

2.2.2. Gaz kromatografisi: Bu analiz yönteminde kromatografi cihazları kullanılmaktadır. Sabit fazın katı bir adsorban veya

katı bir destek yüzeyine kaplanmış sıvı ve hareketli fazın ise gaz olduğu kromatografik tekniklere gaz kromatografisi (GC) adı verilir. Bu yöntem örneklerde bulunan ve özellikle gaz halinde veya kolayca gaz fazına geçebilen maddelerin analizlerinde kullanılır. Taşıyıcı gaz olarak N₂ veya Helyum gazları kullanılır. Gaz kromatografisi kullanılarak maddelerin saf olup olmadığı anlaşılabilir. Analitik yöntemler içerisinde güvenilirliği en yüksek metodlardan biridir(5).

2.2.3. Yüksek Basıncı Likit Kromatografisi (HPLC – UV/FD/PDA): Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi yine bu yöntem için özel geliştirilmiş analitik cihaz ile sabit faz olarak katı maddelerin bulunduğu kolon ve hareketli faz olan sıvı ile ayrımını sağlamaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, gaz kromatografisinde uçucu olmadıklarından ayrıştırılmayan maddelerin ölçümünde sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntemde, bir sıvı içerisinde çözülmüş madde sabit fazın katı olduğu kolonlara enjekte edilir ve bir pompa yardımıyla kolondan hareketli faz olarak bir çözücü veya çözücü karışımı geçirilir. Böylece kullanılan çözücü ile katı sabit faz arasındaki yarış sonucu karışımdaki bileşenler hızlı bir şekilde birbirinden ayrılır. HPLC cihazlarında, bu maddeleri saptamak üzere farklı türde dedektörler kullanılabilir. Bu yöntem ile aromatik hidrokarbonlar, proteinler, amino asitler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar, pestisitler halinde pek çok organik ve inorganik maddelerin analizleri kolaylıkla sağlanabilmektedir(5).

2.2.4. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi (LC-MS/MS): HPLC ve kütle spektrometresi sistemlerinin birbirine eklenmesi ile oluşturulmuş bir sistemdir. Sistemde sıvı kromatografisi ve ardışık üç adet kuadropol bulunmaktadır. Sistem iyonlaştırma kaynağı ile çalışmaktadır. Moleküller, iyonlaştırma kaynağında iyonlaşarak kütle spektrometresine geçer. Birinci kuadropolde oluşan ana iyonlar m/z (kütle/yük) oranına göre belirlenir. Bu iyon kollizyon hücresinde kollizyon gazı (genellikle azot) ile parçalanır. Sonrasında parçalanma sonucu oluşan iyonlar son kuadropolde m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayrılır. Sonuç olarak ana iyon ve parçalanmış iyon eşleştirmesi yaparak yüksek bir duyarlılık ile kantitatif analiz yapılabilir(6).

2.2.5. LC-TOF (Time Of Flight): Sıvı çözeltide bulunan maddenin sıvı kromatografisi sonrasında dedektöre ulaşma (uçuş) süresinin molekül ağırlığı ile ilişkilendirildiği ileri düzey bir analitik methoddur. Bu methodda iyon kaynağı ile yüklenen moleküller sonrasında 1-1,5 m uzunluğunda olabilen tüplerde hızlarına göre ayrılırlar. Daha az molekül ağırlığına sahip

moleküller daha hızlı, daha fazla molekül ağırlığına sahip moleküller daha yavaş olarak dedektöre ulaşırlar. Bu yöntem ile daha hassas ve ayırt edici analiz gerçekleştirilir. Analitik yöntemler arasında en hassas yöntemlerden biridir(7).

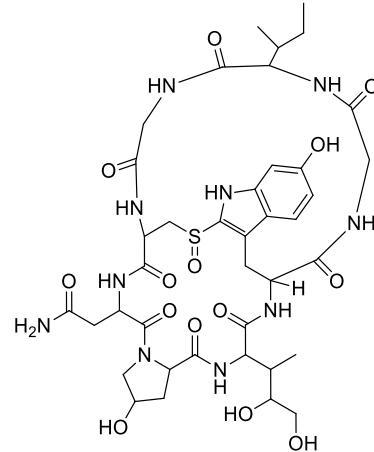
3. MANTARLARDA BULUNAN BAŞLICA TOKSİN ÇEŞİTLERİ(8):

- 3.1. Siklopeptitler (Amanitinler, fallotoksinler, virotoksinler) (Hepatotoksik)
- 3.2. Giromitrin (Monometilhidrazin) (Nefro-Hepato-Nörotoksik)
- 3.3. Orellanin (Nefrotoksik)
- 3.4. Muskarin (Muskarinik etki Otonom Sinir sistemi)
- 3.5. İbotenik asit ve Muskimol (Halüsinojenik)
- 3.6. Koprin (Disülfiram benzeri etki)
- 3.7. Psilosibin (Halüsinojenik)

3.1. SİKLOPEPTİTLER:

3.1.1. Amatoksinler:

3.1.1.1. Yapısı: 8 aminoasitten oluşan halka yapıları mevcuttur. Hüresel hasara yol açarlar. Klinikte ilk etkileri gastrointestinal sistem üzerine olur ve kusma, diyare, karın ağrısı ile seyredir. Toksin emildikten sonra karaciğere gelir ve en büyük hasarı burada gerçekleştirir. Karaciğer hücrelerinde RNA polimeraz II enzimini inhibe ederek protein sentezini durdurur ve birkaç gün içinde hücre ölümüne yol açar. Toksin dolaşım ile böbreklere gelir ve böbrek hücrelerini de hasarlar. Amatoksinler ölümcül zehirlendendir ve mantar intoksikasyonları sonucu görülen ölümlerin %90'ından daha fazlasının sorumlusudur(9).



