

¹ Ertuğrul KAYA

² Kürşat Oğuz YAYKAŞLI

³ Selim KARAHAN

⁴ Recep BAYRAM

⁵ Ayhan SARITAŞ

⁶ Emine YAYKAŞLI

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 İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bolu, Türkiye

⁵ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Düzce, Türkiye

⁶ Düzce Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Düzce, Türkiye

Submitted/Başvuru tarihi:

14.11.2012

Accepted/Kabul tarihi:

30.11.2012

Registration/Kayıt no:

12 11 259

Corresponding Address
/Yazışma Adresi:

Dr. Ertuğrul 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
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

Yüksek Saflıkta Beta Amanitin Üretimi

Production of High Purity Beta Amanitin

ÖZET

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

Yöntem: Saflaştırma işlemi *Amanita phalloides* mantarlarından ekstraksiyonla yapılmıştır. Öncelikle bu mantarlar toplanmış, ekstrakte edilmiş, 2 defa preparatif HPLC ile saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Toksinin karşılaştırması, analitik HPLC sisteminde tutulma zamanı ve ultraviyole spektrumu karşılaştırılması yöntemleriyle yapılmıştır.

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

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

Anahtar Kelimeler: Beta amanitin, Preparatif HPLC, Saflaştırma

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.

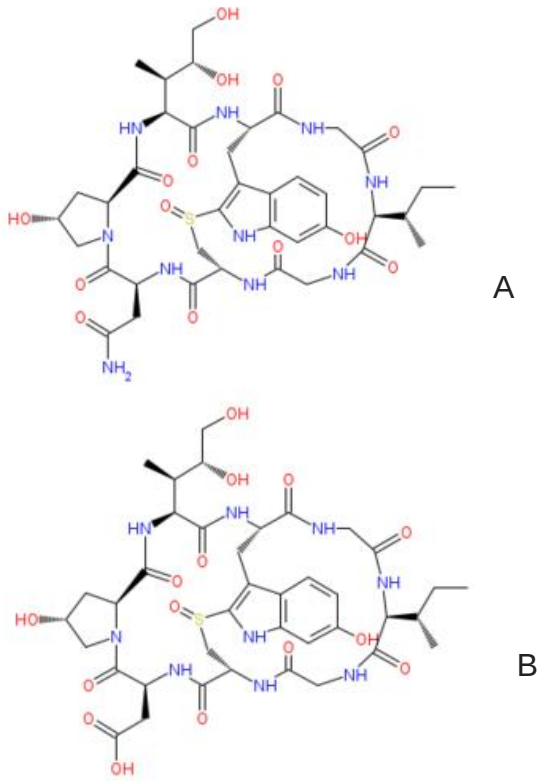
Results: Beta amanitin was obtained with 91% (±2.36) purity after first purification process. Beta amanitin was obtained with 99,2% (±0.38) purity after second purification process. It seemed that purified toxin and standard were given maximum absorbance at 303 nm and minimum absorbance at 263 nm, and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

GİRİŞ

Günümüzde yaklaşık olarak beş 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 bağlı olarak klinik tablo ve prognoz değişiklik 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 yaklaşık %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 bağlı olarak zehirli mantarların bol yetiştiği bazı yıllarda zehirlenme vakalarında artış olduğu bilinmektedir (3). Zehirli mantarlar arasında en iyi bilineni *Amanita phalloides* türüdür. Tüm



Şekil 1: Amanitin grubu toksinlerden alfa(A) ve beta(B) amanitinin moleküler yapısı

