



- ¹ Ertu rul KAYA
² Kür at O uz YAYKA LI
³ Selim KARAHAN
⁴ Recep BAYRAM
⁵ Ayhan SARITA
⁶ Emine YAYKA LI

- ¹ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD, Düzce, Türkiye
² Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Düzce, Türkiye
³ Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD, Diyarbakır, Türkiye
⁴ Abant zzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bolu, Türkiye
⁵ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Düzce, Türkiye
⁶ Düzce Üniversitesi, Sa lık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Düzce, Türkiye

Submitted/Ba vuru tarihi:
14.11.2012
Accepted/Kabul tarihi:
30.11.2012
Registration/Kayıt no:
12 11 259

Corresponding Address
/Yazı ma Adresi:

Dr. Ertu rul KAYA
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD, 81620 Konuralp / DÜZCE
e-posta: drekaya@yahoo.com

© 2012 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdersisi@duzce.edu.tr

Yüksek Saflıkta Beta Amanitin Üretimi

Production of High Purity Beta Amanitin

ÖZET

Amaç: Beta amanitin nadiren bilimsel ara tırmalarda kullanılmakta ve kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Piyasada bu ürün %90 saflıkta ticari olarak satılmaktadır. Bu ara tırmada yüksek saflıkta beta amanitin üretme yöntemi tanımlanmıştır.

Yöntem: Safla tırma i lemi Amanita phalloides mantarlarından ekstraksiyonla yapılmıştır. Öncelikle bu mantarlar toplanmıştır, ekstrakte edilmiştir, 2 defa preparatif HPLC ile safla tırma i lemi uygulanmıştır. Toksinin kar ıla tırması, analitik HPLC sisteminde tutulma zamanı ve ultraviyole spektrumu kar ıla tırılması yöntemleriyle yapılmıştır.

Bulgular: İlk safla tırma sonucunda elde edilen beta amanitin saflık oranı %91(±2,36) olarak ölçülmüştür. İkinci safla tırma sonucunda elde edilen beta amanitin saflık oranı %99,2(±0,38) olarak ölçülmüştür. Safla tırma sonucu elde ettiğimiz toksin ile beta amanitin standardın UV spektrumlarında her ikisinde de 303 nm'de maksimum, 263 nm'de minimum absorbans vermiştir ve spektrum yapısının aynı olduğu görülmüştür.

Sonuç: Tanımladığımız bu yöntemle, >%99 saflıkta beta amanitin üretilmesi mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Beta amanitin, Preparatif HPLC, Safla tırma

SUMMARY

Objective: Beta amanitin has been used in experiment and has been purified only around 90% purity using existing methods. In this study, it has been aimed to describe the method in order to produce high-purity beta amanitin using preparative HPLC.

Methods: Amanita phalloides mushrooms have been collected, extracted and purified 2 times using preparative HPLC. Validation of the toxin has been performed by comparison of retention time at HPLC and ultraviolet spectrum.

Results: Beta amanitin was obtained with 91% (±2.36) purity after first purification process. Beta amanitin was obtained with 99,2% (±0.38) purity after second purification process. It seemed that purified toxin and standard were given maximum absorbance at 303 nm and minimum absorbance at 263 nm, and the structure of the spectrums for both was similar.

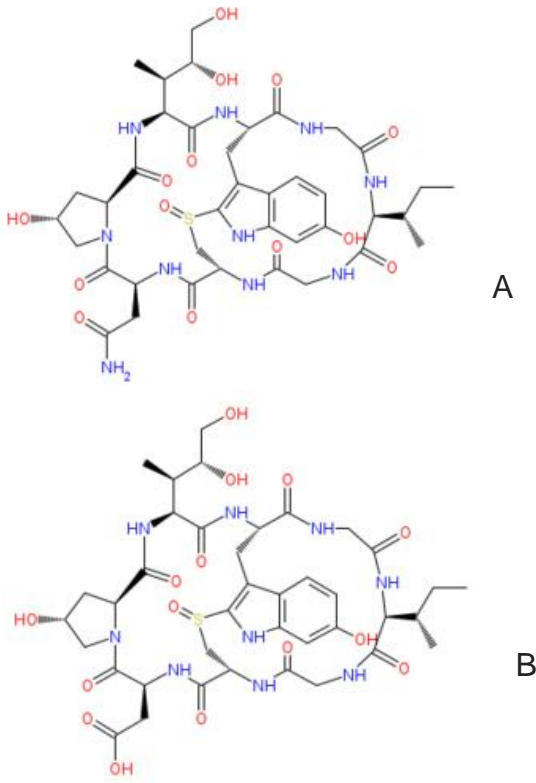
Conclusion: Beta amanitin with >%99 purity can be produced by this method.