Şekil 1. Amatoksinin (α- Amanitin) kimyasal yapısı

3.1.1.2. Amatoksin çeşitleri(10)

- a) α Amanitin
- b) β Amanitin
- c) γ Amanitin
- d) ε Amanitin
- e) Amanin
- f) Amaninamide
- g) Amanullin
- h) Amanullinik asit
- i) Proamanullin

3.1.1.3. Amatoksin içeren mantar türleri:

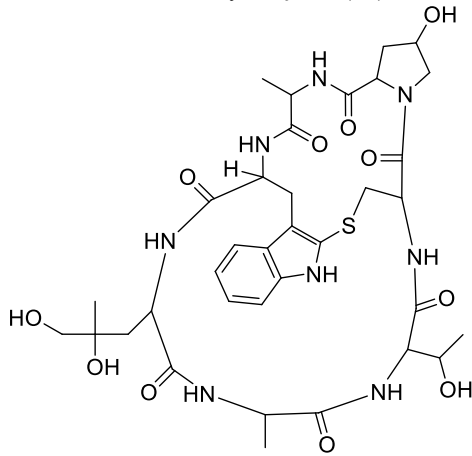
Amatoksin içerdiği bilinen mantar türleri; *Amanita phalloides*, *Amanita brunnescens*, *Amanita ocreata*, *Amanita virosa*, *Amanita verna*, *Lepiota brunneolilacea*, *Lepiota castanea*, *Lepiota brunneoincarnata*, *Lepiota helveola*, *Lepiota subincarnata*, *Galerina steglichii*, *Galerina marginata*, *Galerina autumnalis*, *Conocybe filaris* olarak bildirilmiştir(11).



Resim 1. *Amanita phalloides*

3.1.2. Fallotoksinler:

3.1.2.1. Yapısı: Siklopeptit yapıdadırlar ve halka şeklinde 7 aminoasitten oluşurlar. Karaciğerde nekroz yapıcı etkisini kısa sürede gösterirler. Gastrointestinal sistemden emilimi gösterilememiştir. Deney hayvanlarında sistemik uygulama sonucu ölüme yol açarlar(12).



Şekil 2. Falloidin kimyasal yapısı

3.1.2.2. Fallotoksin çeşitleri: (10).

- Falloidin
- Falloin
- Profallin
- Fallisin
- Fallasin
- Fallasidin
- Falliasin

3.1.2.3. Fallotoksin içeren mantar türleri:

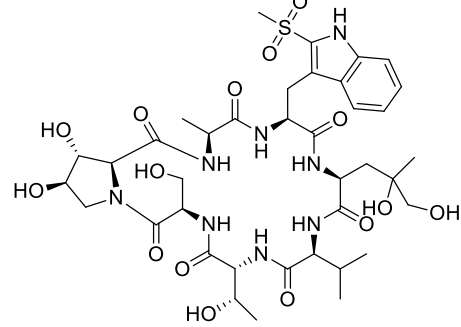
Amanita phalloides, *Amanita virosa*, *Amanita bisporigera*, *Amanita verna*, *Amanita arocheae* (13).



Resim 2. *Amanita phalloides* var. Alba

3.1.3. Virotoksinler:

3.1.3.1. Yapısı: Monosiklik heptapeptit yapıdadırlar. Parenteral yolla verildiklerinde sitotoksik etki ile karaciğer nekrozu yaparlar. Etkileri fallotoksin benzeridir (12).



Şekil 3. Viroidin kimyasal yapısı

3.1.3.2. Virotoksin çeşitleri(10)

- Viroidin
- Dezoksviroidin
- Ala viroidin
- Ala dezoksviroidin
- Viroisin
- Dezoksviroisin

3.1.3.3. Virotoksin içeren mantar türleri:

Amanita virosa(2).



Resim 3. *Amanita virosa*

3.1.4. SİKLOPEPTİTLERİN ANALİZİ

Siklopeptitlerin analizinde yaygın olarak kullanılan yöntemler aşağıda listelenmiştir.

- Spesifik reaksiyon (Meixner test-Wieland test)(amatoksinler)

- b) ELİZA (alfa amanitin, beta amanitin, gama amanitin)
- c) İnce tabaka kromatografisi (amatoksinler, fallotoksinler, virotoksinler)
- d) HPLC (amatoksinler, fallotoksinler, virotoksinler)
- e) LC-MS/MS ve LC-QTOF (amatoksinler, fallotoksinler, virotoksinler)

3.1.4.1. Siklopeptitlerin Wieland Testi (Meixner Testi): Farklı kaynaklarda bu iki farklı isimle de kullanılabilmektedir. Bu yöntemde, taze mantar ezilerek emici kağıt, suyu ile ıslatılmıştır. Daha sonra bu ıslaklığın kurumması beklenmiş ve ıslaklık kuruduktan sonra oluşan lekeye %25'lik HCL damlatılmıştır. Mantar suyu numunesinde 0,02 mg/ml'den fazla amatoksin varsa 5-10 dakika sonra leke önce yeşil mavi, sonra ise mavi renk aldığı görülmüştür. Testin negatif çıkması mantarın zehirsiz olduğu anlamına gelmez. Görece sübjektif bir sonuç verdiğinden güvenilir olarak kabul edilmemektedir, kullanımı tavsiye edilmez(12).

3.1.4.2. Siklopeptitlerin Eliza Analizi: Alfa amanitin ve beta amanitin için özel ELİSA kitleri bulunmaktadır. Örnek olarak insan kan ve idrar örneklerinden 80 – 2000 pg ml⁻¹ aralığında tespit edilebilmektedir. Ayrıca gama amanitin de alfa amanitin kiti ile %22 çapraz reaksiyon görülme oranıyla tespit edilebilmektedir. Kullanışlı bir yöntemdir fakat kit gereksinimi vardır (14).