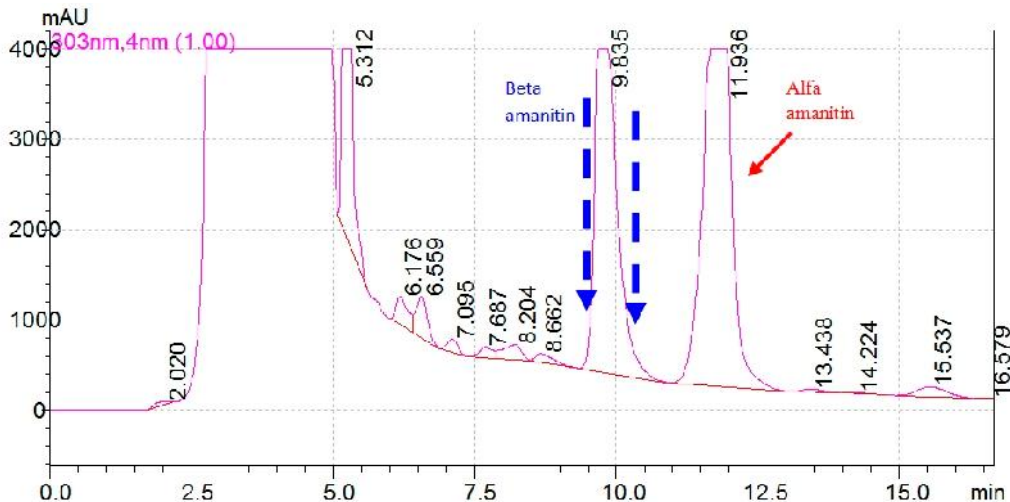
ölümcül mantar zehirlenmesi vakalarının %90'dan fazlasından sorumlu tutulmaktadır. Dünyanın birçok bölgede ve bol miktarda yetişir. Bu mantar içinde birçok toksin tanımlanmıştır. Genel olarak bu toksinler amanitinler (amatoksinler, amanotoksinler) ve fallotoksinler olarak 2 sınıfa ayrılırlar (4). Fallotoksinlerin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

diğer aminoasitlerden triptofanın indolamin grubu ile bağ yaparak yapıyı bisiklik hale getirir. Ana yapının substitüleriindeki değişiklikler sonucu farklı toksinlerin de mantar içinde bulunduğu tespit edilmiştir. Amanitin grubu toksinlerden alfa ve beta amanitinin moleküler yapısı Şekil 1'de verilmiştir (5).

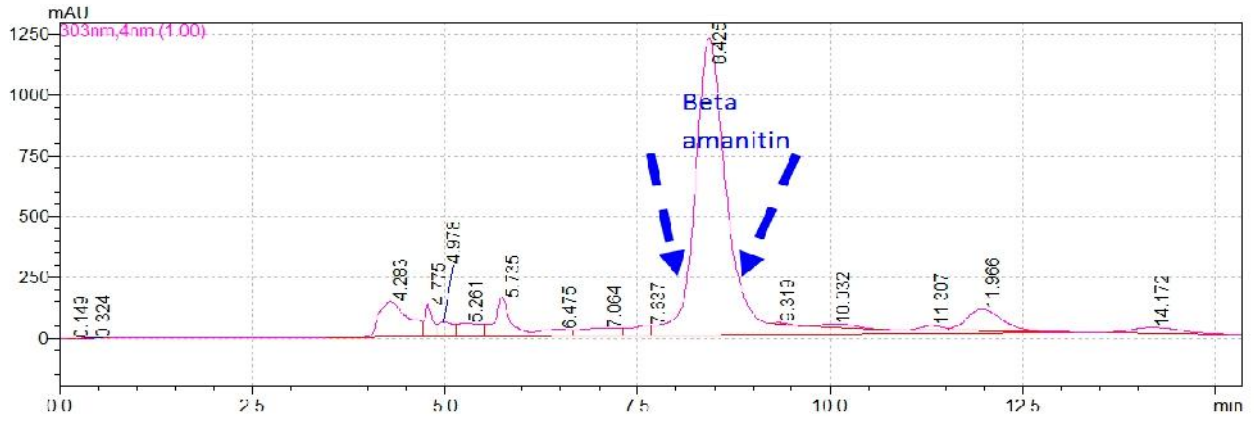
Mantar içinde en fazla oranda bulunan amanitin grubu toksin alfa amanitindir. Zehirlenmeden sorumlu olan toksin olarak da bu tanımlanmış, diğerleri etraflıca araştırılmamıştır. Alfa amanitin oldukça detaylı şekilde araştırılmıştır. Alfa amanitin hücrelerde protein sentezinin ilk basamağı olan transkripsiyonu 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 alınmakta olduğundan asıl toksik etki karaciğer hücrelerinde görülmektedir. Ayrıca toksin böbreklerden atıldığından, karaciğer kadar olmasa da böbrek toksisitesi de görülmektedir (7).

Deneyisel 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 araştırma sonuçlarına göre beta amanitin de RNA polimeraz 2 enzimini inhibe ettiği görülmüştür (10). Ayrıca *Amanita phalloides* mantar zehirlenmelerinde klinik toksisiteye beta amanitin de katkısı olduğu tartışılmaktadır (11). Bu nedenlerle beta amanitin de saf standart olarak 1 mg viyallerde ticari olarak %90 saflıkta satılmaktadır.