Keywords: Beta amanitin, Preparative HPLC, Purification

G R

Günümüzde yaklaşıklık olarak be binden fazla mantar sınıflandırılmış olup, bunlardan yüze yakın türün zehirli olduğu bilinmektedir. Tüm zehirli mantarlar arasında az sayıda tür ölümcül zehirlenmelerin nedeni olarak iyi bilinmektedir. *Amanita phalloides*, *Amanita virosa*, *Amanita verna*, *Amanita muscaria*, *Amanita bisporigera*, *Galerina marginata* ölümcül zehirlenmelere neden olan mantarlara başlıca örneklerdir (1). Zehirlenmeye neden olan mantar türüne ve içerdiği toksine başlı olarak klinik tablo ve prognoz de i iklik gösterir. Birçok zehirlenme sadece gastrointestinal bulgular vererek semptomatik olarak tedavi edilebilirken, bazıları özellikle karaciğer ve böbrek yetmezliği ile seyreder ve çok ciddi tedavi gerektirmektedir. Dünyada tüm acil vakaların yaklaşıklık %2,5-7'sinin, ülkemizde ise %0,5-3'ünün mantar zehirlenmesi vakası olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda medya vasıtasıyla zehirlenmelerin halk arasında duyulması nedeniyle mantar zehirlenmesi vakalarının azaldığı görülmektedir (2). İklim koşullarına başlı olarak zehirli mantarların bol yeti ti i bazı yıllarda zehirlenme vakalarında artışı olduğu bilinmektedir (3).

Zehirli mantarlar arasında en iyi bilineni Amanita phalloides türüdür. Tüm



ekil 1: Amanitin grubu toksinlerden alfa(A) ve beta(B) amanitininin moleküler yapısı

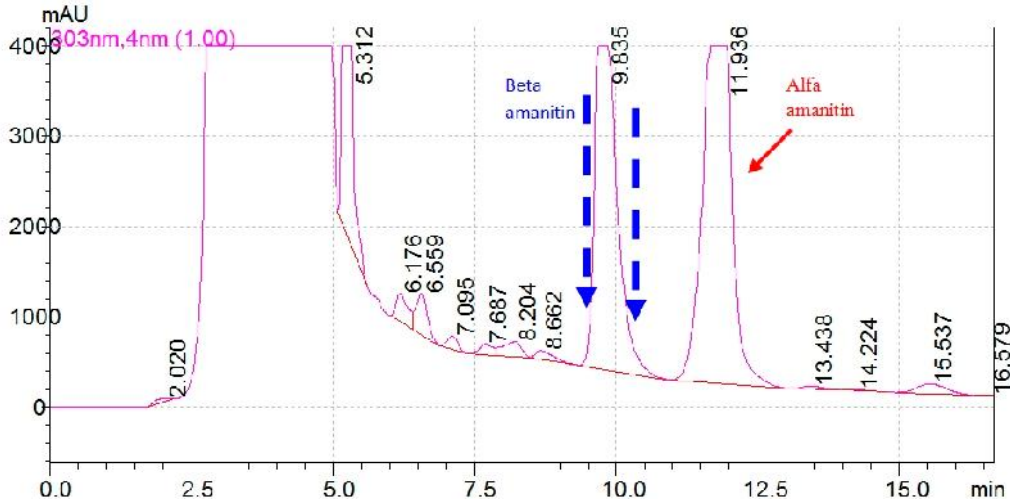
ölümcül mantar zehirlenmesi vakalarının %90'dan fazlasından sorumlu tutulmaktadır. Dünyanın birçok bölgede ve bol miktarda yetirir. Bu mantar içinde birçok toksin tanımlanmıştır. Genel olarak bu toksinler amanitinler (amatoksinler, amanotoksinler) ve fallotoksinler olarak 2 sınıfa ayrılırlar (4). Fallotoksinlerin gastrointestinal yoldan emilip emilmediği konusunda yeterli bilgi mevcut değildir ve toksisiteye katkısı olmadığı düşünülmektedir. Amanitinler 8 aminoasidin dairesel olarak birleşmesi sonucu oluşan siklopeptidler olarak da bilinirler. Yapı içindeki sisteinide bulunan sülfür atomu