3.1.4.3. İnce Tabaka Kromatografisi: Bu yöntemde, taze 1 gr mantar parçalanarak 100 ml metanol ile karıştırılıp 1 saat su banyosunda kaynatılmıştır. Soğuması beklenecek cam pamuğundan süzülmesi ve 50 ml metanol eklenmiştir. 30 dakika daha kaynatılmış ve süzülümüştür. Metanol uçurularak uzaklaştırılmıştır. Kalan kuru madde 2 ml metanolde çözülerek 10x10 silica gel 60 plağa uygulanmıştır. Hazırlanan plak, kloroform, metanol, glasiyal asetik asit, su (75:33:5:7.5,v/v) çözücü sistemi ile yükseltilmiştir. Metanolde bulunan sinmaldehidin %1'lik çözeltisi belirteç olarak plakaya püskürtülmüş ve plak kurutulduktan sonra HCL buharı ile muamele edilmiştir. Sonuçta plak üzerinde amatoksinler mor, fallotoksinler mavi, virotoksinler kahverengimsi-yeşil veya renksiz görülmüştür. Bu analizde amatoksinin dedeksiyon sınırı 0,05 µg'dır. Kantitatif sonuç alınmamaktadır, kalitatif olarak sonuçları verimlidir(12).

3.1.4.4. HPLC ile analiz yöntemi: Bu analiz yönteminde tüm sıvı veya sıvı hale getirilebilen örnekler (mantar, kan, serum, idrar, doku vs.) kullanılabilir. Sistemde dedektör olarak DAD dedektör kullanılmış olup 302 nm (amatoksinler için) ve 291 nm (fallotoksinler için) saptanmıştır. Kolon olarak C18 (ODS) kullanılmıştır. Mobil faz olarak; amonyum asetat/asetonitril (90:10, v/v) kullanılır. Akım hızı 1 ml/dk olarak belirlenmiştir(9).

Başka bir çalışmada alfa amanitin saptanması için; 250mmx4.6mm RP-18 (5µm) ODS/2 kolon kullanılmıştır. Mobil fazda ise %20 metanol içinde 50mM sitrik asit, 0.46mM oktanülfonik asit ve pH 5.5 olacak şekilde 10M NaOH katılmış ve 0.45µm membrandan filtre ve degaze edilerek hazırlanmıştır. Örnekler oda ısısında ve akım hızı 1.0 ml/dk olacak şekilde 20 µl enjekte edilmiştir. Spektroskopik ve coulochemical analiz için; fotodiyod array dedektör ve/veya Colouchem II ile guard cell ve analytical cell elektrokimyasal dedektör kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda her iki dedektörde kullanılmıştır. Elektrokimyasal potansiyel değerleri: guard cell - 550 mV, analitik dedektör +500 mV olarak daha önce raporlanan prosedürlere göre ayarlanmıştır. Geçerli 5 µA tam skala kullanılmıştır. Tüm örnekler görünebilir ultraviyole skalada 230 ila 400 nm arasında toplanmıştır. Kantitatif analizler için 305 nm UV dalgaboyu kullanılmıştır(15).

Bir diğer çalışmada; örneklerin ekstraksiyon işlemi için 30 dakika %50 metanolde kaynatılarak yapılmış ve 5 dakika 5000 rpm'de santrifüj işleminden sonra supernatant 0,25 µm filtreden süzülerek HPLC cihazına 10 µl miktarla enjeksiyon yapılmıştır. Her numuneden 3 ayrı ölçüm yapılmış ve alfa amanitin standart kalibrasyon eğrisi için 0,2-0,4-0,6-1-2 µg miktarlarında olmak üzere 5 noktali olarak hazırlanmıştır. Korelasyon (R²) 0.9993, eğri denklemi (y= 352476x + 17338) olarak bulunmuştur. Sistemde HPLC, 303 nm UV dalga boyu ve C18 250x4,6 mm kolon (5 µm partikül) kullanılarak, 1ml/dk akış hızı ile analiz yapılmıştır. Mobil fazda ise amonyum asetat (50 mM) +metanol+asetonitril kullanılmıştır(16).

HPLC yöntemiyle amatoksinleri analizi oldukça verimli olarak yapılabilmektedir. Dedeksiyon limitleri, doğruluk ve kesinlikleri yeterlidir. Mantar numunelerinde ve kan-idrar vb insan numunelerinde analiz yapmak için uygun bir yöntemdir. Birçok çalışmada bu yöntemle analizlerin yapıldığı görülmektedir. Kit gereksinimi olmayan bir yöntemdir. Özel cihaz gerektirmesi, analitik standartların özel olarak temin edilmesi ve tecrübeli personel gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.

3.1.4.5. LC-MS/MS yöntemi ile analizi: Siklopeptitlerin analizi amacıyla yürütülen ve LC-MS/MS sistemi kullanılan bir çalışmada; 1.8 µm (2.1x100 mm) C18 (ODS) kolon ile UPLC-Triple quadropole (MS/MS) kullanılmıştır. Sistemde örnekler için kolon bölgesinde termostatlı soğutucunun yanısıra amanitin toksinleri için ikili sistem olan XEVO TQ MS dedektör elektro spray pozitif iyon modu (ESI+) (Turbo iyon spray) ve üçlü quadropole analizör kullanılmıştır. TQ MS ölçümünde: kapiller voltaj, 1.5 kV; ekstraktör voltaj, 3 V; iyon kaynak ısı, 150 °C; desolvation gaz (1000 L h⁻¹, 500 °C), nitrojen; collision gaz (0.22 mL dk⁻¹) argon kullanılmıştır.

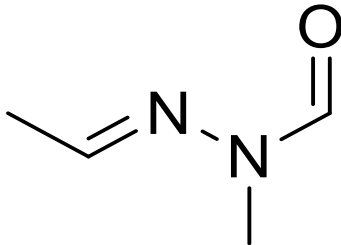
Örnekler kütle spektrofotometreye akım hızı 0.02 mL/dk-1 olacak şekilde verilmişlerdir. Kromatografik sisteme örnekler 20 µL enjeksiyon volümü; 0.5 mL/dk-1 akım hızı; 40 °C kolon sıcaklığı; 10 °C otomatik örnekleme sıcaklığı; (A) 0.02 M amonyum asetat pH 5 ve (B) asetonitril mobil faz sıvıları olmak üzere gradiyent protokolü çeşitli oranlarda değişmek suretiyle 10 dk toplam ölçüm süresi olacak şekilde çalışılmıştır(17).