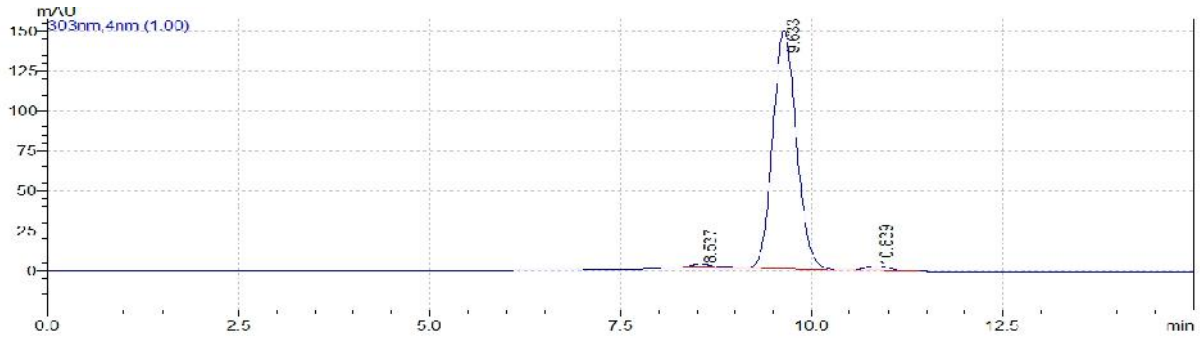
Beta amanitin saflaştırılması için, alfa amanitine benzer şekilde, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve sonrasında kolon kromatografisini içeren bir yöntem önceden



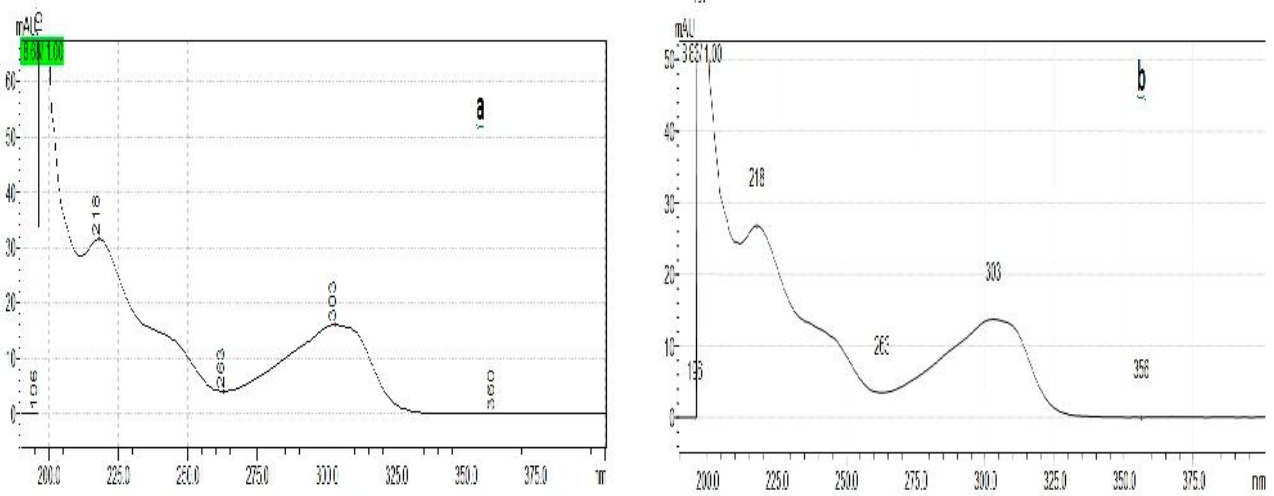
Şekil 2: Birinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli okları fraksiyonlama başlangıç ve bitişi göstermektedir.



Şekil 3: İkinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitişini göstermektedir.



Şekil 4: Elde edilen beta amanitinin analitik sistemdeki kromatogramı



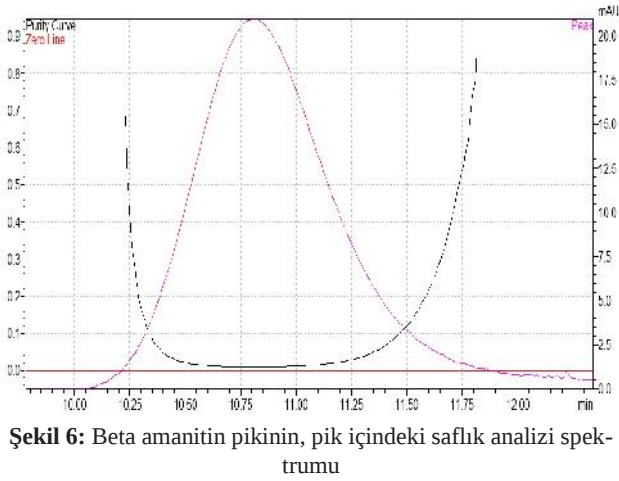
Şekil 5: Elde edilen beta amanitinin (a) ile standart (b) UV absorbanlarının karşılaştırılması