diğer aminoasitlerden triptofanın indolamin grubu ile bağlanarak yapıyı bisiklik hale getirir. Ana yapının substitüellerindeki değişiklikler sonucu farklı toksinlerin de mantar içinde bulunduğunu tespit edilmiştir. Amanitin grubu toksinlerden alfa ve beta amanitininin moleküler yapısı ekil 1'de verilmiştir (5).

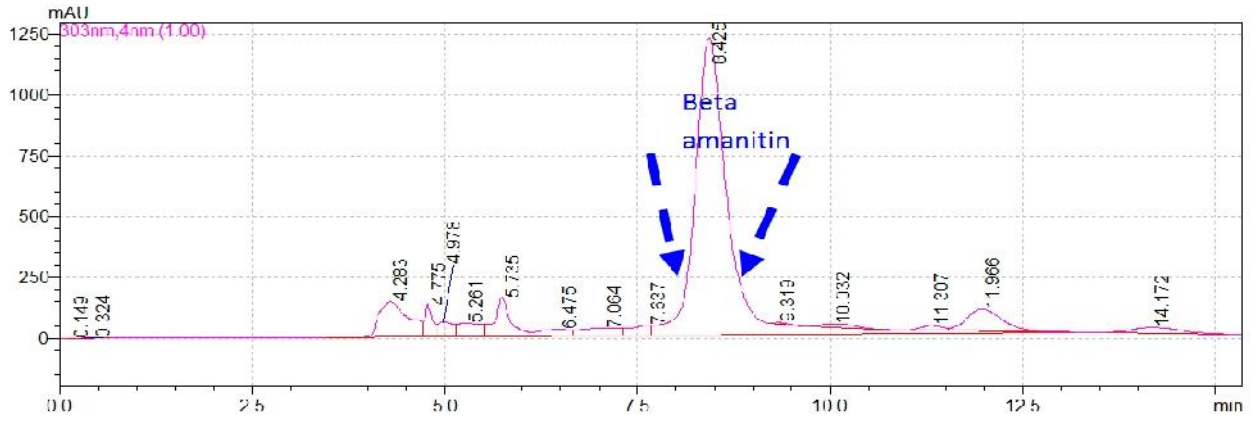
Mantar içinde en fazla oranda bulunan amanitin grubu toksin alfa amanitindir. Zehirlenmeden sorumlu olan toksin olarak da bu tanımlanmıştır, diğerleri etraflıca araştırılmamıştır. Alfa amanitin oldukça detaylı şekilde araştırılmıştır. Alfa amanitin hücrelerde protein sentezinin ilk basamağı olan transkripsiyonu gerçekleştiren RNA polimeraz II enzimine bağlanarak inhibe ettiği bilinmektedir. Protein sentezini gerçekleştiremeyen hücre, mevcut proteinler bitene kadar birkaç gün daha yaşar ve sonra ölür (6). Bu etki nükleus içeren tüm hücrelerde oluşmasına rağmen, alfa amanitin emilim sonrası hemen karaciğer tarafından alınmaktadır. Bu nedenle asıl toksik etki karaciğer hücrelerinde görülmektedir. Ayrıca toksin böbreklerden atıldığından, karaciğer kadar olmasa da böbrek toksisitesi de görülmektedir (7).

