

¹ Ertuğrul KAYA

¹ Selim KARAHAN

¹ Mustafa HANCI

² Kürşat Oğuz YAYKAŞLI

³ Ayhan SARITAŞ

⁴ Recep BAYRAM

⁵ İsmail YILMAZ

¹ Seyfullah Oktay ARSLAN

¹ Düzce Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, Düzce

² Düzce Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Genetik
Anabilim Dalı, Düzce

³ Düzce Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Acil Tıp Anabilim
Dalı, Düzce

⁴ Abant İzzet Baysal
Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Anabilim
Dalı, Bolu

⁵ İzmir Bozyaka Eğitim ve
Araştırma Hastanesi,
Farmakoloji Laboratuvarı,
İzmir

Submitted/Başvuru tarihi:
21. 12. 2012

Accepted/Kabul tarihi:
02. 04. 2012

Registration/Kayıt no:
11 12 173

Corresponding Address
/Yazışma Adresi:

Dr. Ertuğrul KAYA
Düzce Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, Düzce

Email: drekaya@yahoo.com

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

Düzce Yöresinde Yetişen Amanita Phalloides Mantarındaki Alfa Amanitin Düzeyinin Hplc Yöntemiyle Ölçümü

The Measurement Of Alpha Amanitin Levels Using Hplc Method In Amanita Phalloides From Düzce Province

ÖZET

Amaç: Düzce ili sınırlarında 2010 yılında toplanan Amanita phalloides mantarındaki alfa amanitin toksin düzeyinin HPLC yöntemiyle ölçümü amaçlanmıştır.

Yöntem: Bir mantar bütün olarak, diğeri ise parçalara ayrılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Ölçümler HPLC cihazında 303 nm UV dalga boyu, 250x4,6 mm C18 5 µm partikül içeren kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak amonyum asetat + metanol + asetonitril (80+10+10, v/v/v) kullanılmış ve akış hızı 1 mL/dakikaya ayarlanmıştır. Sonuçlar 1 g kuru mantardaki toksin miktarı olarak verilmiştir.

Bulgular: Bütün mantardaki alfa amanitin miktarı 4,806 mg (±0,033), şapkada 3,522 mg (±0,024), lamelde 5,318 mg (±0,056), halkada 0,903 mg (±0,004), sapta 2,577 mg (±0,037), kapçıkta 0,698 mg (±0,008) olarak ölçüldü.

Sonuç: Düzce yöresinde yetişen Amanita phalloides mantarlarındaki alfa amanitin düzeyleri, başka bölgelerde yetişenlerden farklılık göstermektedir. Bulduğumuz sonuçlardan daha yüksek ve daha düşük seviyede toksin düzeyi ölçülmüş araştırmalar literatürde mevcuttur. Bu farklılığın etkenleri arasında iklim şartları yanında ekstraksiyon ve analiz yöntemlerindeki farklılıklar da rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Amanita phalloides, Alfa amanitin, HPLC

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to measure the level of alpha amanitin toxin using HPLC method from Amanita phalloides mushroom collected in the province of Düzce in 2010.

Method: One of the mushrooms as a whole body. The other one was extracted after separated into parts. The measurement was done by HPLC using 303 nm UV wavelength and 250x4,6 mm C18 5 µm particle included column. Ammonium acetate+methanol+acetonitrile (80+10+10, v/v/v) was used as a mobile phase, and the flow rate was set 1 ml/min. The results were given as a toxin quantity in 1 g dry mushroom.

Results: The amount of alpha amanitin was measured as 4,806 mg (±0,033) in the whole body, 3,522 mg (±0,024) in the cap, 5,318 mg (±0,056) in the lamellar, 0,903 mg (±0,004) in the ring, 2,577 mg (±0,037) in the stipe, 0,698 mg (±0,008) in the volva.

Conclusion: The level of alpha amanitin in Amanita phalloides from Düzce Province is differ from different countries. Higher and lower levels of toxin than our data obtained investigations are present in the literature. The reason of this differences might be several factors like extraction methods, analysis methods and environmental conditions.