3.1.4.6. LC-QTOF yöntemi ile analizi: Bu yöntemin kullanıldığı analizde; siklopeptitlerin tespiti için ileri kromatografik tetkiklerden olan LC-QTOF sistemlerinden NanoLock Spray iyon kaynaklı QTOF spektrometre ile birlikte UPLC sistem kullanılmıştır. Kütle spektrometresi pozitif elektrospray modunda ve çözünürlüğü 10,000 (FWHM) ve kapiller voltaj ayarı 2.5 kV ile cone voltaj ayarı 40 V olacak şekilde belirlenmiştir. Cihaz üst kütle sınırı, 4 ng/ml sodyum format, %90 metanol ile 80-1300 m/z olacak şekilde düzenlenmiştir. Örneklerin ölçümü sırasında UPLC Symmetry C18 kolon ile 180 mm-20 mm, 5 mm kolon kullanılmıştır. Kolon 99.9% A (su, 0.1% formik asit) ve 0.1% B (asetonitril, 0.1% formik asit) yıkanmış ve akım hızı 10 ml/dk olacak şekilde kullanılmıştır. Sonrasında örnekler C18, 3 mm, 75 mm-150 mm kolon ve akım hızı 0.4 ml/dk. olacak şekilde analiz edilmişlerdir(18).

3.2. GİROMİTRİN

3.2.1. YAPISI

Metilhidrazin yapısında bir maddedir. Fizyolojik şartlarda saniyeler içinde N-metil N-formilhidrazine sonrasında da formik asit ve hidrazine parçalanır. Oda ısısında yağlı, renksiz ve uçucu bir sıvıdır. Kaynatma ile hidrazinleri parçalanırsa da kalanların zehirlenme oluşturma potansiyeli olabilir. Kaynatırken buharı ile zehirlenme ihtimali de vardır. Giromitrinin parçalanması sonrası oluşan hidrazinler karaciğerde nekroz yaparlar(19)



Şekil 4. Giromitrin kimyasal yapısı

3.2.2. İÇEREN TÜRLER

Gyromitra esculenta, *G. ambigua*, *G. gigas*, *H. lacunosa*, *Helvella crispa*, *Paxina leucomenas*, *Sarcosphaera crassa*(12).



Resim 4. *Gyromitra esculenta*

3.2.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.2.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi

yöntemi ile analizi: Giromitrinin ince tabaka kromatografisinde analiz yöntemi için önce yoğunlaştırılmış kloroform ekstresi silica jel 60 plakaya uygulanmıştır. Örnekler diklormetan-metanol (9:1, v/v) oranında hazırlanan çözücü sistemi kullanılarak yürütülmüştür. Kurutulmuş plak üzerine taze hazırlanmış sinamaldehyd-HCL belirteci püskürtülerek plak 800°C'de bir kaç dakika ısıtılmış ve sonrasında hidrazinler plak üzerinde parlak sarı lekeler halinde görülmüştür(20).

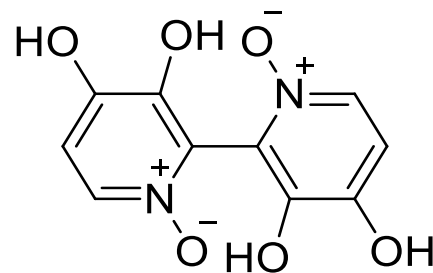
3.2.3.2. Gaz Kromatografi ve GC-MS/MS

yöntemi ile analizi: Giromitrinin GC-MS/MS ile analizinin yapıldığı bu çalışmada; Electron-impact mod (EI) kullanılmıştır. Kapiller kolon 30m×0.25mm I.D., 0.25m özelliklerinde kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 280 °C olup, kolon sıcaklığı; değişken şekilde ayarlanmıştır. Full-scan EI kütle spektrogramı (m/z 35-650, 2.42 scan/s) 70 eV kayıt edilmiştir(21).

3.3. ORELLANİN

3.3.1. YAPISI

3,3',4,4'-tetrahidroksi-2,2'-bipiridil yapısında moleküldür. Polar ve renksiz bir bileşik olup mavi fluoresans gösterir (22)



Şekil 5. Orellaninin kimyasal yapısı

3.3.2. İÇEREN TÜRLER

Cortinarius orellanus, *C. orellanoides*,
Orellani türleri (12).



Resim 5. *Cortinarius orellanus*

3.3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.3.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi yöntemi ile analizi: Orellanın içeren bir parça kuru mantar toz haline getirildikten sonra %50 metanol ile karıştırılmış ve 15 dk. oda ısısında bekletilerek süzölmüştür. Elde edilen karışım silica gel 60 plak üzerine uygulanmış ve n-Butanol,asetik asit,su (3:1:1,v/v) çözücü sisteminde yürütülmüştür. Orellanın için elde edilen RF değerleri, floresan indüktörsüz selüloz plakalarında sırasıyla 0.85 ile 0.70 arasındadır. Bileşiklerin selüloz plakaları üzerindeki yeri, görünür ışıkla ve 366 nm'de UV ışığıyla görünür olmuştur(23).

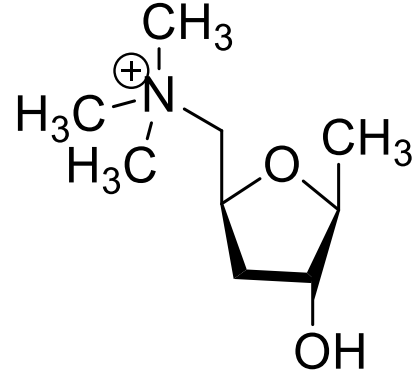
3.3.3.2. HPLC yöntemi ile analizi: Orellanın ölçümü için kullanılan yöntemler arasında HPLC de bulunmaktadır. Orellanın analizi için HPLC sistemlerinin kullanıldığı bir çalışmada photodiode array UV-Vis dedektör kullanılmıştır. Sistemde C18, 3 µm, 150 mmx4.6 mm hplc kolonu kullanılmış olup mobil faz olarak da 4 mM amonyum asetat solüsyonu (A) ve metanol (B) solüsyonları akım hızı 0,3 ml olacak şekilde kullanılmışlardır. Her iki mobil faz da pH 1,5 olacak şekilde o-fosforik asit ile ayarlanmıştır. Toplam çalışma süresi 20 dk olup enjeksiyon miktarı 50 µl olarak ayarlanmıştır. Ayırma işlemleri oda sıcaklığında gerçekleşmiş olup Orellanın 295 nm bandında Uv-Vis dedektör tarafından tespit edilmiştir(24).