DeneySEL araştırmalarda RNA polimeraz II inhibisyonu için çoğunlukla alfa amanitin kullanılmaktadır ve bu amaçla en sık kullanılan ajandır (6). Ayrıca Amanita phalloides mantar zehirlenmesini modellemek amacıyla da hücre kültürü ve hayvan modellerinde kullanılmaktadır (8,9). Ancak bazı araştırmalara göre beta amanitininin de RNA polimeraz 2 enzimini inhibe ettiği görülmüştür (10). Ayrıca Amanita phalloides mantar zehirlenmelerinde klinik toksisiteye beta amanitininin de katkısı olduğu tartışılmaktadır (11). Bu nedenlerle beta amanitin de saf standart olarak 1 mg viallerde ticari olarak %90 saflıkta satılmaktadır.

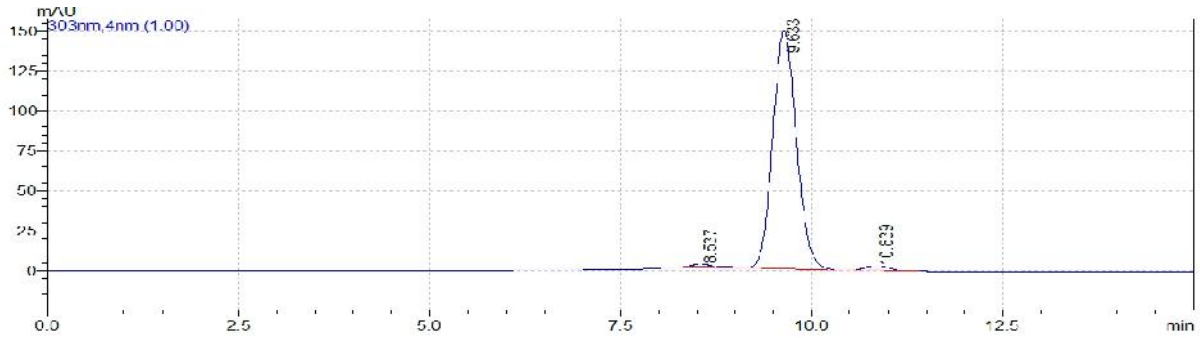
Beta amanitininin saflaştırılması için, alfa amanitine benzer şekilde, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve sonrasında kolon kromatografisini içeren bir yöntem önceden



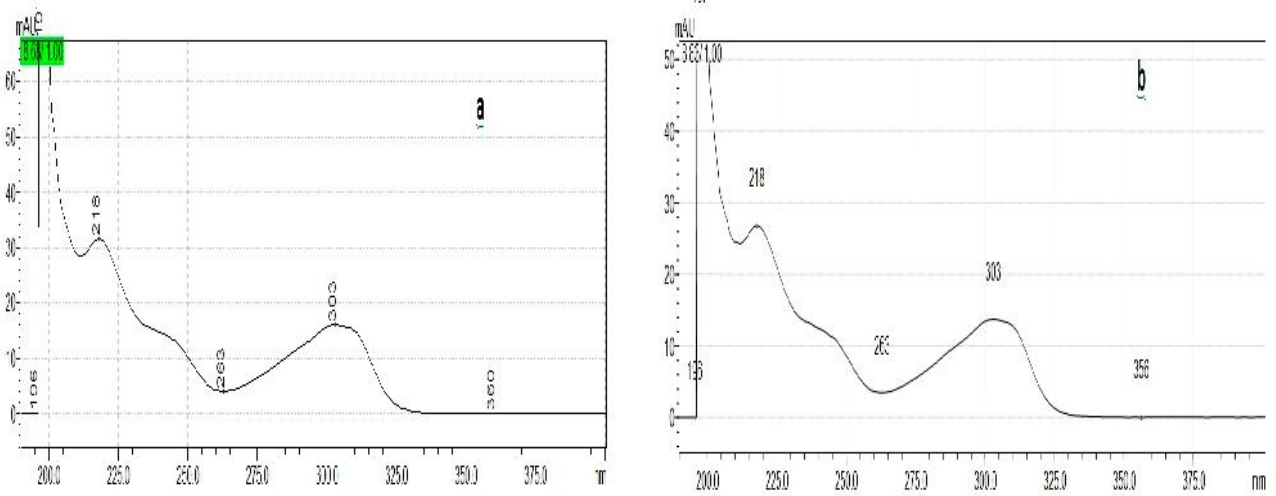
ekil 2: Birinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitiğini göstermektedir.