Key Words: Amanita Phalloides, Alpha amanitin, HPLC

GİRİŞ

Bilinen 100 dolaylarında zehirli mantar türü olmakla birlikte bunlardan yaklaşık 8-10 türle görülen zehirlenmeler ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir. Amanita mantarları, birçok bölgede yaygın olarak yetişen ve birçok üyesi bulunan bir mantar cinsidir. Bu mantarlar içinde çok lezzetli yenilen mantarlar olduğu gibi çok ciddi zehirlenmelere neden olan bazı türler de bulunmaktadır. Bu türler arasında Amanita phalloides, Amanita verna, Amanita bisporigera, Amanita virosa, Amanita muscaria, Amanita pantherina'nın ölümcül zehirlenmelere yol açtığı bilinmektedir (1). Ölümcül zehirlenmelerin en sık nedeni Amanita phalloides türüdür (2). Ülkemizde köygöçüren, evciykıyan; dünyada ise ölüm meleği, ölüm şapkası (death cap) gibi isimlerle bilinen bu

mantarlarda toksisiteden sorumlu 2 grup toksin tanımlanmıştır. Bunlar amatoksinler ve fallotoksinler olarak adlandırılmıştır (3). Fallotoksinler, aşırı toksik olmalarına rağmen gastrointestinal sistemden yeterince emilmediğinden toksisitesi klinikte görülmez (4). Ölümden sorumlu olan toksinler, amatoksinlerdir ve amanitinler olarak da isimlendirilirler. Bu grupta alfa, beta, gama ve epsilon amanitin gibi toksinler bulunur. Emilim oranı çok yüksek olduğundan diğer toksinlere nazaran toksisiteden sorumlu olan alfa amanitindir (5).

Alfa-amanitin emilimden sonra karaciğer tarafından hızla alınır. Karaciğere alınmasında safra asidi transport sisteminin rol oynadığı ileri sürülmektedir (6). Toksin hepatositlerde hücre çekirdeğine girerek RNA Polimeraz II enzimine bağlanır ve bu enzimin aktivitesini durdurur (7). Bu enzim protein sentezindeki ilk basamak olan transkripsiyonu katalize ettiğinden zehirlenme durumunda hücredeki tüm protein sentezi durur. Daha önceden üretilmiş olan proteinler hücrenin bir süre daha canlı kalmasını sağlar. Sonuçta 3-7 gün içerisinde karaciğer yetersizliğine bağlı olarak ölüm görülür (8). Eğer toksin düşük düzeyde alınmışsa karaciğer rejenere olarak hasta sekelsiz olarak kurtulabilir. Alfa amanitinin bilinen spesifik bir inhibitörü yoktur, fakat tedavide penisilin, silibinin tiotik asit ve aucubin gibi bazı ajanlar kullanılabilir ancak etkinlikleri tartışmalıdır (9, 10). Yüksek düzeyde toksin alınması durumunda ya ölüm görülmekte ya da karaciğer transplantasyonu tek çare olarak görülmektedir (11). Deney hayvanlarında LD50 dozları belirlenmiş olmasına rağmen insanlarda tehlikeli toksin düzeyi kesin olarak bilinmemektedir (12).

Yapılan araştırmalarda farklı bölgelerde yetişen *Amanita phalloides* mantarlarındaki alfa amanitin düzeylerinin farklı olduğu görülmektedir. Aynı mantar içindeki farklı kısımlarda da toksin dağılımının farklı olduğu bilinmektedir. En yüksek toksin oranı şapka ve lamel bölümlerinde ölçülmüştür (13). Alfa amanitin ölçümünde birkaç yöntem olmasına rağmen altın standart yöntem HPLC ile analiz olarak görülmektedir. Alfa amanitinin analizi için HPLC’de yerleşmiş bazı yüksek duyarlılıklı yöntemler kullanılmaktadır (14).

Bu araştırmada Düzce yöresinde 2010 yılı sonbaharında yetişen *Amanita phalloides* mantarındaki alfa amanitin miktarının HPLC yöntemiyle analizi amaçlanmıştır.

MATERYAL-METOD

12.10.2010 tarihinde Düzce Gümüşova Yeşilyayla köyü ormanlık alanından iki adet *Amanita phalloides* mantarı toplandı (Şekil 1). Taksonomik



Şekil 1: Analizi yapılan *Amanita phalloides* mantarları

sınıflandırması, mikroskopik ve makroskopik özelliklerine göre yapıldı (15). Mantarlar 8 saat 50 °C hava akımı altında sabit ağırlığa ulaşana dek kurutuldu, öğütücüde öğütüldü. Mantarlardan birinin şapka, lamel, halka (annulus), sap ve kapçık (volva) bölümleri ayrı ayrı hazırlanıp ekstrakte edildi. Diğer mantar ise bütün olarak ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi %50 metanolde 30 dakika kaynatılarak yapıldı. 5 dakika 5000 rpm’de santrifüj yapıldıktan sonra supernatant 0,25 µm filtreden süzülerek HPLC cihazına 10 µl enjeksiyon yapıldı. Her numuneden 3 ayrı ölçüm yapıldı.