3.3.3.3. LC-MS/MS yöntemi ile analizi: Orellanın analizi yapılan diğer bir çalışmada; triple-quadruple LC-MS/MS cihazında elektrosprey iyonizasyon (ESI) sistemi pozitif modda kullanılmıştır. Dedektör 1500 V ayarlanmış ve çalışma süresi 10 dk olmuştur. Mobil fazda çözücü A: 1% formik asit, ve çözücü B: asetonitril, oranları (5:95, v:v) kullanılmıştır. Kolon olarak PRP-1 kolon (PRP-1, 10 µm, 250 x 4.1 mm I.D.) kullanılmıştır. Akım hızı 0.4 ml/dak belirlenmiştir. Örnekler 1:10 90:10,v/v oranında metanol: 3M HCL ile dilüe edilmiş 20 µl kolona enjekte edilmişlerdir. Orellanın kırılma ürünleri: 253 > 163, 253 > 191, 253 > 219, 253 > 236 dalton olarak saptanmıştır(24).

3.4. MUSKARİN

3.4.1. YAPISI

3-hidroksi -2 metil - 5- (trimetil-amonyum-metil)-oksolan yapısında olup doğal olanı L-(+)-muskarindir(12).



Şekil 6. Muskarinin kimyasal yapısı

3.4.2. İÇEREN TÜRLER

Inosibe fastigata, *Inosibe geophylla*,
Clitocybe dealbata, *Clitocybe illudens*, *Amanita muscaria*(25).



Resim 6. *Inosibe fastigata*

3.4.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

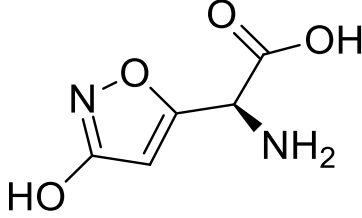
3.4.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi yöntemi ile analizi: Muskarinin ince tabaka kromatografisinde analizi için 0.5 g kuru mantar toz haline getirilerek 50 ml metanol ile karıştırılmıştır. Karışım 1 saat ısıtılıp cam pamuğundan süzölmüştür. Metanol kurutucu sistem ile uçurulup ve kurumuş kalan madde 2 ml metanol ile çözülmüştür. Çözelti 10x10 cm selüloz plağa uygulandıktan sonra bu plak 2-butanol-etanol (%95), asetik asit, su (80:20:10:30, v/v) çözücü sisteminde işleme alınmıştır. Muskarinin Rf=0.55'te kırmızı renkte görülebilir haline gelebilmesi için kurutulmuş plak üzerine modifiye Dragendorff belirteci püskürtülmüştür(26).

3.4.3.2. LC-MS/MS yöntemi ile analizi: Muskarinin analizi için yapılan diğer bir çalışmada; likit kromatografi - kütle spektrometresi kullanılmıştır. Kolon olarak C18 kolon (150 mm x 2.0 mm, 5 µm) ve mobil faz olarak 8 mM heptaflorobütirik asit kullanılmıştır. Saptama değeri muskarin için 174 m/z bulunmuştur. Bu yöntemle LOD ise muskarin için 3 ng/ml olarak tespit edilmiştir(27).

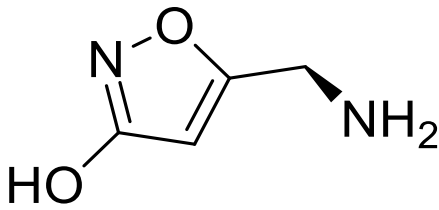
3.5. İBOTENİK ASİT VE MÜSİMOL

3.5.1. YAPISI

İbotenik asit izoksazol türevi bir bileşiktir. Toksin bulunan mantarlarda sadece ibotenik asit bulunur. Ancak bu bileşiğin kurutulması ile dekarboksilasyon ve fotokimyasal reaksiyonu meydana gelerek musimol ve muskazon maddeleri oluşur (12).



Şekil 7. İbotenik asidin kimyasal yapısı



Şekil 8. Musimolün kimyasal yapısı

3.5.2. İÇEREN TÜRLER

Amanita muscaria, *Amanita pantherina*(28).



Resim 7. *Amanita muscaria*



Resim 8. *Amanita pantherina*

3.5.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.5.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi

yöntemi ile analizi: İbotenik asit ve musimol için yapılan çalışmalarda, ince tabaka kromatografisi tekniği için 1 g kuru mantar veya 10 g taze mantar alınıp 10 ml su ile karıştırılarak 2 saat bekletilmiştir. Beklettikten sonra 1 ml formik asit ve 100 ml metanol ile karıştırılarak 1 saat santrifüj içinde ısıtılmıştır. Oluşan sıvı süzülmüş ve kalan miktar 100 ml metanol, su (4:1) karışımı ile 1 saat daha aynı şekilde karıştırılıp ve süzülmiştir. Süzülen sıvılar vakum altında kurutulmuş ve kurutulan madde 2 ml metanol, su (1:1) karışımında çözülerek 10x10 cm selüloz plak üzerine uygulanmıştır. Toksinin uygulandığı plak 2-butanol-etanol(%95), asetik asit (%100), su (75:25:5:25, v/v) çözücü sisteminde yükseltilmiştir. Kurutulan bu plağın üzerine belirteç olarak ninhidrin püskürtülmüş ve 100°C ısıtılmış etüvde birkaç dakika bekletilmiştir. Bu metotta ibotenik asit ve musimol plak üzerinde parlak sarı lekeler halinde belirir, saatler sonra kahverengi, bir gece sonra menekşe rengi olarak görülebilir(29).