ekil 3: kinci preparatif safila tırma i lemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama ba langıç ve biti ini göstermektedir.



ekil 4: Elde edilen beta amanitinin analitik sistemdeki kromatogramı



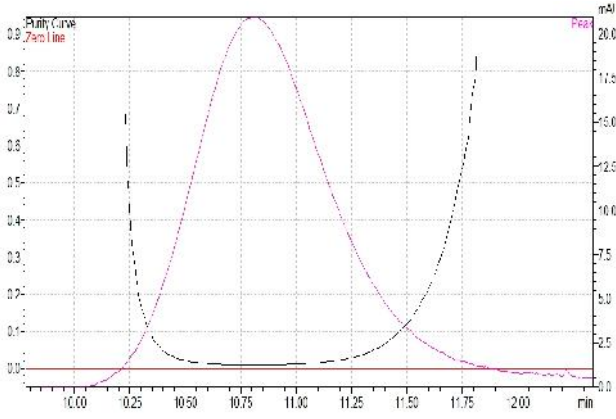
ekil 5: Elde edilen beta amanitinin (a) ile standartın (b) UV absorbanlarının karşılaştırılması

tanımlanmıştır. Beta amanitin, bu toksini içeren her mantardan safila tırılabilir, en bol yeti en Amanita phalloides mantarı bu amaçla tercih edilmektedir (12). Son yıllarda HPLC kullanımının artması ve veriminin iyi olması nedeniyle bu yöntemle beta amanitin ve diğer toksinlerin analiz yöntemleri geliştirilmiştir (11).

HPLC analiz yönteminin farklı bir versiyonu olan preparatif sistemde, analiz edilen materyal yüksek saflıkta elde edilebilmektedir. Bu yöntemde kolon kapasitesi ve mobil faz akı hızı artırılmakta, sisteme

yüksek miktarda numune yüklenmekte, bu sayede bol miktarda analit safila tırılabilir. Ancak sıvı-sıvı ekstraksiyonuna göre daha pahalı ve zor olan bu yöntem, diğer yöntemlerle yüksek verim alınamayan maddelerin safila tırılmasında daha kullanışlı olmaktadır (13).

Bu çalışmada, Amanita phalloides mantarından, preparatif HPLC yöntemi kullanılarak beta amanitin yüksek saflıkta elde edilme yöntemi tanımlanmıştır.



ekil 6: Beta amanitin pikinin, pik içindeki saflık analizi spektrumu

MATERYAL METOD

HPLC analizlerindeki tüm çözücüler analitik grade kullanılmıdır. Beta amanitin standardı Enzo Life Science (ABD) firmasından temin edilmiştir. Amanita phalloides mantarları toplanmış, ekstrakte edilmiş, 2 defa preparatif HPLC saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Her bir adımdan sonra saflık oranları ölçülmüştür. Toksinin dozlanması analitik HPLC'deki tutulma zamanı ve ultraviyole (UV) spektrumu karşılaştırılması yöntemleriyle yapılmıştır.

Deney 6 defa tekrarlanarak, sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Temel olarak daha önce alfa amanitin saflaştırılmasında kullanılan yöntem ufk modifikasyonlar yapılarak kullanılmıdır (13).