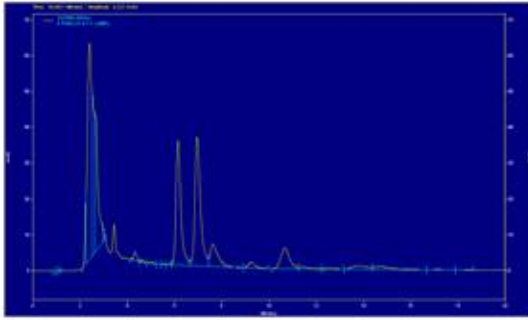
Alfa amanitin standard (Sigma) kalibrasyon eğrisi 0,2 - 0,4 - 0,6 - 1 - 2 µg olmak üzere 5 noktali olarak hazırlandı. Korelasyon (R²) 0.9993, eğri denklemi ($y = 352476x + 17338$) olarak bulundu. HPLC (Thermo), 303 nm UV dalga boyunda, C18 250x4,6 mm kolon (5 µm partikül) 1ml/dk akış hızı ile kullanıldı. Mobil faz olarak amonyumasetat (50 mM) + metanol + asetonitril kullanıldı (14). Sonuçlar 1 gram kuru mantar içerisindeki toksin miktarı ortalaması (± standart hata) olarak verildi. Alfa amanitin standardının tutulma zamanı 7,132 dakika, ekstre kromatogramında alfa amanitin tutulma zamanı ise 6,948 dakikadır (Şekil 2).

BULGULAR

Mantarın bölümlerindeki toksin miktarları ayrı ayrı analiz edilip sonuçlar Tablo 1’de verilmiştir. Mantarın 1 gram kuru kısımlarındaki alfa amanitin seviyeleri şu şekildedir: Şapkasında 3,522; lamelinde 5,318; halkasında 0,903; sapında 2,577; kapçığında 0,698; bütün mantarda 4,806 mg/g toksin ölçülmüştür.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Amatoksinler termostabil oktapeptidlerdir. RNA Polimeraz II enzimini inhibe ederek protein sentezini durdururlar. Oral zehirlenmelerde en toksik türü alfa amanitindir (16). LD50 dozu intraperitoneal uygulamada farelerde 0,1 - 0,6 mg/kg’dır (1). İstanbuldaki yetişen mantarlarda yapılan çalışmada; bütün mantardaki toksin miktarı bizim bulduğumuz



Şekil 2: Amanita phalloides ekstresi HPLC kromatogramı

miktardan daha azdır. Bu makaledeki ekstraksiyon yöntemi, bizim çalışmamızdakinden farklıdır; daha az çözücü kullanılmıştır (17). Bu çalışma dışında ülkemizde yetişen mantarlarda alfa amanitin anlizine rastlanmamıştır. Çinde yetişen mantarlarda ise 1 gram yaş mantardaki toksin miktarı 30,3 mg olarak ölçülmüştür (18). Yine Kolombiya da yapılan bir çalışmada *Amanita bisparigera* türünde ki alfa amanitin miktarı yaklaşık olarak 5700 ppm olarak bulunmuştur (19).

Yaptığımız araştırmada mantarın bölümlerinde farklı miktarlarda alfa amanitinin bulunduğu gösterilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre alfa amanitin miktarı en fazla mantarın lamel kısmında, en az ise kapçık kısmında bulunmaktadır. Fransa da yapılan bir çalışmada *Amanita phalloides* mantarının şapka, lamel, halka ve sap bölümlerinde alfa amanitin miktarının benzer bulunduğunu fakat bulb ve kapçık (volva) bölümlerine göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (20). Yine Amerika da yapılan bir araştırmaya göre *Amanita bisporigera* mantarının sap ve baş bölümlerinde aynı miktarda alfa amanitin bulunduğu gösterilmiştir (13).