3.5.3.2. HPLC yöntemi ile analizi: Diğer bir musimol analiz çalışmasında ise örnekler analiz öncesi -80°C saklanmış olup buzda çözülerek %5 perklorik asit eklenmiş ve 4°C de 4000 rpm 5 dk. santrifüj edilerek elde edilen süpernatanttan 20 µl HPLC-ED sistemine verilerek analiz yapılmıştır. Mobil faz olarak 100 mM Na₂HPO₄, %22 MEOH ve %3.5 asetonitril pH 6.75 olacak şekilde hazırlanmıştır. Akım hızı ise 0.7 ml/dk. olarak ayarlanmıştır. Örnekler sisteme verilmeden önce 2.2 mM O-phthalaldehide ve 0.8 mM 2-merkaptotanol ile karıştırılıp hazırlanmıştır. Ayırma işleminde C18 kolon (4.6-mm iç çapı × 75-mm genişliği, 3-µm por çapı, ile C18 kolon) ve elektriksel saptayıcı olarak elektrokimyasal dedektör kullanılmıştır. Musimol için saptama limiti 0.05 µg/ml bulunmuştur(30).

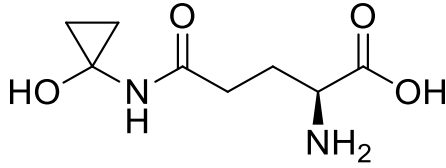
3.5.3.3. LC-MS/MS yöntemi ile analizi: Musimol ve İbotenik asit analizi için likit kromatografi ile 256 nm'ye ayarlanmış entegre diode array dedektör kullanılmıştır. Kromatografik ayırmada C18 kolon (150mm×2.1mm, 3.5 µm) 40°C ısıda kullanılmıştır. Mobil faz ise 10mM amonyum asetat/asetonitril ile akım hızı 0.2 ml/dk. olacak şekilde ayarlanmıştır. Asetonitril oranları; 0–1 dakika arası %30; 1–25 dakika arası %30'dan %90'a; 25–30 dakika arası %90; 30–31 dakika arası %90'dan %30'a; 31–46 dakika arası %30 şeklinde ayarlanmıştır. ESI pozitif modda kullanılmıştır. Prekürsör iyon musimol için 347 m/z ve ibotenik asit için 419 m/z tespit edilmiştir. Saptanma zamanları musimol için 24.4 dk, ibotenik asit için 25.7 dk bulunmuştur (28).

3.6. KOPRİN

3.6.1. YAPISI

Koprin toksini *Coprinus atramentarius*'tan izole edilmiştir. Siklopropanon ve glutaminin kondensasyonu ile meydana gelmiştir. Koprin, 5-N-

(1-hidroksisiklopropil)-L-glutamin yapısında, suda kolay çözünen, kristalize, renksiz bir bileşiktir(20).



Şekil 9. Koprinin kimyasal yapısı

3.6.2. İÇEREN TÜRLER

Coprinus comatus, *Coprinus atramentarius*, *Boletus luridus*, *Clitocybe clavipes*, *Pholiota squarrosa*, *Tricholoma auratum*(12,25).



Resim 9. *Coprinus comatus*

3.6.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

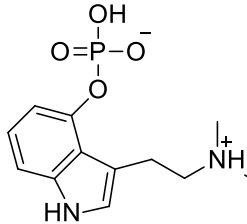
Koprinin ince tabaka kromatografik yöntemle ayrılmaları; selüloz plakalar üzerinde: n-bütanol / aseton / su / dietilamin (10/5/5/2 h / h) ve etil asetat / asetik asit / su (2/1) / 1 h / h); N- (1-hidroksi-siklopropil) amidler, % 20 etanol içinde taze bir % 2 ferrik klorür ve % 1 potasyum ferrisiyanür karışımının, % 20 etanol içerisine püskürtülmesiyle spesifik olarak tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar, silis jeli plakaları ile n-propanol / piridin / asetik asit / su (15/10/3/10 v/v), aseton / metanol / su (2/2/1 v/v) ve etanol / su (4/1 v/v) kullanmış ve ninhidrin (ısı ile kırmızı-mor) ile ortaya çıktığı görülmüştür(31).

Koprinin analizi için daha çok indirekt yöntemler kullanılmış olup, halen analizi için etkili bir analitik yöntem geliştirilememiştir.

3.7. PSİLOSİBİN (PSİLOSİN)

3.7.1. YAPISI

2000 yıl öncesinde Güney Amerika'da Mayalar ve Aztek uygarlıklarının psilosibin içeren mantarları kullandıklarına dair bulgulara rastlanmıştır. N,N-dimetil-4-fosforiloksitriptamin yapısındadır. Psilosin ise psilosibinin hidroliz ürünüdür. LSD türünde halüsinasyonlara yol açabildiği görülmüştür(32).



Şekil 10. Psilosibinin kimyasal yapısı

3.7.2. İÇEREN TÜRLER

Psilocybe cubensis, *Psilocybe argentipes*, *Psilocybe mexicana*, *Psilocybe bohemica*, *Panaeolus cyanoscens*, *Panaeolus foenicicii*, *Gymnophilus purpuratus*, *Stropharia semiglobata*(25).



Resim 10. *Psilocybe cubensis*

3.7.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.7.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi yöntemi ile analizi: Psilosibinin ince tabaka kromatografisi analizlerinde; 100-200 mg miktarında kuru mantar alınıp toz haline getirilip daha sonra 10 ml metanol ile karıştırılarak oda sıcaklığında bir gece çalkalanmıştır. Çalkalanmış sıvı süzülüp silica gel 60 plağa uygulanmış ve plak metanol, glasiyal asetik asit, su (75:10:15, v/v) çözücü sisteminde yükseltilmiştir. Sonrasında ise belirteç olarak 4-dimetilaminosinnamaldehit püskürtülerek tespit edilmiştir(20).