Mantar ekstraksiyonu: Amanita phalloides mantarları 12.10.2010 tarihinde Düzce/ Gümü ova/ Ye ilayla Kasabası ormanlık alanından toplanmıştır. Mantarların tanımlanması mikroskopik ve makroskopik özelliklerine göre yapılmış ve Amanita phalloides türü olduğu gösterilmiştir (1). Mantarlar 50-60 °C hava akımı altında 12 saatte kurutulmuş, öğütülerek toz haline getirilmiştir. 10 gramlık materyal, 6 ayrı sokslet filtresi içine alınmış, 6 farklı kanalda 250 mL %40 metanolde 4 saat sokslet aparatında ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlar vakum evaporatörde tam kuruluşa kadar 50 °C de buharlaştırılmıştır. Kalan materyal üzerine 1. mobil fazdan 10 mL eklenerek iyice çözülmüştür, 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilmiş, üstteki sıvı kısım alınarak, 45 µm filtreden geçirilip preparatif HPLC sistemine 1 mL enjekte edilmiştir.

Preparatif HPLC Sistemi: Aynı degazer, pompa ve dedektör 2 farklı paralel hatta bağlanarak bir vana yoluyla hem preparatif hem analitik HPLC sistemleri oluşturulmuştur. Preparatif sistemde (Shimadzu) degazer, 0,05 mL/dakika hassasiyetli pompa, bilgi ünitesi, ayırıcı vana (preparatif/analitik), 5 mL manuel enjektörlü sample loop, C18 ODS 10 µm partikül 250x20 mm preparatif kolon (GLS), diyod

array dedektör (DAD), fraksiyon toplayıcı kullanılmıştır. Mobil faz akı hızı 16 mL/dakika izokratik olarak kullanılmıştır. 1. mobil faz olarak amonyum asetat (50 mM, pH 5,5 asetik asit), asetonitril, metanol (80:10:10, v/v/v) kullanılmıştır. Öncelikle beta amanitin standardı 100ug/mL bu sisteme uygulanmış ve tutulma zamanı ile toksinin UV spektrumu kaydedilmiştir. Hazırlanmış olan Amanita phalloides ekstresi bu sisteme 1 mL uygulanmıştır. Beta amanitin standardı ile aynı tutulma zamanında gelen pik başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır (ekil 2). Fraksiyonun saflık oranı ölçülmüştür. Elde edilen fraksiyon vakum evaporatörde 50 °C de kurularak, 1 mL %40 metanolde çözülmüş ve 2. saflaştırma için yeniden preparatif HPLC sistemine uygulanmıştır.

2. preparatif HPLC işlemi, özellikle materyale karışan beta amanitini uzaklaştırmak saflık oranını artırmak ve toksini amonyum asetat tuzundan arındırmak amacıyla uygulanmıştır. Bu adımda 2. mobil faz olarak %40 metanol kullanılmıştır. Diğer tüm parametreler yukarıdaki yöntemle aynı uygulanmıştır. Bu sistemde de önce beta amanitin standardı uygulanmış, tutulma zamanı kaydedilmiştir. Fraksiyonun sisteme verilmesinden sonra standart ile aynı zamanda gelen pik başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile alınmıştır (ekil 3). Elde edilen fraksiyonun hacmi ölçülmüştür. Bu fraksiyondaki saflık oranını ve toksin miktarını ölçmek için 20 µL analitik HPLC sistemine uygulanmıştır.

Analitik HPLC sistemi: Yukarıdaki preparatif sisteme paralel olarak ayırıcı vana sonrasında analitik kolon kullanılmıştır. Bu amaçla 5 µm partiküllü, 4,6x250 mm C18 ODS kolon sisteme bağlanmıştır. Mobil faz olarak 1. mobil faz kullanılmıştır. Mobil faz akı hızı izokratik olarak 1 mL/dakika olarak ayarlanmıştır.

Saflık analizi: Analitik HPLC sisteminde elde edilen kromatogramdaki toksin pikinin tüm piklere oranı saflık oranı olarak kullanılmıştır. Ayrıca toksin pikinin kendi içindeki saflık oranı UV tarama ile yapılmıştır. Miktar analizi: Analitik HPLC sisteminde beta amanitin standardı için 5 noktalı (her biri 3 defa tekrarlı) kalibrasyon gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin denklemine, analizlerde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümü yapılmıştır.