tanımlanmıştır. Beta amanitin, bu toksini içeren her mantardan saflaştırılabilir, en bol yetişen 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 akış hızı artırılmakta, sisteme

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

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



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

MATERYAL METOD

HPLC analizlerindeki tüm çözücüler analitik grade kullanılmıştır. 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 aşamadan sonra saflık oranları ölçülmüştür. Toksinin doğrulaması analitik HPLC'deki tutulma zamanı ve ultraviyole (UV) spektrumu karşılaştırılması yöntemleriyle yapılmıştır. İşlem 6 defa tekrarlanarak, sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak verilmiştir. Temel olarak daha önce alfa amanitin saflaştırılmasında kullanılan yöntem ufak modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır (13).

Mantar ekstraksiyonu: Amanita phalloides mantarları 12.10.2010 tarihinde Düzce/ Gümüşova/ Yeşilyayla Kasabası ormanlık alanından toplanmıştır. Mantarların tanımlaması 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 kuruluğa 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 işlem 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 akış 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 (Şekil 2). Fraksiyonun saflık oranı ölçülmüştür. Elde edilen fraksiyon vakum evaporatörde 50 °C de kurutularak, 1 mL %40 metanolde çözülmüş ve 2. saflaştırma için yeniden preparatif HPLC sistemine uygulanmıştır.

2. preparatif HPLC işlemi, özellikle materyale karışan beta amanitini uzaklaştırarak saflık oranını artırmak ve toksini amonyum asetat tuzundan arındırmak amacıyla uygulanmıştır. Bu aşamada 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 (Şekil 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 akış 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 eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin denklemine, analizlerde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümü yapılmıştır.

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

SONUÇLAR

1. saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen beta amanitin saflık oranı %91($\pm$ 2,36) olarak bulunmuştur. Bu işlemde beta amanitin tutulma zamanı 8,84 dakikadır (Şekil 2).

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

TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmamız sonucunda >99 saflıkta beta amanitin elde edilmiş ve yöntemi tanımlanmıştır.

Beta amanitinin UV spektrumunda 303 nm'de maksimum absorpsiyon sahip olduğu bilinmektedir (14). HPLC cihazlarında sıkça kullanılan UV dedektörler tek bir dalga boyunda tarama yaptığından, eğer 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 anlaşılabilmektedir (15). Çalışmamızda elde ettiğimiz pik saflık indeksi değeri, elde ettiğimiz moleküllere başka bir maddenin karışmadığını ve sadece tek bir kimyasal madde elde ettiğimizi göstermektedir.

HPLC cihazlarında temel prensip tutulma zamanının farklılığı olmasına rağmen, ortam şartlarının değişkenliği veya kimyasal maddelerin fiziki özelliklerinin benzemesi gibi bazı nedenlerle farklı maddeler aynı tutulma zamanında gelebilmekte, bu da analitin başka bir madde ile karışmasına neden olabilmektedir. Bu durumu engellemek için bazı yöntemler kullanılmaktadır. DAD dedektörler sayesinde analiz sırasında analitin UV spektrumu alınabilmekte, standartla karşılaştırması sonucunda doğrulama yapılabilmektedir (13). Saflaştırma işlemleri sonrasında elde ettiğimiz maddenin beta amanitin olduğu UV spektrumunun standardın spektrumuyla karşılaştırması sonucunda ispatlanmıştır. Ayrıca bu spektrum literatürde

bildirilmiş olan beta amanitin spektrumu ile aynıdır (14). Ancak alfa amanitinin moleküler yapısı beta amanitine çok benzemektedir (Şekil 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 ayırabilmektedir (13).

Elde ettiğimiz saflık oranı çok yüksektir, zira araştırmalarda kullanılmak üzere piyasada satılan birkaç ürünün saflık oranı %90-95 arasındadır. Bu durumun, araştırmalarda 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 başka çalışmalara gerek duyulabilir.

Araştırmamızın 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, Yaykaşlı KO, Bayram R, Sarıtaş 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.