3.7.3.2. HPLC yöntemi ile analizi: Bu toksinin kromatografik analizi likid kromatograf ile yapılmıştır. HPLC pompa kontrolü, UV dedeksiyonu 269 nm olarak yapılmıştır. Tüm ayırma işlemleri için C12 kolon (150mmx4.6mm) kullanılmış ve enjeksiyon volümü 10 µL olarak belirlenmiştir. Mobil faz olarak; 95:5 (% v:v) metanol:10mM amonyum format, pH 3.5 ve akım hızı 0.5 ml/dk, 5 dk sürecek şekilde ayarlanmıştır(33).

3.7.3.3. LC-MS/MS yöntemi ile analizi: Psilosibinin LC-MS-MS analizi için ve triple quadropole LC-MS/MS sistemi kullanılmıştır. Kromatografik ayırma için C18 kolon (2.1 mm × 150 mm, 1.8 µm) kullanılmış olup mobil faz olarak da %0.3 formik asit içeren asetonitril (solvent A) ile 5 mM amonyum format pH 3 (solvent B) kullanılmıştır. Solvent A ilk 0.50 dk. %5, 0.50 ile 10.00 dk arasında artarak %55, 10.00 ile 10.75 dk ve 10.75- 12.85 dk arasında artarak %90, 12.85 ile 13.00 dk arasında ise düşerek %5 ve 13.00 ile 16.50 dk arasında aynı değerde tutulacak şekilde ayarlanmıştır. Akım hızı 0.40 ml/dk ve kolon sıcaklığı 50oC olacak şekilde ayarlanmıştır. Kütle spektrofotometresi multiple reaction monitoring (MRM) modu ile pozitif electrospray iyonizasyon (ESI) metoduna göre yapılmıştır. ESI: kapiller voltajı 3 kV, desolvation sıcaklığı 600oC, kaynak sıcaklık 150oC, cone gaz akım hızı 20 l/sa, desolvation gaz akım oranı 1000 l/sa ve collision gaz akım oranı 0.12 ml/dk olarak ayarlanmıştır(34).

3.7.3.4. GC-MS yöntemi ile analizi:

Psilosin analizi yapılan diğer bir çalışmada ise gaz kromatograf/kütle spektrometre sistemi kullanılmış olup enjektör sıcaklığı 250°C; dedektör sıcaklığı 200°C, ve fırın sıcaklığı 200°C ile 250°C arasında belirlenmiştir. Kolon olarak kapiller kolon (12 m×0.2 mm I.D.×0.33 µm film inceliği) kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Örneklerin çözünmesi için metanol/amonyum hidroksit (98+2 v/v) kullanılmış olup enjeksiyon volümü olarak da 10 µl verilmiştir. Dedektör elektron impakt mod (EI) olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresi 50–550 m/z arasında kayıt almıştır. Psilosin SIM taramasında psilocin-di-TMS 290, 291 ve 348 olan üç iyon bulunmuştur(35).

3.7.3.5. Radioimmünassay (RIA) yöntemi ile analizi: Toksin içeren serum yada kan örnekleri Tracer PBS (pH 7.4) ile dilüe edilerek 100 µl'de 2000 counts per minute (cpm) olacak şekilde dilüe edilmiştir. 100 µl tracer solüsyonu, 1,5 ml vialde 100 µl dilüe antiserum ile (1:100, 1:250, 1:500) karıştırılarak 75 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen solüsyon ultra-filtrasyon cihazı ile filtre edildikten sonra viyal 200 µl PBS ile 2 kere yıkanmıştır. Solüsyon santrifüje edilip ayırıcı radyoaktif kompleks ışınlama tüplerine konulmuş ve ışınlama solüsyonu ile doldurulmuştur. Daha sonra bu tüpler β-counter cihazına konularak ve radyoaktivite okutulmuştur(36).

4. SONUÇ

Bu derlememizde özellikle insanlarda zehirlenme tablosuna neden olan başlıca şapkalı

mantar toksinlerinin tespitinde kullanılan ve literatürde yer almış tüm analiz metotlarına yer verilmiştir. Bu şapkalı mantarların doğadan toplanarak tüketilmesi sonucu ülkemizde ve dünyada pek çok insan çeşitli sağlık sorunları ve ölümlerle karşılaşabilmektedir. Bu nedenle bu mantar toksinlerinin tespit edilmesinin; mantar zehirlenmelerinin teşhisi, tedavisi ve önlenmesinde çok önemli rolü vardır. Günümüzde madde analizi yöntemleri her gün gelişmekte ve yeni analiz metotları literatürümüze katılmaktadır. Mantar zehirlenmelerinin erken tespit edilmesi tedavi protokolü açısından önem teşkil etmektedir. Hastanın zehirlendiği toksinin kısa zamanda tespiti mortalite ve morbidite oranlarını önemli ölçüde etkileyecektir.