Toksinin dozlanması: Elde edilen beta amanitin toksininin dozlanması için 2 yöntem kullanılmıştır. 1. olarak preparatif HPLC sisteminde tutulma zamanı, 2. olarak UV spektrumunda minimum ve maksimum absorbans değerleri ile genel spektrum yapısı karşılaştırılmıştır.

SONUÇLAR

1. safra tırma işlemi sonrasında elde edilen beta amanitin saflık oranı %91(±2,36) olarak bulunmuştur. Bu işlemde beta amanitin tutulma zamanı 8,84 dakikadır (ekil 2).

2. safra tırma işlemi sonrasında elde edilen beta amanitin saflık oranı %99,2(±0,38) olarak bulunmuştur. Bu işlemde elde edilen beta amanitin miktarı 421(±24,5) mg olarak ölçülmüştür. Analitik sistemde tutulma zamanı 9,63 dakika olarak görülmüştür (ekil 4). Elde edilen toksin ile standardın UV spektrumlarında her ikisinde de 303 nm'de absorpsiyon pikini yaptı, 263 nm'de negatif absorpsiyon pikini verdi ve spektrum yapısının aynı olduğu görülmüştür (ekil 5). Toksin pikinin kendi içindeki saflık indeksinin >0,999 (±0) olduğu görüldü (ekil 6).

TARTI MA VE SONUÇ

Ara tırmamız sonucunda >%99 saflıkta beta amanitin elde edilmiş ve yöntemi tanımlanmıştır.

Beta amanitin UV spektrumunda 303 nm'de maksimum absorpsiyon pikini almıştır ve bilinmektedir (14). HPLC cihazlarında sıkça kullanılan UV dedektörler tek bir dalga boyunda tarama yapmıyorsa, her birden fazla madde aynı anda dedektöre gelirse bunu anlamak mümkün olmamaktadır. Son yıllarda geliştirilen DAD dedektörler, tek dalga boyu yerine UV ve görünen alandaki tüm dalga boylarında aynı anda tarama yaparak, HPLC kromatogramında aynı anda gelen ve çakışan farklı maddelerin görülebilmesini sağlamaktadır. Böylece, 2 farklı madde aynı tutulma zamanında dedektöre gelse bile, ultraviyole absorpsiyonlarındaki farklılık sayesinde DAD dedektörde bu safsızlık anlaşılabilir (15). Çalışmamızda elde ettiğimiz pik saflık indeksi de eride, elde ettiğimiz moleküllere benzer bir maddenin karışımını ve sadece tek bir kimyasal madde elde ettiğimizi göstermektedir.

HPLC cihazlarında temel prensip tutulma zamanının farklılığına dayanarak, ortam artlarının deiykenli veya kimyasal maddelerin fiziki özelliklerinin benzerliği gibi bazı nedenlerle farklı maddelerin aynı tutulma zamanında gelebilmesi, bu da analitin benzer bir madde ile karışımına neden olabilmektedir. Bu durumu engellemek için bazı yöntemler kullanılmaktadır. DAD dedektörler sayesinde analiz sırasında analitin UV spektrumu alınabilmekte, standartla karşılaştırılması sonucunda doğrulama yapılabilmektedir (13). Safra tırma işlemleri sonrasında elde ettiğimiz maddenin beta amanitin olduğu UV spektrumunun standardın spektrumuyla karşılaştırılması sonucunda ispatlanmıştır. Ayrıca bu spektrum literatürde

bildirilmiş olan beta amanitin spektrumu ile aynıdır (14). Ancak alfa amanitinin moleküler yapısı beta amanitine çok benzemektedir (ekil 1). Bu nedenle de ultraviyole spektrumları birbirinin aynıdır, bu iki toksin bu yöntemle ayırt edilememektedir. Ancak HPLC deki tutulma zamanları uyguladığımız yöntemde farklıdır ve bu zamana göre ayrımları yapılabilmektedir. Kullandığımız yöntem alfa amanitin ile beta amanitini birbirinden net olarak ayırmaktadır (13).