Yapılan çalışmalarda elde edilen toksin miktarları bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında hem daha az hem de daha çok toksin ölçülen çalışmalar bulunmaktadır. Farklı bölgelerde yetişen mantar bölümlerindeki alfa amanitin miktarlarının oldukça farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. Bunun nedenleri arasında ekstraksiyon yöntemi, analiz yöntemi ve mantarın yetiştiği bölgedeki çevresel ve iklimsel koşullardaki değişiklikler olabilir.

KAYNAKLAR

1. Mat A. Türkiye’de Mantar Zehirlenmeleri Ve Zehirli Mantarlar. İstanbul: Nobel Yayınları; 2000.
2. French LK, Hendrickson RG, Horowitz BZ. Amanita phalloides poisoning. Clin Toxicol (Phila). 2011;49(2):128-9.
3. Vetter J. Toxins of Amanita phalloides. Toxicol. 1998;36(1);13-24.
4. Lengsfeld AM, Löw I, Wieland T, Dancker P, Hasselbach W. Interaction of phalloidin with actin. Proc Natl Acad Sci USA. 1974;71(7);2803-7.
5. Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular

Tablo 1: Alfa amanitin düzeyleri (n=3)

Mantar Bölümleri	1 gram kuru örnekteki Alfa Amanitin Miktarı (mg)
Şapka	3,522 ± 0,024
Lamel	5,318 ± 0,056
Halka	0,903 ± 0,004
Sap	2,577 ± 0,037
Kapçık	0,698 ± 0,008
Bütün Mantar	4,806 ± 0,033

characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci.* 2006;91(1);140-9.

5. Kröncke KD, Fricker G, Meier PJ, Gerok W, Wieland T, Kurz G. Alpha-Amanitin uptake into hepatocytes. Identification of hepatic membrane transport systems used by amatoxins. *J Biol Chem.* 1986;25:261(27);12562-7.
7. Gong XQ, Nedialkov YA, Burton ZF. Alpha-amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 2004;25:279(26);27422-7.
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;14(1);42-4.
9. Tong TC, Hernandez M, Richardson WH, et al. Comparative treatment of alpha-amanitin poisoning with N-acetylcysteine, benzylpenicillin, cimetidine, thioctic acid, and silybin in a murine model. *Ann Emerg Med.* 2007;50(3);282-8.
10. Özbek H, Cengiz N, Bayram İ, Öntürk. Alfa amanitinle oluşturulmuş böbrek ve karaciğer toksisitesinde alfa pinen ve silibininin etkisinin sıçanlar üzerinde araştırılması. *Genel Tıp Dergisi.* 2008;18(4):159-64.
11. Ganzert M, Felgenhauer N, Zilker T. Indication of liver transplantation following amatoxin intoxication. *J Hepatol.* 2005;42(2);202-9.
12. 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;27(12);3047-52.
13. Mcknight TA, Mcknight KB, Skeels MC. Amatoxin and phallotoxin concentration in amanita bisporigera spores. *Mycologia.* 2010;102(4):763-5.
14. Defendenti C, Bonacina E, Mauroni M, Gelosa L. Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine. *Forensic Sci Int.* 1998;92(1);59-68.
15. Bresinsky A, Besl H, A Colour. *Atlas of Poisonous Fungi.* London: Wolf Publishing; 1990.
16. Ergüven M, Çakı S, Deveci M. Mantar Zehirlenmesi: 28 vakanın değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2004;47:249-53.
17. Mat A, Yurdun T, Tümkor Z. Determination of alpha amanitin by HPLC in Amanita phalloides growing in Istanbul forests. *İ. Ü. Ecz. Fak. Derg.* 1995;31;17-24.
18. Wang Y, Bao. H, Xu L, Bau T. Determination of main peptide toxins from Amanita phalloidrosea with HPLC and their antifungal action on Blastomyces albicans. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2011;51(9);1205-11.
19. Vargas N, Bernal A, Sarria V, Franco-Molano A, Restrepo S. Amatoxin and phallotoxin composition in species of the genus Amanita in Colombia: A taxonomic perspective. *Toxicon.* 2011;58:583-90.
20. Enjalbert F, Cassanas G, Salhi SL, Guinchard C, Chaumont JP. Distribution of the amatoxins and phallotoxins in Amanita phalloides. Influence of the tissues and the collection site. *C R Acad Sci III.* 1999;322(10);855-62.