Ayrıca mantar zehirlenmelerinde birçok farklı mantar toksininin etken olması söz konusudur. Farklı toksinlerin analizinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle tüm toksinleri aynı anda analiz edebilecek bir yöntemin geliştirilmesi klinik toksikoloji açısından kritik öneme sahiptir. Bu toksin analizlerinin basitleştirilmesi, maliyetinin azaltılması ve yaygınlaştırılması halinde pek çok insanın mantar zehirlenmelerinden ölmesi veya zarar görmesi önlenebilecektir. Hatta bu yöntemlerin daha da geliştirilerek bütün mantar toksinlerini analiz edecek kapasitede, basit mobil analiz kitleri şeklinde kullanıma sunulabilmesi halinde pek çok mantar zehirlenmesi vakası engellenerek toplum sağlığını tehdit eden bu önemli sorunun önüne geçebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Yardan T, Eden AO, Baydın A, et. al. Mantar zehirlenmeleri. O.M.Ü. Tıp Dergisi 2008;25(2): 75–83.
2. Pekşen A. Mantar zehirlenmeleri ve başlıca zehirli mantarlar. Ordu'da Gıda Güvenliği Dergisi 2015;25(6).
3. Aras Z. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. Türk Hij. Den. Biyol. Dergisi 2011;68(2): 97 – 104.
4. Kaya E, Akata I, Bakırcı S, et. al. İmmünokromatografik kart testlerin çalışma prensibi ve üretim teknikleri. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2014;16(3): 46-54.
5. Kromatografik analizler, Kimya teknolojisi. TC. Milli Eğitim Bakanlığı yayınları 2013:13-15.
6. Eser B, Dinçel AS. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. Journal of Health Services and Education 2018;2(2): 51-57.
7. Hoffman E, Stroobant V. Mass spectrometry principles and applications. Wiley 2007: 126-127.
8. Woo-Sik J, Hossain A, Seung-Chun P. Toxicological Profiles of Poisonous, Edible, and Medicinal Mushrooms. Mycobiology 2014;42(3):215-220.
9. Kaya E, Yılmaz I, Sinirlioglu Z, et al. Amanitin and phallotoxin concentration in Amanita phalloides var. alba mushroom. Toxicon 2013;76:225–233.
10. Vetter JN. Toxins of amanita phalloides. Toxicon 1998;36(1):13-24.
11. Diaz JH. Amatoxin-Containing Mushroom Poisonings: Species, Toxidromes, Treatments, and Outcomes. Wilderness & environmental medicine 2018;29: 111–118.
12. Mat A. Türkiye'de mantar zehirlenmeleri ve zehirli mantarlar. Nobel Tıp Kitabevi, 2000.
13. Graeme KA. Mycetism: A review of the recent literature. J. Med. Toxicol. 2014;10:173–189
14. Abuknesha RA, Maragkou A. A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of β-amanitin in biological fluids. Anal Bioanal Chem. 2004;379:853–860.
15. Garcia J, Costa VM, Baptista P et al. Quantification of alpha-amanitin in biological samples by HPLC using simultaneous UV- diode array and electrochemical detection. Journal of Chromatography B 2015;997:85–95.
16. Kaya E, Karahan S, Hancı M et al. Düzce Yöresinde Yetişen Amanita Phalloides Mantarındaki Alfa Amanitin Düzeyinin Hplc Yöntemiyle Ölçümü. Düzce Tıp Dergisi 2012;14(2):15-17.

17. Leite M, Freitas A, Azul AM, et al. Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples. *Analytica Chimica Acta* 2013;799:77– 87
18. Jansson D, Fredriksson SA, Herrmann A, et al. A concept study on identification and attribution profiling of chemical threat agents using liquid chromatography–mass spectrometry applied to Amanita toxins in food. *Forensic Science International* 2012;221:44–49
19. Patocka J, Pita R, Kuca K. Gyromitrin, mushroom toxin of gyromitra spp. *Mil. Med. Sci. Lett.* 2012;81(2): 61-67.
20. Spoerke DG, Rumack BH. *Handbook of mushroom poisoning, diagnosis and treatment.* CRC Press Boca Raton, 1994
21. Arshadi M, Nilsson C, Magnusson B. Gas chromatography–mass spectrometry determination of the pentafluorobenzoyl derivative of methylhydrazine in false morel (*Gyromitra esculenta*) as a monitor for the content of the toxin gyromitrin. *Journal of Chromatography A* 2006; 1125:229–233
22. Najar D, Haraldsson B, Thorsell A, Sihlbom C et. al. Pharmacokinetic properties of the nephrotoxin orellanine in rats toxins 2018;10: 333.
23. Oubrahim H, Richard JM, Cantin-Esnault D et. al. Novel methods for identification and quantification of the mushroom nephrotoxin orellanine Thin-layer chromatography and electrophoresis screening of mushrooms with electron spin resonance determination of the toxin. *J. Chromatogr. A* 1997;758: 145-157.
24. Shao D, Tang S, Healy RA, et al. A novel orellanine containing mushroom *Cortinarius armillatus*. *Toxicon* 2016;114:65-74
25. Berger KJ, Guss DA. Mycotoxins Revisited: Part II. *The Journal of Emergency Medicine* 2005; 28(2):175–183
26. Michelot D, Melendez-Howell LM. *Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology and ethnomycology.* *Mycol. Res.* 2003;107(2): 131-146.
27. Merova B, Ondra P, Stankova M, et al. Isolation and identification of the *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* toxins in human urine. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(5):744-8
28. Tsujikawa K, Kuwayama K, Miyaguchi H, et al. Determination of muscimol and ibotenic acid in *Amanita* mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Journal of Chromatography B* 2007;852:430–435
29. Stijve T. High-performance thin-layer chromatographic determination of the toxic principles of some poisonous mushrooms. *Mitt. Gebiete Lebensm Hyg.* 1981;72: 44-54
30. Ludvig N, Tang HM, Baptiste SL, et al. Long-term behavioral, electrophysiological, and neurochemical monitoring of the safety of an experimental antiepileptic implant, the muscimol-delivering Subdural Pharmacotherapy Device in monkeys. *J Neurosurg.* 2012; 117:162–175
31. Michelot D. Poisoning by *Coprinus atramentarius*. *Natural Toxins* 1992;1:73-80
32. Kinghorn AD. *Toxic plants.* Columbia University Press, New York, 1979.
33. Anastos N, Lewis SW, Barnett NW, et al. The Determination of Psilocin and Psilocybin in Hallucinogenic Mushrooms by HPLC Utilizing a Dual Reagent Acidic Potassium Permanganate and Tris(2,20-bipyridyl)ruthenium(II) Chemiluminescence Detection System. *J Forensic Sci* 2006;51(1)
34. Pichini S, Marchei E, Garcia-Algar O, et al. Ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of hallucinogenic drugs in hair of psychedelic plants and mushrooms consumers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014;100:284–289
35. Sticht G, Kaferstein H. Detection of psilocin in body fluids; *Forensic Science International* 2000;113:403–407
36. Albers C, Köhler H, Lehr M, et al. Development of a psilocin immunoassay for serum and blood samples. *Int J Legal Med.* 2004;118:326–331.