Elde ettiğimiz saflık oranı çok yüksektir, zira ara tırmalarda kullanılmak üzere piyasada satılan birkaç ürünün saflık oranı %90-95 arasındadır. Bu durumun, ara tırmalarda doğruluk oranını artırması beklenir.

Elde ettiğimiz beta amanitin miktarı ancak 2-3 tekrar sonunda 1 mg dolaylarına çıkabilmektedir. Bu miktar çok yüksek değildir. Ancak başlangıçta kullanılan ekstre konsantrasyonu artırılarak miktar artırılabilir. Bu haliyle de, 1 mg toksin satın alma maliyetinin çok daha altında maliyetle elde edilebilmektedir. Verimi artırmak amacıyla başlangıçta kullanılan malzemelere gerek duyulabilir.

Ara tırmamızın limitasyonları, tanımladığımız yöntemi uygulamak için preparatif ve analitik HPLC altyapısına ve kullanıcı tecrübesine ihtiyaç olmasıdır. Tanımladığımız bu yöntemle, yüksek saflıkta beta amanitin elde edilmesi mümkündür.

KAYNAKLAR

- 1- Bresinsky A, Besl H. A Colour Atlas of Poisonous Fungi. Wolf Publishing, London, 1990; 24-29.
- 2- Mat A: Türkiye'de mantar zehirlenmeleri ve zehirli mantarlar. Nobel Yayınları, İstanbul, 2000; 15-63.
- 3- Işılolu M, Gücin F, Mat A. Kasım 1994'te İstanbul'da meydana gelen mantar zehirlenmeleri. Ekoloji-Çevre Dergisi 4 (14), 22-28,1995.
- 4- Vetter J: Toxins of Amanita Phalloides. Toxicon 1998 Jan;36(1):13-24.
- 5- May JP, Fournier P, Patrick BO, Perrin DM. Synthesis, characterisation, and in vitro evaluation of Pro2-Ile3-S-deoxo-amaninamide and Pro2-D-allo-Ile3-S-deoxo-amaninamide: implications for structure-activity relationships in amanitin conformation and toxicity. Chemistry. 2008;14(11):3410-7.
- 6- Gong XQ, Nedialkov YA, Burton ZF. Alpha-amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II. J Biol Chem 2004 Jun 25;279(26):27422-7.
- 7- Faulstich H, Talas A, Wellhöner HH. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. Arch Toxicol 1985 Jan;56(3):190-4.
- 8- Buku A, Campadelli-Fiume G, Fiume L, Wieland T. Inhibitory effect of naturally occurring and chemically modified amatoxins on RNA polymerase of rat liver nuclei. FEBS Lett 1971 Apr 12;14(1):42-44.
- 9- Zhao J, Cao M, Zhang J, Sun Q, Chen Q, Yang ZR. Pathological effects of the mushroom toxin alpha-amanitin on BALB/c mice. Peptides 2006 Dec;27(12):3047-52.

- 10- Foá-Tomasi L, Costanzo F, Campadelli-Fiume G. Enhanced inhibition of RNA synthesis by amanitins in in vitro cultured cells. *Experientia*. 1976 Jan 15;32(1):45-6.
- 11- Robinson-Fuentes VA, Jaime-Sánchez JL, García-Aguilar L, Gómez-Peralta M, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G. Determination of alpha- and beta-amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*. 2008 Aug 5;47(4-5):913-7.
- 12- Yocum RR. New laboratory scale purification of beta-amanitin from American *Amanita phalloides*. *Biochemistry*. 1978 Sep 5;17(18):3786-9.
- 13- Kaya E, Karahan S, Yayka lı KO, Bayram R, Sarita A. Purification of High Purity Alpha Amanitin Using Preparative HPLC Method. *Konuralp Med J*. 2012;4(3): 35-41
- 14- Wieland T, Wieland O: Chemistry and toxicology of the toxins of *Amanita phalloides*: *Pharmacol Rev* 1959 Mar;11(1):87-107.
- 15- Brüggemann O, Meder M, Freitag R. Analysis of amatoxins alpha-amanitin and beta-amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection. *J Chromatogr A* 1996 Sep 13;744(1-2):167-76.